T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA(VET) ANABİLİMDALI

SWİSS ALBİNO IRKI FARELERDE SPERMA KALİTESİNİN BELİRLENMESİ AMACIYLA HOS TESTİ SONUÇLARI VE DİĞER SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Orhan AKMAN

Danışman
Prof. Dr. Melih AKSOY

KONYA / 2007

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA(VET) ANABİLİMDALI

SABE PROJE NO: 2003 / 13

SWİSS ALBİNO IRKI FARELERDE SPERMA KALİTESİNİN BELİRLENMESİ AMACIYLA HOS TESTİ SONUÇLARI VE DİĞER SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Orhan AKMAN

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından … / … / 2007 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği* ile kabul edilmiştir. (S.B.E. Yön.Kur. Karar tarih ve No: .....)

Tez jürisi:	Jüri Başkanı	Prof. Dr. Melih AKSOY……...
	Danışman	Prof. Dr. Melih AKSOY……...
	Üye	Prof. Dr. Tevfik TEKELİ……..
	Üye	Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN……..
	Üye	Doç. Dr. Ergun AKÇAY……
	Üye	Doç. Dr. Hüseyin ERDEM…….……..

TEZİN BÖLÜMLERİ

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ

GRAFİK LİSTESİ

RESİM LİSTESİ

KISALTMALAR

1. GİRİŞ
2. LİTERATÜR BİLGİ
3. MATERYAL ve METOD
4. BULGULAR
5. TARTIŞMA ve SONUÇ
6. ÖZET
7. SUMMARY
8. KAYNAKLAR
9. ÖZGEÇMİŞ
10. TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ……...1

2. LİTERATÜR BİLGİ ……..……....3

2.1. Farelerin Zoolojik Sistemdeki Yeri ……..……...……3

2.2. Farelerin Deney Hayvanı Olarak Kullanılma Nedeni ……....……. 3

2.3. Farelerin Biyoteknoloji Çalışmalarında Kullanılması ……..3

2.4. Farelerde Reprodüktif Anatomi ……..……...……...4

2.5. Farelerde Seksüel Olgunlaşma ……..……... 4

2.6. Östrüs Siklusu ve Spermatogenezis ……..5

2.7. Farelerden Spermanın Elde Edilmesi …...……..…….. 5

2.7.1. Dişi genital kanaldan spermanın elde edilmesi ……..……..…….. 6

2.7.2. Elektroejakülatör yardımıyla farelerden spermanın alınması ……..……...6

2.7.3. Erkek farenin öldürülerek spermanın epididimisten alınması …...……..……... 7

2.8. Fare Spermasının Dondurulması ……..……..……... 7

2.9. Motilite ……..……..……9

2.10. Ölü – Canlı Spermatozoon Oranı ……..……...9

2.11. Anormal Spermatozoon Oranı ……..…….. 10

2.12. HOS Testi ……..…… 10

2.13. HOS Testinin Diğer Spermatolojik Analiz Yöntemleriyle Karşılaştırılması ve Güvenilirliği ……..… 12

2.13.1. HOS testi ile geleneksel spermatolojik parametrelerin karşılaştırılması …… 12

2.13.2. HOS testinin Hamster testi ile karşılaştırılması ……..……13

2.13.3. IVF çalışmalarında HOS testinin kullanımı …….……..…… 13

3. MATERYAL ve METOT ……..……...……..... 15

3.1. Materyal ……..……..15

3.2. Metot ……..…….. 15

3.2.1. İn vivo fertilite testi ……..…….. 15

3.2.2. Deney planı ……...…..……....15

3.2.3. Spermanın alınması ……..…….…. 16

3.2.4. HE testinin uygulanması ……..……...17

3.2.5. Konvansiyonel spermatolojik parametrelerin belirlenmesi ……...……. 18

3.2.5.1. Motilite muayenesi ……..……... 18

3.2.5.2. Ölü – canlı spermatozoon muayenesi ……..……... 19

3.2.5.3. Anormal spermatozoon muayenesi ……..……..19

3.3. İstatistiki Analiz ……..……..20

4. BULGULAR ……..…… **21**

4.1. Farklı Ozmotik Basınçta İnkübe Edilen Spermatozoonlarda Oluşan Şişme Cevapları ……..……. 21

4.2. Farklı Ozmotik Basınçta İnkübe Edilen Spermatozoonlarda Boya Alma Oranları …. 22

4.3. HE Testi Sonuçları ile Konvansiyonel Spermatolojik Parametreler Arasındaki İlişkiler ……..…….…. 22

5. TARTIŞMA ve SONUÇ ……..……...36

6. ÖZET ……..……..……...41

7. SUMMARY ……..……..……43

8. KAYNAKLAR ……..……..45

9. ÖZGEÇMİŞ ……..……..……..……52

10. TEŞEKKÜR ……..……..…..…53

TABLO LİSTESİ

1. Tablo 4.1: 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 ve 400 mOsm'lük fruktoz solüsyonunda 30 dk inkübe edilen fare spermatozoonlarında ortalama kıvrık kuyruk oranları …….23

2. Tablo 4.2: 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 ve 400 mOsm gruplarında elde edilen ortalama kıvrık kuyruk oranlarının gruplar arası istatistiksel karşılaştırması ve P değerleri ……....24

3. Tablo 4.3: 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 ve 400 mOsm'lük fruktoz solüsyonunda 30 dk inkübe edilen, daha sonra eosin – nigrosin ile boyanan fare spermatozoonlarında ortalama boya almamış spermatozoon oranları ……. 25

4. Tablo 4.4: 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 ve 400 mOsm gruplarında elde edilen ortalama boya almamış spermatozoon oranlarının gruplar arası istatistiksel karşılaştırması ……...26

5. Tablo 4.5: Çalışmanın ikinci aşamasında yapılan 9 deneysel replikasyonda elde edilen motilite, canlı spermatozoon oranı ve 80 mOsm de uygulanan HE testi sonuçları.....28

6. Tablo 4.6: Çalışmanın ikinci aşamasında yapılan replikasyonlarda elde edilen motilite, canlı spermatozoon oranı ve 80 mOsm de uygulanan HE testi sonuçları……. 29

7. Tablo 4.7: Çalışmanın ikinci aşamasında yapılan replikasyonlarda deneysel replikasyonda elde edilen anormal spermatozoon oranları ve yerleşim bölgesi……... 29

8. Tablo 4.8: Farelerde toplam 9 deneysel replikasyonda elde edilen anormal spermatozoon oranları……... 31

GRAFİK LİSTESİ

1. Grafik 4.1: Farklı ozmotik basınçlara ait Tip1+Tip2 (toplam kıvrık kuyurklu) spermatozoon oranları……...…… 27

2. Grafik 4.2: Farklı ozmotik basınçlara ait Tip1+Tip3 (toplam başı boya almamış) spermatozoon oranları……... 27

3. Grafik 4.3: Çalışmanın ikinci aşamasında yapılan toplam 9 deneysel replikasyonda uygulanan HE testlerinde elde edilen Tip1, Tip2, Tip3 ve Tip4 spermatozoon oranları……...30

4. Grafik 4.4: Çalışmanın ikinci aşamasında yapılan toplam 9 deneysel replikasyonda elde edilen ortalama anormal spermatozoon oranları ve yerleşim bölgeleri…….32

RESİM LİSTESİ

1. Resim 4.1: Eosin – nigrosin boyası ile boyanmış fare spermatozoonları……..……...32

2. Resim 4.2: Farelerde çeşitli anormal spermatozoon tipleri……... 33

3. Resim 4.3: HOS test sırasında şişen değişik morfolojide spermatozoonlar…….. 34

4. Resim 4.4: Fare spermasında HE testi sırasında spermatozoonların tiplendirilmesi… 35

KISALTMALAR

1. BSA …… (Bovine Serume Albumine)

2. D-PBS ….(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

3. FSH …….(Follikül Stimülan Hormon)

4. HOS …… (Hypoosmotic Swelling)

5. HE ……...(Hypoosmotic Swelling -Eosin-Y Testi)

6. HT ……...(Hamster Testi)

7. ICSI …….(İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu)

8. IU ……(International Unit)

9. IVF ……..(İn Vitro Fertilizasyon)

10. LH ……...(Luteinleştirici Hormon)

11. mOsm …. (Miliozmol)

12. Tip1…….. (Başı Boya Almamış Kıvrık Kuyruklu Spermatozoa)

13. Tip2 …….(Başı Boya Almış Kıvrık Kuyruklu Spermatozoa)

14. Tip3 …….(Başı Boya Almamış Düz Kuyruklu Spermatozoa)

15. Tip4 …….(Başı Boya Almış Düz Kuyruklu Spermatozoa)

16. $X^{-} \pm Sx^{-}$ ... (Ortalama ± Ortalamanın Standart Hatası)

17. ZFHO …..(Zonası Çıkarılmış Hamster Oositi)

1. GİRİŞ

Son yıllarda insanlar üzerinde yürütülen "Human Genome" projesinin sonuçlandırılarak gen haritasının ortaya çıkartılması ile genetik olarak aktarılan hastalıklara ilişkin pek çok yeni bilgiye ulaşılmıştır. Genetik olarak aktarılan bu hastalıkların tedavisi, önlenmesi ve çeşitli ilaçların bu tip hastalıklardaki terapötik etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla, anılan genetik hastalıklara sahip transgenik deney hayvanlarının oluşturulması giderek önem kazanmaktadır. Bu amaçla, deney hayvanı olarak fareler, karmaşık genetik manipülasyonların kolayca uygulanabilmesi, bakım ve beslenmelerinin kolay olması ve fazla bir yetiştirme alanına gerek duyulmaması nedeniyle tercih edilmektedir. Bununla birlikte, transgenik fare üretiminde hala istenilen noktaya ulaşılamamış olması nedeniyle, istenilen deneysel modelin oluşturulması bazı hallerde uzun zaman almakta ve oluşturulan model hayvanların maliyetleri olağanüstü yüksek rakamlara ulaşmaktadır. Özel amaçlı üretilen bu değerli transgenik fareler, bir dizi araştırmada kullanıldıktan sonra diğer bir çalışma periyoduna kadar aktif olarak üretilmesine ara verilmekte ve genetik olarak saklanmaktadır. Bu nedenle, transgenik farelerin üretildiği merkezlerde damızlık stokların uzun süre elde tutulmasından doğacak maliyeti azaltmak ve aynı zamanda neslin devamını ve ihtiyaç halinde tekrar üretilebilmesini sağlamak amacıyla sperma ve embriyonun yanı sıra somatik hücreler de dondurulmaktadır. Bazı genetik bozuklukların sperma düzeyinde taşınması ve erkekler aracılığıyla yayılması nedeniyle, bu özel amaçlarla geliştirilen farelerde sperma dondurma tekniklerinin optimizasyonu zorunlu görünmektedir.

Memelilerde erkek hayvanların fertilite düzeyini belirlemek amacıyla kullanılan spermatolojik parametreler ile in vivo fertilite arasındaki korelasyon henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Erkek hayvanlarda in vivo fertiliteyi belirlemenin en uygun yolu, fazla sayıdaki dişinin o erkeğin spermaları kullanılarak döllenmesidir. Ancak, bu yöntem önemli bir ekonomik yatırım gerektirmesinin yanı sıra sonuç alınması için uzun zamana gereksinim göstermektedir. Sayılan sebeplerden dolayı, erkek hayvanlardan elde edilecek in vivo fertilite düzeyi ile daha yakın bir korelasyona sahip, sperm fonksiyon testleri olarak bilinen çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bunlar arasında en fazla kullanım alanı bulan tekniklerden bir tanesi de "Hypoosmotic Swelling (HOS) Test" ya da Türkçe anlamıyla "Düşük Ozmotik Basınçta Şişirme Testi" dir. Bu test, membranları sağlam spermatozoonların düşük ozmotik basınçlı medyumlarda şişebilmesi; buna karşın çeşitli

nedenlerle membranları zarar görmüş olanların ise aynı reaksiyonu gösterememesi esasına dayanır.

HOS testi ilk olarak geleneksel spermatolojik parametrelere alternatif bir yöntem olması düşüncesiyle ortaya çıkarılmıştır. Bu testin geleneksel spermatolojik parametrelerden daha güvenilir olduğu belirlenmesiyle hem alternatif bir spermatolojik parametre olmuş hem de infertilitenin belirlenmesinde yardımcı bir metot olarak kullanılmıştır. Bu avantajlarından faydalanılarak HOS testi insan (Jeyendran ve ark 1984), boğa (Kathiravan ve ark 2007), manda (Shukla ve Misra 2007), aygır (Neild ve ark 1999), koç (Aisen ve ark 2005), köpek (Kumi-Diaka 1993), tavşan (Ducci ve ark 2002), geyik (Fernandez-Santos ve ark 2006), domuz (Gadea ve ark 1998), alabalık (Cabrita ve ark 1999), fare (Sliwa 1993) ve diğer canlı türlerinde kullanım alanı bulmuştur.

Yukarıda bildirilen nedenlere ek olarak taze ve dondurulmuş fare spermasında fertilitenin belirlenmesi amacıyla kullanılan konvansiyonel muayene yöntemlerinin yetersiz olması da HOS testinin pratik anlamda kullanımını zorunlu hale getirmektedir. Bu nedenle, HOS testinin geliştirilerek diğer parametrelerle beraber kullanılabilme olanaklarının araştırılması fare spermasının saklanabilmesine olanak sağlayacak çeşitli yöntemlerin geliştirilmesinde ve değerli genetik materyalin saklanmasında bir ön adım olarak değerlendirilebilir.

Bu çalışmanın amacı, a) fare spermatozoonları için uygun HOS test aralığını belirlemek, b) supravital boyama tekniği ile birleştirilmiş modifiye bir HOS test prosedürü olan Hypoosmotic Swelling -Eosin-Y testinin (HE) konvansiyonel spermatolojik parametrelerle olan ilişkisini ve kullanılabilirliğini belirlemektir.

2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1.Farelerin Zoolojik Sistemdeki Yeri

Chordata Craniata grubu, Gnathostama alt filumu, Tetrapoda üst sınıfı, Mammalia sınıfı, Rodentia takımı, Myomorpha alttakımı, Muridae familyası, Mus genus, Mus subgenus, Mus Musculus türüne ait örneklerdir.

Fareler, insanlarla ortak yaşayan hayvanlardır. Çevresel koşullara çok iyi uyum sağlamış olup dünyanın hemen her yerinde bulunur. Günümüzde kullanılan laboratuar fareleri ev veya pirinç farelerinden (Mus musculus domesticus / Mus domesticus domesticus) geliştirilmiştir (Poyraz 2000).

2.2.Farelerin Deney Hayvanı Olarak Kullanılma Nedeni

Uluslararası Laboratuar Hayvanları Komitesi anketine göre bilginin üretildiği ülkelerin çoğunda laboratuar hayvanlarının % 40 – 80'ini farelerin oluşturması, en büyük talep gören laboratuar hayvanının fare olduğunu göstermektedir (Tuffery 1967). Bunun sebebi ise yetiştirme kolaylığı ve yetiştirme masraflarının düşük olması, seksüel siklusun kısa olması, gebelik süresinin kısa olması (Tuffery 1967, Tekin 1998) ve uzun yıllar kullanımına bağlı bilgi birikiminin yeterli olmasıdır (Tuffery 1967). Diğer taraftan kalite kontrolünün bilim adamları tarafından yapılabilmesi de büyük pay sahibidir (Tuffery 1967).

2.3.Farelerin Biyoteknoloji Çalışmalarında Kullanılması

Fareler genetik çalışmalarda ve kanser araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Tuffery 1967).

Son yıllarda insanlarda belirlenen çeşitli genetik hastalıklarla bağlantılı olarak sorumlu genlerin belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmalar büyük bir önem ve hız kazanmış durumdadır. Bu tip çalışmaların yürütülmesinde deney hayvanı olarak farelerin kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Çeşitli genetik bozuklukların uyarılması amacıyla uzun çalışmalar sonucunda transgenik farelerin oluşturulmuş ve bu özel farelerin kanser ve genetik çalışmalarda büyük ölçüde talep görmesi nedeniyle transgenik fareler çok kıymetli biyolojik malzemeler haline gelmiştir.

Transgenik farelerin üretiminin zor olmasının yanı sıra, oluşturulan hatların yıllar boyu korunması da genetik materyalin saklanması zorunluluğunu beraberinde getirmektedir. Bu amaçla sperma, embriyo ve somatik hücrelerin dondurularak saklanmasıyla transgenik hayvanların genetik yapıları uzun yıllar boyunca korunabilir (Noiles ve ark 1997, Songsasen ve Leibo 1997-a, Songsasen ve Leibo 1997-b, Storey ve ark 1998, Katkov ve ark 1998, Koshimoto ve ark 2000).

2.4.Farelerde Reprodüktif Anatomi

Erkek farelerde üreme organları; bir çift testis, üretra, penis, yardımcı kanal ve bezlerden oluşur (Poyraz 2000, Jacob ve ark 2002).

Dişi genital organlar ise; bir çift ovaryum, bir çift ovidukt, uterus, serviks, vagina, klitoris ve bir çift klitoral bezden meydana gelmektedir. Klitoral bezler erkeklerdeki prepusyal bezlere benzer olup, yağlı sekretini klitoral çukurun lateral duvarındaki kanal çıkışına doğru bırakır (Jacob ve ark 2002).

2.5.Farelerde Seksüel Olgunlaşma

Her iki cinsiyette de FSH, gametogenezisi organize eder. LH, dişilerde östrojen ile progesteronu, erkeklerde ise androjenin sekresyonunu düzenler. Prolaktin, laktasyon ve gebelik boyunca ovaryumun gelişmesini kontrol eder. Gonadal hormonlar da genital organların uygun bir şekilde gelişmesini sağlar ve başarılı bir çiftleşmeyi gerçekleştirmek için gerekli davranışların geliştirilmesini sağlar. Hipofiz bezi, genellikle erkeklerde 6, dişilerde 12. günden itibaren hormonal etkiye cevap verir. Ovaryumdaki folliküller üç haftalık yaşta gelişmeye başlarken, 30. gün civarında olgunlaşır. Aynı günlerde gonadotropin seviyesindeki yükselme seksüel olgunluğun bir işareti olarak ortaya çıkar. Yavru dişiler 24 – 28. gününü doldurmadan önce vaginanın açılıp vaginal epitelyumun kornifikasyonu gibi değişikliklerin meydana gelebilmesi için östrojen hormonuna ihtiyaç duyulur. Pubertas, erkeklerde dişilerden biraz daha sonra (iki hafta kadar) görülür. Seksüel olgunluk, ırklar arasında ve barındırma şartlarına göre değişirken, mevsimsel ve çevresel faktörlere de bağlıdır. Çiftleşme davranışı, gebe kalma ve fetüsün taşınması ön hipofiz vasıtasıyla kontrol edilen, hormonal bir kompleks tarafından sağlanır (Jacob ve ark 2002).

2.6.Östrüs Siklusu ve Spermatogenezis

Fareler polióstrik hayvanlar olup her 4-5 günde bir seksüel siklus tamamlanır. Farelerde seksüel siklus; proöstrüs, östrüs, metöstrüs ve diöstrüsten oluşmaktadır. Vagina orifisiyumundaki açıklık ve vulvada görülen şişkinlik proöstrüs ve östrüsün belirtisidir.

Doğum sonrası gözlenen ilk östrüs, yaklaşık 14 – 18. saatlerde meydana gelir. Vaginanın kornifikasyonu tamamlanmamış olup bu dönemde gerçekleşen çiftleşme ile meydana gelecek fertilite oranı normal bir östrüse oranla daha düşüktür.

Farelerde ovulasyon spontan olarak meydana gelir. Her östrüste ovulasyon gözlenmeyebilir. Çünkü östrüs gonadal hormonlara bağlı olarak şekillenirken, ovulasyon gonadotropinlere bağlıdır. Östrüs periyodu ve ovulasyon, fotoperiyodun günlük ritmiyle kontrol edilir. Çiftleşme, östrüs ve ovulasyon genellikle fotoperiyodun karanlık döneminde meydana gelir.

Feromonlar ve çevresel şartlar östrüs siklusunu etkiler. Farelerin kalabalık guruplar halinde tutulması yalancı gebelik ve diöstrüse sebebiyet vereceğinden (Whitten etkisi) östrüs baskılanır. Bu etki erkek farelerden salgılanan feromonların koku yoluyla dişi tarafından algılanmasını engeller. Aksine yabancı, özellikle de farklı ırka ait erkek farelerden salgılanan feromonlar, yeni çiftleşmiş dişi farelerde implantasyon ve yalancı gebeliği engeller (Bruce etkisi). Erkek hayvanlar ile çiftleşen dişi farelerde östrüs senkronize edilebilir. Gurup halinde yaşama östrüsü baskılar, fakat erkek farenin feromonlarına maruz kalan dişilerin çoğunluğu çiftleşmeden üç gün sonra östrüse döner ve siklus yeniden başlar. Bir sonraki östrüs ise 11 gün içinde meydana gelir (Jacob ve ark 2002).

Spermatogenezis, farelerde yaklaşık beş hafta civarında tamamlanır (Otubanjo ve Mosuro 2001).

2.7.Farelerden Spermanın Elde Edilmesi

Farelerden sperma üç şekilde alınır. Bu yöntemler; dişi genital kanaldan spermanın elde edilmesi, elektroejakülatör yardımıyla spermanın alınması ve fare öldürüldükten sonra spermanın epididimisten alınması şeklinde özetlenebilir.

2.7.1. Dişi genital kanaldan spermanın elde edilmesi

Erkek ve dişi fareler bir kafese konularak çiftleşmesi beklenir. Farelerin çiftleşip çiftleşmediğini tespit etmek amacıyla, günün erken saatlerinden başlanarak 30 dakikada arayla vaginal tıkaç kontrolü yapılır. Vaginal tıkaç tespit edilen dişi fare kafesten alınır. Servikal dislokasyon ile ötenazisi sağlandıktan sonra laparatomi yapılır. Dişi genital organlar dışarı alındıktan sonra bir tanesi ovaryumlar ile uterus arasına, diğeri ise vaginal tıkacın hemen kranialine olmak üzere birer ligatür konulur. Bir makas yardımıyla ligatürlerin arasında kalan genital organlar dışarı çıkarılır.

Dişi genital organlar, uygun bir solüsyon kullanılarak yıkanır ve sperma steril bir tüpe alınır.

Bu yöntem; bir fareden çok fazla sayıda ejakülat toplanmasına olanak sağlamasına rağmen, çiftleşme sonrası dişi genital kanala bırakılan spermada bazı değişiklikler (kapasitasyon v.b.) meydana gelmektedir. Spermatolojik özelliklerde önemli bir değişiklik olmamasına rağmen spermanın dondurulabilirliği düşebilmektedir (Songsasen ve Leibo 1998).

2.7.2. Elektroejakülatör yardımıyla farelerden spermanın alınması

Bu yöntemde kullanılacak olan prob, fareler için uygun ebatlarda olmalıdır. Erkek farenin hafif bir sedasyona alınması tercihe bağlıdır. Rektumdaki gaita masaj ile dışarı alınır. Serum fizyolojik ile kayganlaştırılan prob, rektuma yerleştirilir. Belirli aralıklarla uygulanan elektrik akımı sonrasında sperma 25 µl'lik kapillar pipete alınır. Sonrasında, üretranın veziküler bez salgılarıyla kapanarak üremik komplikasyonlara sebebiyet vermemesi için koagulüm bir forseps yardımıyla tamamen glans penisten uzaklaştırılır (Anderson ve ark 1983, Tecirlioğlu ve ark 2002).

Elektroejakülatör kullanılarak elde edilen sperma ile bir fareden birden fazla ejakülat elde edilebilmektedir. Toplanan ejakülatın idrarla karışması, sadece erkek eklenti bezi salgısından oluşması ve koagulasyon bezi salgısı ile karışması muayeneyi güçleştirebilir (Anderson ve ark 1983, Songsasen and Leibo 1998, Tecirlioğlu ve ark 2002). Ayrıca erkek farelerde, spermanın alındıktan sonra koagulümün glans penisten uzaklaştırılmaması nedeniyle üremiden veya kullanılan elektrik akımı nedeniyle ölümlerin görüldüğü bildirilmiştir (Songsasen and Leibo 1998, Tecirlioğlu ve ark 2002). Anderson ve

ark (1983) ise 53 fareden 192 başarılı ejakülat elde edilmesine rağmen sadece bir tanesinin öldüğünü ve bu yöntemin dikkatli bir şekilde uygulanması halinde ölüm oranının düşük seviyelerde kalacağını bildirmektedirler.

2.7.3. Erkek farenin öldürülerek spermanın epididimisten alınması

Erkek fare ya eter kullanılarak ya da servikal dislokasyon ile öldürülür. Karın duvarı açılarak genital organlar ortaya çıkarılır. Kauda epididimisler, her fare için 200 μl'lik uygun bir sperm süspansiyonu içerisine alınır. Kauda epididimisler makas yardımıyla en az beş yerinden parçalanır ve 30 dk boyunca spermanın medyum içerisine difüzyonu sağlanır. Bu süre sonunda, kauda epididimise ait doku parçacıkları medyumdan uzaklaştırılarak sperma süspansiyonu elde edilmiş olur.

Bu yöntem sayesinde alınan sperma ile dişi genital kanaldan elde edilen spermaların muayene sonuçları arasında ve bu iki yöntemle elde edilen in vitro fertilizasyon (IVF) sonuçları arasında önemli bir fark bulunamamıştır. Bu yöntemin dezavantajı ise erkek fareden sadece bir kez sperma elde edilebilmesidir (Songsasen ve Leibo 1998). Diğer bir konu ise kauda epididimisin parçalanması sırasında meydana gelecek kanama spermatozoonlar üzerinde toksik etki yapabilmektedir (Noiles ve ark 1997, Songsasen ve Leibo 1997-a, Songsasen ve Leibo 1997-b, Katkov ve ark 1998, Songsasen ve Leibo 1998, Storey ve ark 1998, Dewit ve ark 2000, Koshimoto ve ark 2000, Sztein ve ark 2001, Koshimoto ve Mazur 2002).

2.8.Fare Spermasının Dondurulması

Fare spermasının dondurulmasına ilişkin ilk yöntemler 1990'dan itibaren geliştirilmeye başlanmıştır. Fare sperması ilk kez Tada ve ark (1990) tarafından başarıyla dondurulmuştur. Böylece, ekonomik açıdan pahalı olan embriyo dondurma yöntemine alternatif olabilecek basit ve ucuz bir yöntem ortaya çıkarılmıştır. Bundan sonra yapılan araştırmalarda dondurulan fare spermalarının fertilite açısından yeterli sonuç sağladığı rapor edilmiştir (Songsasen ve Leibo 1997-b, Katkov ve ark 1998, Sztein ve ark 2001). Dondurulmuş ve taze fare spermaları ile yapılan IVF sonrası, fertilize olan oositlerin in vivo ortama aktarılıp embriyoları incelendiğinde sonucun birbirine yakın olduğu bulunmuştur (Tada ve ark 1993).

Spermanın fertilite düzeyinin dondurma işlemi sonrasında da korunması esastır (Sztein ve ark 2001). Fare sperması, dondurma işlemleri sırasında oluşacak biyolojik hasarlara karşı diğer evcil hayvan türlerinin spermalarından daha duyarlıdır. Bu nedenle, fare spermasının dondurulması esnasında yaşanan problemlerin aşılmasına yönelik çabalar günümüze kadar devam etmiştir (Noiles ve ark 1997, Songsasen ve Leibo 1997-b, Storey ve ark 1998, Katkov ve ark 1998, Dewit ve ark 2000, Koshimoto ve ark 2000, Koshimoto ve Mazur 2002). Bu problemler arasında; fare spermasının serbest oksijen radikallerine karşı hassas oluşu (Katkov ve ark 1998, Koshimoto ve ark 2000), spermatozoon baş formunun diğer memelilerden farklı olması, sperma plazma membranının su geçirgenliğinin az oluşu (Dewit ve ark 2000), dondurma işlemi sırasında meydana gelen soğuk şoku, fare spermasının kriyobiyolojik özelliğinin farklılığı (Songsasen ve Leibo 1997-a) ve mekanik stres faktörlerine (pipetleme, karıştırma, santrifüj etme ve dilüe edilmesi gibi) karşı diğer memeli spermalarından daha duyarlı olması sayılabilir (Katkov ve ark 1998, Koshimoto ve ark 2000). Bununla birlikte, fare spermalarının zayıf membran yapısı, ortamın ozmotik basıncında meydana gelen değişiklikleri tolere edebilme gücünü de sınırlı kılmaktadır (Noiles ve ark 1997, Songsasen ve Leibo 1997-b, Katkov ve ark 1998, Storey ve ark 1998, Dewit ve ark 2000, Koshimoto ve ark 2000, Koshimoto ve Mazur 2002). Fare sperma membranındaki bu duyarlılığın temel sebebi, spermatozoonun hücresel yapısından kaynaklanmaktadır. Spermatozoonun yapısında yer alan aktin flamentler (f-actin) bir gemi çapası gibi sperm membranının stabilizasyonunda etkin rol oynamaktadır. Hipoozmotik bir ortamda membran stabilizatörlerinin yeterli direnci sağlayamaması sonucunda membran bütünlüğü bozularak selektif geçirgen niteliği ortadan kalkmaktadır (Noiles ve ark 1997).

Dondurma solüsyonu içerisine kriyoprotektanların eklenmesi, spermanın ozmotik toleransını etkilemektedir (Songsasen ve Leibo 1997-b, Katkov ve ark 1998, Storey ve ark 1998, Koshimoto ve Mazur 2002). Kriyoprotektan olarak kullanılan maddeler plazma membranının su geçirgenliğini değiştirir (Gilmore ve ark 1995, Gilmore ve ark 1996). Fare spermasının farklı kriyobiyolojik özelliği nedeniyle, kriyoprotektanların medyuma ilave edilmesi, spermatozoon membranının karşı karşıya kaldığı farklı ozmotik basınca verdiği tepkisini de değiştirir ve böylece sperma plazma membran bütünlüğü bozulur (Songsasen ve Leibo 1997-a). Plazma membranında şekillenen mikro düzeydeki hasarlı geçitlerden ekstraselüler sıvının hücre içerisine geçmesi ve dondurma sırasında hücre içi büyük buz kristallerinin oluşumu spermatozoonların ölümüne neden olur. Bununla birlikte, hasarlı

bölmeden hücre içi komponentlerin de ekstraselüler bölgeye sızması spermatozoonların hayati fonksiyonlarının durmasına sebep olabilmektedir (Mazur 1990). Dondurulmuş spermaların çözdürülmesi ve çözdürme sonrası kriyoprotektanın ortamdan uzaklaştırılması esnasında meydana gelen ozmotik basınçtaki değişikliğe adapte olmaya çalışan sperma plazma membranı, yine birtakım yıkımlanmalara uğrayarak bütünlüğünü kaybedebilmektedir (Songsasen ve Leibo 1997-a, Koshimoto ve Mazur 2002). Fare spermasını dondurma yöntemi, bu spermayla yapılan tohumlamalardan (IVF de dahil) doğacak canlı yavru sayısını da etkilemektedir (Songsasen ve Leibo 1997-a).

2.9.Motilite

Fare spermasındaki motilite dinamiği insan, boğa, aygır, köpek, kedi gibi baş kısmı oval yapıdaki diğer spermalardan farklıdır. Fare spermasının baş kısmı orak şeklinde olup asimetrik yapısı ve kuyruğun kendine has hareketinden dolayı medyum içerisinde aşağı ve yukarı olmak üzere hareket eder. Kuyruk spiral bir dönme hareketinden ziyade daha karmaşık bir hareket dinamiği gösterir (Woolley 2003).

Farelerde spermatozoonlar ileri doğru düzgün doğrusal hareketin dışında, baş kısmında yer alan apikal kanca yardımıyla diğer spermatozoonlara tutunarak 10 – 50 hücreli motil guruplar oluşturup hareket edebilme yeteneğine sahiptir. Bu olay, motilite muayenesinde aglütinasyon gibi görülse de aslında normal bir görünümdür (Moore ve ark 2002).

2.10.Ölü – Canlı Spermatozoon Oranı

Bu amaçla yaygın olarak eosin, eosin – nigrosin, opal blue, fast gren gibi boyalardan yararlanılır (Tekin 1990). Spermanın yaralanması veya ölümü nedeniyle membranların morfolojik olarak değiştiğinin bir işareti olarak, hasarlı ve fonksiyonel olmayan sperma membranlarından geçebilme yeteneğine sahip olan eosin-Y (supravital) hücre içerisine geçebilmektedir (Jeyendran ve ark 1984). Bu yöntem ölü spermatozoonların boyayı sperma içerisine alması, canlıların ise boyayı almaması prensibine dayandırılarak pratikte kullanılmaktadır (Tekin N 1990). Somfai ve ark (2002), fare spermasında ölü – canlı spermatozoonları belirlerken yaptıkları boyamalarda, eğer sperma başı boyayı tamamen almış ya da boya postakrozomal bölgeye kadar olan kısma da nüfuz etmişse ölü, boya almamış ise canlı olarak nitelendirmişlerdir.

2.11.Anormal Spermaozoon Oranı

Anormal yapılı spermatozoonların fertilizasyon yeteneğinin düşüklüğü ve kimi kalıtsal bozuklukları taşıması bakımından, spermatozoa'nın morfolojik muayenesi çok önemlidir. Bu amaçla ya boyama yöntemi ya da sıvı fikzasyon yöntemi kullanılır (Tekin 1990).

Somfai ve ark (2002) fare spermasında morfolojik muayene için geliştirdikleri boyama yönteminde trypan blue ile Congo red boyaları kullanmışlardır. Bu yöntemin kolay ve pahalı olmayan bir yöntem olduğu ve basit bir ışık mikroskobunda değerlendirmelerin yapılabildiği bildirilmektedir.

2.12.HOS Testi

Standart spermatolojik analizler, erkek hayvanların fertilite düzeyini değerlendirmek amacıyla yapılan spermatozoon yoğunluğu, motilite ve sperm morfolojisi gibi parametreleri kapsar ve ejakülatın sahip olduğu fertilite düzeyi hakkında sınırlı bilgiler verir (Correa ve Zavos 1994, Neild ve ark 1999, Lagares ve ark 2000). Örneğin; taze ve donmuş spermada, motiliteye bakarak fertilite ile direkt bağlantı kurmak yanlıştır. Doğal olarak motilite, spermanın zona pellusida'ya yapışması ve penetrasyonu için gerekli bir etkendir. Ancak, IVF ya da intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemi kullanılacaksa motilite düzeyi fazla bir önem taşımayabilir (Sztein ve ark 2001).

Erkek infertilitesinin tanısında çeşitli spermatolojik parametreler kullanılabilir. Ancak sadece sınırlı sayıda yöntem, sperma membranının fonksiyonel bütünlüğünü belirlemede kullanılabilir. Membran bütünlüğü sadece spermatozoon metabolizması için değil, aynı zamanda kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve oosit yüzeyine spermanın tutunma olayının gerçekleşmesinde hayati bir öneme sahiptir. Bu nedenle membran fonksiyonunun belirlenmesi, spermatozoanın fetilizasyon kapasitesinin bir göstergesi olabilir (Jeyendran ve ark 1984).

Spermatozoanın membran bütünlüğü iki şekilde incelenir. Bu yöntemlerden birincisi supravital boyama tekniği, ikincisi ise HOS testtir. HOS testi, spermatozoa membranının fonksiyonel olup olmadığını inceler. Bu nedenle HOS testi, rutin sperm analizlerini tamamlayıcı bir metot olarak kullanılmaktadır (Neild ve ark 1999). Ayrıca HOS testi, dondurma prosedürleri sonucu ortaya çıkan sperm membran yıkımını

belirlemede de kullanım alanı bulmuştur (Correa ve Zavos 1994, Nield ve ark 1999, Thundathil ve ark 2002, Tartaglione ve Ritta 2004). Bu yöntem, farklı ozmotik basınca sahip iki ortam arasında ozmotik basınç dengeleninceye kadar fonksiyonel bütünlüğü bozulmamış aktif bir membrandan suyun taşınması esasına dayanmaktadır (Jeyendran ve ark 1992). Hipoozmotik bir medyuma bırakılan spermatozoa içerisine suyun girmesi neticesinde hipoozmotik bir stres ouşturur. Biyokimyasal olarak aktif bir sperma plazma membranı, HOS testi boyunca intraselüler ve ekstraselüler sıvı arasında ozmotik basıncı dengelemeye çalışır. Bu sırada spermatozoa içerisine suyun girmesiyle hacimde bir artış meydana gelir, spermatozoa şişmeye başlar ve böylece spermatozoonların kuyruklarının kıvrıldığı gözlenir (Jeyendran ve ark 1984, Jeyendran ve ark 1992, Sliwa 1993, Correa ve Zavos 1994, Lagares ve ark 2000, Nie ve Wenzel 2001). İnsanlarda yapılan çalışmalarda HOS test sonuçları % 60'dan yukarı olan ejakülatlar normal, % 50 ve altında olan ejakülatlar anormal, % 50 ile % 59 arasında olan ejakülatlar ise şüpheli (ne normal ne de anormal) olarak nitelendirilmektedir (Jeyendran ve ark 1992).

Sadece kuyrukta esneme ile başlayıp kuyruğun kıvrılması, kısalmış ve kalınlaşmış kuyruk ve kuyruk fibrillerinin farklı derecede kıvrılması gibi çeşitli şekillerde ve derecelerde kıvrık kuyruk tipleri gözlenebilir (Jeyendran ve ark 1992). Hipoozmotik solüsyon varlığında sperm kuyruğunun şişebilme kabiliyeti, membrandan su transportunun normal bir şekilde meydana geldiğinin bir göstergesi olarak kabul edilir (Jeyendran ve ark 1984). HOS testinde spermatozoonlarda kuyrukta kıvrılmanın görülmesi ilk olarak kuyruk membranının sağlam olduğunu gösterir. Ejaküle olmuş fonksiyonel olarak sağlam (bütün) kuyruğa sahip spermatozoonların baş plazma membranları da muhtemelen sağlamdır (Jeyendran ve ark 1992).

Kolay ve pahalı olmayan bu yöntem ile insanlarda kullanılan Hamster Testi ve IVF sonuçları arasında pozitif bir korelasyon bulunması, HOS testinin fertilite düzeyinin belirlenmesinde ilave bir yöntem olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Correa ve Zavos 1994). Bununla birlikte, insan ve farklı hayvan türlerine ait spermatozoonların HOS testine verdiği cevap farklılık göstermektedir (Kumi-Diaka 1993, Songsasen ve Leibo 1997-b, Nie ve Wenzel 2001, Lagares ve ark 2000). İnsan sperması 150 mOsm (Jeyendran ve ark 1984), boğa spermasında 150 mOsm (Kathiravan ve ark 2007), koç spermasında 100 mOsm (Aisen ve ark 2005), aygır spermasında 25 – 100 mOsm (Neild ve ark 1999), köpek sperması 60 mOsm (Kumi-Diaka 1993), tavşan spermasında 60 mOsm (Ducci ve

ark 2002) ve alabalık spermasında ise 100 mOsm (Cabrita ve ark 1999) maksimum kuyruk kıvrılması oluşmaktadır. Deney hayvanı olarak kullanılan çeşitli fare ırklarının hipoozmotik basınca verdiği tepki de farklı bulunmuştur (Songsasen ve Leibo 1997-b).

2.13.HOS Testinin Diğer Spermatolojik Analiz Yöntemleriyle Karşılaştırılması ve Güvenilirliği

2.13.1. HOS testi ile geleneksel spermatolojik parametrelerin karşılaştırılması

HOS test ile standart spermatolojik parametreler arasında farklı korelasyonlar bildirilmiştir. Bunlardan sperm motilitesi ile ölü – canlı boyama yöntemi arasında önemli bir korelasyon mevcuttur (Check ve ark 1988, Coetzee ve ark 1989, Avarey ve ark 1990). HOS test sonuçları ile sperm motilitesi ve ölü – canlı boyamaları arasında görülen korelasyonun yüksek olmasına rağmen, HOS test sonuçları ile sperm kromatin yapısı analizi hariç diğer testler arasındaki korelasyon düşük bulunmuştur (Schrader ve ark 1986, Jeyendran ve ark 1992). Son yıllarda nükleer DNA hasarlarını ortaya koyan kromatin yapısı analizleri geliştirilmiş ve bu yöntemlerden elde edilen sonuçların HOS test ve diğer spermatolojik muayene yöntemlerine göre fertilite ile daha fazla korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (Jeyendran ve ark 1992).

HOS test ve eosin boyası ile uygulanan supravital boyama yöntemleri arasındaki prensip farkı; bir spermatozoonun HOS teste reaksiyon vermeden önce hem fiziksel ve hem de kimyasal olarak sağlam bir sperma membranına gereksinim duymasına karşın, eosin boyası ile supravital boyama yönteminin sadece sperma membranın spermatozoonun ölümü neticesi fonksiyonunu kaybedip kaybetmediğini ölçmesidir (Schrader ve ark 1986). Sıcağa maruz bırakılarak öldürülen spermatozoonlar ile taze spermatozoonlar farklı oranlarda karıştırılarak HOS testi uygulandığında, HOS testi sonucunda kıvrık kuyruklu spermatozoon oranı ile sıcaktan ölen spermatozoon oranı arasında negatif bir ilişki ortaya çıkmıştır (Schrader ve ark 1988). Bu nedenle HOS testi, eosin boyası ile ölü – canlı boyama yöntemine göre oldukça kapsamlı bir testtir (Schrader ve ark 1986).

Dondurulmuş boğa sperması üzerinde yapılan bir çalışmada motilite ile HOS test ve HE ile HOS test sonuçları arasında pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (Corea ve Zavos 1994). Tavşanlarda yapılan bir araştırmada ise HE testi sonrası canlı spermatozoon

oranı ile HOS test sonucu arasında pozitif bir korelasyon tepsit edilmiştir (Ducci ve ark 2002).

2.13.2. HOS testinin Hamster testi ile karşılaştırılması

Canlı ve akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoonlar, zonası çıkarılmış hamster oositleriyle (ZFHO) birleşebilirler. Bu test Hamster testi (HT) olarak bilinir. Fertil erkeklerden alınan spermanın, uygun bir kültür medyumunda inkübasyonu sonrasında ZFHO'lerinin sitoplazmasına penetre olması, spermanın kapasitasyon ve akrozom reaksiyonuna uğradığını gösterir. HT, 1970'lerden beri donmuş boğa spermasının akrozomal fonksiyonunun değerlendirilmesi için diğer testlerle birlikte kullanılmaktadır (Bousquet ve Bracket 1982). Çeşitli araştırmacılar HT sonuçları ile bazı spermatolojik parametreler arasında pozitif bir ilişkinin varlığını belirtmelerine rağmen, diğer bir gurup araştırıcı ise bunun tersini iddia etmişlerdir (Yanagimachi 1984). HOS testi sonucu anormal (< % 50) olan erkeklerin spermalarıyla, hiçbir oositin penetre edilemediği bildirilmektedir (Coetzee ve ark 1989). Ayrıca standart spermatolojik parametreleri normal olan spermalarla HT ve HOS testi uygulandığında, HT'inde elde edilen penetrasyon oranı ile HOS test sonuçları oldukça önemli bir korelasyon ($P<0.001$) sağlayabilmiştir (Jeyendran ve ark 1984). HT'inin kendi başına her zaman güvenilir sonuçlar vermediği göz önünde bulundurulursa, HOS testi gibi ilave bir testle beraber kullanılmasının sonuçları olumlu etkileyebileceği sonucuna varılabilir (Kremer ve Jager 1990).

2.13.3. IVF çalışmalarında HOS testinin kullanımı

Çoğu beşeri IVF kliniklerinde spermatozoa kapasitasyonu ve spermatozoanın oosit ile inkübasyona bırakılmasından önce, spermatozoon ayrımı için swim up gibi teknikler kullanmaktadır. Bu tekniklerle seçilen spermalar HOS teste tabi tutulduklarında, bu teknikler kullanılarak seçim yapılmayan ejakülata göre daha yüksek sonuçlar elde edilmektedir. Bu metot aynı zamanda sperma seçim prosedürünün kontrol edilmesine de olanak sağlamaktadır (Jeyendran ve ark 1992). Sperma seçimi uygulanmadan yapılan bir çalışmada, HOS test sonucu en az % 60 olan ejakülatların oositleri başarıyla fertilize edebildikleri gösterilmiştir (Van der Venn ve ark 1986). Buna karşın, HOS test sonuçları anormal olan insanlardan elde edilen ejakülatların hiçbirisi oositlerde fertilizasyon sağlamamıştır (Coetzee ve ark 1989). Ayrıca HT sonucu % 40'ın üzerinde olan ve HOS test sonucu % 65'ten yüksek olan ejakülatlar, diğer klasik spermatolojik parametreleri

anormal bile olsa fertil olarak kabul edilerek IVF amacıyla kullanılabilirler. Bunun aksine, HT sonuçları % 20'nin altında ve HOS test sonucu %50'den düşük bir ejakülatın IVF prosedürü çerçevesinde fertilizasyon ve gebelik sağlama olasılığı çok düşüktür (Riedel ve ark 1989).

IVF yapılacak dondurulmuş boğa spermalarının fertilitesini önceden belirlemek için supravital boyanın (eosin – nigrosin) HOS testiyle birleştirilmesi sonucu fertilite oranının % 78 oranda başarılı bir biçimde belirlenebilmiştir (Tartaglione ve Ritta 2004). Bununla birlikte bu yöntem insanlarda yoğunluk, motilite ve morfoloji ile önemli derecede ilişkili olmasına rağmen ICSI uygulaması sonuçlarını tahmin etmede hassas bir yöntem değildir (Cincik ve ark 2007).

3. MATERYAL ve METOT

3.1.Materyal

Çalışmada hayvan materyali olarak en az 12 haftalık, Swiss albino ırkı erkek ve dişi fareler kullanıldı. Deneyin ilk ve ikinci aşamalarında sırasıyla 18 ve 9 olmak üzere toplam 27 adet fertil erkek fare kullanıldı. Fareler, erkek ve dişi olmak üzere ayrılarak gruplar halinde ızgaralı, plastik kafeslerde barındırıldı. Farelerin barındırıldığı odanın ortalama sıcaklığının kış ayları süresince 20°C'nin altına düşürülmemesi amacıyla, deney süresince ek ısıtma uygulandı. Çalışma süresince yem ve taze su sınırsız olarak verildi ve herhangi bir yapay ışık düzenlemesi yapılmadı.

3.2.Metot

3.2.1 In vivo fertilite testi

Çalışmada kullanılacak erkek farelerin fertilitesinin in vivo olarak belirlenmesi amacıyla çiftleştirme denemeleri uygulandı. Bu amaçla her erkek fare iki dişi ile yukarıda belirtilen koşullarda barındırılarak bir hafta boyunca birlikte kalmaları sağlandı. Bu süre zarfında dişi farelerde çiftleşme kriteri olarak vaginal tıkaç oluşumu, her gün günün erken saatlerinden itibaren 30 dakika aralıklarla periyodik olarak muayene edildi (Songsasen ve Leibo 1998). Bu süre sonunda dişi ve erkek fareler ayrılarak farklı kafeslere alındı ve dişilerde bir ay süresince gebelik gelişimi ve doğum izlendi. Erkek farelerin çiftleştirme denemelerinde en az iki dişi farede gebelik oluşturması pozitif sonuç olarak değerlendirildi ve bu kriter çalışma grubunun oluşturulmasında temel parametre olarak kabul edildi. Gebeliğin oluşmadığı dişi farelerle barındırılan erkek fareler çalışma grubuna dahil edilmedi.

3.2.2 Deney planı

Çalışma iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada, fertilitesi in vivo olarak belirlenmiş erkek farelerde spermanın maksimum cevap vereceği HOS test aralığı

belirlendi. İkinci aşamada ise konvansiyonal spermatolojik parametreler (motilite, ölü-canlı spermatozoon oranı ve anormal spermatozoon oranı) ile çalışmanın ilk aşamasında belirlenen uygun test aralığında gerçekleştirilen HE testi arasındaki korelasyon araştırıldı.

3.2.3 Spermanın alınması

Deneyin birici aşamasında, her deney replikasyonu için servikal dislokasyon ile fertil iki erkek farenin ötenazisi yapıldı (Dewit ve ark 2000, Katkov ve ark 1998). Elde edilen kauda epididimisler bir petri kutusunda mineral yağ ile üzeri kapatılan, ozmotik basıncı önceden bilinen (270 mOsm) Dulbecco's Phosphate Buffer (D-PBS) + 4.5mg/ml BSA (Sigma) (D-PBS Work) (her fare için 200 µl) medyumu içerisine (Songsasen ve Leibo 1997-a, Songsasen ve Leibo 1997-b, Katkov ve ark 1998, Koshimoto ve ark 2000, Koshimoto ve Mazur 2002) yerleştirilerek oda sıcaklığında 30 dk boyunca sperm difüzyonu sağlandı. Difüzyon sonrası kauda epididimisler medyumdan uzaklaştırıldı (Noiles ve ark 1997, Songsasen ve Leibo 1997-a, Songsasen ve Leibo 1997-b, Katkov ve ark 1998, Storey ve ark 1998, Dewit ve ark 2000, Koshimoto ve ark 2000, Sztein ve ark 2001, Koshimoto ve Mazur 2002).

D-PBS (A):

$CaCl_2$ $2H_2O$..... 0.0132 gr

$MgSO_4$ $7H_2O$..... 0.0121 gr

Ultra saf su ile 20 ml'ye tamamlanır (Hafez 2000).

D-PBS (B):

NaCl..... 0.800 gr

KCl..... 0.020 gr

Na_2HPO_4..... 0.115 gr

KH_2PO_4..... 0.020 gr

Glucose..... 0.100 gr

Streptomycine Sulfate..... 0.050 gr

Na pyruvate..... 0.360 gr

K penicillin G..... 10 000 IU

Ultra saf su ile 80 ml'ye tamamlanır (Hafez 2000).

D-PBS Work Hazırlanışı:

D-PBS(A).....1ml

D-PBS(B).....4ml

BSA.....0.0225gr (ya da 0.0045gr/ml) (Hafez 2000).

3.2.4 HE testinin uygulanması

Ozmotik basınçları ayarlamak ve ölçmek için Selçuk ÜniversitesiMeram Tıp Fakültesi Tüp Bebek Ünitesi'ndeki Advanced Instrument 3300 (USA) ozmometreden yararlanıldı. Daha sonra ultra saf su içerisine ozmotik basıncı 400 mOsm'ye ulaşıncaya kadar Fruktoz ilave edilerek stok solüsyon oluşturuldu. Daha sonra elde edilen stok solüsyon milipor filtreler yardımıyla filtre edilerek saklandı. Stok solüsyon ve süper saf su değişik miktarlarda eklenerek 50'şer ml'lik renkli steril şişeler içerisine farklı ozmotik basınçtaki solüsyonlar hazırlandı.

Deneyin birinci aşamasında her replikasyon için iki fertil erkek fare kullanıldı. Deneyin birinci aşamasında spermatozoonlar 1.5 ml'lik ependorf tüpler içerisine hipoozmotik medyumda inkübe edildiler. Ependorf tüpler içerisinde farklı ozmotik basınçlara ayarlanmış (20, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 ve 400 mOsm) 180 µl HOS test solüsyonu içerisine 20 µl sperm süspansiyonu ilave edilerek 35°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hafifçe çalkalanarak homojen hale getirilen her tüpten 10 µl örnek alınarak vücut sıcaklığındaki bir lam üzerine damlatıldı ve üzerine 35°C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletilen eosin - nigrosin boyasından 20 µl damlatılarak ikişer adet preparat hazırlandı. Her ozmotik basınç kademesi için hazırlanan ikişer frotiden toplam 200 spermatozoon x1000 büyütüldü faz – kontrast mikroskop altında sayılarak her gurupta kıvrık kuyruklu spermatozoon oranı belirlendi.

Çalışmanın ikinci aşamasında her deneysel replikasyon için bir fareden alınan kauda epididimisler 200µl'lik D-PBS Work solüsyonu içerisinde inkübe edilerek sperma süspansiyonu hazırlandı. Deneyin ilk aşamasındaki sonuçlar dikkate alınarak HOS testi aynen yukarıda belirtildiği biçimde 80 mOsm'de gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda daha önce belirtildiği biçimde eosin – nigrosin boyası ile boyanarak ikişer adet froti hazırlandı. Ancak bu kez HOS testi ve boyama sonuçları dikkate alınarak spermatozoonların başı boya almış ve almamış, kuyruğu kıvrılmış ya da kıvrılmamış oluşuna göre dört alt tip [Başı boya almamış kıvrık kuyruklu (Tip1), başı boya almış kıvrık kuyruklu (Tip2), başı boya almamış düz kuyruklu (Tip3) ve başı boya almış düz kuyruklu (Tip4)] oluşturuldu. Her fare için sperma süspansiyonunda belirtilen tiplendirmeye uyan spermatozoonların sayı ve oranları yukarıda belirtildiği şekilde preparatlarda sayılarak belirlendi ve kaydedildi.

Eosin – nigrosin boyasının formülasyonu.

Eosin (water soluble) ……... 1.67 gr

Nigrosin (water soluble) …….. 10.00 gr

Sodium Citrate $2H_2O$ ……...2.90 gr

Ultra Saf Su ile 100 ml'ye tamamlanır (Evans ve Maxwell 1987).

3.2.5. Konvansiyonel spermatolojik parametrelerin belirlenmesi

3.2.5.1. Motilite muayenesi

Motilite muayenesi, sperma süspansiyonu elde edildikten hemen sonra yapıldı. Motilite muayenesinde kullanılan lam, lamel ve otomatik pipet uçlarının temiz ve vücut sıcaklığında olmasına dikkat edildi. Lam üzerine 10 µl'lik sperma süspansiyonundan damlatılıp üzerine 45°'lik açı ile bir lamel kapatıldı. Motilite, 35°C'ye ayarlanmış ısıtma tablası yardımıyla, faz – kontrast mikroskop altında, x400'lük büyütmede, en az üç farklı sahada ileri doğru düzgün doğrusal hareket yapan spermatozoonların sayımı ile yapıldı. Fare spermasında motilite muayenesinde Moore ve ark (2002) ile Woolley (2003)'in farelerde sperma motilitesinin değerlendirilmesi sırasında temel aldıkları hususlara da dikkat edildi.

3.2.5.2. Ölü – canlı spermatozoon muayenesi

Ölü – canlı spermatozoon oranını belirlemek için sperma süspansiyonunun hazırlanmasından hemen sonra iki adet froti hazırlandı. Frotilerin hazırlanması için yağı alınmış lam, lamel ve otomatik pipet uçlarının temiz ve vücut sıcaklığında olmasına dikkat edildi. Sıcaklığı 35°C'ye ayarlanmış ısıtma tablası üzerindeki lama 10 µl'lik sperma süspansiyonundan damlatıldı. Bunun üzerine 35°C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletilen eosin – nigrosin boyasından 20 µl ilave edilerek bir lamel yardımıyla sperma süspansiyonu ve boya nazik bir şekilde karıştırıldı. Bu karışımdan aynı lam üzerine sürme froti çekilerek kısa sürede kuruması sağlandı. Her sperma örneğinden iki froti hazırlandı ve x1000'lik büyütmede immersiyon bakışla her bir frotiden 100 adet olmak üzere toplam 200 adet spermatozoon sayılarak ölü – canlı spermatozoon oranı tespit edildi.

Yapılan tez çalışmasında fare spermasında ölü – canlı spermatozoonların değerlendirmesini yaparken Somfai ve ark (2002)'nın değerlendirmeleri dikkate alınmıştır. Buna göre fare spermatozoasının başı boyayı tamamen almış ya da postakrozomal bölgeye kadar olan kısma da boya nüfuz etmişse hücre ölü, boya almamış ise canlı olarak nitelendirildi (Resim 4.1).

3.5.2.3. Anormal spermatozoon muayenesi

Anormal spermatozoonların oranını belirlemek için her sperma süspansiyonundan toplam iki adet preparat hazırlandı. Preparatların hazırlanması için yağı alınmış lam, lamel ve otomatik pipet uçlarının temiz ve vücut sıcaklığında olmasına dikkat edildi. Bu çalışmada eosin – nigrosin yöntemi kullanılarak anormal spermatozoon muayenesi yapıldı (IRDG ve CASA Gurubu 2000).

Preparatların hazırlanması, yukarıda ölü – canlı spermatozoon muayenesi bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı.

Faz – kontrast mikroskopta x1000'lik büyütmede immersiyon bakışla her bir frotiden 100 adet olmak üzere toplam 200 adet spermatozoon sayılarak anormal spermatozoon oranı tespit edildi (Resim 4.2).

3.3.İstatistiki Analiz

Çalışmanın her iki aşamasında da deneyler en az 5 kez tekrarlanarak ortalama değerler ($\bar{X}$) belirlenmiş ve ortalama değerlerin standart hataları ($\pm S\bar{x}$) hesaplanmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında gurupların istatistiksel karşılaştırılması amacıyla "unpaired t-testi" kullanılmış, P değerinin 0.05'in altında ($P<0.05$) olduğu hallerde fark önemli olarak kabul edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise elde edilen HE test sonuçları ile diğer konvansiyonel spermatolojik parametreler arasındaki ilişkinin belirlenebilmesi amacıyla korelasyon analizi yapılmış ve $P<0.05$ olduğu hallerde fark önemli kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1.Farklı Ozmotik Basınçta İnkübe Edilen Spermatozoonlarda Oluşan Şişme Cevapları

İzoozmotik basınç 290 mOsm olduğu için 20 – 280 mOsm aralığı hipoozmotik, 320 – 400 mOsm aralığı hiperozmotik olarak değerlendirilmiştir.

Ozmotik basıncı 20 – 400 mOsm arasında değişen solüsyonlarda 30 dk süreyle inkübe edilen fare spermatozoonlarında hipoozmotik şişme, hiperozmotik büzüşme ve buna bağlı olarak spermatozoon kuyruklarında gözlenen kıvrılma oranları % 22.9 ± 3.75 ile % 52.3 ± 4.74 arasında değişmiştir. En yüksek şişme cevabı % 52.3 ± 4.74 ile 20 mOsm grubunda elde edilirken, en düşük cevap ise % 22.9 ± 3.75 ile 400 mOsm grubunda elde edilmiştir. İnkübasyon sırasında kullanılan solüsyonun ozmotik basıncı, spermatozoonların şişme cevabını önemli ölçüde etkilemiştir ($P<0.01$).

Araştırmanın birinci aşamasında kullanılan farklı ozmotik basınca sahip solüsyonlarda inkübe edilen fare spermatozoonlarından elde edilen şişme cevabına ilişkin oranlar Tablo 4.1'de görülen ortalama kıvrık kuyruk oranlarının istatistik karşılaştırılması sonucu elde edilen bulgular da Tablo 4.2'de sunulmuştur. Resim 4.3'te HE testinde fare spermasında meydana gelen kıvrılmalar ve Resim 4.4'te ise HE testinde fare spermasının tiplendirilmesi sunulmuştur.

Tablo 4.1 ve 4.2 ile grafik 4.1 ve 4.2' de görülebileceği gibi 20, 40, 80, 120 ve 160 mOsm grupları arasında spermatozoonların şişme cevapları açısından istatistiksel bir fark bulunmamasına rağmen, 20-160 mOsm'lük aralıkta elde edilen kıvrık kuyruklu spermatozoon oranı 200-400 mOsm aralığında elde edilen kıvrık kuyruklu spermatozoon oranından önemli ölçüde yüksek bulunmuştur ($P<0.001$). Bu nedenle çalışmanın ikinci bölümünde fare spermatozoonlarının şişme ve boya alma özelliklerinin belirlenmesi için 20 – 160 mOsm aralığındaki median grup olan 80 mOsm seçilerek HE testi bu ozmotik basınçta uygulanmıştır (Grafik 4.3).

4.2.Farklı Ozmotik Basınçta İnkübe Edilen Spermatozoonlarda Boya Alma Oranları

Farklı ozmotik basınca sahip fruktoz solüsyonunda inkübe edilen, daha sonra eosin – nigrosin ile boyanan fare spermatozoonlarında başı boya almamış spermatozoon oranları gruplar arasında istatistiksel fark göstermezken ($P>0.05$), en yüksek oran % 42.9 ile 120 mOsm grubunda ve en düşük oranı ise % 32.3 ile 20 mOsm grubunda tespit edilmiştir. Diğer gruplarda elde edilen ortalama boya almamış spermatozoon oranları Tablo 4.3'de ve verilerin gruplar arası karşılaştırması ve P değerleri ise Tablo 4.4'de sunulmuştur.

4.3.HE Testi Sonuçları ile Konvansiyonel Spermatolojik Parametreler Arasındaki İlişkiler

Çalışmanın ikinci bölümünde yapılan toplam 9 deneysel replikasyonda elde edilen spermatolojik muayene ve HE testi sonuçları Tablo 4.5, Tablo 4.6, Tablo 4.7 ve Tablo 4.8 ile Grafik 4.4'te sunulmuştur.

HE testi sonuçları ile akrozom, baş, implantasyon bölgesi, orta kısım ve diğer tip anormal spermatozoon oranları arasında bir korelasyon saptanamamasına rağmen ($P>0.05$) anormal kuyruklu spermatozoon oranları ile Tip1 spermatozoon oranları arasında negatif yönde önemli ($P<0.01$) bir korelasyon saptandı. Fare spermasında artan kuyruk anomalilerinin 80 mOsm de yapılan HE testine cevap vererek şişen kıvrık kuyruklu spermatozoon sayısını önemli ölçüde azalttığı ($P<0.01$) tespit edildi.

Ölü – canlı spermatozoon oranları ile 80 mOsm'de uygulanan HE test sonuçları arasında önemli bir korelasyon tespit edilemedi ($P>0.05$). Sperma motilitesi ile HE testinde tespit edilen Tip 1 spermatozoon oranları arasında pozitif yönde ($P<0.05$) ve yine motilite değerleri ile HE testinde tespit edilen toplam boya almamış spermatozoon oranları arasında pozitif yönde bir korelasyon ($P<0.05$) belirlenmiştir.

HE test sonuçları ile klasik spermatolojik parametreler arasında gözlenen bu korelasyonlar dışında spermatolojik parametrelerin kendileri arasında örneğin baş anormal oranı ile toplam anormal spermatozoon oranı ($P<0.01$), implantasyon bölgesi anormal oranı ile toplam anormal spermatozoon oranı ($P<0.05$), canlı spermatozoon oranı ve motilite ($P<0.05$) ve toplam anormal spermatozoon oranı ile de motilite arasında ($P=0.05$) istatistiksel açıdan önemli korelasyonlar tespit edilmiştir.

Tablo 4.1: 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 ve 400 mOsm'lük fruktoz solüsyonunda 30 dk inkübe edilen fare spermatozoonlarında ortalama kıvrık kuyruk oranları ($X^- \pm Sx^-$) (n=18).

Gruplar (mOsm)	Kıvrık kuyruk oranı (%)
20	52.3±4.7
40	49.2±7.1
80	49.7±7.7
120	45.4±6.0
160	41.5±5.7
200	33.5±3.6
240	33.4±4.6
280	31.1±3.5
320	29.7±3.7
360	25.6±4.0
400	22.9±3.7

Tablo 4.2: 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 ve 400 mOsm gruplarında elde edilen ortalama kıvrık kuyruk oranlarının gruplar arası istatistiksel karşılaştırması ve P değerleri.

Gruplar (mOsm)	**20**	**40**	**80**	**120**	**160**	**200**	**240**	**280**	**320**	**360**
40	0.726									
80	0.781	0.962								
120	0.383	0.686	0.664							
160	0.170	0.413	0.407	0.649						
200	0.008*	0.072	0.081	0.117	0.256					
240	0.014*	0.087	0.095	0.142	0.291	0.90				
280	0.003*	0.041*	0.048*	0.063	0.144	0.645	0.699			
320	0.002*	0.032*	0.037*	0.047*	0.107	0.479	0.543	0.783		
360	0.001*	0.013*	0.016*	0.017*	0.039*	0.164	0.220	0.460	0.460	
400	0.0004*	0.006*	0.008*	0.008*	0.017*	0.063	0.101	0.218	0.218	0.627

*P<0.05

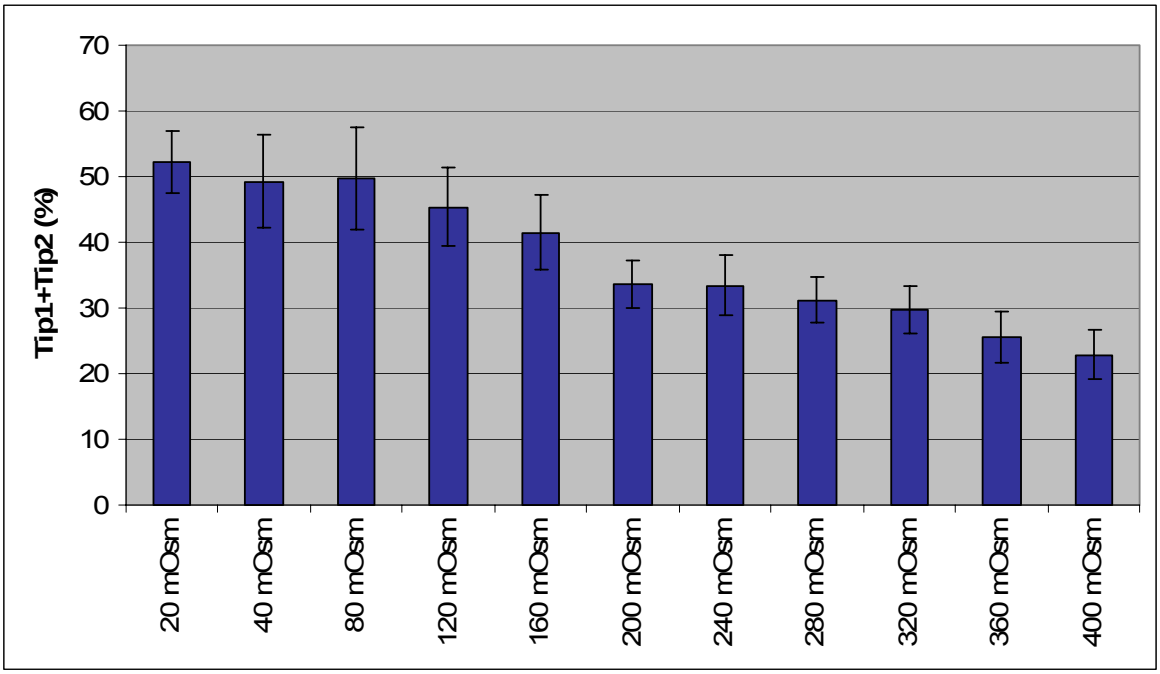
Tablo 4.3: 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 ve 400 mOsm'lük fruktoz solüsyonunda 30 dk inkübe edilen, daha sonra eosin – nigrosin ile boyanan fare spermatozoonlarında ortalama boya almamış spermatozoon oranları ($X^- \pm Sx^-$) (n=18).

Gruplar (mOsm)	Boya almamış spermatozoon oranı (%)
20	32.3±4.3
40	33.6±5.4
80	41.0±5.2
120	42.9±5.8
160	42.6±5.2
200	39.5±6.2
240	42.7±6.4
280	41.3±6.9
320	41.7±6.0
360	42.3±6.0
400	38.7±5.7

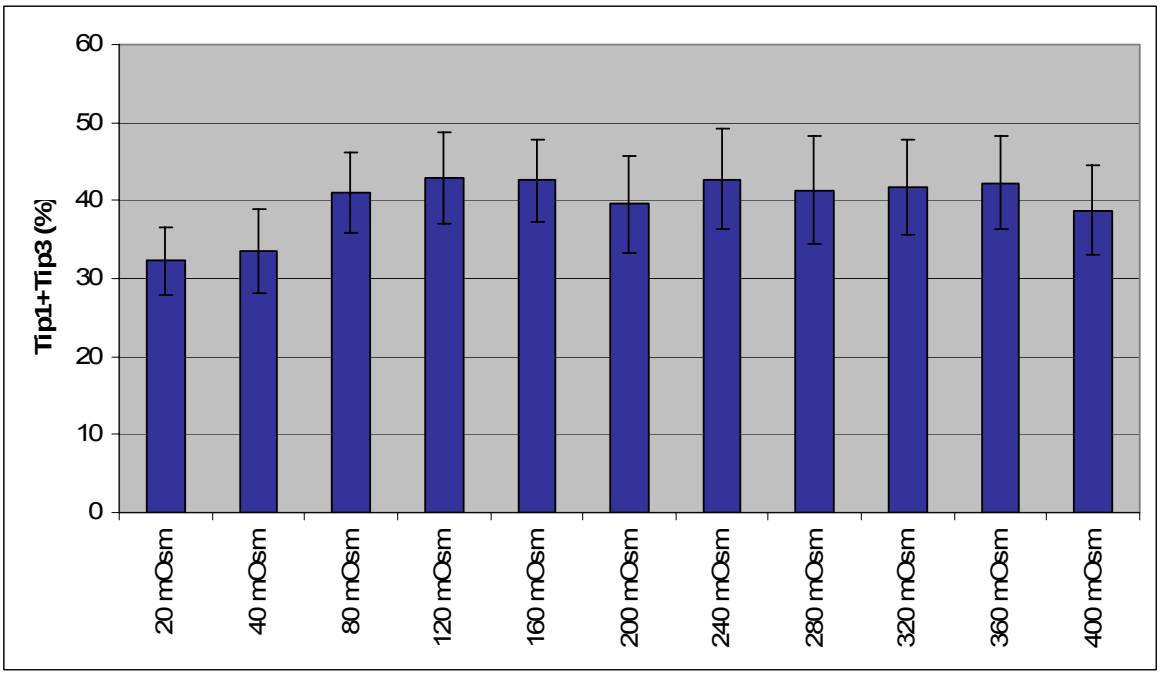
Tablo 4.4: 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 ve 400 mOsm gruplarında elde edilen ortalama boya almamış spermatozoon oranlarının gruplar arası istatistiksel karşılaştırması.

Gruplar (mOsm)	**20**	**40**	**80**	**120**	**160**	**200**	**240**	**280**	**320**	**360**
40	0.857									
80	0.225	0.343								
120	0.168	0.260	0.808							
160	0.156	0.254	0.834	0.964						
200	0.360	0.485	0.855	0.692	0.710					
240	0.203	0.297	0.838	0.980	0.986	0.723				
280	0.294	0.398	0.974	0.858	0.884	0.850	0.882			
320	0.231	0.336	0.930	0.886	0.916	0.802	0.911	0.963		
360	0.201	0.301	0.873	0.939	0.971	0.751	0.961	0.914	0.947	
400	0.388	0.525	0.772	0.612	0.625	0.927	0.648	0.779	0.724	0.672

Grafik 4.1: Farklı ozmotik basınçlara ait Tip1+Tip2 (toplam kıvrık kuyurklu) spermatozoon oranları.



Grafik 4.2: Farklı ozmotik basınçlara ait Tip1+Tip3 (toplam başı boya almamış) spermatozoon oranları (P>0.05).



Tablo 4.5: Çalışmanın ikinci aşamasında yapılan 9 deneysel replikasyonda elde edilen motilite, canlı spermatozoon oranı ve 80 mOsm de uygulanan HE testi sonuçları

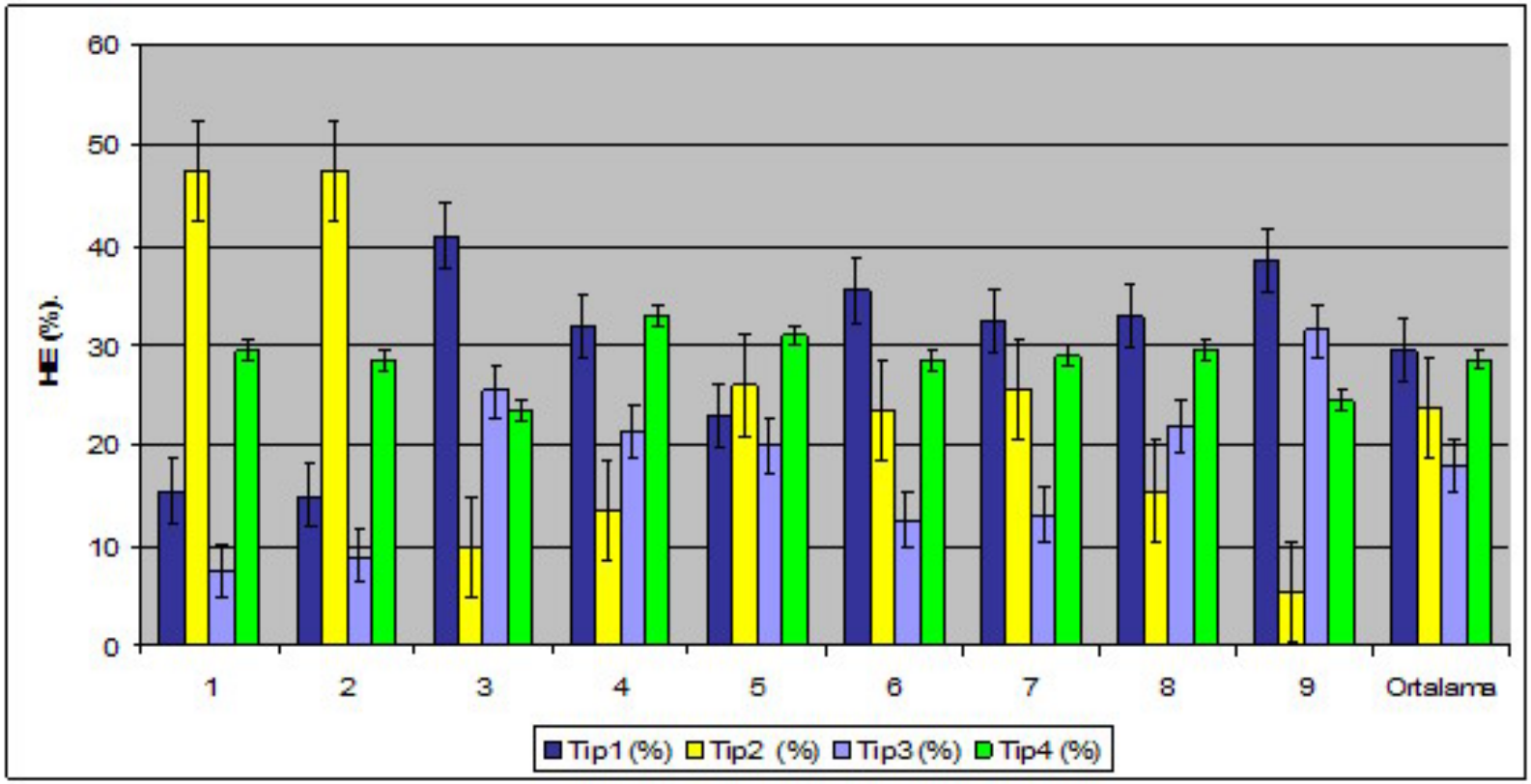
n (9)	Motilite (%)	Canlı spermatozoon oranı (%)	HE testi spermatozoon oranları (%)				Tip1 + Tip2 (Toplam Kıvrık Kuyruk) (%)	Tip1 + Tip 3 (Toplam Boyanmamış Baş) (%)
			Tip1	Tip2	Tip3	Tip4		
1	30	67	15.5	47.5	7.5	29.5	63.0	23.0
2	10	49	15.0	47.5	9.0	28.5	62.5	24.0
3	50	41	41.0	10.0	25.5	23.5	51.0	66.5
4	60	72	32.0	13.5	21.5	33.0	45.5	53.5
5	60	60	23.0	26.0	20.0	31.0	49.0	43.0
6	60	65	35.5	23.5	12.5	28.5	59.0	48.0
7	50	57	32.5	25.5	13.0	29.0	58.0	45.5
8	60	70	33.0	15.5	22.0	29.5	48.5	55.0
9	60	67.5	38.5	5.5	31.5	24.5	44.0	70.0

Tablo 4.6: Çalışmanın ikinci aşamasında yapılan replikasyonlarda elde edilen motilite, canlı spermatozoon oranı ve 80 mOsm de uygulanan HE testi sonuçları ($X^- \pm Sx^-$) (n=9).

Motilite (%)	Canlı spermatozoon oranı (%)	HE testi spermatozoon oranları (%)				Tip1 + Tip2 (Toplam Kıvrık Kuyruk) (%)	Tip1 + Tip 3 (Toplam Boyanmamış Baş) (%)
		Tip1	Tip2	Tip3	Tip4		
48.9±5.9	63.2±2.4	29.6±3.2	23.8±5.0	18.1±2.7	28.6±1.0	53.4±2.4	47.6±5.4

Tablo 4.7: Çalışmanın ikinci aşamasında yapılan replikasyonlarda deneysel replikasyonda elde edilen anormal spermatozoon oranları ve yerleşim bölgesi ($X^- \pm Sx^-$) (n=9).

Akrozom	Baş	İmplantasyon Bölgesi	Orta Kısım	Kuyruk	Sitoplazmik Damlacık	Diğer	Toplam
4.2±0.7	11.8±4.4	7.4±2.8	5.7±1.6	5.6±1.5	5.8±1.6	0.2±0.05	40.7±7.4

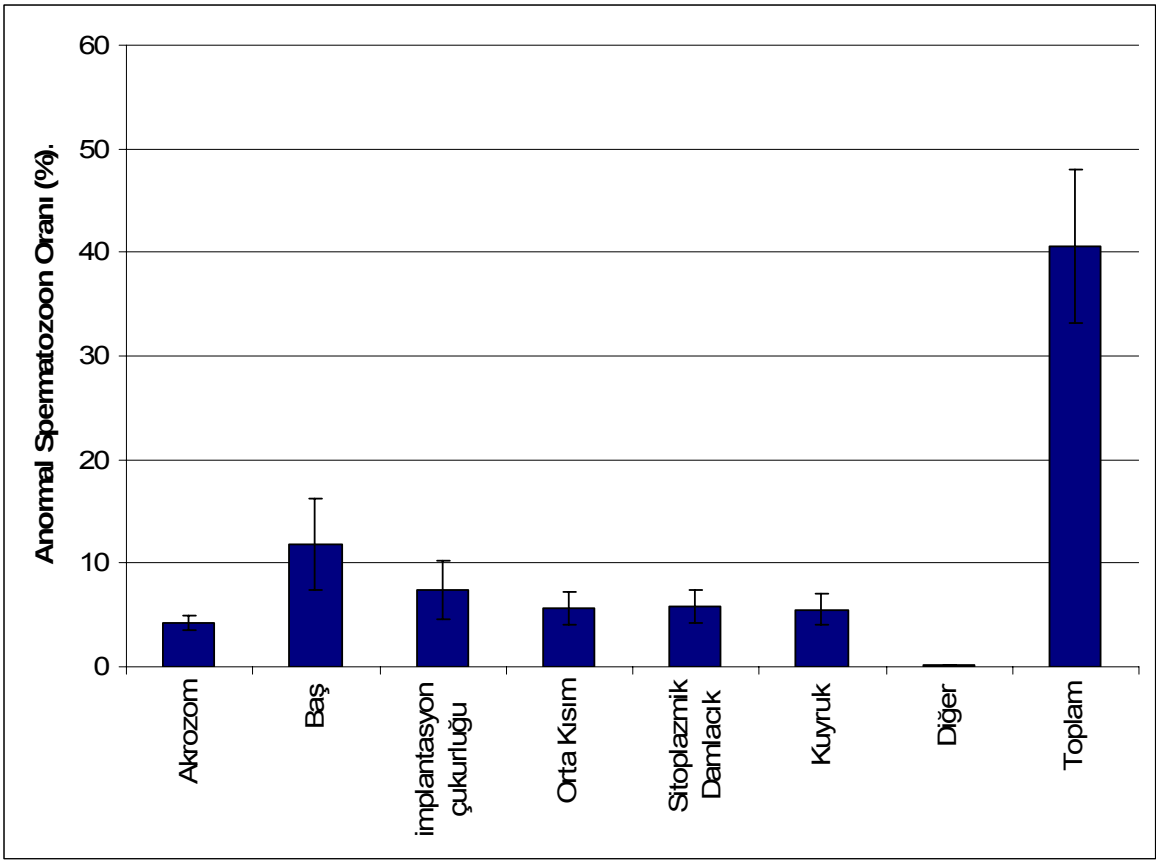


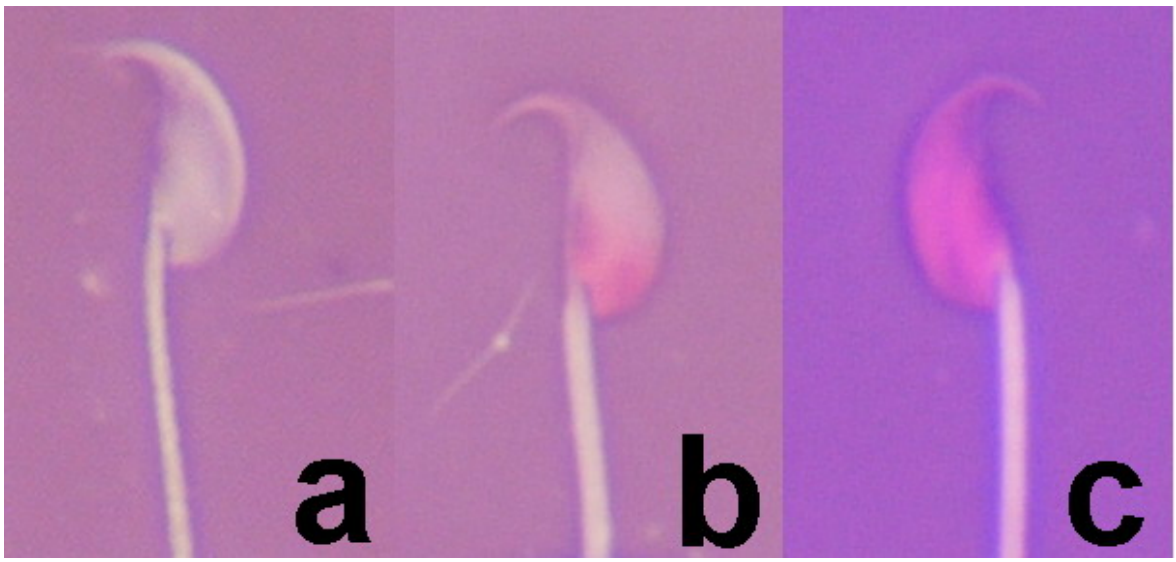
Grafik 4.3: Çalışmanın ikinci aşamasında yapılan toplam 9 deneysel replikasyonda uygulanan HE testlerinde elde edilen Tip1, Tip2, Tip3 ve Tip4 spermatozoon oranları.

Tablo 4.8: Farelerde toplam 9 deneysel replikasyonda elde edilen anormal spermatozoon oranları.

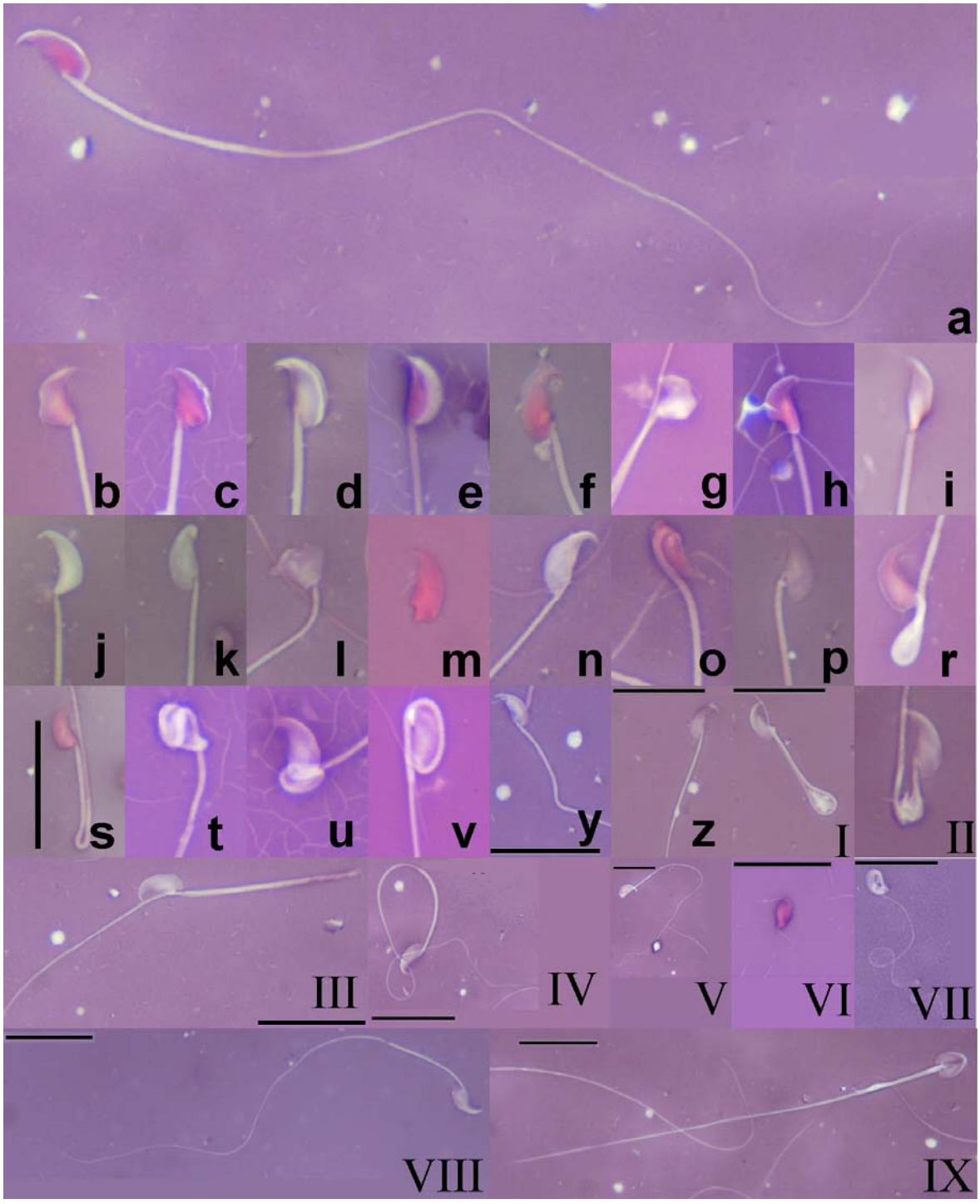
N (9)	Akrozom	Baş	İmplantasyon Bölgesi	Orta Kısım	Kuyruk	Sitoplazmik Damlacık	Diğer	Toplam
1	2.5	22.0	2.0	5.0	15.5	6.5	1.0	54.5
2	4.5	14.5	27.0	13.0	9.5	1.0	0.5	70.0
3	8.0	5.0	2.5	2.5	3.0	1.5	0	22.5
4	4.5	4.0	11.0	1.0	2.5	7.5	0	30.5
5	2.5	7.5	4.0	1.5	5.5	6.0	0	27.0
6	2.0	5.5	5.0	13.5	7.0	17.5	0	50.5
7	7.5	42.5	12.5	6.5	2.0	3.5	0	74.5
8	3.5	1.5	1.5	5.5	3.0	5.0	0	20.0
9	2.5	4.0	1.0	2.5	2.0	3.5	0	15.5

Grafik 4.4: Çalışmanın ikinci aşamasında yapılan toplam 9 deneysel replikasyonda elde edilen ortalama anormal spermatozoon oranları ve yerleşim bölgeleri ($X^{-} \pm Sx^{-}$).

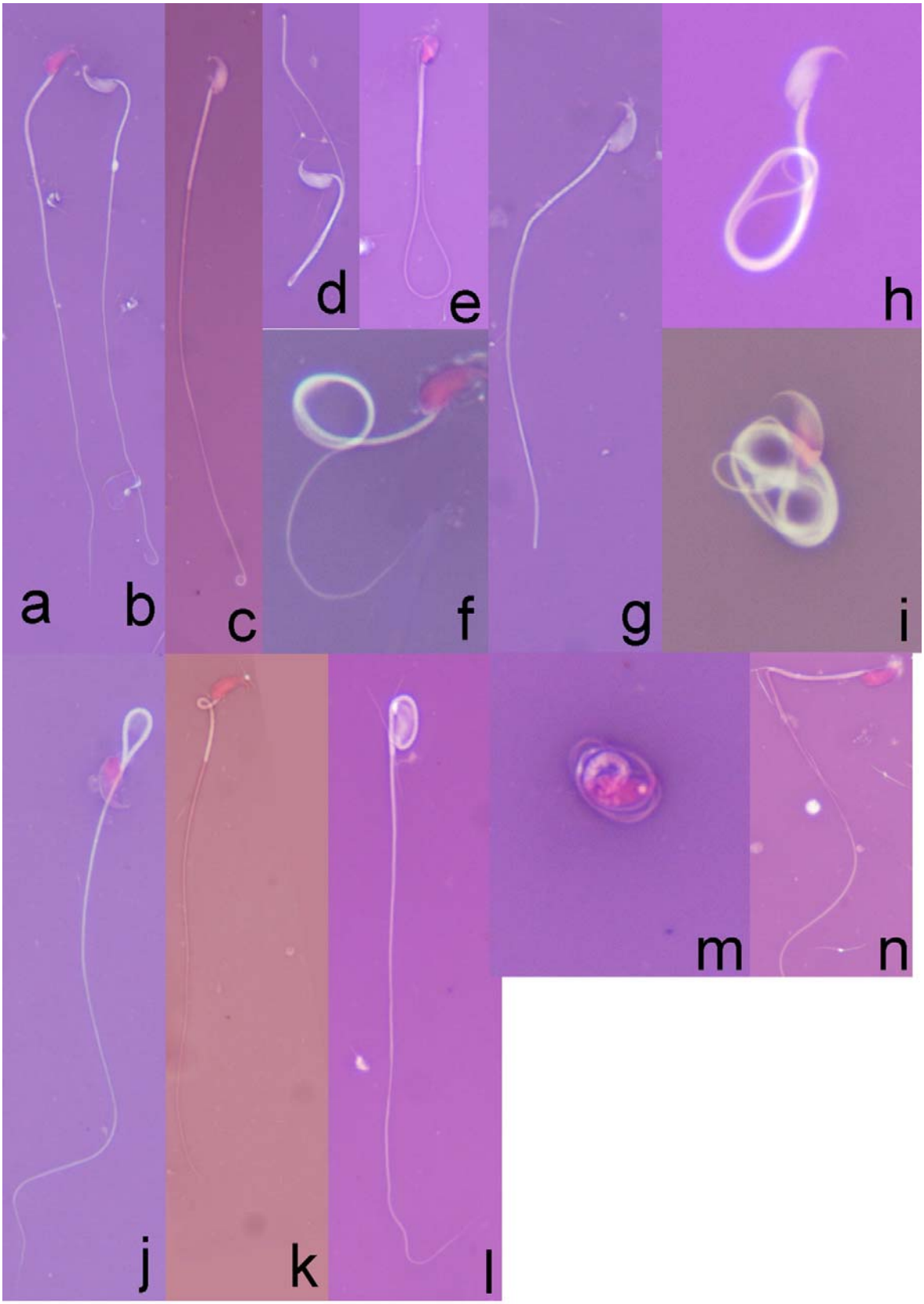




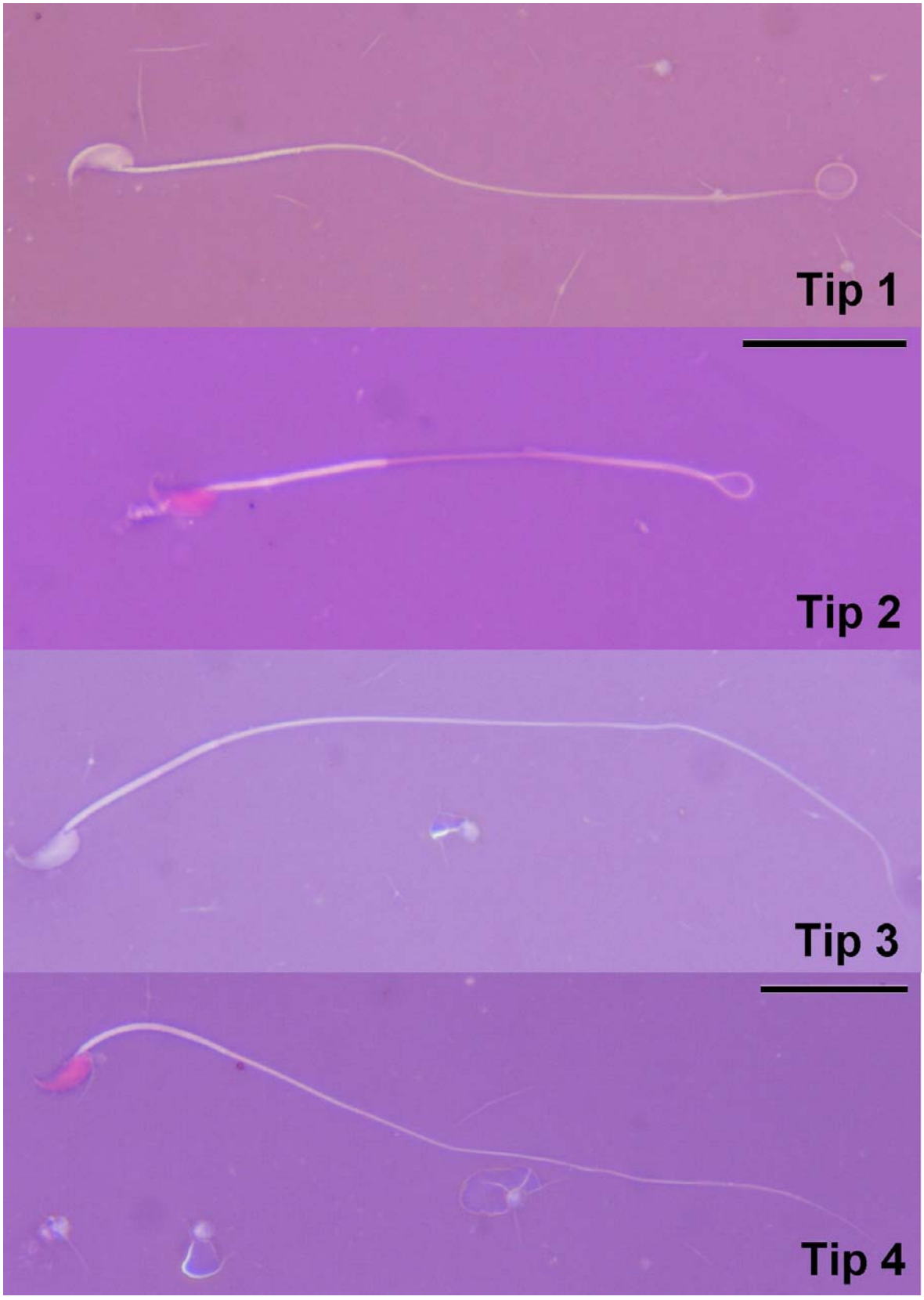
Resim 4.1: Eosin – nigrosin boyası ile boyanmış fare spermatozoonları. **a;** Canlı spermatozoon, **b-c;**Ölü spermatozoon



Resim 4.2: Farelerde çeşitli anormal spermatozoon tipleri **a;** Normal spermatozoon, **b – f;** Akrozomal anomali, **g – m;** Baş anomalisi, **n – p;** İmplantasyon çukurluğu anomalisi, **r – y;** Orta kısım anomalisi, **z – II;** Sitoplazmik damlacık, **III – VIII;** Kuyruk anomalisi, **IX;** Çift oluşum (Ölçek bar uzunluğu 20µm).



Resim 4.3: HOS test sırasında şişen değişik morfolojide spermatozoonlar. **b – i;** HOS testi sonucu şişen, **j – n,a;** şişme benzeri yapı gösteren anormal spermatozoonlar.



Resim 4.4: Fare spermasında HE testi sırasında spermatozoonların tiplendirilmesi. (Ölçek bar uzunluğu 20μm).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Motilite, ölü-canlı spermatozoon oranı, anormal spermatozoon oranı ve spermatozoon yoğunluğu gibi standart parametreler üzerinden gerçekleştirilen spermatolojik muayene yöntemleri çoğu kez bir ejakülatın fertilite düzeyinin önceden belirlenmesi amacıyla yeterli sonuçlar vermez (Amann 1989). Spermatozoon plazma membranı akrozom reaksiyonu ve kapasitasyon gibi hayati öneme sahip fizyolojik olaylar dışında fertilizasyon olgusunun şekillenmesi sırasında da aktif olarak sürece katılır ve oosit plazma membranı ile spermatozoon membranı arasında füzyon sağlanması gibi bazı önemli fonksiyonların yerine getirilmesinden sorumludur (Tamuli ve Watson 1992). Son yıllarda bu önemli görevleri nedeniyle spermatozoonlarda membran bütünlüğünün ve fonksiyonelliğinin belirlenmesine olanak sağlayacak daha detaylı yöntemlerin geliştirilmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla carboxyfluorescein diacetate ve propidium iodide kullanılarak uygulanan florasan boyama yöntemleri yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Curry ve Watson 1994).

Membran bütünlüğünün belirlenmesinde klasik bir yöntem konumundaki supravital boyalar (eosin-nigrosin gibi) sadece hücrenin canlı olup olmadığına ilişkin olarak bilgi vermesine rağmen, HOS testi spermatozoon plazma membranının biyokimyasal olarak aktif olup olmadığını test eder (Jeyendran ve ark 1984). Supravital boyalar spermatozoon plazma membranın fiziksel olarak sağlam olduğunu gösterir. Fiziksel olarak sağlam ancak biyokimyasal olarak inaktif olan plazma membranı fertilizasyonu sağlamada yetersizdir. Hücre membranının biyokimyasal aktivitesi hakkında fikir vermesi nedeniyle HOS testi supravital boyalara tercih edilir (Tartaglione ve Ritta 2004). HOS testi neticesinde kuyruk plazma membranı sağlam olan spermatozoonların muhtemelen baş plazma membranının da sağlam olabileceği kanısına (Jeyendran ve ark 1992) rağmen HOS değerleri sınırda olan ejakülatlarda supravital boyalar ile HOS testinin birleştirilmesi hatalı pozitif sonuçları azaltarak daha doğru bir tahmin olanağı sunmaktadır (Tartaglione ve Ritta 2004). Bu iki yöntemin birleştirilerek kullanılmasını ve böylelikle de aynı spermatozoon üzerinde ve aynı anda hem baş hem de kuyruk membranlarının durumunun belirlenmesinin yararlarını bildiren çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Corea ve Zavos 1994, Lagares ve ark 2000, Ducci ve ark 2002, Thundathil ve ark 2002, Tartaglione ve Ritta 2004). Bu çalışmada kullanılan HE testi de bu amaçla kullanılabilen hem supravital boyama ve hem de HOS testini birleştiren kombine bir test yöntemidir.

HOS testi çeşitli hayvan türlerinde ve insanlarda spermatozoonların membran bütünlüğünün belirlenmesinde başarıyla kullanılmasına rağmen, testin uygulanması için önerilen ozmotik basınç düzeyi türler arasında farklılık göstermektedir. Uygun ozmotik basınç insan sperması için 150 mOsm (Jeyendran ve ark 1984), boğa spermasında 150 mOsm (Kathiravan ve ark 2007), manda spermasında 150 mOsm (Shukla ve Misra 2007) koç spermasında 100 mOsm (Aisen ve ark 2005), aygır spermasında 25 – 100 mOsm (Neild ve ark 1999), köpek spermasında 60 mOsm (Kumi-Diaka 1993), tavşan spermasında 60 mOsm (Ducci ve ark 2002), geyik spermasında 100 mOsm (Fernandez-Santos ve ark 2006), domuz spermasında 150 mOsm (Gadea ve ark 1998) ve alabalık spermasında ise 100 mOsm (Cabrita ve ark 1999) olarak bildirilmiştir. Literatürde fare sperması için uygun HOS testi aralığını karşılaştırmalı olarak inceleyen bir çalışma olmadığı için bu araştırmada Swiss albino ırkı fareler için tanımlanan 20 – 160 mOsm'lük aralığın literatürdeki verilerle değerlendirme olanağı elde edilememiştir. Bu çalışmada 20 – 160 mOsm aralığında elde edilen % 52.3 ± 4.7 - 41.5 ± 5.7'lik kıvrık kuyruklu spermatozoon oranları Reddy ve ark (2006)'nın insan sperması için tanımlanan HOS test değerlerini kullanarak Swiss albino farelerde bildirdiği % 56.4 ± 0.9'luk orana yakın bulunmuştur.

Sunulan çalışmada ilk aşamada 20 – 160 mOsm aralığında elde edilmiş olan % 52.3 ± 4.7 - 41.5 ± 5.7'lik kıvrık kuyruk oranları uygun hipoozmotik basınca karşı manda spermasında elde edilen % 66.0 ± 1.2 (Shukla ve Misra 2007), aygır spermasında elde edilen % 69.0 ± 13.1 (Nie ve Wenzel 2001), tavşan spermasında elde edilen % 75.14 ± 6.5 (Ducci ve ark 2002) ve geyik spermasında belirlenen % 75.0 ± 3.0'lık (Fernandez Santos ve ark 2006) cevap oranlarından önemli ölçüde düşüktür. Fare spermasında diğer evcil hayvan türlerine ait spermalara göre elde edilen bu düşük HOS testi cevapları genel olarak fare spermatozoonlarının şişmesini zorlaştıran farklı bir hücre membranı ve hücre iskeleti bağlantısından kaynaklanmaktadır (Noiles ve ark 1997).

Çalışmanın ilk aşamasında 20 – 400 mOsm basınçtaki solüsyonlarda inkübe edilen spermatozoonlarda kıvrık kuyruk oranları osmotik basınca bağlı olarak önemli ölçüde değişmesine rağmen, başı boya alan spermatozoon oranları sabit kalmıştır. 400 mOsm düzeyindeki anizotonik solüsyonlarda inkübe edilen fare spermatozoonlarında motilite değerlerinde ve plazma membranı özelliklerinde önemli bir değişme olmadığı bildirilmesine rağmen (Koshimoto ve Mazur 2002), 75 mOsm'lük solüsyonlarda akrozom

ve plazma membranı bütünlüğü ve motilite değerleri farklı fare ırklarında değişik oranlarda olmak üzere olumsuz etkilenmiştir (Walters ve ark 2005). Bu çalışmada 20 – 400 mOsm'lük geniş bir spektrum içerisinde başı boya alan spermatozoon (Tip2 + Tip4) oranının istatistiksel olarak farklı olmaması, ancak aynı aralıklarda kıvrık kuyruklu spermatozoon (Tip1 + Tip2) oranının önemli ölçüde farklılık göstermesi; HOS testinin aslında spermatozoonların membran bütünlüğünü belirlemede supravital boyama tekniklerine göre ne oranda üstün olduğunu ya da supravital boyama yöntemlerinin bu amaçla ne denli yetersiz olduğuna işaret etmektedir.

Bu çalışmanın ikinci bölümünde HE testi sonuçları ile akrozom, baş, implantasyon bölgesi, orta kısım ve diğer tip anormal spermatozoonların görülme oranları arasında istatistiksel açıdan önemli bir korelasyon saptanamamasına rağmen sadece kuyruk anomalisine sahip spermatozoon oranları ile Tip1 spermatozoon oranları arasında negatif yönde önemli ($P<0.01$) bir korelasyon saptandı. Genel olarak insan spermasıyla yapılan çalışmalarda HOS testi sonuçları ile anormal spermatozoon oranları arasında bir korelasyon tespit edilmemiştir (Jeyendran ve ark 1984). Tip1 ve Tip2 spermatozoonlar ile karışabilen kıvrık kuyruklu spermatozoon anomalilerinin oranı % 5.44 ± 0,73 olarak tespit edilmiştir. Oranın düşüklüğü dikkate alındığına HE test sonuçlarını önemli ölçüde değiştirme olanağının olmadığı ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmada özellikle kuyruk anomalileriyle Tip1 spermatozoonlar arasında görülen negatif korelasyon, muhtemelen orta kısım anomalilerinin spermatozoonların hipoozmotik ortamda şişerek kıvrılmalarına mani olmasından ya da plazma membranının fonksiyonel bazı anomalileri ile birlikte olmasından kaynaklanabilir. Buna benzer bir gözlem daha önce Thundathil ve ark (2002) tarafından boğa spermalarında bildirilmiştir. Bu araştırıcılar akrozom anomalisi gözlenen boğa spermalarının HOS testi cevaplarının diğer boğalara oranla önemli ölçüde farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada % 40.6 ± 7.4 olarak elde edilen ortalama toplam anormal spermatozoon oranı Otubanjo ve Mosuro (2001)'nun farelerde bildirdiği %2-3 lük oranının ve Tyl ve Friedman (2003)'ın % 3.65'lik oranının çok üzerinde, Mudry ve ark (2006)'nın bildirdiği % 36.0 – 46.0'lık anormal spermatozoon oranına yakın olarak bulunmuştur.

Sunulan çalışmada canlı spermatozoon oranları ile HE testi sonuçları arasında herhangi bir korelasyon bulunamamıştır. Ducci ve ark (2002) tavşanlarda yaptıkları

çalışmalarda canlı spermatozoon oranı (toplam başı boya almamış kıvrık ve düz kuyruklu spermatozoon oranı) ile toplam kıvrık kuyruklu spermatozoon (toplam başı boya almış ve almamış kıvrık kuyruklu spermatozoon oranı) oranları arasında pozitif bir korelasyon tespit etmişlerdir. Sliwa (1993) farelerde yaptığı çalışmada ise canlı spermatozoon oranı ile hipoozmotik su testi sonucu şişmiş kıvrık kuyruklu spermatozoa oranı arasında pozitif bir korelasyon ($P<0.01$) tespit etmiş, ayrıca canlı spermatozoon ve şişmiş kıvrık kuyruklu spermatozoon oranlarının fare ırkları arasında da farklılık gösterdiğini bildirmiştir. Bu farklılığın muhtemelen kullanılan farklı HOS protokolleri ve ozmotik basınç nedeniyle oluştuğu söylenebilir. Çalışmada belirlenen % 63.2 ± 2.4 lük canlı spermatozoon oranı Songsasen ve Leibo (1998)'nun florosan boyama tekniği ile fare spermasında belirledikleri % 33.8 - 69.0'lık orana benzer bulunmuştur.

Sunulan tez çalışmasında servikal dislokasyon ile ötenazi yapılarak epididimisten elde edilen sperma örneklerinde ortalama motilite oranı % 48.9 ± 5.9 olarak tespit edilmiştir. Bu oran, Tada ve ark (1990), Tada ve ark (1993) ve Sliwa (1993)'nın elde ettiği % 70'in üzerindeki motilite oranlarına göre daha düşük, Songsasen ve Leibo (1998), Koyama ve Kamimura (2000) ve Tecirlioğlu ve ark (2002)'nın kauda epididimisten aldıkları ejakülatlardan motilite bulguları ile benzer, Tecirlioğlu ve ark (2002) ve Anderson ve ark (1983)'nın elektoejakülasyonla aldıkları ejakülatlarda elde ettikleri % 28'lik motilite değerinden yüksek olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada motilite düzeyleri ile HE testinde belirlenen Tip1 spermatozoonlar arasında pozitif yönde önemli ($P<0.05$), Tip2 spermatozoonlar ile negatif yönde önemli ($P<0.05$) ve Tip3 spermatozoonlar ile ise pozitif yönde ($P=0.05$) bir korelasyon tespit edilmiştir. HE testinde başı boya almamış toplam spermatozoon oranı (Tip1+Tip3) ile de yine motilite düzeyleri arasında önemli pozitif bir korelasyon ($P<0.05$) saptanmıştır. Benzer biçimde, Ducci ve ark (2002) tavşan spermasında HE testinde gözlenen Tip1 spermatozoon oranı ile motilite arasında bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Fare spermasında yapılan bir çalışmada (Sliwa 1993) ise motilite oranları ile hipoozmotik su testi sonucu şişmiş kıvrık kuyruklu spermatozoa oranı arasında bir korelasyon bulunamamıştır. İnsan sperması ile yapılan çalışmalarda motilite oranı ile HOS testindeki kıvrık kuyruklu spermatozoa oranı arasında pozitif bir korelasyon bildirilmiştir (Jeyendran ve ark 1984). Nield ve ark (1999) aygır sperması üzerinde yaptıkları bir araştırmada HOS test sonuçları ile taze spermanın motilite değerleri arasında pozitif bir korelasyon ($P<0.05$)

bulmalarına rağmen çözüm sonrası spermada bu korelasyonun ortadan kalktığını belirlemişlerdir. Köpek spermasında yapılan bir araştırmada ise motilite ve HOS test sonuçları arasında pozitif bir korelasyon ($P<0.0001$) bulunmuştur (Kumi-Diaka 1993). Corea ve Zavos (1994) dondurulmuş boğa sperması üzerinde yaptıkları araştırmada ise motilite ve HOS test sonuçları arasında pozitif bir korelasyon ($P<0.05$) olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç: Sunulan tez çalışmasında daha önce birçok evcil hayvan türüne ait spermalar için belirlenmiş olmasına rağmen farelerde henüz bilinmeyen HOS testi aralığı 20 - 400 mOsm'lük geniş bir spektrum çerçevesinde karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve HOS testi için farelerde 20 – 160 mOsm'lük aralığın uygun olduğu kanısına varılmıştır. Bu aralıktaki median grup olarak 80 mOsm'lük solüsyonlar içerisinde supravital boyama ile kombine edilmiş modifiye bir HOS testi olan HE testi uygulanarak aynı spermatozoon üzerinde hem kuyruk ve hem de baş membranlarının fonksiyonel bütünlükleri aynı anda belirlenebilmiş ve HE testi sonuçlarının bazı anormal spermatozoon tipleri (özellikle kuyruk) ve motilite düzeyleri ile korelasyon gösterdiği, ancak ölü – canlı spermatozoon oranlarıyla korelasyon göstermediği belirlenmiştir. HE testinin fare spermasının potansiyel fertilite düzeyinin belirlenmesi sırasında motilite, anormal spermatozoon oranı ve ölü-canlı spermatozoon oranı gibi diğer konvansiyonel parametrelerle birlikte kullanılmasının daha doğru sonuçlara ulaşılması açısından yeni olanaklar sunduğu kanısına varılmıştır.

6. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Dölerme ve Suni Tohumlama (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2007

Orhan AKMAN

Swiss Albino Irkı Farelerde Sperma Kalitesinin Belirlenmesi Amacıyla HOS Testi Sonuçları ve Diğer Spermatolojik Parametreler Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Swiss albino ırkı fare spermatozoonlarında plazma membranının bütünlüğünün belirlenmesi amacıyla klasik supravital boyama yöntemi ile kombine edilmiş modifiye bir hipoozmotik şişme testi (HOS) olan HE (HOS-Eosin - Y) testinin motilite, ölü-canlı ve anormal spermatozoon oranları gibi klasik spermatolojik parametrelerle olan korelasyonu araştırıldı. Çalışmada en az 12 haftalık dişi ve erkek fareler kullanıldı. Çalışma grubuna alınmadan önce erkek fareler in vivo fertilite düzeylerinin kontrol edilmesi amacıyla iki dişi fare ile çiftleştirilerek fertil oldukları ve gebelik sağlayabildikleri doğrulandı.

Çalışmanın ilk aşamasında HE testinin yapılması amacıyla uygun ozmotik basınç aralığının belirlenmesi amaçlandı. Erkek fareler servikal dislokasyonla ötenazi yapıldıktan sonra cauda epididimisleri ayrıldı ve sperma sıvı parafin ile örtülmüş Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) içerisinde toplandı. Alınan sperma 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 ve 400 mOsm'lük fruktoz solüsyonu içerisinde 30 dk süreyle inkübe edilerek, inkübasyon sonrası eosin – nigrosin boyası ile boyanıp toplam kıvrık kuyruklu ve boya almamış spermatozoon oranları belirlendi.

Bu aşamada 20, 40, 80, 120 ve 160 mOsm lük solüsyonlarda elde edilen şişme cevaplarının (% 52.3 ± 4.7 - 41.5 ± 5.7) istatistiksel olarak benzer olmasına rağmen, 180 – 400 mOsm gruptan önemli ölçüde yüksek olduğu saptandı. Bu nedenle bu aralıktaki (20 –

160 mOsm) median grup 80 mOsm olarak belirlendi ve çalışmanın ikinci aşamasında HE testi için bu osmotik basınç eşiği kullanıldı.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise 80 mOsm'de yapılan HE testi sonrasında kuyruk kıvrılması ve başın boya alması durumu dikkate alınarak spermatozoonlar 4 ayrı tip altında sınıflandırıldı. Buna göre Tip1: Boya almamış-kıvrık kuyruklu; Tip2: Boya almış-kıvrık kuyruklu; Tip3:Boya almamış-düz kuyruklu ve Tip4: Boya almış-düz kuyruklu olarak sınıflandırıldı. Yapılan korelasyon analizi motilite değerleri ile Tip1, Tip2 ve Tip3 spermatozoon oranlarının önemli ölçüde ($P<0.05$) korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Akrozom, baş, orta kısım anomalileri ile HE testi sonuçları arasında korelasyon bulunamazken kuyruk anomalileri ile Tip1 spermatozoon oranı arasında önemli bir negaif korelasyon saptanmıştır ($P<0.01$). Ölü-canlı spermatozoon oranları ile HE testi arasında herhangi bir korelasyon tespit edilememiştir.

Sonuç olarak, farelerde HOS testi için uygun ozmotik aralığın 20 - 160 mOsm olduğu belirlenmiş, bu aralıkta (80 mOsm) uygulanan HE testi sonucunda boya alan ve almayan spermatozoonlarda ayrı ayrı membran bütünlüğü belirlenebilmiş ve HE testi sonuçlarının bazı anormal spermatozoon tipleri (özellikle kuyruk) ve motilite düzeyleri ile korelasyon gösterdiği ancak ölü - canlı spermatozoon oranlarıyla korelasyon göstermediği belirlenmiştir.

7. SUMMARY

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Dölerme ve Suni Tohumlama (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2007

Orhan AKMAN

Use of HOS Test Results to Determine Sperm Quality

and Its Relationship with Other Spermatologic Parameters

in Swiss Albino Mice

The correlation between HE (HOS-Eosin-Y; a modified hypoosmotic swelling (HOS) test combined with supravital staining) test results with conventional sperm parameters i.e., motility, live-dead and abnormal sperm rate, was evaluated to estimate functional integrity of sperm plasma membranes in Swiss albino mice.

Male and female mice at least 12 weeks old were used in the experiments. Fertility level of each male was confirmed by mating tests in the cage with two females.

The first step of the study focussed on determination of the optimum range of osmotic pressure to provide maximum curled tail sperm rate (for HE test) which indicates swelling of the plasma membrane. Sperm was collected directly from caudal part of the epididymides from males sacrificed by cervical dislocation in Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) covered by paraffin oil. Sperm cells were exposed to 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 or 400 mOsm fructose solution for 30 minutes and the percentage of the curled tail and stained sperm cells after incubation were determined in the each group following eosin-nigrosin staining.

Although curled tail sperm rate were similar in 20, 40, 80, 120 and 160 mOsm groups, varied between 52.3 ± 4.7 and 41.5 ± 5.7 %, it was significantly higher compared to the curled tail sperm rate obtained in 180 – 400 mOsm group. Therefore, median group of 80 mOsm, between 20 – 160 mOsm, was selected for the HE tests to be performed in the following experiments.

In the second part of the study sperm cells were classified into four groups according to swelling status of the tail and eosin-Y exclusion as Type1:Unstained-curled tail; Type2: Stained-curled tail; Type3: Unstained-straight tail; Type4: Stained-straight tail.

Correlation analysis between HE test results and conventional sperm parameters indicated that individual motility score is correlated significantly with Type1, 2 and 3 sperms ($P<0.05$) in HE test. While the percentage of the sperm cells with acrosomal, head and mid-peace were not correlated with HE test results, the sperm rate with tail abnormality was negatively correlated with Type1 sperm cells ($P<0.01$). No significant relationship was determined between HE test results and the live-dead sperm ratio.

In conclusion, proper osmotic range for the HOS test in mouse sperm was determined as 20-160 mOsm. Functional integrity of the sperm plasma membranes could be determined separately both in live and dead sperm cells by means of 80 mOsm HE test which also correlated with certain type of sperm abnormalities (especially tail) and motility score but not with the live-dead sperm rate.

8. KAYNAKLAR

Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H and Venturino A (2005) *Ultramicroscopic and Biochemical Changes in Ram Spermatozoa Cryopreserved With Trehalose-Based Hypertonic Extenders*, Cryobiology, **50**, 239–249

Amann RP (1989) *Can The Fertility Potential of A Seminal Sample be Predicted Accurately?* J Androl, **10**, 89-98.

Anderson RA, Oswald C, Willis BR and Zanaveld LJD (1983) *Relationship Between Semen Characteristics and Fertility in Electroejaculated Mice,* J Reprod Fert, **68**, 1-7.

Avarey S, Bolton VM and Mason BA (1990) *An Evaluation of the Hypo-Osmotic Sperm Swelling Test as a Predictor of Fertilizin Capacity in In Vitro*, Int J Androl, **13**, 93-99.

Bousquet D and Brackett BG (1982) *Penetration of Zona-Free Hamster Ova as a Test to Assess Fertilizing Ability of Bull Sperm After Frozen Storage*, Theriogenology, **17**, 199-213.

Cabrita E, Alvarez R, Anel E and Herraez MP (1999) *The Hypoosmotic Swelling Test Performed with Coulter Counter: A Method to Assay Functional Integrity of Sperm Membrane in Rainbow Trout*, Anim Reprod Sci, **55 (3-4)**, 279-287.

Check JH, Nowroozi K, Wu CH and Bollendorf A (1988) *Correlation of Semen Analysis and Hypoosmotic Swelling Test with Subsequent Pregnancies*, Arch Androl, **20**, 251-255.

Cincik M, Ergur AR, Tutuncu L, Muhcu M, Kilic K, Balaban B and Urman B (2007) *Combination of Hypoosmotic Swelling=Eosin Y Test for Sperm Membrane Integrity Evaluation: Correlations with Other Sperm Parameters to Predict ICSI Cycles*, Arch Androl, **53**, 25–28.

Coetzee K, Krunger TF, Menkveld R, Lombard CJ and Swanson RJ (1989) *Hypoosmotic Swelling Test in the Prediction of Male Fertility*, Arch Androl, **23**, 131-138.

Correa JR and Zavos PM (1994) *The Hypoosmotic Swelling Test: Its Employment as an Assay to Evaluate the Functional Integrity of The Frozen-Thawed Bovine Sperm Membrane*, Theriogenology, **42**, 351-360.

Curry MR and Watson PF (1994) *Osmotic Effects on Ram and Human Sperm Membranes in Relation to Thawing Injury*, Cryobiology, **31**, 39-46.

Dewit M, Marley WS and Graham JK (2000) *Fertilizing Potential of Mouse Spermotozoa Cryopreserved in Medium Containing Whole Eggs*, Cryobiology, **40**, 36-45.

Ducci M, Gazzano A, Villani C, Cela V, Artini PG, Martelli F and Genazzani AR (2002) *Membran Integrity Evaluation in Rabbit Spermatozoa*, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, **102**, 53-56.

Evans G and Maxwell WMC (1987) *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goat*, Ed. G Evans and WMC Maxwell, Butterworths Pty Limited, Australia.

Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, García-Macías V, Esteso MC, Soler AJ, de Paz P, Anel L and Garde JJ (2006) *Extender Osmolality and Sugar Supplementation Exert a Complex Effect on the Cryopreservation of Iberian red deer (Cervus elaphus hispanicus) Spididymal Spermatozoa*, Theriogenology, doi:10.1016/j.theriogenology.2006.10.005 (Baskıda).

Gadea J, Matas C and Lucas X (1998) *Prediction of Porcine Semen Fertility by homologous In Vitro Penetration (hIVP) assay*, Anim Reprod Sci, **56**, 95–108.

Gilmore JA, Liu J and Critser JK (1996) *Activation Energies for Membrane Permability Characteristics of Human Spermatozoa*, Cryobiology, **33**, 633-634.

Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW and Critser JK (1995) *Effect of Cryoprotectant Solutes on Water Permeability of Human Spermatozoa*, Biol Reprod, **53**, 985-995.

Hafez ESE (2000) *Reproduction in Farm Animals*, Ed. ESE Hafez, 7th ed, WB Saunders Co, Phledelphia, USA.

IRDG-Industial Reproductive toxicology Discussion Group and CASA-Computer Assisted Sperm Analysis Group (2000) *Rat Sperm Morphological Assessment*, 1st ed, Rat Sperm Morphological Assessment Guideline Document.

Jacoby RO, Fox JG and Davisson M (2002) *Biology and Diseases of Mice* In "Laboratory Animal Medline" Ed. by Fox JG, Anderson LC, Loew FM and Quimbly FW, 35-119, Second Edition, Academic Press London UK.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG and Zaneveld LJD (1984) *Development of an Assay to Assess The Functional Integrity of the Human Sperm Membrane and Its Relationship to Other Semen Characteristics*, J Reprod Fertil, **70**, 219-228.

Jeyendran RS, Van der Ven HH and Zaneveld LJD (1992) *The Hypoosmotic Swelling Test: An Update*, Arch Androl, **29**, 105-116.

Kathiravan PJ, Kalatharan J, John Edwin M and Veerapandian C (2007) *Computer Automated Motion Analysis of Crossbred Bull Spermatozoa and Its Relationship with In Vitro Fertility in Zona-Free Hamster Oocytes*, Anim Reprod Sci, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.01.002 (Baskıda).

Katkov II, Katkova N, Critser JK and Mazur P (1998) *Mouse spermatozoa in High Consentrations of Glycerol: Chemical Toxicity vs Osmotic Shock at Normal and Reduced Oxygen Concentrations*, Cryobiology, **37**, 325-338.

Koshimoto C, Gamliel E and Mazur P (2000) *Effect of Osmolality and Oxygen Tension on the Survival of Mouse Sperm Frozen to Various Temperatures in Various Concentrations of Glycerol and Raffinose*, Cryobiology, **41**, 204-231.

Koshimoto C and Mazur P (2002) *Effect of Varming Rate, Temperature, and Antifreeze Protein on the Survival of Mouse Spermatozoa Frozen at an Optimal Rate*, Cryobiology, **45**, 49-59.

Koyama S and Kamimura S (2000) *Influence of Social Dominance and Famale Odor on the Sperm Activity of Male Mice*, Physiology & Behavior, **71**, 415-422.

Kremer J and Jager S (1990) *The Significans of the Zona-Free Hamster Oocyte test for the Evaluation of Male Infertility*, Fertil Steril, **54**, 509-512.

Kumi-Diaka J (1993) *Subjecting Canine Semen to the Hypo-osmotic Test*, Theriogenology, **39**, 1279-1289.

Lagares MA, Petzoldt R, Sieme H and Klug E (2000) *Assesing Equine Sperm-Membrane Integrity*, Andrologia, **32**, 163-167.

Mazur P (1990) *Equilibrium, Quasi-equilibrium, and Non-equlibrium Freezing of Mammalian Embryos*, Cell Biophys, **17**, 53-92.

Moore H, Dvorakova K, Jenkins N and Breed W (2002) *Exceptional Sperm Cooperation in the Wood Mouse*, Letters to Nature, **418**, 174-177.

Mudry DM, Palermo AM and Merani MS (2006) *Carballo MA. Metronidazole-induced alterations in murine spermatozoa morphology*, Reprod Toxicol, doi:10.1016/j.reprotox.2006.11.010 (Baskıda).

Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M and Aguero A (1999) *Hypoosmotic Test in Equine Spermatozoa*, Theriogenology, **51**, 721-727.

Nie GJ and Wenzel JGW (2001) *Adaptation of the Hypoosmotic Swelling Test to Assess Functional Integrity of Stallion Spermatozoal Plasma Membranes*, Theriogenology, **55**, 1005-1018.

Noiles EE, Thompson KA and Storey BT (1997) *Water Permability, L_p, of the Mouse Sperm Plasma Membrane and Its Activation Energy are Strongly Dependent on Interaction of the Plasma Membrane with the Sperm Cytoskeleton*, Cryobiology, **35**, 79-92.

Otubanjo OA and Mosuro AA (2001) *An In Vivo Evaluation of Induction of Abnormal Sperm Morphology by Some Antelmentic Drugs in Mice*, Mutation Research, **497**, 131-138.

Poyraz Ö (2000) Laboratuar Hayvanları Bilimi, Kardelen Ofset, Ankara.

Reddy SP, Pushpalatha T, Reddy PS (2006) *Reduction of Spermatogenesis and Steroidogenesis in Mice After Fentin and Fenbutatin Administration*, Toxicology Letters, **166**, 53–59.

Riedel HH, Hubner F, Ensslen SC, Bieniek KW and Grillo M (1989) *Minimal Andrological Requirement for In Vitro Fertilization*, Human Reprod, **4**, 73-77.

Schrader SM, Platek SF, Zanaveld LJD, Perez-Palaez M and Jeyendran RS (1986) *Sperm Viability: A Comparision of Analytical Methods*, Andrologia, **18**,530-538.

Schrader SM, Turner TW, Breinstein MJ and Simon SD (1988) *Longitudinal Study of Semen Quality of unexposedworkers*. Reprod Toxicol, **2**, 183-190.

Shukla MK and Misra AK (2007) *Effect of Bradykinin on Murrah buffalo (Bubalus bubalis) Semen Cryopreservation*, Anim Reprod Sci, **97**, 175–179.

Sliwa L (1993) *Usability of the Hypoosmotic Swelling "Water-test"- A Simple Method to Assess Sperm Membrane Integrity in Mouse Spermatozoa*, Folia Biol (Krakow), **41**, 29-31.

Somfai T, Bodo SZ, Nagy SZ, Gocza E, Ivancsics J and Kovacs A (2002) *Simultaneous Evaluation of Viability and Acrosome Integrity of Mouse Spermatozoa Using light Microscopy*, Biotechnic & Histochemistry, **77 (3)**, 117-120.

Songsasen N and Leibo SP (1997-a) *Cryopreservation of Mouse Spermatozoa. I. Effect of Seeding on Fertilizing Abilityof Cryopreserved Spermatozoa*, Cryobiology, **35**, 240-254.

Songsasen N and Leibo SP (1997-b) *Cryopreservation of Mouse Spermatozoa. II. Relationship Between Survival After Cryopreservation and Osmotic Tolarence of Spermatozoa from Three Strains of Mice*, Cryobiology, **35**, 255-269.

Songsasen N and Leibo SP (1998) *Live Mice Cryopreserved Embryos Derive In Vitro with Cryopreserved Ejaculated Spermatozoa*, Lab Anim Sci, **48 (3)**, 275-281.

Storey BT, Noiles EE and Thompson KA (1998) *Comparison of Glycerol, Other Polyols, Trehalose, and Raffinose to Provide a Defined Cryoprotectant Medium for Mouse Sperm Cryopreservation*, Cryobiology, **37**, 46-58.

Sztein JM, Noble K, Farley JS and Mobraaten LE (2001) *Comparison of Permeating and Nonpermeating Cryoprotectants for Mouse Sperm Cryopreservation*, Cryobiology, **41**, 28-39.

Tada N, Sato M, Amann E and Ogawa S (1993) *Effect of Pre-Freezing Equilibration and Phost-Thawing Centrifugation on the Fertilizing Capacity of Frozen Mouse Epididymal Spermatozoa*, Cryo-Letters, **14**, 195-206.

Tada N, Sato M, Yamanoi J, Mizorogi T, Kasai K and Ogawa S (1990) *Cryopreservation of Mouse Spermatozoa in the Presence of Raffinose and Glycerol*, J Reprod Fert, **89**, 511-516.

Tamuli MK and Watson PF (1992) *Effect of Temperature of Incubation on the Development of Resistance to Cold Stress and Hypoosmotic Stress in Boar Spermatozoa Incubated for up to 24 Hours*, Proc 12th Int Congr Anim Reprod, The Hague, The Nedherlands, Agust, 1484-1486.

Tartaglione CM and Ritta MN (2004) *Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen*, Theriogenology, **62**, 1245-1252.

Tecirlioğlu RT, Hayes ES and Trounson AO (2002) *Semen Collection of Mice: Electroejaculation*, Rerod Fertil Dev, **14**, 363-371.

Tekin ME (1998) Laboratuar Hayvanları Yetiştiriciliği Öğrenci Ders Notları, Konya.

Tekin N (1990) *Erkek Üreme Organlarının Muayenesi (Androlojik Muayeneler)*, In "Theriogenology" Ed. E Alaçam, 53-67, Nurol Matbaacılık AŞ, Ankara.

Thundathil J, Palasz AJ, Barth AD ve Mapletoft (2002) *Plasma Membrane Integrity and Acrosomal Integrity in Bovine Spermatozoa with Knobbed Acrosome Defect*, Theriogenology, **58**, 87-102.

Tuffery AA (1967) *The Mous*e In "The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals"Ed. by W Lane-Petter, AN Worden, BF Hill, JS Paterson, HG Vevers, 288-310, Third Edition E. & S. Livingstone Ltd, Edinburg and London.

Tyl RW and Friedman MA (2003) *Effects of acrylamide on rodent reproductive performance*, Reprod Toxicol, **17**, 1–13.

Van der Venn HH, Jeyendran RS, Al-Hasani S, Perez-Pelaez M, Diedrich K and Zaneveld LJD (1988) *Correlation between Human Sperm Swelling in Hypoosmotic Medium (Hypoosmotic Swelling Test) and In Vitro Fertilization*, J Androl, **7**, 190-196.

Walters EM, Men H, Agca Y, Mullen SF, Critser ES, Critser JK (2005) *Osmotic tolerance of mouse spermatozoa from various genetic backgrounds: Acrosome integrity, membrane integrity, and maintenance of motility*, Cryobiology, **50**, 193–205.

Woolley DM (2003) *Motility of the Spermatozoa at surfaces*, Reproduction, **126**, 259-270.

Yanagimachi R (1984) *Zona-Free Hamster Eggs: Their Use in Assessing Fertilizing Capacity and Examining Chrosomes of Human Spermatozoa*, Gamete Research, **10**, 187-232.

9. ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Nevşehir'in Acıgöl kasabasına bağlı Kozluca köyünde doğdu. Ailesiyle birlikte Nevşehir Merkez'e yerleştikten sonra ilk, orta ve lise eğitimini aynı şehirde tamamladı. 1995 yılında ÖSYM'nin düzenlediği sınav sonucu Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandı ve 2000 yılında bu fakülteden mezun oldu. Mezun olduğu sene aynı fakültenin Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında Doktora eğitimine başladı. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde açılan Araştırma Görevlisi Kadrosuna 2001 yılında atandı. Evli ve bir çocuk babasıdır.

10. TEŞEKKÜR

Doktora programım süresince tecrübe ve birikimlerinden faydalandığım sayın Prof. Dr. Kenan ÇOYAN, Prof. Dr. Melih AKSOY, Prof. Dr. Tevfik TEKELİ, Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN, Doç. Dr. Abdullah KAYA'ya teşekkür ederim. Yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Behiç COŞKUN, Prof. Dr. İlhami ÇELİK, Arş. Gör. Dr. Necdet Cankat LEHİMCİOĞLU, Arş. Gör. Dr. Emel GÜRBÜZ, Arş. Gör. Dr. Alper YILMAZ, Arş. Gör. Ali Doğan ÖMÜR ile Patoloji A.B.D. öğretim elemanları ve çalışanlarına şükranlarımı sunarım.

Bugüne kadar maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür edirim.