



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DAMIZLIK BOĞA SPERMASININ SERVİKAL MUKUS
PENETRASYON YETENEĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Derya ŞAHİN

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

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali DAŞKIN**

ANKARA

2021

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DAMIZLIK BOĞA SPERMASININ SERVİKAL MUKUS
PENETRASYON YETENEĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Derya ŞAHİN

DÖLERME ve SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali DAŞKIN

Bu tez TAGEM tarafından HAYSUD/2111 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
2021

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Damızlık boğa spermasının servikal mukus penetrasyon yeteneğinin değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak hazırlanmıştır. Tezimin fikir ve hipotezi tümüyle tez danışmanıma ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Derya ŞAHİN

Tarih: .../.../2021

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında Derya ŞAHİN tarafından hazırlanan “Damızlık Boğa Spermasının Servikal Mukus Penetrasyon Yeteneğinin Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10.06.2021

Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Raportör

Üye

Üye

Üye

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

Prof.Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Boğaların Spermatolojik Özellikleri	1
1.2. Spermanın Dişi Genital Kanalda Taşınması	2
1.2.1. Spermanın Servikste Taşınması	3
1.2.2. Spermanın Uterusta Taşınması	5
1.2.3. Spermanın Oviduktta Taşınması	7
1.3. Servikal Mukusun Yapısal Özellikleri	7
1.3.1. Servikal Mukusun Fiziksel Özellikleri	8
1.3.2. Servikal Mukusun Biyokimyasal Özellikleri	11
1.4. Servikal Mukus Penetrasyon Testi	15
2. GEREÇ ve YÖNTEM	18
2.1. Gereç	18
2.2. Yöntem	19
2.2.1. Hayvan Materyali	19
2.2.2. Spermanın Alınması ve İşlenmesi	19
2.2.3. Servikal Mukusun Toplanması ve Değerlendirilmesi	20
2.2.4. Servikal Mukus Penetrasyon Testi	21
2.2.5. Bilgisayar Destekli Sperma Analizi	23

2.2.6. Akım Sitometri Analizi	24
2.2.7. İstatistiksel Analiz	25
3. BULGULAR	26
3.1. Penetrasyon Aralığı Bulguları	26
3.2. Akım Sitometri Bulguları	27
3.3. Motilite Bulguları	31
3.4. Kinetik Parametre Bulguları	32
4. TARTIŞMA	35
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	46
ÖZET	48
SUMMARY	49
KAYNAKLAR	51
EKLER	67
Ek-1. Etik Kurul Belgesi	67
ÖZGEÇMİŞ	68

ÖNSÖZ

Suni tohumlama uygulaması hayvanlarda genetik ilerlemenin sağlanabilmesi, üstün vasıflı boğa yavrularının elde edilebilmesi ve çiftleşme yoluyla bulaşabilecek hastalıkların önlenmesi için oldukça önemlidir. Bu sebeplerle suni tohumlama uygulamalarında kullanılan dondurulmuş sperma üretimi kadar üretilen spermaların çözüm sonu kalite analizleri ve potansiyel fertilitenin belirlenmesi de gerekli ve önemlidir.

Servikal mukus anormal morfolojiye sahip spermatozoonlara karşı doğal bir bariyer olarak görev yapmakta, mukusu penetre etme yeteneğine sahip olmayan ve mukus içerisinde migrasyon gösteremeyen spermatozoonların ovumu dölleme yeteneğinden yoksun oldukları bilinmektedir. İnsan hekimliğinde fertilizasyon yeteneğinin belirlenebilmesi için yapılan pek çok çalışmada spermatozoonların potansiyel fertilite yetenekleri ve servikal mukus penetrasyon yetenekleri arasında korelasyon olduğu belirlenmiştir. Ayrıca insan sperması ile çalışan laboratuvarlarda fertilizasyon yeteneğinin belirlenmesinde rutin olarak servikal mukus penetrasyon testleri kullanılmaktadır.

Özellikle koç, teke ve boğa sperması kullanılarak yapılan çalışmalarda servikal mukus penetrasyon testleri 35 yılı aşkın süredir ilgi çekse de dondurulmuş boğa sperması üretim laboratuvarlarında rutin olarak kullanımı bulunmamaktadır. Ayrıca boğaların potansiyel fertilitelerinin belirlenmesinde kullanılan motilite ve morfoloji ağırlıklı analizler günümüzde tek başlarına yeterli olmamaktadır. Bu sebeple servikal mukus penetrasyon testinin, gelişmiş yöntemler olan akım sitometri ve bilgisayar destekli sperma analizi ile birlikte kullanılarak sperma üretim laboratuvarlarında rutin analiz haline getirilebileceğinin ortaya konulması tez çalışmasının temel amacı olmuştur.

Tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesi aşamalarında bana yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Ali DAŞKIN' a, eş danışman hocam Prof. Dr. Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU' na, desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet Borge TIRPAN, Dr. Öğr. Üyesi Koray TEKİN, Arş. Gör. Beste ÇİL ve Dr. Ufuk KAYA'ya, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nın tüm akademik ve idari personeline; doktora sürecim boyunca beni asla yalnız bırakmayan, destek ve emeklerini esirgemeyen Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi, Biyoteknoloji ve Fizyoloji Bölümü, Suni Tohumlama Şubesi mesai arkadaşlarım Dr. Fırat KORKMAZ, Seher ŞİMŞEK, Ali ŞİMŞEK ve Dr. İlktan BAŞTAN'a, tüm hayatım boyunca bana yol gösteren, beni bugünlere getiren, emek ve desteklerini esirgemeyen kıymetli ailem; Babam Turan ŞAHİN ve Annem Fadime ŞAHİN'e teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
Ω	: Ohm
%	: Yüzde
°C	: Degree Celsius (Santigrat Derece)
~	: Yaklaşık
ALH	: Lateral Head Displacement (Sperm Başının Yanal Sapma Genliği)
BCF	: Beat Cross Frequency (Çapraz Geçiş Frekansı)
CASA	: Computer Aided Sperm Analyser (Bilgisayar Destekli Sperma Analiz Cihazı)
CCD	: Charge Coupled Device (Şarj Bağlantılı Cihaz)
cm	: Centimetre (Santimetre)
dk	: Dakika
DMMP	: Düşük Mitokondriyal Membran Potansiyeli
DNA	: Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
FITC-PNA	: Flurescein Isothiocyanate Conjugated Peanut Agglutinin (Floresan İzosiyanata Bağlı Aglutinin)
Hz	: Hertz
ICSI	: Intra-Cytoplasmic Sperm Injection (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu)
IVF	: In vitro fertilizasyon
JC-1	: 5,5', 6,6'-tetrakloro-1,1', 3,3' tetraetil benzimidazolilkarbosiyanin iyodit
LH	: Luteinleştirici Hormon
LIN	: Linearity (Eğrisel Yol Doğrusallığı)
mg	: Miligram

ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MMP	: Mitokondriyal Membran Potansiyeli
nm	: Nanometre
PA	: Penetrasyon Aralığı
PBS	: Phosphate Buffer Saline (Fosfat Tampon Solüsyonu)
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojen Basıncı)
PI	: Propidium Iodide (Propidyum İyodid)
PKT	: Post Koital Test
PM	: Progresif Motilite
PMAB	: Plazma Membran Akrozom Bütünlüğü
PMN	: Polimorfonükleer Hücre
SMPT	: Servikal Mukus Penetrasyon Testi
SSMPT	: Sperma Servikal Mukus Penetrasyon Testi
sn	: Saniye
STR	: Straightness (Doğrusallık)
Std.	: Standart
TLR	: Toll Like Receptore
TM	: Total Motilite
VAP	: Velocity Average Path (Ortalama Yörünge Hızı)
VCL	: Velocity Curve Linear (Eğrisel Hız)
VSL	: Velocity Straight Line (Doğrusal Hız)
YMMP	: Yüksek Mitokondriyal Membran Potansiyeli
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µm/s	: Mikrometre/Saniye

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. RI (Kırılma indeksi) gradyanına dayalı sığır spermatozoonunun 3 boyutlu modeli	1
Şekil 1.2. Serviks üzerindeki mikrolukların mikroskopik görünümü	5
Şekil 1.3. Servikal mukusun eğrelti otu görünümü	10
Şekil 1.4. Sims-Huhner testi örneği.	15
Şekil 2.1. A- Draminski dedektörü ile vaginal elektriksel direnç ölçümü, B- Servikal mukus toplama işlemi	20
Şekil 2.2. A-Spermanın çözdürülüp steril tüplere aktarılması, B- Payetlerin SMPT için hazırlanması, C- SMPT uygulanıp dondurulmuş payetler	22
Şekil 3.1. İsviçre Esmeri ırkı boğalara ait sperma numunelerinin plazma membran ve akrozom bütünlüğü analizi (PMAB) ile mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) analizi.	29

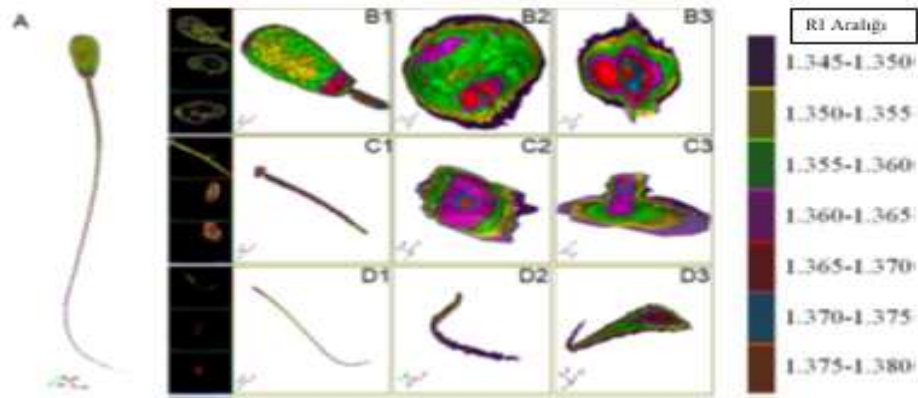
ÇİZELGELER

Çizelge 1.4. Mukoproteinlerin sınıflandırılması	12
Çizelge 2.1. Penetrasyon aralıklarının belirlenmesi amacıyla işaretlenen bölgeler	22
Çizelge 2.2. Penetrasyon aralığı 3 (PA3) (50,0 – 52,5 mm) spermatozoon sayısına göre gruplandırma	23
Çizelge 3.1. Penetrasyon aralığı bulguları.	26
Çizelge 3.2. Akım sitometri analiz bulguları	27
Çizelge 3.3. Motilite bulguları	31
Çizelge 3.4. Kinetik parametre bulguları	32

1. GİRİŞ

1.1. Boğaların Spermatolojik Özellikleri

Spermatozoa, testislerin seminifer tübüllerinde, spermatogenezis sonucu oluşan ve erkeğe ait genetik materyal taşıyan üreme hücreleri olarak tanımlanmaktadır (Senger,1999). Spermatozoonun yaklaşık uzunluğunun boğalarda 68-70 mikron olduğu bildirilmektedir (Coppola ve ark., 2013). Genel olarak spermatozoonun yapısal kısımları, akrozom ve nükleusu taşıyan baş kısmı (8-10 mikron), mitokondriumları içeren orta kısım (8-10 mikron) ve hareketi sağlayan kuyruk (50 mikron) olmak üzere üç ana bölümden oluşmaktadır (Şekil 1.1) (Demirhan ve ark., 2020; Di Caprio ve ark., 2015; Friedrich ve ark., 2010; Hafez ve Hafez, 2000 ve Jiang ve ark., 2019). Spermatozoonun bu üç ana bölümünde hücrenin yaşamsal fonksiyonlarını etkileyen komponentler bulunmaktadır. Bu yapısal komponentler hücrenin kriyoprezervasyonu sırasında ısı ve ozmotik şoklara karşı yanıt oluşturulmasında görev almaktadırlar (Correa ve ark., 1997; Grötter ve ark., 2019 ve Nagy ve ark., 1999).



Şekil 1.1. RI (Kırılma indeksi) gradyanına dayalı sığır spermatozoonunun 3 boyutlu modeli. A- Farklı RI aralıklarında görselleştirilmiş tam sığır spermatozoonunun 3D RI tomogramı; B1'den B3'e- Çeşitli perspektif açılarından görüntülenen spermatozoon başı; C1 ila C3- Çeşitli perspektif açılarından görüntülenen spermatozoon orta parçası; D1'den D3'e- Çeşitli perspektif açılarından görülen spermatozoon kuyruğu. Farklı RI aralıklarına sahip kuru madde kütlesi dijital olarak renk kodlu olarak belirtilmektedir (Jiang ve ark., 2019).

Kriyoprezervasyon işleminden önce spermatolojik incelemelerin yapılması önemli ve gerekli görülmektedir (Chong ve ark., 1983; Grötter ve ark., 2019 ve Tekin ve Daşkın, 2019). Makroskobik ve mikroskobik olarak iki ana grupta toplanan bu incelemelerde makroskobik olarak, yetişkin bir boğanın sperma hacminin ortalama 2-8 ml arasında olduğu, yumurta sarısının kokusunu andıran çok hafif aromatik bir kokuya sahip olduğu, farklı türlerde spermanın pH'sı 6,9-7,5 arasında değişmekle birlikte boğalarda nõtrem yakın değerde olduğu bildirilmektedir (Carr ve ark., 1985; Contri ve ark., 2013; Hafez ve Hafez, 2000 ve Yavaş ve Daşkın, 2012). Mikroskobik özellikler olarak, ortalama %70-80 total motilite, 1×10^9 /ml spermatozoon yoğunluğu ve %20 morfolojik bozukluğa sahip olabilecekleri belirtilmektedir (İleri ve ark., 1998 ve Taş, 2003). Bu değerlendirmelerin temel amacı suni tohumlama uygulamasında kullanılacak sperma kalitesinin belirlenmesidir (İnanç ve ark., 2018; Morrell ve ark., 2018 ve Tekin ve ark., 2016). Spermatolojik özellikler ve sperma kalitesi fertilitite potansiyelinin belirlenmesiyle ilişkilendirilmektedir (Nongbua ve ark., 2020 ve Tekin ve ark., 2019). Taze boğa spermasında motilitenin yaklaşık %50 ve morfolojik bütünlüğe sahip spermatozoon oranının ise %80'den fazla olması gerektiği belirtilmektedir (Hafez ve Hafez, 2000). Motilite ve morfolojik özelliklerin spermatozoonların dişi genital kanalda ilerlemelerini önemli oranda etkilediği bildirilmektedir (Gomez ve ark., 2011; Mann ve ark., 1956 ve Tourmente ve ark., 2011).

1.2. Spermanın Dişi Genital Kanalda Taşınması

Ejakülasyon sırasında dişi genital kanala çok sayıda spermatozoon bırakılmakta, ancak daha azının oosite ulaşması mümkün olmaktadır (Mattner ve ark., 1966 ve Yaniz ve ark., 2015). Dişi genital kanalında spermatozoonların, farklı fiziksel engelleri aşmak ve immünolojik etmenlerle karmaşık etkileşimlere girmek zorunda olduğu belirtilmektedir (Kawano ve ark., 2014 ve Schubert ve ark., 2008). Bu zorlu engelleri aşmak ve oosite ulaşmak için, ejakülat içerisindeki alt popülasyonları oluşturan spermatozoonların bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir (Holt ve Fazeli, 2016 ve Vincente ve ark., 2013). Alt popülasyonlar motilite, DNA

fragmentasyon durumu, morfoloji gibi birçok özellik ile karakterize edilmektedir (Garcia-Herreros ve Leal, 2014 ve Hernandez-Caravaca ve ark., 2015). Dişi genital kanalın spermatozoonları bu özelliklerine göre filtrelediği, normal morfolojiye ve güçlü motiliteye sahip spermatozoonların başarılı olarak döllenme bölgesine ulaşabileceği şekilde fiziksel ve kimyasal olarak kendisini düzenlendiği bildirilmektedir (Garcia-Vazquez ve ark., 2016).

Çiftleşme sırasında boğa, koç, teke ve insan gibi türlerde sperma dişi genital kanala doğal aşım ile aktarıldığında vajinanın kranialine, suni tohumlama uygulamasında ise serviks, korpus uteri ya da kornu uteriye bırakılmaktadır (Lopez-Gatius, 2000; Senger, 1999 ve Vishwanath, 2003). Dolaysı ile doğal aşım yoluyla vajinaya bırakılan spermatozoonlar serviksi aşmak zorunda kalmaktadırlar (Mullins ve Saacke, 1989 ve Suarez ve Pacey, 2006).

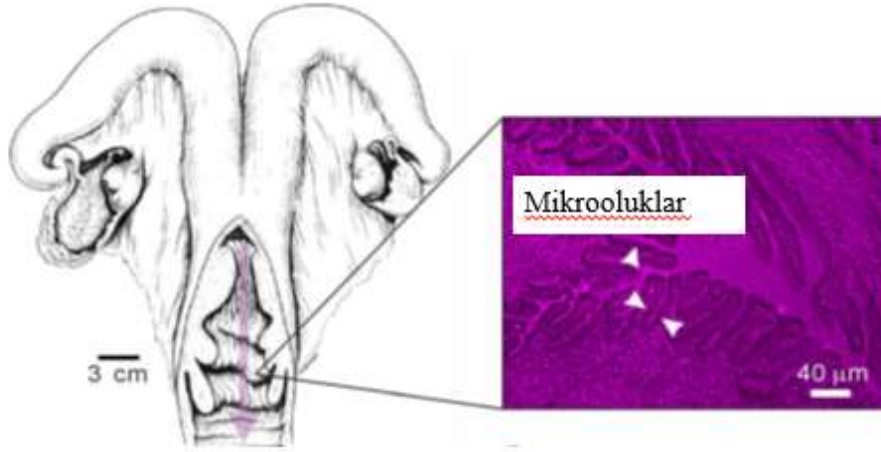
1.2.1. Spermanın Servikte Taşınması

Spermatozoonların dişi genital kanalda karşılaştıkları ilk fiziksel engel servikstir (Blair ve ark., 1941). İneklerde, yaş, ırk ve doğum yapmış ya da yapmamış olmasına bağlı olarak değişmekle birlikte serviks 8-10 cm uzunluğundadır. Serviks yapısında fibröz ve kıvrımlı halkalar ile çok sayıda küçük kör keseler ve silliumlar barındırmaktadır (Senger, 1999). Serviksin en önemli görevlerinden birisi de endoservikte bulunan bezler aracılığıyla servikal mukus üretmektir. Servikten uterusa ulaşmaya çalışan spermatozoonlara kendi motilitelerinin yanısıra servikal mukusta yardımcı olmaktadır. Servikal mukusla birlikte spermatozoonlar serviks içerisinde hareket ederken, serviks ölü ve anormal spermatozoonları eleyerek filtre gibi davranmaktadır (Katz ve ark., 1997; Mattner, 1966 ve Suarez ve Pacey, 2006). Ruminantların serviksi çok belirgin halkalar ve mukozal kıvrımlar bulundurmakta, bu kısımlardan üretilen servikal mukus spermatozoonları hapsederek bir nevi depo görevi görmektedir (İleri ve ark., 2002; Mattner, 1966 ve Mullins ve Saacke, 1983). Serviksin ve servikal mukusun spermatozoonları vajinanın zorlu ortamından ve fagositozdan korumak, kapasitasyona katılmak, ovulasyona yakın zaman diliminde dişi genital kanalı spermatozoon penetrasyonuna açık ve uygun hale getirmek gibi görevlerinin de

bulunduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Bigelow, 2004 ve Garcia-Vazquez ve ark., 2016).

Servikal mukus, su ve üç boyutlu bir ađ oluşturan katı bileşenler içeren bir hidrojel olup, düşük ve yüksek viskoziteli bileşenlerin varlığı nedeniyle heterojen yapıdadır (Carlsteadt ve Sheehan, 1984 ve Carlsteadt ve Sheehan, 1989). Servikal mukus, viskozite, akış elastikiyeti, spinnbarkeit (uzayabilme), tiksotrofi ve yapışkanlık gibi reolojik özelliklere sahiptir (Layek ve ark., 2013; Rutllant ve ark., 2005 ve Tung ve ark., 2017). Spermatozoon motilitesinin yanı sıra servikal mukusun bu mikroreolojik ve makroreolojik özellikleri fertilizasyon zamanına yaklaştıkça spermatozoon penetrasyon ve migrasyonuna uygun bir yapıya dönüşerek spermatozoonların serviksi geçmelerinde yardımcı olmakta, östrus döngüsünün diğer evrelerinde ise spermatozoon geçişine engel olmaktadır (Baumber ve ark., 2002; Hunter, 1995; Ma ve ark., 2016; Miki ve Clapham, 2013 ve Suarez, 2006).

Spermatozoon kuyruğunun atım ve titreşim hareketlerine bağlı olarak spermatozoon başı, direnci östrusun diğer evrelerine göre azalmış olan servikal kanallarda ileri doğru itilmektedir (Pluta ve ark., 2011). Hidrodinamik prensipler hareket halinde olan spermatozoonları etkilemekte böylece, büyük hareketli nesneleri etkileyen eylemsizlik kuvvetinden etkilenmek yerine spermatozoonlar, ortamın viskoz kuvveti ile dinamik bir dengede bulunmaktadır (Druart, 2012; Tung ve ark., 2015 ve Tung ve ark., 2017). Deneysel kanıtlara göre, sıvı akışı ve yüzeyler birlikte hareket ederek spermatozoonların dişi genital kanalın bölümlerinden geçmelerine yardımcı olmaktadır (Ma ve ark., 2016; Mullins ve Saacke, 1989 ve Wrobel ve ark., 2014). Bu durumu en iyi açıklayan örneğin vajinadan uterusu kadar devam eden tüm kanal boyunca yüzeyde bulunan mikrooluklar olduğu belirtilmektedir (Tung ve ark., 2014 ve Tung ve ark., 2015). Mikroolukların yaklaşık olarak spermatozoon başı büyüklüğünde olduğu ve servikal kanal içeriindeki sıvı akışından spermatozoonları koruyarak uterusu doğru yönlendirdiği bildirilmektedir (şekil 1.2) (Suarez, 2015).



Şekil 1.2. Sığır dişi genital kanalı (Roberts ve ark., 1986); Mikrooolukların hemotoksilin ile boyanmış ve donmuş kesiti (Suarez ve ark., 1997).

Her ne kadar spermatozoonlar servikal kanal içerisindeki sıvı akışında rastgele hareket ediyor gibi görünse de, servikal mukus lifleri boyunca en az direnç gösteren yolu takip ettikleri düşünülmektedir (Richardson ve ark., 2011). Spermatozoonlar servikal mukus içerisine parmak benzeri çıkıntılar halinde nüfuz etmektedirler. Parmaksı yapı oluşumu, sperma ve servikal mukus arasındaki yüzey alanını artırma ve uterusu spermatozoon göçünü kolaylaştırma işlevi görebilmektedir (Moghissi ve ark., 1964).

1.2.2. Spermanın Uterusta Taşınması

Sperma ve uterus etkileşiminde memeli uterusu çift yönlü olarak görev yapmaktadır (Hawk, 1983). Bu görevlerden ilki spermatozoonların uterustan taşınmasına miyometriyumun proovaryan kasılmaları ile yardımcı olmaktır. Diğerleri ise anormal morfolojiye sahip, ölü ve sayıca fazla olan spermatozoonları immün yanıt ve kasılmalar yardımıyla uzaklaştırmaktır (Hafez ve Hafez, 2000; Kunz ve ark., 1996 ve Lyons ve ark., 1991).

Ultrasonografi ve elektromiyografi yöntemleriyle yapılan çalışmalarda inek (Ruckebusch ve Bayard, 1975), koyun (Hawk, 1983) ve insanda (Lyons ve ark., 1991 ve Kunz ve ark., 1996) östrus döneminde uterusu kasılmalar olduğu bildirilmekte,

kasılmaların luteal fazda azaldıkları belirtilmektedir. Dişi genital kanalda sperma varlığının da bu kasılmaları indüklediği bildirilmektedir (Senger, 1999 ve Yanagimachi, 1996). Uterusta gerçekleşen kasılmaların sperma-servikal mukus karışımını uterusu çekerek, spermatozoonların kasılma ve servikal mukus yardımıyla uterus boşluğu boyunca taşınmalarına yardımcı olduğu belirtilmektedir (Kunz ve ark., 1996 ve Suarez ve Pacey, 2006). Uterusun gebeliğin oluşması ve sürdürülebilmesinde çeşitli görevleri bulunmakta, bu görevler dahilinde bağışıklık sisteminde antijenik olarak kabul edilen spermatozoonları tolere ederek, uterusu taşınmalarına yardımcı olduğu belirtilmektedir (Bazer ve ark., 2010; Katila, 2012 ve Rath ve ark., 2008).

Uterus, maruz kaldığı çeşitli antijenlere etkili bir şekilde yanıt verebilecek, iyi geliştirilmiş ve sıkı bir şekilde kontrol edilen bir bağışıklık sistemi ile donatılmıştır (Ezz ve ark., 2019 ve Quayle, 2002). Uterusta bulunan spermatozoonlar antijenik olarak kabul edilmektedir. Bu sebeple bağışıklık sistemi devreye girmekte ve çoğunluğu polimorfonükleer hücrelerden (PMN'ler) oluşan hızlı ve geçici bir lökosit infiltrasyonu ile karakterize immun yanıt oluşturulmaktadır (Elweza ve ark., 2018 ve Koga ve Mor, 2008). PMN'lerin uterusu ölü, kusurlu ve fazla spermadan arındırmak için gerekli olduğu düşünülmektedir (Oliveira ve ark., 2014a). Spermanın uterusu temizlenmesinin oluşan immun tepkinin süresini kısalttığı düşünülmektedir (Katila, 2012). PMN'ler spermatozoonları genellikle doğrudan fagosit ederek uterusu uzaklaştırmaktadır (Alghamdi ve ark., 2009).

Sığır uterusu ve sperması arasındaki immun etkileşimin nasıl gerçekleştiği ile ilgili bilgiler sınırlı olmakla birlikte, günümüzde de araştırılmaya devam etmektedir (Elweza ve ark., 2018 ve Ezz ve ark., 2019). Spermanın sığır oviduktal epitelyumu ile nasıl etkileşime girdiği hakkında daha fazla şey bilinmektedir (Elweza ve ark., 2018). Spermatozoonların ovidukt kanalı epitel hücrelerine bağlanmasının bir antiinflamatuvar ortam oluşturduğunu ve spermatozoon fagositozunu baskıladığı bildirilmektedir (Marey ve ark., 2014 ve Yousef ve ark., 2016).

1.2.3. Spermanın Oviduktta Taşınması

Memelilerde spermatozoonların ovidukt kanalına girdikten sonra fertilizasyon bölgesine ulaşabilmeleri için taşınmaları gerekmektedir (Harper, 1973 ve Rodriguez - Martinez, 2007). Ovidukt kanalına giren spermatozoonlar buradaki epitel hücrelerine bağlanarak hem sperma fagositozuna karşı antiinflamatuvar ortam oluşturmakta hem de spermatozoon rezervuarı oluşturulmasını sağlamaktadırlar (Guidobaldi ve ark., 2012; Suarez, 2015 ve Yousef ve ark., 2016).

Spermatozoonların oviduktta taşınmalarında birkaç mekanizmanın ortak hareket ettiği düşünülmektedir (Guidobaldi ve ark., 2012). Ovidukt kanalındaki peristaltik ve antiperistaltik kasılmalar, oviduktal sıvı akımı, kemotaksis, termotaksis gibi çeşitli mekanizmaların spermatozoonların fertilizasyon bölgesine ulaşmasında etkili olduğu bildirilmektedir (Bahat ve ark. 2003; Eisenbach ve Giojalas, 2006; Guidobaldi ve ark., 2008 ve Teves ve ark., 2006).

Bu mekanizmaların işleyişinde ovaryumlardan salgılanan hormonların da etkili olduğu belirtilmektedir (Senger, 1999). Hormonlar serviks, uterus ve oviduktal epitelin yapısını, dişi genital kanaldaki kasılma aktivitesini ayrıca servikal mukus, uterus ve oviduktal sekresyonların kimyasal ve fiziksel yapılarını değiştirmekte ve düzenlemektedir (Hunter ve Wilmot, 1984; Rutlant ve ark., 2005 ve Suarez ve Pacey, 2006). Dişi genital kanalda üretilen ve salgılanan servikal mukus ve sekresyonların yapısındaki değişimler spermatozoonların ovidukta, sonrasında da fertilizasyon bölgesine ulaşmasını etkilemektedir (Druart, 2012 ve Hunter ve ark., 1983).

1.3. Servikal Mukusun Yapısal Özellikleri

Spermatozoonların dişi genital kanalda karşılaştıkları ilk medyum servikal mukustur (Blair, 1941). Servikal mukusun yapısı östrus evrelerinde spermatozoonların dişi genital kanalında ilerlemelerini ve taşınmalarını etkileyecek şekilde fiziksel ve

biyokimyasal olarak değişikliklere uğramaktadır (Cortes ve ark., 2014). Luteal fazda servikal kanalda bulunan mukusun miktarı ve hidrasyonu azalırken, viskozitesi artmakta böylece spermatozoon göçünü engellemektedir. Ovulasyon döneminde ise servikal mukus, morfolojik olarak sağlam ve motil spermatozoonların geçişine izin verecek yapıdadır (Dubey ve ark., 2016).

1.3.1. Servikal Mukusun Fiziksel Özellikleri

Servikal mukusun yapısı östrus döngüsünün her döneminde hormon seviyelerindeki farklılıklardan dolayı değişiklik göstermektedir. Ovulasyon zamanına yakın dönemde veya hemen sonrasında servikal mukus akışkan, berrak, esnek ve ince yapıda, luteal fazda ise akışkanlığı azalmış veya kaybolmuş, bulanık, esnelikten yoksun ve katı kıvamlı olarak tanımlanmaktadır (Layek ve ark., 2013 ve Rutllant ve ark., 2005). Bununla birlikte ovulasyon zamanına yakın dönemde elde edilen servikal mukusun rengi berrak, yapısı lifli ve kısmen yumurta akı görünümündedir. Dışiden elde edilen mukus berrak, bulanık ve tortulu olmak üzere üç şekilde değerlendirilmektedir (Siregar ve ark., 2017). Genellikle bazık karakterde olan pH değeri ise yaklaşık 7,8 olarak bildirilmektedir (Hanumant ve ark., 2019).

“Reoloji, belirli bir sistemin akış ve deformasyon özelliklerinin incelenmesidir” (Rutllant ve ark., 2005). Servikal mukusun fiziksel yapı özelliklerinin ve moleküler değişikliklerin bu yapı üzerine etkilerinin belirlenmesi, servikal mukusun reolojik özelliklerinin incelenmesinde önemli yol göstericiler olarak kabul edilmektedir (Siregar ve ark., 2017). Servikal mukusun kıvamını belirlemek için 2-3 damla servikal mukus lam üzerine damlatılmakta, 45° eğim verilen lam üzerindeki mukusun hareketi gözlemlenmekte, sonrasında ince, orta ve kalın olarak değerlendirilmektedir (Hanumant ve ark., 2019). Kıvam ve uzama değeri gibi reolojik değerler özellikle spermatozoon-mukus etkileşimi, dışinin östrus siklusunun hangi döneminde olduğunun belirlenmesi, fertilizasyon ve döl tutmayı etkileyen sağlık problemleriyle ilişkilendirilmektedir (Blair ve ark., 1941; Lofstedt ve ark., 1991; Rangnekar ve ark., 2002; Rutllant ve ark., 2005 ve Zaman ve ark., 2013).

Uzama değeri (Spinnbarkeit) ovulasyon döneminde en yüksek değere ulaşmaktadır. Östrojenlerin etkisiyle, servikal mukusun miktarı artmakta, berrak ve elastik bir hal almaktadır (Hanumant ve ark., 2019). Ovulasyon döneminde yumurta akı görünümü ve benzer yapısında olan servikal mukus spermatozoon migrasyonu için oldukça elverişli olarak değerlendirilmektedir (Druart ve ark., 2012). Ovulasyondan sonra, servikal mukusun yapısı değişmekte ve progesteron etkisi altında kalın, yapışkan ve uzayabilme yeteneğinden yoksun bir hal almaktadır (Brunelli ve ark., 2007 ve Lee ve ark., 2002). Uzama değerinin belirlenebilmesi için lam üzerine 2-3 damla servikal mukus damlatılmakta ve üzerine başka bir lam kapatılmaktadır. Servikal mukus uzantısı kopana kadar lamlar birbirinden uzaklaştırılmakta bu esnada incelen servikal mukus uzantısından cm cinsinden ardışık ölçümler alınmaktadır. Ölçülen değerlerin ortalaması mukusun uzama değerini vermektedir. 12 cm ve üzeri uzama değerine sahip mukus, tohumlama ve penetrasyon testleri açısından uygun olarak değerlendirilmektedir (Bennur ve ark., 2004; Hanumant ve ark., 2019 ve Sharma ve ark., 2008).

Kristalizasyon ve parmak benzeri çıkıntılarının oluşturduğu, eğrelti otu görünümü servikal mukusun yapısının belirlenmesinde önem taşımaktadır. Bu görünümü elde etmek için lam üzerine bir damla servikal mukus damlatılmakta ve kurutulup daha sonrasında mikroskopta x10 büyütme altında tipik, atipik ve olumsuz olarak üç şekilde değerlendirilmektedir (Luktuke ve Roy, 1967). Servikal mukus içerisindeki tuz ve organik bileşenlerden dolayı eğrelti otu deseni oluşturmakta, oluşan bu yapının spermatozoon yaşayabilirliği ve migrasyonunu desteklediği böylece gebe kalma oranını olumlu yönde etkilediği belirtilmektedir (Galhotra ve ark., 1971 ve Sharma ve ark., 2008). Fertilite bakımından sağlıklı dişilerden alınan servikal mukusun eğrelti otu deseni oluşturacağı ve ovulasyon zamanında elde edildiğinin bir göstergesi olduğu dolayısıyla dişilerin bu belirtiler ışığında tohumlamaya uygun oldukları ifade edilmektedir (Şekil 1.3) (Hanumant ve ark., 2019).



Şekil 1.3. Servikal mukusun eğrelti otu görünümü. İsviçre Esmeri ırkı sığırdan östrusun 0-12. saat arasında toplanan servikal mukusun faz-kontrast mikroskopta x10 büyütme ile CCD kamera ile çekilen görüntüsü.

Östrus siklusu boyunca östradiol ve progesteron seviyeleri değişmekte, bu değişikliklerde servikal mukusun iyon içeriğini özellikle NaCl oranını etkilemektedir (Hondmode ve Pachlag, 1973). İyonlar servikal mukusa elektriksel kondüktivite sağlamakta, tuz oranının artması elektriği iletme kuvvetini arttırmaktadır (Bartlewski ve ark., 1999). Servikal mukusun elektriksel direncinin ölçülmesi, sığır (Ahmed ve ark., 2017 ve Agbugba ve ark., 2019), manda (Biradar ve ark., 2016), koyun (Bartlewski ve ark., 2015) ve keçide (Triagil ve ark., 2020) östrus tespiti ve tohumlama zamanının belirlenmesi için kullanılmaktadır. Servikal mukusun elektriksel direnci luteal fazda yüksek değerlere sahipken, ovulasyon zamanına yaklaştıkça azalmaktadır. En düşük direnç değerleri, östrojen pik noktasından ve östrus başlangıcından birkaç saat sonra LH pikine denk gelmektedir. LH pikinden sonra, elektriksel direnç artmaktadır (Ahmadi ve ark., 2007 ve Meena ve ark., 2003). Elektriksel direnci ölçmek için vaginal prob bulunduran çeşitli dedektörler kullanılmakta, mukus direnci ohm (Ω) veya unite cinsinden ifade edilmektedir (Ahmed ve ark., 2017; Çevik ve ark., 2010 ve Jotanovic ve ark., 2011). Tohumlama için yaklaşık 180 Ω değerinin uygun olduğu,

280 Ω ve üzeri elektriksel direnç değerine sahip dişilerden gebelik elde etmenin güç olacağı belirtilmektedir (Ahmed ve ark., 2017; Kostov ve ark., 1984; Rorie ve ark., 2002 ve Soto, 2008).

Servikal mukusun fiziksel özelliklerinin değişmesi spermatozoonların penetrasyonunu ve migrasyonunu etkilemektedir (Sharma ve ark., 2008). Fiziksel özelliklerin değişmesi ise hormonal dalgalanmalar ve servikal mukusun biyokimyasal yapısının değişmesiyle gerçekleşmektedir (Bartlewski ve ark., 2015 ve Curlin ve Bursac, 2013).

1.3.2. Servikal Mukusun Biyokimyasal Özellikleri

Servikal kanal kolumnar epitel hücreleri tarafından kaplanmıştır. Servikal mukus salgılanmasından sorumlu bu hücreler; alt kolumnar bazal hücreler, mukus salgılayan hücreler ve silli kolumnar hücreler olarak üç tipte tanımlanmaktadır (Becher ve ark., 2009). Silli epitel hücreler müsin moleküllerinin hidrasyonunu ayarlayarak, iyon ve su değişim aktivitesi ile mukus üretimine katkıda bulunmaktadır. Alt kolumnar bazal hücreler ve mukus salgılayan hücrelerin yapılarının ve tam olarak görevlerinin tanımlanabilmesi için detaylı ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Carmichael ve Jeaffreson, 1939 ve Dubey ve ark., 2016).

Servikal mukus %92-95 oranında su içeren bir hidrojel olarak tanımlanmaktadır (Bergman, 1960; Moghissi, 1972 ve Tsiligianni ve ark., 2001). Geriye kalan kısmını çözünabilir maddeler ve çözünabilir olmayan maddeler oluşturmaktadır (Rutlant ve ark., 2005). Çözünabilir maddeler arasında laktoferrin gibi proteinler (Cooper ve ark., 2014 ve Rao ve ark., 1973) immünoglobülinler, karbonhidratlar, glukoronidaz, amilaz, fosforilaz, esteraz ve fosfatazlar gibi çeşitli enzimler bulunmaktadır (El-Naggar ve Baksai, 1971; Kim ve ark., 2012; Tsiligianni ve ark., 2001 ve Tsiligianni ve ark., 2003). Bu maddelerin dışında glukozamin, galaktosamin, treonin, serin, aspartik asit, glutamik asit, prolin, glisin, alanin, valin,

lösin, izölösün, plenylalanin, lizin ve arginin amino asitleri, kolesterol gibi lipidler ve en önemlileri Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ve Cl^- olmak üzere inorganik iyonlar (elektrolitler) içermektedir (Bernardi ve ark., 2018; Cortes ve ark., 2014 ve Curlin ve Bursac, 2013). Servikal mukusun çözünebilir olmayan kısmını ise glikoprotein yapılı (%25 amino asit ve %75 karbonhidrat) makromoleküller olarak tanımlanan müsinler oluşturmaktadır (Gibbons ve Glover, 1959; Gipson, 2005; Pluta ve ark., 2011 ve Rutllant ve ark., 2005). Müsinler, uzun polipeptit zincirine ve çok sayıda oligosakkarit yan zincirine sahiptirler. Bu makro moleküller galaktoz, fukoz, siyalik asit, prealbumin, lipoprotein, albumin, β globulin ve γ globülinden oluşmaktadır (Bornhöfft ve ark., 2019; Mullins ve Saacke, 1989; Nakano ve ark., 2015 ve Tsiligianni ve ark., 2003). Müsinlerin yapısında bulunan siyalik asidin servikal mukusun viskoelastik jel özelliklerinden sorumlu olduğu bildirilmektedir (Curlin ve Bursac, 2013 ve Gibbons ve Glover, 1959).

Servikal mukusun üretilmesinde görev alan ve jel formu kazanmasını sağlayan yapı taşlarından olan müsin olarak da adlandırılan mukoproteinlerden günümüzde 20 tanesi tanımlanabilmiştir. Servikal epitelde sekrete edilen (Jel oluşturanlar/Jel oluşturmayanlar) ve membran ilişkili olarak sınıflandırılan iki tip mukoprotein grubu bulunmaktadır (Çizelge 1.4) (Chauhan ve ark., 2009).

Çizelge 1.4. Mukoproteinlerin sınıflandırılması (Aksoy, 2010).

Sekrete Edilen Mukoproteinler		Membran İlişkili Mukoproteinler
Jel Oluşturanlar	Jel Oluşturmayanlar	
MUC 2	MUC 7	MUC 1
MUC 5AC	MUC 8	MUC 3
MUC 5B	MUC11	MUC 4
MUC 6		MUC 9
		MUC 10
		MUC 12
		MUC 13
		MUC 16
		MUC 17
		MUC 18
		MUC 20

Jel oluşturan müsinler içerisinde yer alan MUC 6 mukoproteininin endoserviks ve ovaryum kist mukusunda ekspresyonu tanımlanmıştır (Gipson, 2001). MUC 5AC mide, solunum sistemi ve endoservikte eksprese edilmiş, östrus siklusunun foliküler

fazında servikal mukusta yüksek miktarda bulunduğu bildirilmiştir (Aksoy, 2010; Gipson ve ark., 2001 ve Lau ve ark., 2004). MUC 5B endoservikal mukusun temel proteinlerinden olup, miktarı östrus siklusunun fazlarına göre değişiklik göstermekle birlikte, jel oluşturan mukoproteinlerden olduğu ve servikal mukusun fiziksel özelliklerini etkilediği bildirilmektedir (Aksoy ve ark., 2012; Gipson ve ark., 1999 ve Gipson ve ark., 2001) Sekrete edilen mukoproteinlerden MUC 2'nin, spesifik olarak en fazla ince barsak, kolonik epitel ve goblet hücrelerinde, zayıf olarak da endoservikal dokuda eksprese edildiği, özellikle kolon epitelinde anti-enflamatuvar yanıtta etkili olduğu bildirilmiştir (Lau ve ark., 2004 ve Van der Sluis ve ark., 2006). Ancak sekrete edilen mukoproteinlerin özellikleri tam olarak açıklanamamıştır (Aksoy ve ark., 2012; Dekker ve ark., 2002 ve Hoorens ve ark., 2011).

Membran ilişkili mukoproteinlerden olan MUC 1, tüm epitel dokularında, lökositlerde (T hücreleri, B hücreleri, dentritik hücreler ve monositler), göz, kulak, ağız, cilt, süt ve safra kesesi taşlarında eksprese edilen yüksek moleküler ağırlıklı bir glikoproteindir ve üreme sisteminde önemli bir rol oynamaktadır (Apostolopoulos ve ark., 2015; Corrales ve ark., 2011; Kuroda ve ark., 2012; Xu ve ark., 2012 ve Wykes ve ark., 2002). Sığır serviksinde MUC 1 ekspresyonunun, östrojenin yüksek seviyelerde salgılandığı dönemlerde artış gösterdiği bildirilmektedir (Surveyor ve ark., 1995). Östrus siklusunda artan östrojen seviyesiyle birlikte MUC 1 ekspresyonu da artmaktadır. Artan MUC 1 ekspresyonunun serviks açıkken burada bulunan mukusun antimikrobiyal görevinde yer aldığı düşünülmektedir (Aplin, 1996; Brayman ve ark., 2004 ve McAuley ve ark., 2007). MUC 1, hücreden hücreye bağlanmayı inhibe ederek patojenlerin endometriyuma bağlanmasını önlemektedir. MUC 1'in endometritis olgularında ve bazı kanser türlerine karşı immunolojik yanıt oluşturulmasında prostaglandinler ve siklooksijenazlar (COX1 ve COX2) ile birlikte rol aldığı bildirilmektedir (Grover ve ark., 2018 ve Tiwari ve ark., 2018). Ayrıca MUC 1'in sığırlarda (Johnson ve ark., 2001) ve insanlarda (Wesseling ve ark., 1995) embriyonun implantasyonuna müdahale ettiği dolayısıyla infertilite ile ilişkili olduğu da belirtilmektedir (Meseguer ve ark., 2001). Servikal mukusta MUC 1 düzeyinin ölçülmesinin tekrarlayan abortlar ve döl tutma sorunlarının erken teşhisinde faydalı olabileceği bildirilmektedir (Adnane ve ark., 2018).

MUC 4 mukoproteini serviks, vajina ve konjonktivada eksprese edilebilmiş, bu bölgeler dışında bronşiyal mukusta ayrıca akciğer ve pankreasın kanserli dokularında ekspresyonları gözlenmiştir (Moniaux ve ark., 2001). MUC 4'ün epidermal büyüme faktörü reseptörü olan tirozin - protein kinaz ErbB2' nin aktivasyonunda rol oynadığı ve aşırı ekspresyonunun insanlarda çeşitli kanserlerin oluşumu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Ramsauer ve ark., 2006 ve Voynow ve Rubin 2009).

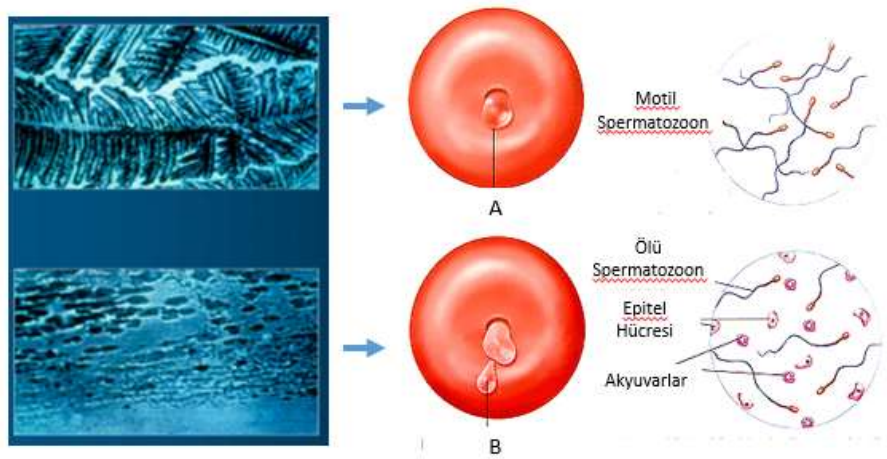
Sığır serviksinde MUC 16 regülasyonu, luteal faz sırasında azalmaktadır. Membran ilişkili bu müsin, insanlarda trofoblast yapışmasını önleyici tedavilerde kullanılmaktadır (Gipson ve ark., 2008 ve Pluta ve ark., 2012). Ayrıca, tümör belirteci olarak kabul edilmekte, özellikle ovaryum kanseri ile ilişkilendirilmektedir (Bafna ve ark., 2010 ve Gipson ve ark., 2014).

MUC 20 sığırlarda foliküler fazda yüksek oranda elde edilmiştir. Ayrıca erkeklerin üretra, vas deferens ve prostatında da bulunmaktadır. Ancak etki ve ekspresyon mekanizmasının anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir (Aksoy, 2010; Becher ve ark., 2009 ve Pluta ve ark., 2012).

Müsinler ile birçok sitokin ve epitel hücre yüzey reseptörlerinin (TLR, toll like receptores) ilişkili oldukları, müsin salgılanmasını uyardıkları bu sebeple, servikal mukus içerisindeki müsin düzeylerinin belirlenmesinin enfeksiyonlar ve infertilitenin belirlenmesinde potansiyel bilgi kaynağı olabileceği belirtilmektedir (Adnane ve ark., 2018; Carneiro ve ark., 2016; Healy ve ark., 2015 ve Sheldon ve ark., 2009). Servikal mukus, enfeksiyon ve infertilite belirteci olarak kullanılabilirliğinin yanı sıra özellikle beşeri hekimlikte spermatozoonların migrasyon ve penetrasyonunu değerlendirmek amacıyla servikal mukus penetrasyon testlerinde ve post-koital testlerde fertilitte belirteci olarak da kullanılmaktadır (Centola, 2018 ve WHO, 2010).

1.4. Servikal Mukus Penetrasyon Testi (SMPT)

Dişiden alınan servikal mukus ve erkek donörden alınan sperma örneğinin etkileşiminin çeşitli metodlarla incelenip, değerlendirilmesini içeren SMPT' nin temeli post-koital teste (PKT) dayanmaktadır (Botella ve Velasco, 1960 ve Kremer, 1965). Bu testlerin birkaç çeşidi bulunmakta ve aynı test bile çeşitli araştırmacılar tarafından farklı şekilde uygulanabilmektedir (Doody ve Good, 1993; Hanson ve ark., 1982; Katz ve ark., 1992; Overstreet, 1986 ve Taş ve ark., 2007). İlk defa insanlarda gerçekleştirilen ve in vivo bir yöntem olan PKT diğer adıyla Sims - Huhner testinin orijinali 1866'da J. Marion Sims tarafından yapılmış ve yaklaşık 50 yıl sonra Max Huhner tarafından revize edilmiştir (Huhner, 1913 ve Sims, 1866). İnfertilite sebebini araştırmak ve donörlerden alınan servikal mukus ile sperma numunelerinin kalitesini belirlemek için başlangıçta laboratuvar kökenli bir teknik olarak geliştirilen PKT, östrustaki dişiden, çiftleşme olduktan 9 ila 24 saat sonra servikal mukusun örneklenmesini ve ışık mikroskobu altında, alan başına spermatozoon sayısının ve hareketliliğinin incelenmesini içermektedir (Overstreet, 1986) (Şekil 1.4). İncelen mukus içerisinde progresif motil spermatozoon görülmesi, infertilite sebebinin servikal kaynaklı olmadığına göstergesi olarak kabul edilmektedir (Ola ve ark., 2003 ve Tejedor ve ark., 2000).



Şekil 1.4. Sims-Huhner testi örneği. A- Berrak, ince ve spermatozoon migrasyonuna uygun yapıda servikal mukus; B- Bulanık, kalın ve spermatozoon migrasyonuna uygun yapıda olmayan servikal mukus (Kaynak erişim adresi: <https://www.slideserve.com/emil/infertility>, 19.01.2021).

PKT'nin uygulanmasındaki zorluk, hatalı sonuç ihtimalinin yüksek olması ve fertilitéyle doğrudan ilişkisini destekleyen çalışmaların az olması araştırmacıları yeni test arayışına yönlendirmiştir (Graham, 2001; Hirano ve ark., 2001; Nasr-Esfahani ve ark., 2002; Ola ve ark., 2003 ve Stalhammar ve ark., 1993). Bu aşamada devreye SMPT girmiş, elde edilmesi kolay olan sığır servikal mukusunun hem insanlarda hem de hayvanlarda test için kullanılabilir olması ayrıca sentetik medyumların da yaygınlaşmasıyla birlikte SMPT çalışmaları hız kazanmıştır (Cox ve ark., 2006; Ivic ve ark., 2002; Matousek ve ark., 1989; Robayo ve ark., 2008 ve Yogev ve ark., 1999).

En basit yöntem, sperma ve servikal mukusun steril bir lama yerleştirildikten sonra üzerine lamel kapatılarak mikroskopta incelendiği slayt penetrasyon testidir (Kremer ve Jager, 1976). Bu koşullar altında spermadan mukusa göçün değerlendirilmesi, yararlı klinik bilgiler sağlayabilmektedir (Lewis ve ark., 2010 ve WHO, 2010). Bununla birlikte, slayt testleri oldukça öznel ve bu nedenle sonuçların yorumlanması önemli ölçüde gözlemcinin deneyimine bağlı kalmaktadır (Overstreet, 1986).

Kremer testi, sperma-servikal mukus etkileşimini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan, slayt penetrasyon testine göre daha objektif sonuçlar elde edilen kılcal tüp testidir (Aitken ve ark., 1992; David ve ark., 1979; Ducot ve ark., 1988 ve Ivic ve ark., 2002). İn vitro olarak uygulanan Kremer testi sperma-servikal mukus penetrasyon testi (SSMPT) olarak da bilinmektedir (Kremer, 1965). Bu yöntemde dışının servikal kanalı taklit edilerek, spermanın servikal kanal içerisindeki hareketi gözlemlenmektedir (Tang ve ark., 2005). Spermatozoonlar kılcal tüpler içerisindeki mukusla temas ettiğinde, tüpün yönüne paralel olarak kanallar boyunca göç etme eğilimi göstermektedir (Kremer ve Jager, 1976 ve Mills ve Katz, 1978). Kremer testinde, servikal mukus ile doldurulmuş kılcal tüpler küçük sperma kuyucuklarına yerleştirilmekte, 60 dk boyunca inkübe edilerek, 3 cm mesafede en öndeki spermatozoonlar tarafından kat edilen mesafe mm cinsinden kaydedilerek spermatozoonların tüp boyunca göçünü belirlemek için çeşitli zaman noktalarında incelenmektedir (Kremer, 1965 ve Tang ve ark., 2005). Genel olarak Kremer testinde öncü spermatozoon mesafesi, spermatozoon yoğunluğu ve motilitesi kaydedilmektedir

(Han ve ark., 2017 ve Overstreet, 1986). Schütte (1987), SMPT'ne farklı bir bakış açısı getirerek, iki adet 65 mm uzunluğundaki kapillar tüp içerisinde bulunan servikal mukus ile muamele ettiği spermatozoonları 90 dk inkübasyona tabi tutmuş ve tüpler içerisinde spermatozoonların kat ettiği mesafeleri mm cinsinden kaydetmiştir. Her iki tüpte de en uzak mesafeye ulaşan spermatozoonların ortalaması alınmış ve penetrasyon yetenekleri yorumlanmıştır (Schütte, 1987). Eggert-Kruse (1989), aynı servikal mukus ile farklı sperma örnekleri kullanarak SMPT sonuçlarının iyileştiğini kaydetmiş ve penetrasyonun, spermatozoon fonksiyonel yeterliliğine servikal mukusun kendisinin kalitesinden daha fazla bağlı olduğunu ifade etmiştir (Eggert ve ark., 1989). SMPT farklı inkübasyon sıcaklıklarında uygulanabilmektedir (Taş ve ark., 2007). Vücut sıcaklığından yüksek sıcaklıklarda inkübasyon süresinin kısa tutulması gerektiği çünkü sıcaklık süre ilişkisinin spermatozoonların servikal mukus penetrasyon yeteneğini etkilediği bildirilmektedir (Avdatek ve ark., 2010; Taş ve ark., 2006 ve Yogev ve ark., 1999). Sıcaklık haricinde spermatozoonların servikal mukus içerisindeki penetrasyon ve migrasyon yeteneklerini etkilediği düşünülen spermatozoon motilite, kinetik (doğrusal hız, çapraz geçiş frekansı, ortalama yol hızı gibi) ve morfolojik parametreleri (akrozom bütünlüğü, mitokondriyal aktivasyon gibi) de araştırılmaktadır (Cox ve ark., 2002; Gliozzi ve ark., 2017; Gillan ve ark., 2008; Tollner ve ark., 2011; Pini ve ark., 2018 ve Swami ve ark., 2017).

Tüm bu bilgiler ışığında tez çalışmasında boğa spermasının servikal mukus penetrasyon yeteneğinin belirlenmesi amacıyla SMPT uygulanmıştır. Belirtildiği üzere sperma-servikal mukus etkileşiminde, servikal mukusun özelliklerinin yanı sıra spermatozoonların motilite ve morfolojik özelliklerinin de rol oynadığı düşünülmektedir. Bu sebeple, çalışmada boğa spermasının servikal mukus penetrasyon yeteneği ile motilite (total motilite (TM, %) ve progresif motilite (PM, %)), spermatozoon kinetik parametreleri (ortalama yörünge hızı (VAP, $\mu\text{m/s}$), doğrusal hız (VSL, $\mu\text{m/s}$), eğrisel hız (VCL, $\mu\text{m/s}$), doğrusallık (STR, %), eğrisel yol doğrusallığı (LIN, %), spermatozoon başının yanal sapma genliği (ALH, μm), çapraz geçiş frekansı (BCF, Hz)), plazma membran ve akrozom bütünlüğü ile mitokondriyal membran potansiyeli arasındaki ilişki incelenerek, bu yöntemin boğa sperması üretim laboratuvarlarında rutin kullanıma uygunluğunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışma, Tarım ve Orman Bakanlığına bağlı Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü Suni Tohumlama Laboratuvarında bulunan İsviçre Esmeri ırkı 7 boğadan alınan sperma numuneleri ve Sığır Yetiştirme Şubesinde bulunan İsviçre Esmeri ırkı 5 dişi sığırdan alınan servikal mukus numuneleri ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma prosedürü, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Etik Kurul Onayı Karar No: 2018-153). Etik kurul onayı ekte sunulmuştur.

Çalışmada gerçekleştirilen sperma ve servikal mukus materyali eldesi ve yapılan tüm analizlerde gerekli olan cihazlar için Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü laboratuvar ve şubelerinden faydalanılmıştır.

Tez çalışmasında ticari sperma sulandırıcısı olarak Andromed (Minitüb, Almanya), akım sitometri cihazında yapılan PMAB ve MMP analizleri için floresein izotiyosiyanat-konjuge Arachis hypogaea (peanut) lektini (FITC-PNA, 1 mg liyofilize pudra, Sigma), propidium iodide (PI, 100 mg, İnvitrogen, Thermo Fischer Scientific, ABD) ve 5,5', 6,6'-tetrakloro-1,1', 3,3' tetraetil-benzimidazolilkarbosiyanin iyodit (JC-1,5 mg, İnvitrogen, Thermo Fischer Scientific, ABD) boyları kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Hayvan Materyali

Tez çalışmasında sperma numunesi alımı için, kullanılan boğaların “Sperma, Embriyo ve Ovum Üretim Merkezlerinin Çalışma Usul ve Esasları Talimatı” gereğince sağlık testleri; Sığır Tüberkülozu, Sığır Brusellozu, Enzootik Sığır Löykozu, Enfeksiyöz Sığır Rhinotrakheitis, Sığır Viral Diarezi ve Mavi Dil hastalıkları bakımından serolojik ve antijen testleri, *Campylobacter fetus* bakterisi ve *Trichomonas fetus* paraziti varlığının araştırılması amacıyla preputial yıkantı testleri ayrıca spermatolojik değerlendirmeleri (morfolojik ve motilite) üretim izni prosedüründe belirtildiği şekilde çalışma öncesinde Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi tarafından yapılmıştır.

Servikal mukus materyali toplama işlemi için genel sağlık durumu iyi ve reproduktif olarak sağlıklı dişi sığırlar seçilerek bahsi geçen işlemde kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan dişi ve erkek hayvanların bakım ve beslenmeleri Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü tarafından yapılmıştır.

2.2.2. Spermanın Alınması ve İşlenmesi

Suni Tohumlama Laboratuvarında bulunan boğalardan, haftada iki gün tek ejakülat, toplamda ise 140 ejakülat olmak üzere, sperma numuneleri suni vajen yöntemiyle alınmıştır. Alınan ejakülatların yoğunlukları (spermatozoon/ml) spektrofotometre (Accucell, IMV, Fransa) ile ölçülerek kaydedilmiştir. Bu işlemten sonra 1:1 oranında sulandırılarak, ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta 37°C’de subjektif olarak motilite değerleri incelenmiş, %80 ve üzerinde total motilite değerine sahip sperma numuneleri, 60×10^6 spermatozoon/ml olacak şekilde total sulandırma miktarına tamamlanmıştır. Sulandırılan sperma numuneleri +4°C’de 3 saat

eklibrasyon işleminden sonra 0,25 ml hacmindeki payetlere (IMV Technologies; L'Aigle, Fransa) çekilmiştir. Payetleme işlemi sonrasında, otomatik dondurma cihazında (Digitcool 5300 ZB 250, IMV, Fransa), 3 safhada; +4°C/-10°C (3°C/dk), -10°C/-100°C (40°C/dk) ve -100°C/-140°C (20°C/dk) toplam 7 dk içinde sperma dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Dondurulmuş sperma numunelerinin tamamı çalışma süresince -196°C’de sıvı azot içerisinde muhafaza edilmiştir.

2.2.3. Servikal Mukusun Toplanması ve Değerlendirilmesi

Dişi sığırların vajinal elektriksel dirençleri draminski dedektörüyle ölçülerek östrus tespiti yapılmıştır. Vajinal elektriksel direnci 180-360 ünite değerine sahip dişilerin östrusun 0-12. saatinde oldukları kabul edilerek servikal mukus toplama işlemine geçilmiştir (Daşkın ve ark., 1996; Jotanovic ve ark., 2011 ve Rorie ve ark., 2002). Kızgınlıkta oldukları tespit edilen dişilerden, 50 ml’lik enjektöre adapte edilmiş kateter ile servikal mukus, serviksin kaudalinden aspire edilerek steril falkon tüplere aktarılmıştır (Şekil 2.1).



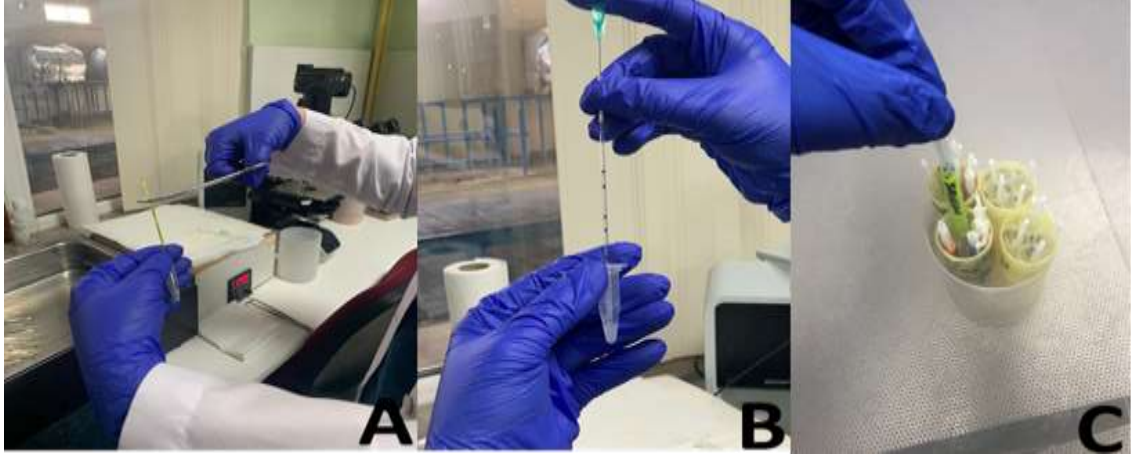
Şekil 2.1. A- Draminski dedektörü ile vajinal elektriksel direnç ölçümü; B- Servikal mukus toplama işlemi.

Toplanan mukus örnekleri +4°C’lik ortamda 10 dk içinde suni tohumlama laboratuvarına getirilmiştir. Servikal mukus numuneleri mukus penetrasyon testinde

kullanıma uygun olup olmadıklarının belirlenmesi için uzama değerin tespit edilmesi amacıyla Spinnbarkeit testine tabi tutulmuşlardır. Uzama değerin belirlenmesi için birkaç damla servikal mukus lam üzerine damlatılmış daha sonra üzerine başka bir lam kapatılmıştır. Lamalar birbirinden servikal mukus kopana kadar uzaklaştırılmış, mukusun koptuğu noktada lamalar arasındaki uzaklık cm cinsinden kaydedilmiştir. Çalışmada 12 cm üzeri uzama değerine sahip servikal mukus numuneleri kullanılmıştır (Bennur ve ark., 2004; Hanumant ve ark., 2019 ve Sharma ve ark., 2008).

2.2.4. Servikal Mukus Penetrasyon Testi

Test için kullanılacak servikal mukus numuneleri toplandıkları gün içerisinde 0,25 ml hacmindeki şeffaf payetlere (IMV Technologies; L'Aigle, Fransa) çekilmiş ve 37°C'de 5 dk dik olarak bekletilmiştir. Bekletme sonrasında içinde hava kabarcığı oluşan payetler kullanılmamıştır. İnkübasyon öncesinde servikal mukusun payetin ucundan 1 mm kadar çıkıntı yapması sağlanmış, payet ucunda oluşan mukus çıkıntısı, daha önceden 37°C'de 30 sn su banyosunda çözdürülerek farklı tüpler içerisine aktarılmış spermayla teması sağlanarak (90 derecelik açı ile dik bir şekilde ve payetin plastik kısmı spermaya değmeksizin) etüv içerisinde 37°C'de 45 dk inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 2.2). İnkübasyon sonrasında spermatozoonları bulundukları noktada tespit etmek amacıyla örnekler sıvı azot buharında (sıvı azottan 5 cm yükseklikte) dondurulmuştur.



Şekil 2.2. A- Spermanın çözündürülüp steril tüpe aktarılması; B- Payetlerin SMPT için hazırlanması; C- SMPT uygulanıp dondurulmuş payetler.

Servikal mukusun çekileceği payetler kullanımdan önce penetrasyon aralıklarının belirlenmesi için uç kısımlarından itibaren milimetrik cetvel yardımıyla ölçülerek işaretlenmiştir (Taş, 2003 ve Taş ve ark., 2006) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Penetrasyon aralıklarının belirlenmesi amacıyla işaretlenen bölgeler.

Penetrasyon Aralıklarının Belirlenmesi Amacıyla İşaretlenen Bölgeler		
Bölge Adı	Penetrasyon Aralığı	Ölçü Birimi
Penetrasyon Aralığı 1 (PA1)	15,0 – 17,5	mm
Penetrasyon Aralığı 2 (PA2)	32,5 - 35,0	mm
Penetrasyon Aralığı 3 (PA3)	50,0–52,5	mm

Penetrasyon aralıklarında spermatozoonların değerlendirilebilmesi için total motilite yüzdelere göre (TM >%50, TM %40-%50 ve TM<%40) ön gruplandırma yapılmıştır. İnkübasyon ve dondurma işlemlerinden sonra penetrasyon aralıklarındaki spermatozoonların sayılması amacıyla belirlenen aralıklardan bir makas yardımıyla kesilmiştir. Daha sonra kesilen parçalar içerisindeki mukus steril bir tel vasıtasıyla itilerek donmuş halde lam üzerine aktarılmıştır (Kremer, 1965; Taş, 2003 ve Taş ve ark., 2006). Sıvı hale geldikten sonra örneklerin üzerine lamel kapatılarak faz -

kontrast mikroskop altında (200x) spermatozoonlar sayılmıştır. Tüm penetrasyon aralıklarındaki spermatozoonlar sayılmıştır. En uzak mesafeye ulaşan spermatozoon yüzdesinin belirlenebilmesi amacıyla penetrasyon aralıklarındaki toplam spermatozoon sayısı hesaplanmıştır. Daha sonra PA3 aralığına ulaşan spermatozoon sayısı $>50\%$, $40\%-50\%$ ve $<40\%$ olarak hesaplanmış ve kaydedilmiştir (Çizelge 2.2) (Kremer, 1965 ve Schütte, 1987). İşlemler her ejakülat tarihine ait sperma numunesi için tekrar edilmiştir.

Çizelge 2.2. Penetrasyon aralığı 3 (PA3) (50,0–52,5 mm) spermatozoon sayısına göre gruplandırma.

Penetrasyon Aralığı 3 (PA3) Spermatozoon Sayısına Göre Gruplandırma	
Grup Adı	
PA3 $>50\%$	PA3 aralığında payet içerisindeki toplam spermatozoon sayısının 50% 'den fazlası bulunmaktadır
PA3 $40\%-50\%$	PA3 aralığında payet içerisindeki toplam spermatozoon sayısının 40% ila 50% 'si bulunmaktadır
PA3 $<40\%$	PA3 aralığında payet içerisindeki toplam spermatozoon sayısının 40% 'ından azı bulunmaktadır

2.2.5. Bilgisayar Destekli Sperma Analizi (CASA)

Servikal mukus penetrasyon testinde kullanılacak olan ejakülatlara ait dondurulmuş sperma numuneleri CASA (IVOS I, Hamilton Thorne, Beverly A.Ş., ABD) cihazında analiz edilmek üzere 37°C 'de 30 sn su banyosunda çözündürülmüştür. Daha sonra sperma numunelerinden 3 μl alınarak 20 μm derinliğinde 4 bölmeli leja (Leja, Nieuw-Vennep, Hollanda) lamina aktarılmıştır. Cihaz içerisinde yer alan faz-kontrast mikroskopunda 37°C 'de 10x büyütmede CCD (Charge coupled device) kamera (30 frame/sn, 60 Hz) ile otomatik olarak, her bir numune için en az 5 farklı alandan alınan görüntüler analiz edilmiştir. Analizlerde, spermatozoonlara ait motilite (total motilite (TM), %), progresif motilite (PM, %)), ve kinetik parametreler

(ortalama yörünge hızı (VAP), $\mu\text{m/s}$), doğrusal hız (VSL), $\mu\text{m/s}$), eğrisel hız (VCL), $\mu\text{m/s}$), doğrusallık (STR), (%), eğrisel yol doğrusallığı (LIN), (%), spermatozoon başının yanal sapma genliği (ALH), μm), çapraz geçiş frekansı (BCF), Hz) değerlendirilerek kaydedilmiştir. Motilite değerlendirmesinde, VSL %70 ve VAP 50 $\mu\text{m/s}$ değerine sahip spermatozoa PM olarak, VAP değeri; statik, yavaş >40 $\mu\text{m/s}$, orta >70 $\mu\text{m/s}$, hızlı >100 $\mu\text{m/s}$ olarak sınıflandırılmıştır.

2.2.6. Akım Sitometri Analizleri

Spermatozoonların mitokondriyal membran potansiyelinin, plazma zarının ve akrozom bütünlüğünün belirlenebilmesi amacıyla, akım sitometri analizleri yapılmıştır. Analizler için CytoFLEX System B4-R0-V0 (Beckman Coulter, ABD; 488 nm lazer) cihazından yararlanılmıştır. Spermatozoon olmayan partiküller popülasyon dışı bırakılarak analizler, 1×10^4 spermatozoon üzerinden değerlendirilmiştir.

Spermatozoonların mitokondriyal membran potansiyel (MMP) yüzdesini belirlemek için, filtrelenmiş (Millex-GV Syringe Filter Unit, 0,22 μm , PVDF, 33 mm, Merc, Almanya) 240 μl fosfat buffer saline (PBS) çözeltisi içinde seyreltilen 5 μl sperma (37°C'de çözdürülmüş) numunesi üzerine, her bir örnek için 1,5 μl PI ve 2.5 μl JC-1 eklenmiştir. Numuneler, 15 dakikalık inkübasyondan (37°C) sonra akım sitometrik olarak analiz edilmiştir. PI-pozitif hücreler çıkarıldıktan sonra, canlı spermatozoonlarda iki alt popülasyon:

- PI negatif ve yeşil floresan yayan (düşük MMP (DMMP), %) spermatozoonlar,
- PI negatif ve turuncu floresan yayan (yüksek MMP (YMMP), %) spermatozoonlar şeklinde belirlenmiştir.

Plazma zarının ve akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi için, filtrelenmiş (Millex-GV Syringe Filter Unit, 0,22 μm , PVDF, 33 mm, Merc, Almanya) 240 μl

fosfat buffer saline (PBS) çözeltisi içinde seyreltilen 5 µl sperma (37°C'de 30 sn çözdürülmüş), 1,5 µl PI ve 2,5 µl FITC-PNA ile boyanarak ve 37°C'de 15 dakikalık inkübasyondan sonra akım sitometri cihazında analiz edilmiştir. Spermatozoonlar:

- Sağlam plazma membranı ve akrozomu olan (canlı spermatozoon olarak kabul edilen PI ve FITC-PNA negatif hücreler; PMAB, %) hücreler,
- Kusurlu plazma membranı ve bozulmamış akrozom ile PI pozitif ve FITC-PNA negatif hücreler,
- Bozulmamış plazma membranı ve kusurlu akrozom ile PI negatif ve FITC-PNA pozitif hücreler,
- Kusurlu plazma membranı ve akrozomu olan PI ve FITC-PNA pozitif hücreler olmak üzere 4 alt grupta değerlendirilmiştir.

2.2.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen tüm değişkenler önemlilik testlerine geçilmeden önce normallik yönünden parametrik test varsayımlarından Kolmogorov Smirnov testi ile, varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile incelenmiştir. CASA parametrelerinin PA3 seviyelerine göre belirlenen gruplar arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır. Gruplar arası farklılığın anlamlı bulunduğu değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testi'nden yararlanılmıştır. Motilite seviyelerine göre belirlenen gruplarda PA1, PA2 ve PA3 seviyelerinin farklılığının belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Gruplar arası farklılığın anlamlı bulunduğu değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi'nden yararlanılmıştır. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelenmiş ve SPSS 14.01 paket programıyla yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Penetrasyon Aralığı (PA) Bulguları

Tez çalışmasında servikal mukus ve sperma numuneleri kullanılarak SMPT uygulaması yapılmış ve penetrasyon aralığı bulguları Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Penetrasyon aralığı bulguları. Total motilite seviyelerine göre belirlenen gruplarda PA1 (15,0-17,5 mm), PA2 (32,5-35,0 mm) ve PA3 (50,0-52,5 mm) bölgelerindeki farklılığının belirlenen verileri; a, b, c: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0,001$) (Ort $\pm$ SH).

Parametre	Gruplar			p değeri
	TM >%50 (n=85)	TM %40-%50 (n=21)	TM <%40 (n=34)	
PA1	236,11 $\pm$ 102,10 ^a	153,00 $\pm$ 86,01 ^b	131,67 $\pm$ 109,61 ^b	<0,001
PA2	282,16 $\pm$ 152,01 ^a	163,88 $\pm$ 153,49 ^b	132,67 $\pm$ 116,11 ^b	<0,001
PA3	469,39 $\pm$ 219,83 ^a	216,29 $\pm$ 193,77 ^b	87,37 $\pm$ 74,37 ^c	<0,001

PA1 bölgesinde bulunan spermatozoon sayıları TM >%50 grubunda 236,11 $\pm$ 102,10, TM %40-%50 grubunda 153,00 $\pm$ 86,01 ve TM <%40 grubunda 131,67 $\pm$ 109,61 olarak belirlenmiştir. Total motilitesi %50’den yüksek (TM >%50 grubu) değerdeki sperma numuneleri PA1 bölgesine, total motilitesi %40 ila %50 arasında olan (TM %40-%50 grubu) ve %40’dan daha düşük (TM <%40 grubu) olan sperma numunelerine göre daha fazla sayıda spermatozoon ulaştırabilmiştir. PA1 bölgesinde, TM >%50 grubunun spermatozoon sayısı TM %40-%50 ve TM <%40 gruplarına göre anlamlı derecede yüksek çıkmıştır. Gruplar arasındaki bu durum istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilmiştir ($p<0,001$).

PA2 bölgesinde bulunan spermatozoon sayıları TM >%50 grubunda $282,16 \pm 152,01$, TM %40-%50 grubunda $163,88 \pm 153,49$ ve TM <%40 grubunda $132,67 \pm 116,11$ olarak belirlenmiştir. Total motilitesi %50'den yüksek (TM >%50 grubu) değerdeki sperma numuneleri PA2 bölgesine, total motilitesi %40 ila %50 arasında olan (TM %40-%50 grubu) ve %40'dan daha düşük (TM <%40 grubu) olan sperma numunelerine göre daha fazla sayıda spermatozoon ulaştırabilmiştir. PA2 bölgesinde, TM >%50 grubunun spermatozoon sayısı TM %40-%50 ve TM <%40 gruplarına göre anlamlı derecede yüksek çıkmıştır. Gruplar arasındaki bu durum istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilmiştir ($p < 0,001$).

PA3 bölgesinde bulunan spermatozoon sayıları TM >%50 grubunda $469,39 \pm 219,83$, TM %40-%50 grubunda $216,29 \pm 193,77$ ve TM <%40 grubunda $87,37 \pm 74,37$ olarak belirlenmiştir. Total motilitesi %50'den yüksek (TM >%50 grubu) değerdeki sperma numuneleri PA3 bölgesine, total motilitesi %40 ila %50 arasında olan (TM %40-%50 grubu) ve %40'dan daha düşük (TM <%40 grubu) olan sperma numunelerine göre daha fazla sayıda spermatozoon ulaştırabilmiştir. Total motilitesi %40 ila %50 arasında olan gruptaki numuneler ise total motilitesi %40'dan daha düşük olan sperma numunelerine göre PA3 bölgesine daha fazla sayıda spermatozoon ulaştırabilmiştir. PA3 bölgesinde belirlenen spermatozoon sayıları bakımından TM >%50, TM %40-%50 ve TM <%40 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark belirlenmiştir ($p < 0,001$).

Yapılan analiz sonucunda her üç penetrasyon aralığında (PA1, PA2, PA3) da en fazla sayıda spermatozoon bulunduran grubun total motilitesi %50'den yüksek olan grup (TM >%50) olduğu belirlenmiştir.

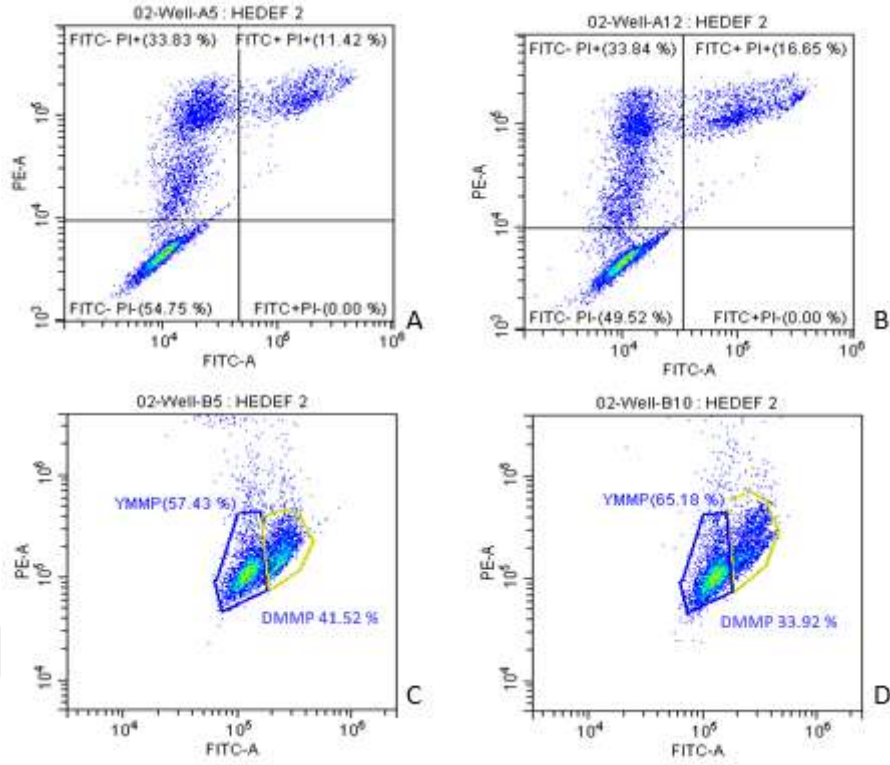
3.2 Akım Sitometri Bulguları

Tez çalışmasında kullanılmak üzere elde edilen sperma numuneleri DMMP (Düşük mitokondriyal membran potansiyeli, %), YMMP (Yüksek mitokondriyal membran potansiyeli, %) ve PMAB (Plazma membran ve akrozom bütünlüğü, %)

yönünden analiz edilmiştir (Şekil 3.1). Bu analizlere ait sonuçlar Çizelge 3.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.2. Akım sitometri analiz bulguları. DMMP: Düşük mitokondriyal membran potansiyeli, YMMP: Yüksek mitokondriyal membran potansiyeli, PMAB: Plazma membran ve akrozom bütünlüğü. a, b, c: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0,001$) ($\text{Ort}\pm\text{SH}$).

Parametre	Gruplar			p değeri
	PA3 >%50 (n=28)	PA3 %40-%50 (n=58)	PA3 <%40 (n=54)	
DMMP (%)	34,73 $\pm$ 12,91 ^b	40,96 $\pm$ 17,19 ^b	69,01 $\pm$ 17,67 ^a	<0,001
YMMP (%)	65,00 $\pm$ 13,06 ^a	58,94 $\pm$ 17,26 ^a	30,77 $\pm$ 17,61 ^b	<0,001
PMAB (%)	56,91 $\pm$ 9,56 ^a	47,68 $\pm$ 11,58 ^b	25,60 $\pm$ 14,04 ^c	<0,001



Şekil 3.1. İsviçre Esmeri ırkı boğalara ait sperma numunelerinin plazma membran ve akrozom bütünlüğü analizi (PMAB) ile mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) analizi. A-B: PMAB analizi için FITC-PNA/PI Boyama, C-D: MMP analizi için JC-1/PI Boyama (CytoFLEX System B4-R0-V0 (Beckman Coulter, ABD; 488 nm lazer)). FITC-PI-:Plazma membranı ve akrozomu sağlam hücreler, FITC-PI+ : Plazma membranı hasarlı ancak akrozomu sağlam hücreler, FITC+PI- : Plazma membranı sağlam ancak akrozomu hasarlı hücreler, FITC+PI+ : Plazma membranı ve akrozomu hasarlı hücreler. DMMP: Düşük mitokondriyal membran potansiyeli, YMMP: Yüksek mitokondriyal membran potansiyeli.

Düşük mitokondriyal membran potansiyeli (DMMP) analiz sonuçlarına göre PA3 >%50 grubunun değeri $34,73 \pm 12,91$, PA3 %40-%50 grubu $40,96 \pm 17,26$ ve PA3 <%40 grubu ise $69,01 \pm 17,67$ olarak belirlenmiştir. PA3 (50,0–52,5 mm) bölgesine payet içerisindeki toplam spermatozoon sayısının %50’den fazlasının ulaştığı grup (PA3 >%50) ve bu bölgeye payet içerisindeki toplam spermatozoon sayısının %40-%50 arasında spermatozoon ulaştırabilen grup (PA3 %40-%50) arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark saptanmamıştır ($p > 0,001$). Düşük mitokondriyal membran potansiyel yüzdesi en fazla çıkan grup PA3 <%40 ($69,01 \pm 17,67$) grubu olmuştur. PA3 <%40 grubu, servikal mukus ile dolu ve önceden penetrasyon aralığı işaretli olan payetlerin içerisinde bulunan toplam spermatozoon varlığının %40’ından daha azının payet içerisindeki en uzak mesafe olan PA3 aralığına

ulaştırabilmiştir. PA3 <%40 grubunun DMMP değeri PA3 >%50 ve PA3 %40-%50 gruplarına göre daha yüksek olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında belirlenen bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,001$).

Yüksek mitokondriyal membran potansiyelini (YMMP) belirlemek amacıyla yapılan analizde PA3 >%50 grubunun değeri $65,00\pm13,06$, PA3 %40-%50 grubu $58,94\pm17,26$ ve PA3 <%40 grubu ise $25,60\pm14,04$ olarak belirlenmiştir. PA3 >%50 ve PA3 %40-%50 grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır ($p>0,001$). PA3 %50 ve PA3 %40-%50 gruplarının, PA3 <%40 grubuna göre daha yüksek YMMP değerine sahip oldukları belirlenmiştir. PA3 <%40 grubu ile PA3 >%50 ve PA3 %40-%50 grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$).

Plazma membran ve akrozom bütünlüğünün (PMAB) belirlenmesi amacıyla yapılan analizlerde PA3 >%50 grubunun değeri $56,91\pm9,56$, PA3 %40-%50 grubu $47,68\pm11,58$ ve PA3 <%40 grubu ise $25,60\pm14,04$ olarak belirlenmiştir. Sağlam plazma membranı ve akrozomu olan (canlı spermatozoon olarak kabul edilen PI ve FITC-PNA negatif hücreler; PMAB, %) hücreler yönünden en yüksek değere PA3 >%50 grubunun, en düşük değere ise PA3 <%40 grubunun sahip olduğu belirlenmiş, PMAB bakımından üç grup arasında fark olduğu saptanmıştır. Gruplar arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$).

Plazma membran ve akrozom bütünlüğü ile mitokondriyal membran potansiyeli analizlerinin sonucunda hem yüksek mitokondriyal membran potansiyeline sahip hem de plazma ve akrozom bütünlüğü yüksek olan sperma numunelerinin PA3 >%50 grubunda olduğu belirlenmiştir.

3.3. Motilite Bulguları

Tez çalışmasında kullanılan sperma numuneleri total motilite (TM, %) ve progresif motilitelerinin (PM, %) belirlenmesi amacıyla analiz edilmiştir. TM ve PM sonuçları Çizelge 3.3'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.3 Motilite bulguları; total motilite (TM, %), progresif motilite (PM, %). a, b, c: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0,001$) (Ort $\pm$ SH).

Parametre	Gruplar			p değeri
	PA3 >%50 (n= 28)	PA3 %40-%50 (n= 58)	PA3 <%40 (n= 54)	
TM (%)	73,95 $\pm$ 9,17 ^a	65,02 $\pm$ 13,01 ^b	40,17 $\pm$ 17,97 ^c	<0,001
PM (%)	27,45 $\pm$ 7,3 ^a	23,40 $\pm$ 6,88 ^b	11,74 $\pm$ 7,26 ^c	<0,001

TM sonuçlarına göre PA3 >%50 grubunun değeri %73,95 $\pm$ 9,17, PA3 %40-%50 grubu %65,02 $\pm$ 13,01 ve PA3 <%40 grubu ise %40,17 $\pm$ 17,97 olarak belirlenmiştir. PA3 >%50, PA3 %40-%50 ve PA3 <%40 grupları arasında farklılık olduğu saptanmış ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$).

PM değeri incelendiğinde PA3 >%50 grubunun değeri %27,45 $\pm$ 7,3, PA3 %40-%50 grubu %23,40 $\pm$ 6,88 ve PA3 <%40 grubu ise %11,74 $\pm$ 7,26 olarak belirlenmiştir. PA3 >%50, PA3 %40-%50 ve PA3 <%40 grupları arasında farklılık olduğu saptanmış ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$).

Motilite analizlerinin neticesinde payet içerisindeki en uzak mesafe olarak işaretlenen PA3 penetrasyon aralığına en fazla sayıda spermatozoon ulaştıran grupta (PA3 >%50) hem TM hem de PM değerinin diğer gruplara (PA3 %40-%50, PA3 <%40) göre yüksek olduğu belirlenmiştir.

3.4. Kinetik Parametre Bulguları

Spermatozoon hareket kalıplarını ayırt etmek için kullanılan kinetik parametrelerin belirlenmesi amacıyla bilgisayar destekli sperma analizleri yapılmıştır. Bu analizlerin sonuçları Çizelge 3.4’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.4. Kinetik parametre bulguları, a, b, c: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0,01) (p<0,001) (Ort±SH).

Parametre	Gruplar			p değeri
	PA3 >%50 (n= 28)	PA3 %40-%50 (n= 58)	PA3 <%40 (n= 54)	
VAP (µm/s)	98,80±10,03 ^a	97,03±10,58 ^a	91,12±8,41 ^b	p=0,001
VCL (µm/s)	178,02±19,70 ^a	175,01±21,14 ^a	164,77±16,24 ^b	p=0,005
STR (%)	69,55±3,83 ^c	71,66±2,94 ^b	73,30±2,77 ^a	p<0,001
LIN (%)	39,80±3,56 ^b	41,07±2,43 ^a	42,20±2,07 ^a	p=0,001
VSL (µm/s)	69,39±6,24	69,76±6,99	67,72±6,58	p=0,260
ALH (µm)	7,73±0,57	7,81±0,65	7,92±0,61	p=0,416
BCF (Hz)	24,80±1,86	24,77±1,47	25,34±1,74	p=0,157

Ortalama yörünge hızı olarak ifade edilen VAP kinetik parametresi PA3 >%50 grubunda 98,80±10,03 µm/s, PA3 %40-%50 grubunda 97,03±10,58 µm/s ve PA3 <%40 grubunda 91,12±8,41 µm/s olarak belirlenmiştir. PA3 <%40 grubu, PA3 %40-%50 ve PA3 >%50 gruplarına göre daha düşük VAP değerine sahip olarak belirlenmiş, PA3 <%40 grubu ile diğer iki grup olan PA3 %40-%50 ve PA3 >%50 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.001). PA3 %40-%50 ve PA3 >%50 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05).

Spermatozoonların eğrisel olarak izlediği yörüngedeki hızlarının ifadesi olan VCL parametresi yönünden analiz edilen sperma numunelerinin PA3 >%50 grubundaki değeri 178,02±19,70 µm/s, PA3 %40-%50 grubunda 175,01±21,14 µm/s

ve PA3 <%40 grubunda $164,77 \pm 16,24$ $\mu\text{m/s}$ olarak belirlenmiştir. PA3 <%40 grubu ile PA3 %40-%50 ve PA3 >%50 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,005$). PA3 %40-%50 ve PA3 >%50 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Spermatozoonun yörüngesi üzerindeki ortalama doğrusal yol olarak ifade edilen STR kinetik parametresi bakımından incelenen grupların değerleri PA3 >%50 grubunda $69,55 \pm 3,83$, PA3 %40-%50 grubunda $71,66 \pm 2,94$ ve PA3 <%40 grubunda $73,30 \pm 2,77$ olarak belirlenmiştir. PA3 >%50, PA3 %40-%50 ve PA3 <%40 grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$).

Eğrisel yol doğrusallığını ifade eden lineerlik değeri olan LIN kinetik parametresi analizler sonucunda PA3 >%50 grubunda $39,80 \pm 3,56$, PA3 %40-%50 grubunda $41,07 \pm 2,43$ ve PA3 <%40 grubunda $42,20 \pm 2,07$ olarak belirlenmiştir. PA3 %40-%50 ve PA3 <%40 grupları PA3 > %50 grubuna göre daha yüksek LIN değerine sahip olarak belirlenmiştir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$). PA3 %40-%50 ve PA3 <%40 grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

VSL (doğrusal hız, $\mu\text{m/s}$) kinetik parametresi yönünden sperma numuneleri değerlendirilmiş, PA3 >%50 grubunda $69,39 \pm 6,24$ $\mu\text{m/s}$, PA3 %40-%50 grubunda $69,76 \pm 6,99$ $\mu\text{m/s}$ ve PA3 <%40 grubunda $67,72 \pm 6,58$ $\mu\text{m/s}$ olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,260$).

Spermatozoon başının yanal sapma genliği olan ALH değeri yönünden sperma numuneleri analiz edilmiş ve değerler PA3 >%50 grubunda $7,73 \pm 0,57$ μm , PA3 %40-%50 grubunda $7,81 \pm 0,65$ μm ve PA3 <%40 grubunda $7,92 \pm 0,61$ μm olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,416$).

BCF (Çapraz geçiş frekansı) kinetik parametresi yönünden değerlendirilen sperma numunelerinin PA3 >%50 grubundaki değeri $24,80 \pm 1,86$ Hz, PA3 %40-%50 grubunda $24,77 \pm 1,47$ Hz ve PA3 <%40 grubunda $25,34 \pm 1,74$ Hz olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,157$).

Kinetik parametre analizlerinin sonucunda VAP, VCL, STR ve LIN parametreleri bakımından gruplar arasında (PA3 >%50, PA3 %40-%50 ve PA3 <%40) istatistiksel olarak önemli fark olduğu belirlenmiş, en yüksek VAP ve VCL değerinin PA3 >%50 grubunda, en yüksek STR ve LIN değerinin ise PA3 <%40 grubunda olduğu belirlenmiştir. VSL, ALH ve BCF değerleri bakımından ise gruplar arasında (PA3 >%50, PA3 %40-%50 ve PA3 <%40) fark belirlenememiştir.

4. TARTIŞMA

Spermatozoonların dışı genital kanalda karşılaşmış oldukları ilk medyum olan servikal mukus ile etkileşiminin ve bu hücrelerin servikal mukus içerisindeki fonksiyonel yeterliliğinin dolayısıyla sperma kalitesinin incelenmesine yönelik olan SMPT, araştırmacılara sperma numunesi hakkında faydalı bilgiler sağlamaktadır. Ancak tek başına kullanıldığında diğer tüm analizler gibi elbette ki sağlayacağı veriler bakımından yetersiz kalabilmektedir. Bu sebeple tez çalışmasında SMPT analizine TM, PM, kinetik parametre ve akım sitometri analizleri de eklenerek boğa sperma kalitesi hakkında daha fazla bilgi edinilmesi amaçlanmıştır.

Spermatozoonların servikal mukus içerisindeki penetrasyon mesafelerinin belirlenmesi, sperma fertilizasyon oranının değerlendirilmesinde yardımcı olabilmektedir (Taş ve ark., 2006). Spermatozoonların servikal mukus içerisinde ilerlemesinde TM değerinin önemli olduğu, ayrıca sperma kalitesinin belirlenmesinde de önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Gillan ve ark., 2008). Bir SMPT çalışmasında, payet içerisinde belirlenen en uzak mesafeye en fazla sayıda spermatozoon ulaştırabilen grubun, TM değeri %60'dan yüksek olan sperma numunelerinde olduğu şeklinde bildirilmektedir (Krishnan ve ark., 2016). Boğa sperması ve sığır servikal mukusu kullanılarak yapılan bir çalışmada tez çalışmasıyla yakın penetrasyon aralıklarındaki sperma numunelerinin TM değeri incelenmiş ve 52.22 ± 1.09 total motiliteye sahip spermatozoonların <20 mm'ye kadar gidebildikleri, TM değeri azalıp, inkübasyon süresi arttıkça penetrasyon mesafesinin azaldığı bildirilmektedir (Kedia ve ark., 2013). Yapılan tez çalışmasında TM <40 olan grupta spermatozoonlar diğer gruplara göre üç penetrasyon aralığına da ulaşmada olumsuz sonuçlar vermekte, en fazla spermatozoon sayısı ise bu grup için 32,5-35,0 mm aralığında olduğu görülmektedir. Bahsedilen çalışmadan farklı olmasının sebebinin spermatozoonların morfolojik özelliklerine ve uygulanan farklı inkübasyon süresine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Ancak diğer araştırmalar ve tez çalışmasının ortak paydası TM değeri >50 olan sperma numuneleri bakımından tüm

penetrasyon aralıklarında daha düşük motiliteye sahip numunelere göre daha fazla sayıda spermatozoon bulunmasıdır. Ayrıca en uzak mesafe olan PA3 aralığına yani 50,0–52,5 mm mesafesine TM >%50 olan sperma numunelerinin TM %40-%50 ve TM <%40 gruplarından daha fazla sayıda spermatozoon ulaştırabilmesi diğer bir ortak sonuçtur. İnsanlarda, sığır servikal mukusu kullanılarak yapılan çalışmalarda total motilitesi %30'un üzerinde olan sperma numunelerinin fertilite sonuçlarını önemli oranda etkilediği bildirilmektedir (Paoli ve ark., 2011). Boğa sperması kullanılarak yapılan bir çalışmada ise TM değeri yaklaşık %60 olan fertilite grubuna ait numunelerden elde edilen gebelik oranının daha düşük motiliteye sahip gruplara oranla yüksek olduğu bildirilmiştir (Pardede ve ark., 2020). Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar yapılan diğer çalışmaların sonuçlarıyla olumlu yönde örtüşmektedir. Dolayısıyla servikal mukus penetrasyon testi, bilgisayar destekli sperma analizi motilite ve kinetik parametre verileri, plazma membran ve akrozom bütünlüğü analizi ve mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesine yönelik analizlerle desteklendiği takdirde total motilitesi %50 ve üzeri olan boğa sperma numunelerinin servikal mukus penetrasyon testi sonuçlarının fertilite belirteci olarak önemli bilgiler vereceği düşünülmektedir.

Akım sitometri analizi, kısa sürede binlerce spermatozoonu değerlendirerek mitokondriyal membran potansiyeli, akrozom bütünlüğü, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı gibi sperma kalitesini etkileyen parametreler hakkında bilgi sağlamaktadır (Garcia-Vazquez ve ark., 2016; Gliozzi ve ark., 2017 ve Tırpan ve ark., 2018). Bu parametrelere yönelik çalışmaların in vitro fertilizasyon ve SMPT çalışmalarıyla desteklenmesi gerektiği belirtilmektedir (Gillan ve ark., 2005). Mitokondriyal membran potansiyelinin sığır (Celegghini ve ark., 2007a; Celegghini ve ark., 2008 ve Forero-Gonzalez ve ark., 2012), at (Celegghini ve ark., 2010a ve Nascimento ve ark., 2008), domuz (Andrade ve ark., 2007), koyun (Celegghini ve ark., 2010b) ve kanatlı (Celegghini ve ark., 2007b) türlerinde sperma kalitesinin belirlenmesinde kullanıldığı ve fertilite ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bilindiği üzere spermatozoonlardaki mitokondri bu hücrelerin oosite ulaşabilmesi ve penetre olabilmesi için enerji sağlamaktadır (Lardy ve Phillips, 1941 ve Tourmente ve ark., 2015). Dolayısıyla düşük ve yüksek mitokondriyal membran potansiyeline sahip olmalarının

spermatozoonların oosite ulaşma sürecinde özellikle servikal mukus içerisinde yol almalarını etkileyeceği düşünülerek tez çalışmasında DMMP ve YMMP değerleri incelenmiştir. Boğa spermasıyla yapılan bir çalışmada, YMMP $45,07 \pm 1,76$ olarak bulunmuş, bu değer tez çalışmasında en yüksek PA3 >50 grubunda $65,00 \pm 13,06$, en düşük PA3 <40 grubunda $30,77 \pm 17,61$ olarak belirlenmiştir. Bahsi geçen çalışmada $45,07 \pm 1,76$ YMMP değerine sahip grubun fertilité oranlarının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Gliozzi ve ark., 2017). Tez çalışması sonuçlarının daha yüksek olması sebebiyle YMMP değerinin spermatozoonlara servikal mukusu penetre etmede olumlu yönde yardımcı olduğu düşünülmektedir. İnsanlarda yapılan bazı çalışmalarda ise DMMP değerine sahip grubun orta ve yüksek MMP değerine sahip gruplara oranla daha düşük fertilité oranına sahip olduğu, aynı şekilde oositi penetrasyon ve gebelik elde etme oranlarının da bu grupta daha düşük olduğu belirtilmiştir (Kasai ve ark., 2002 ve Paoli ve ark., 2011). Tez çalışması sonuçlarına göre servikal mukus ile dolu payetler içerisinde en uzak mesafeye gitmeyi başaramayan grupta (PA3 <40) DMMP değeri $69,01 \pm 17,67$, YMMP değeri ise $30,77 \pm 17,61$ olarak bulunmuştur. Bu çalışma sonuçlarının, MMP'nin servikal mukusu ve oositi penetrasyonda etkili olduğu göz önüne alınacak olursa, tez çalışmasında en yüksek DMMP değerine sahip grubun servikal mukusu penetre edemeyerek payet içerisinde ilerleyememesini açıkladığı düşünülmektedir. Mitokondriyal membran potansiyeli ve fertilité ilişkisinin belirlenmesi amacıyla sığırlarda yapılan çalışmalarda sırasıyla YMMP ve DMMP değerlerini Morrell ve ark. (2018), 58 ± 12 ve 42 ± 12 , Celeghini ve ark. (2008), $55,2 \pm 1,2$ ve $42,1 \pm 3,4$ olarak bulduklarını, Oliveria ve ark. (2014b), ise çalışmalarında YMMP değerini $61,5$ olarak bulduklarını belirtmişlerdir. Tez çalışmasında, YMMP değeri PA3 >50 grubunun değeri $65,00 \pm 13,06$, PA3 $40-50$ grubu $58,94 \pm 17,26$ ve PA3 <40 grubu ise $25,60 \pm 14,04$ olarak, DMMP değeri PA3 >50 grubunda $34,73 \pm 12,91$, PA3 $40-50$ grubunda $40,96 \pm 17,26$ ve PA3 <40 grubunda ise $69,01 \pm 17,67$ olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar ve tez çalışması sonuçları arasındaki farklılığın sperma kalitelerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmalarda hem Celeghini ve ark. (2008), hem de Oliveira ve ark. (2014b), yaklaşık 50 ve üzeri YMMP değerine sahip sperma numunelerinden elde edilen gebelik sayısının daha fazla olduğunu

belirtmektedir. Morrell ve ark. (2018), ise fertilitenin mitokondriyal membran potansiyeli ile ilişkili olduğunu ancak etçi ve sütçü sığırlar arasında fertilite oranı bakımından fark bulamadıklarını bildirmişlerdir. Tez çalışmasında YMMP değerinin belirtilen çalışmalardan yüksek çıkması kullanılan sperma numunelerinin penetrasyon ve migrasyon yeteneklerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla SMPT ve MMP analizlerinin sperma kalitesinin belirlenmesinde kullanılabileceği ve fertilite kapasite tahmininde ön bilgi sağlayacağı düşünülmektedir.

Sperma kalitesinin ve spermatozoonların fertilite yeteneklerinin belirlenmesinde önemli bir parametre olan PMAB, tez çalışmasında SMPT ile birlikte incelenmiştir. Yapılan çalışmada PMAB bakımından tüm gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bu değer PA3 >%50, PA3 %40-%50 ve PA3 <%40 gruplarında sırasıyla %59,91, %47,68 ve %25,60 olarak bulunmuştur. Boğa sperması kullanılarak yapılan bir çalışmada, SMP testine tabi tutulan sperma numunelerinin PMAB değeri floresan mikroskop kullanılarak incelenmiş ancak gruplar arasında fark bulunamamıştır (Gillan ve ark., 2008). Tez çalışmasında gruplar arasında fark bulunmasının sebebinin floresan mikroskop yerine, objektif şekilde daha fazla sayıda hücre incelemeye imkan sağlayan akım sitometri cihazının kullanılması olduğu düşünülmektedir. Sığır (Ray and Ghosh, 2013) ve manda (Singh ve ark., 2016) sperması kullanarak yapılan çalışmalarda akrozom bütünlüğü yüksek olan sperma numunelerinin servikal mukus içerisinde daha uzak mesafeye gidebildiklerini belirtilmiştir. Tez çalışmasında, spermatozoonlardan %50'den fazlası payetteki en uzak mesafe olan PA3 aralığına ulaşan grupta (PA3 > %50), PMAB değeri yüksek olan hücrelerin sayısı diğer gruplara (PA3 %40-%50 ve PA3 <%40) göre daha fazla sayıda bulunmuştur. Elde edilen çalışma verilerine göre PMAB değeri azaldıkça spermatozoonların katettikleri mesafe de azalmıştır. Boğa (Gillan ve ark., 2008), koç (Manes ve ark., 2016 ve Maxwell ve ark., 1999) ve mandada (Singh ve ark., 2016 ve Saini ve ark., 2020) yapılan çalışmaların PMAB ve SMPT sonuçları tez çalışmasında bulunan sonuçlarla örtüşmekte, ayrıca bu çalışmalardaki fertilite oranlarının SMP testinde uzak mesafelere ulaşabilen gruplarda PMAB ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmektedir. Fertilite ve PMAB arasındaki ilişkinin araştırması amacıyla boğa sperması kullanılarak yapılan bir çalışmada PMAB en yüksek %52 en düşük %26

olarak bulunmuştur (Ibanescu ve ark., 2020). Bu değer tez çalışmasında en yüksek $56,91 \pm 9,56$ olarak PA3 >50 grubunda, en düşük $25,60 \pm 14,04$ olarak PA3 <40 grubunda belirlenmiştir. Belirlenen değerler birbirine yakın olmakla birlikte aralarındaki farklılığın sperma kalitesinden ve bireysel farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ibanescu ve ark. (2020), çalışmasında PMAB ve fertilite potansiyeli arasında pozitif korelasyon olduğu belirtilmektedir. Fertilite ve korona radiatanın penetrasyonunda PMAB parametresinin etkili olduğunun bildirildiği çalışmalar da mevcuttur (Kasimanickam ve ark., 2019; Love, 2018; Oliveira ve ark., 2014b ve Shinohe ve ark., 2017). Tüm bu çalışmalar ışığında PMAB parametresinin fertilite ve SMP yeteneğini etkilediği, bu sebeple PMAB ve SMPT analiz sonuçları arasındaki korelasyonun sperma kalitesi ve fertilizasyon gücünün belirlenmesinde kullanılabileceği kanaatine varılmaktadır.

Total ve progresif motilitenin sperma kalitesi ve fertilite oranı bakımından oldukça önemli parametreler olduğu belirtilmektedir (İnanç ve ark., 2015). Boğa sperması kullanılarak yapılan bir çalışmada motilite ve servikal mukus penetrasyon mesafeleri karşılaştırılmış TM $45\%-60\%$ aralığında olan sperma numunelerinin 40 mm penetrasyon mesafesine kadar ulaşabildikleri bildirilmiştir (Kedia ve ark., 2013). Tez çalışmasında 50,0–52,5 mm (PA3) penetrasyon aralığına ulaşan gruptan PA3 >50 için TM $73,95 \pm 9,7$, PA3 $40\%-50$ için TM $65,02 \pm 13,01$ ve PA3 <40 için TM $40,17 \pm 17,97$ olarak bulunmuştur. Kedia ve ark.'nın (2013), çalışması ile penetrasyon aralığı yönünden karşılaştırıldığında farklı sonuçlar elde edilmesinin tez çalışmasında kullanılan numunelerin TM değerlerinin daha yüksek olmasıyla ilgili olduğu, motilite farklılığının ise bireysel sperma kalitesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Benzer bir çalışmada ise SMPT ve progresif motilite arasındaki ilişki incelenmiş ve PM değeri $69,10 \pm 0,75$ olan numunelerin $31,32 \pm 0,70$ mm penetrasyon aralığına ulaşabildikleri bildirilmiştir (Sonar ve ark., 2016). Tez çalışması sonuçları 50,0–52,5 mm (PA3) penetrasyon aralığına ulaşan gruptan PA3 >50 için PM $27,45 \pm 7,33$, PA3 $40\%-50$ için PM $23,40 \pm 6,88$ son olarak PA3 <40 içinse PM $11,74 \pm 7,26$ olarak bulunmuştur. Tez çalışması PM sonuçlarının Sonar ve ark.'nın (2016), çalışmasında düşük olmasının bahsedilen çalışmada tez çalışmasından farklı olarak taze sperma numunesi kullanılması ve dolayısıyla

dondurma çözdürmeye bağlı motilite kaybı yaşanmamasıyla ilgili olduğu, penetrasyon aralıkları yönünden incelendiğinde ise tez çalışmasında kullanılan numunelerin daha uzak mesafelere gidebildikleri gözlemlenmekte bu durumun da kullanılan SMPT tekniğinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Boğalarda yapılan başka bir çalışmada > 50 mm penetrasyon aralığına ulaşabilen spermatozoonların TM değeri ortalama $48,22 \pm 15,54$ ve PM değeri ortalama $31,77 \pm 11,28$ olarak bildirilmiştir (Galli ve ark., 1991). Tez çalışmasında 50,0–52,5 mm (PA3) penetrasyon aralığına ulaşan gruplardan PA3 > %50 için TM $73,95 \pm 9,7$ ve PM $27,45 \pm 7,33$, PA3 %40–%50 için TM $65,02 \pm 13,01$ ve PM $23,40 \pm 6,88$ son olarak PA3 < %40 içinse TM $40,17 \pm 17,97$ ve PM $11,74 \pm 7,26$ olarak bulunmuştur. Tez çalışmasında tüm gruplar arasında fark bulunmakla beraber PA3 aralığında en düşük sayıda spermatozoon bulunan grubun TM ve PM değeri Galli ve ark.'nın (1991), > 50 mm aralığı için bulduğu değerlerden (TM $48,22 \pm 15,54$, PM $31,77 \pm 11,28$) düşük bulunmuştur. Ancak tez çalışmasında değerlendirilen üç grupta 50,0–52,5 mm uzaklığına ulaşabilen spermatozoonlardan oluştuğu için yaklaşık olarak ≥ 40 TM ve ≥ 11 PM değerine sahip spermatozoonların da >50 mm aralığına ulaşmada başarılı olacağı düşünülmektedir. Boğa (Gliozzi ve ark., 2017) ve insanda (Holmes ve ark., 2019) yapılan çalışmalarda TM ve PM parametrelerinin spermatozoonların servikal mukus penetrasyonunda ve fertilite sonuçlarında etkili olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmalarda tez çalışması sonuçlarına benzer şekilde TM ve PM yüzdeleri yüksek olan spermatozoonların SMPT'nde belirlenen en uzak mesafeye ulaşmada daha başarılı oldukları belirtilmiştir. Yapılan çalışma sonuçlarının yanı sıra bahsedilen ve benzeri çalışmalar ışığında tek başlarına yeterli olmamakla birlikte TM ve PM yüzde değerleri arttıkça spermatozoon penetrasyon yeteneğinin arttığı düşünülmektedir (Nicovich ve ark., 2015 ve Sonar ve ark., 2016).

Kinetik parametre sonuçlarında ise özellikle VAP değerinin gebelik oranlarıyla ve spermatozoonun dişi genital kanalda migrasyon yeteneği ile yüksek oranda pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmektedir (Cox ve ark., 2002 ve Tekin ve Daşkın, 2016). VAP, spermatozoonun yörünge üzerindeki ortalama hızını ifade etmektedir. Bu kinetik parametre spermatozoonun izlediği eğrisel yolun bilgisayar destekli sperma analiz cihazlarındaki çeşitli algoritmalarla düzleştirilmiş yolak haline getirilmesiyle

hesaplanmaktadır (Mortimer, 2000). Tez çalışmasında, VAP değerinin gruplar arasında yapılan analize göre sonuçları PA3 >%50 grubunda $98,80 \pm 10,03 \mu\text{m/s}$, PA3 %40-%50 grubunda $97,03 \pm 10,58 \mu\text{m/s}$ ve PA3 <%40 grubunda $91,12 \pm 8,41 \mu\text{m/s}$ olarak belirlenmiştir. PA3 (50,0–52,5 mm) aralığına en az sayıda spermatozoon ulaştırabilen grupta VAP değeri diğer gruplara göre daha düşük bulunmuş ve bu düşük değer istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Manda boğa sperması kullanılarak yapılan bir SMPT çalışmasında istatistiksel olarak önemsiz olsa da ≥ 20 mm uzaklığa erişebilen sperma numunelerinde ($106,2 \pm 4,6 \mu\text{m/s}$) VAP değerinin ≤ 20 mm grubuna ($101,2 \pm 4,0 \mu\text{m/s}$) göre daha yüksek değere sahip olduğu bildirilmektedir (Singh ve ark., 2016). Tez çalışmasında VAP parametresi bakımından gruplar arasında fark bulunmasının örnek sayısının yüksek olmasından ve bireysel farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Koç spermasının servikal mukus penetrasyon yeteneğiyle ilgili olarak yapılan çalışmalarda ise yüksek VAP değerine sahip spermatozoonların servikal mukus içerisindeki migrasyon yetenekleri arasında pozitif korelasyon bulunduğu bildirilmektedir (Martinez- Rodriguez ve ark., 2012 ve Robayo ve ark., 2008). Boğa spermasıyla yapılan çeşitli çalışmalarda VAP değeri yüksek olan spermatozoonların dişi genital kanalda ilerleme yeteneklerinin, oositi penetrasyon güçlerinin ve fertilite oranlarının yüksek olduğu bildirilmektedir (Gillan ve ark., 2008 ve Phillips ve ark., 2004). Yapılan tez çalışması sonuçları bahsi geçen çalışmalarda SMPT ve VAP değeri korelasyonu yönünden benzer sonuçlara ulaşıldığından VAP değeri analizinin SMPT araştırma sonuçlarıyla birlikte kullanıldığında spermatozoonların migrasyon yeteneği ve fertilite oranı tahmininde önemli bilgiler vereceği düşünülmektedir.

VCL (Curvilinear velocity), eğrisel hız olarak tanımlanmaktadır. Spermatozoon başının ilerlerken katettiği 2 boyutlu gerçek eğrisel yoldaki hızıdır ve spermatozoa canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Akçay ve ark., 2006 ve Mortimer, 2000). Yapılan çeşitli çalışmalarda VCL değerinin, oositlerin %50'den fazlasını dölleyen sperma numunelerinde, oositlerin %50'den daha azını dölleyen numunelere göre anlamlı derecede yüksek çıktığı, VCL ve fertilite oranı arasında pozitif bir korelasyon bulunduğu belirtilmektedir (Jokiniemi ve ark., 2020 ve Nagy ve ark., 2015). Boğalarda yapılan bir çalışmada VCL değeri $173,51 \pm 3,96 \mu\text{m/s}$ olarak

bulunmuştur (Gooverts ve ark., 2006). Bu değer tez çalışmasında, PA3 >%50 grubunda $178,02 \pm 19,70 \mu\text{m/s}$, PA3 %40-%50 grubunda $175,01 \pm 21,14 \mu\text{m/s}$ ve PA3 <%40 grubunda ise $164,77 \pm 16,24 \mu\text{m/s}$ olarak bulunmuştur. Bir diğer çalışma da ise VCL değerinin $108,09 \pm 42,88 \mu\text{m/s}$ olarak bulunduğu bahsedilmektedir (Yaniz ve ark., 2018). Bahsi geçen çalışmalarda elde edilen VCL değeri tez çalışmasında bulunan ve PA3 (50,0–52,5 mm) aralığına ulaşmada yüksek başarı sağlayan ilk iki gruptan (PA3 >%50, PA3 %40-%50) daha düşük, bu penetrasyon aralığına ulaşmada daha yetersiz kalan son grubun (PA3 <%40) VCL değeri Gooverts ve ark. (2006), çalışmasındaki değerden düşük, Yaniz ve ark. (2018), bulduğu sonuçtan ise yüksek olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar karşılaştırıldığında, VCL değerinin spermatozoon migrasyon yeteneğinde etkili olabileceğini düşünülmektedir. Çünkü VCL değeri daha düşük olan grup PA3 aralığına ulaşmada diğer gruplara oranla daha az başarılı olmuştur. Koçlarda koyun, keçi ve sığır servikal mukusu kullanılarak yapılan bir çalışmada, VCL değerinin her üç servikal mukusta da spermatozoonların migrasyon yeteneğini etkilediği belirtilmektedir (Robayo ve ark., 2008). VCL kinetik parametresinin IVF sonuçlarıyla yüksek korelasyon gösterdiği (Holt ve ark., 1997 ve İnanc ve ark., 2018), ve fertilite oranlarının tahmininde SMPT ile birlikte kullanılabileceğine yönelik bir çalışmada bulunmaktadır (Martinez- Rodriguez ve ark. 2012). Tez çalışmasında elde edilen SMPT ve VCL korelasyonu ile benzer çalışmalarla paralel sonuçlara ulaşılmaktadır.

Fertilite ve servikal mukus penetrasyon yeteneği ile ilişkilendirilen bir diğer parametre olan STR (Straightness), spermatozoon yörüngesi üzerindeki ortalama doğrusal yol olarak ifade edilmektedir (Mortimer, 2000). Tez çalışması sonuçlarına göre STR parametresi bakımından her üç grup arasında da istatistiksel açıdan fark önemli bulunmuştur. Bir SMPT çalışmasında belirtilen en uzak mesafeye ($\geq 20 \text{ mm}$) gidebilen spermatozoon popülasyonunda bu değer $82,3 \pm 1,1$ ile tez çalışmasındaki değerlerden yüksek olarak belirlenmiştir (Singh ve ark., 2016). Bu değer bahsedilen çalışmada her ne kadar yüksek bulunmuş olsa da, tez çalışmasındaki diğer iki grupta olduğu gibi $69,55 \pm 3,83$ STR değerine sahip grubun dahi daha fazla mesafe katedebildiği gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin bireysel farklılıkların yanı sıra PMAB ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Şöyle ki plazma membran ve akrozom

bütünlüğü yüksek olan spermatozoonların STR değeri yapılan bir çalışmada ortalama $73,05 \pm 28,06$ olarak belirlenmiştir (Yaniz ve ark., 2018). STR parametresinin fertilite ile ilişkisini düşük olarak belirleyen çalışmalar (Botta ve ark., 2019 ve İnanc ve ark., 2018) bulunmakla birlikte, aralarında pozitif korelasyon olduğunu belirten çalışmalar da bulunmaktadır (Krishnan ve ark., 2016 ve Luongo ve ark., 2019). STR yüzdesi ve fertilite oranlarının incelendiği bir çalışmada, yüksek fertilite oranı belirlenen grupta STR $64,86 \pm 1,03$ olarak, tez çalışması gruplarından PA3 (50,0–52,5 mm) aralığına en çok spermatozoon ulaşan grupta (PA3 >%50) yakın değerde belirlenmiştir. Fertilite ve STR değeri arasındaki ilişki netleştirilememiş olsa da spermatozoonların servikal mukus migrasyon ve penetrasyonu ile aralarında ilişki olduğu belirtilmektedir (Martinez-Rodriguez ve ark., 2012). Tez çalışmasında gruplar arasında fark bulunması, ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmakla birlikte SMPT ile STR korelasyonunun spermatozoon penetrasyon yeteneği ve fertilite ile ilgili faydalı bilgiler sağlayacağını düşündürmektedir.

Spermatozoonların servikal mukus içerisinde izlemiş oldukları yolun oldukça önemli olduğu bilinmektedir (Katz ve ark., 1992). Bu yolun belirlenmesinde kullanılan parametrelerden biri de lineerlik (LIN) yani eğrisel yolakların doğrusallığıdır. Spermatozoon başının belirlendiği ilk ve son nokta arasındaki doğrusal hızın, 2 boyutlu gerçek eğrisel yoldaki hıza oranıyla belirlenmektedir (Verstegen ve ark., 2002). Fertilite oranları ve kinetik parametrelerin ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Gliozzi ve ark., 2017) LIN $30,15 \pm 0,80$, benzer bir diğer çalışmada ise $51,64 \pm 1,16$ olarak belirlenmiştir (Gooverts ve ark., 2006). Tez çalışmasında LIN değeri PA3 >%50, PA3 %40-%50 ve PA3 <%40 gruplarında sırasıyla $39,80 \pm 3,56$, $41,07 \pm 2,43$ ve $42,20 \pm 2,07$ olarak belirlenmiş ve PA3 >%50 grubu diğer gruplara göre istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Gliozzi ve ark. (2017), yaptığı araştırma sonuçlarından yüksek, Gooverts ve ark. (2006), elde ettiği sonuçtan ise düşük bulunmuştur. Farklı sonuçlar elde edilmesinin kullanılan cihaza bağlı olduğu düşünülmektedir çünkü kullanılan algoritmalar yazılımsal olarak ya da türe bağlı olarak farklı sonuçlar verebilmektedir (Al-Qarawi ve ark., 2002; Broekhuijse ve ark., 2012; Cox ve ark., 2006 ve Tekin ve Daşkın, 2016). SMPT çalışmalarında LIN değerinin spermatozoon penetrasyon yeteneğini ve IVF başarı oranını etkilediği

belirlenmektedir (Gillan ve ark., 2008; Robayo ve ark., 2008 ve Singh ve ark., 2016). PA3 aralığına en fazla sayıda spermatozoon ulaşan grupta bu değerin düşük olmasının sebebinin hiperaktivite olabileceği düşünülmektedir. Hiperaktivite değeri artan spermatozoonların LIN değerinin azaldığı ve penetrasyon yeteneklerinin de değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir (Cox ve ark., 2006 ve Singh ve ark., 2016). Ancak hiperaktivitesi yüksek spermatozoonların fertilite oranlarının daha yüksek olduğunu belirten çalışmalar da bulunmaktadır (Shojaei ve ark., 2012 ve Ibanescu ve ark., 2020). Tez çalışmasında gruplar arasında fark bulunması, SMPT ve LIN korelasyonunun sperma kalitesi, spermatozoon penetrasyon yeteneği ve fertilite oranı hakkında sağlayacağı ön verilerle rutin analizlere katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Tez çalışmasında incelenen diğer kinetik parametreler doğrusal hız (VSL, $\mu\text{m/s}$), spermatozoon başının yanal sapma genliği (ALH, μm) ve çapraz geçiş frekansıdır (BCF, Hz). Bu parametreler incelenmiş ancak gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır. Manda boğa sperması kullanılarak yapılan bir SMPT çalışmasında VSL değeri ≥ 20 mm mesafeye ulaşabilen sperma numunelerinde $86,8 \pm 3,4 \mu\text{m/s}$, ≤ 20 mm mesafeye ulaşabilen sperma numunelerinde ise $84,2 \pm 3,2 \mu\text{m/s}$ olarak, ALH değeri ≥ 20 mm grubu için $6,3 \pm 0,5 \mu\text{m}$, ≤ 20 mm grubu için $6,9 \pm 0,7 \mu\text{m}$, BCF değeri ise ≥ 20 mm grubu için $35,0 \pm 0,7$ Hz ve ≤ 20 mm grubu için $34,8 \pm 0,6$ Hz olarak belirlenmiş olup her üç kinetik parametre değeri için de gruplar arasında fark bulunamadığı belirtilmiştir (Singh ve ark., 2016). Boğa sperması ile yapılan bir çalışmada ise sperma numunelerine swim-up yöntemi uygulanmış gruplar arasında VSL, ALH ve BCF değerleri bakımından fark bulunduğu ancak spermatozoon migrasyon testinde ortalama $41,0 \pm 2,0$ mm uzaklığa gidebilen numuneler değerlendirildiğinde gruplar arasında fark bulunamadığı bildirilmiştir (Gillan ve ark., 2008). Tez çalışmasında sperma numuneleri PA3 (50,0–52,5 mm) aralığında değerlendirilmiş ve PA3 > 50 , PA3 $40-50$ ve PA3 < 40 grupları için sırasıyla VSL $69,39 \pm 6,25 \mu\text{m/s}$, $69,76 \pm 6,99 \mu\text{m/s}$ ve $67,72 \pm 6,58 \mu\text{m/s}$, ALH $7,73 \pm 0,57 \mu\text{m}$, $7,81 \pm 0,65 \mu\text{m}$ ve $7,92 \pm 0,61 \mu\text{m}$, BCF $24,80 \pm 1,86$ Hz, $24,77 \pm 1,47$ Hz ve $25,34 \pm 1,74$ Hz olarak bulunmuştur. Bu değerler bahsedilen çalışmalarla migrasyon ve penetrasyon yeteneği bakımından karşılaştırıldığında benzer şekilde gruplar arasında fark olmadığı gözlemlenmektedir. Singh ve ark. (2016), çalışmasındaki değerlerden farklı

bulunmasının sebebinin manda ve boğa sperması arasındaki farktan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Gillan ve ark. (2008), çalışma sonuçlarından farklı değerler elde edilmesinin ise bu çalışmada sperma numunelerine swim-up uygulanmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada sperma numuneleri kinetik parametreler, servikal mukus penetrasyon yeteneği ve fertilite bakımından değerlendirilmiş VSL, ALH, BCF parametreleri yönünden bireyler arasında fark bulunduğu ancak bu değerlerin servikal mukus içerisinde spermatozoonların katettikleri mesafeyi ve fertilite sonuçlarını etkilemediği belirtilmiştir (Saini ve ark., 2020). Boğa spermalarının fertilite oranları yönünden gruplandırılarak değerlendirildiği bir çalışmada spermalar VSL, ALH ve BCF kinetik parametreleri incelendiğinde yüksek ve düşük fertilite grupları arasında fark bulunmadığı dolayısıyla fertilite oranını istatistiksel açıdan önemli düzeyde etkilemediği belirtilmektedir (Gliozzi ve ark., 2017). VSL, ALH ve BCF parametrelerinin progresif motilite ve spermatozoon hiperaktivitesini etkilediği bu sebeple fertiliteyi etkileyebileceği ancak daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu belirten araştırmalar da bulunmaktadır (Al-Qarawi ve ark., 2002 ve Ibanescu ve ark., 2020). Bu kinetik parametrelerin sperma subpopülasyonlarındaki yeri ve kinetik değerlendirmeler için önemi kabul edilmekle birlikte, tez çalışmasında gruplar arasında fark bulunmamıştır. Bu durum VSL, ALH ve BCF parametrelerinin spermatozoon migrasyon ve penetrasyon yeteneğine önemli düzeyde etki edip etmediğinin rutin sperma analiz yöntemlerine servikal mukus penetrasyon testinin eklenerek spermaların değerlendirilmesinin faydalı olacağını düşündürmektedir.

Gelişen analiz yöntemleri göz önüne alındığında sperma kalitesinin ve fertilizasyon gücünün belirlenmesinde sadece motilite ve morfoloji analizlerinin yeterli olmayacağı düşünülmektedir. Bahsi geçen tüm çalışmalar ışığında damızlık boğaların spermasının değerlendirilmesinde motilite, kinetik parametre analizi, PMAB ve MMP analizlerinin birlikte kullanıldığında daha objektif veriler elde edileceği sonucuna varılmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde sperma kalitesi ve fertilite kapasitesinin belirlenmesine yönelik çalışmalar diğer türlerde olduğu gibi boğa spermasına yönelik olarakta devam etmektedir. Pek çok araştırmada SMPT'nin spermatozoon migrasyon, penetrasyon ve fertilite kapasitesi hakkında önemli veriler sağladığı bildirilmektedir. Bu sebeple insan sperması üzerine çalışma yapan laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmaktadır.

Yapılan çalışmada nispeten yeni bir yöntem olan payet yöntemi ile SMPT, CASA ve akım sitometri analiz sonuçları arasındaki korelasyon incelenmiştir. Çalışma bulgularına göre farklı penetrasyon aralıklarında total motilite ayrıca spermatozoon kinetik özelliklerine, mitokondriyal membran potansiyeli ile plazma membran ve akrozom bütünlüğüne bağlı olarak spermatozoonların servikal mukusu penetrasyon oranlarında farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda boğa sperması üretim istasyonlarında da rutin olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmasında sperma kalitesi ve fertilite kapasitesinin belirlenmesi için yapılan analizlerde sığır servikal mukusu kullanılmış ve SMPT 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Günümüz sperma üretim laboratuvarları için ulaşılabilir materyal ve ortamlar olduğu düşünülmektedir. Boğa sperma kalitesinin ve fertilizasyon gücünün tahmin edilmesinde lamel ve kapillar tüp testlerine göre payet yönteminde, spermatozoonlar payet içerisinde belirlenen bölgelerde sabitlenerek sayıldığından dolayı daha objektif sonuçlar elde edileceği çalışma sonuçlarıyla ortaya konulmuştur. Çalışmada, sığır servikal mukusu kullanılması, sentetik mukus kullanımının seçenekler arasında olması, uygulanan payetleme, ekilibrasyon, sıvı azotta sabitleme, faz-kontrast mikroskopta spermatozoon sayımı sperma üretim laboratuvarlarında gerçekleştirilebilir işlemlerdir. SMPT testi sağladığı veriler ve kolay uygulanabilir olması sebebiyle öne çıkmakta dolayısıyla sperma üretim laboratuvarlarında kullanılan rutin analizler arasına dahil edilmesi önerilmektedir. Öte yandan üretilen boğa spermalarının fertilite verilerinin sahadan elde edilmesi her zaman sağlıklı ve

kolay şekilde gerçekleştirilememekte dolayısıyla sperma fertilite kapasitesinin belirlenmesi önem kazanmaktadır. TM ve PA arasındaki korelasyon ve oluşturulan çalışma grupları arasındaki istatistiksel fark, insan ve çeşitli hayvan türlerinin fertilite oranı karşılaştırmasını içeren çalışma sonuçlarıyla olumlu yönde benzerlik göstermektedir. Bu da boğa sperması üretim istasyonlarında SMPT uygulaması kullanıldığı takdirde sperma kalitesi ve fertilite kapasitesi hakkında daha fazla bilgiye ulaşılabileceğinin göstergesidir.

PA3 (50,0–52,5 mm) aralığına ulaşmada, spermatozoonların kinetik değerlerinin özellikle VAP, VCL, STR ve LIN gibi fertiliteyi etkilediği belirtilen parametrelerin farklılık oluşturduğu yapılan tez çalışması sonuçlarıyla belirlenmiştir. Ayrıca spermatozoon penetrasyon yeteneği üzerine MMP ve PMAB sonuçlarının da etkili olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla sperma kalitesi ve fertilite potansiyelinin belirlenmesinde SMPT, CASA ve akım sitometri analizlerinin birlikte kullanılmasının daha kapsamlı veriler sağlayacağı sonucuna varılmıştır. Ancak boğa sperması üretim istasyonlarında ve laboratuvarlarda kullanımının standardize edilebilmesi için fertilizasyon verileri ile karşılaştırılan ve desteklenen ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu belirtilmelidir.

ÖZET

Damızlık Boğa Spermasının Servikal Mukus Penetrasyon Yeteneğinin Değerlendirilmesi

Tez çalışmasının amacı, boğa spermalarının servikal mucus penetrasyon testi (SMPT) ile değerlendirilerek sonuçlarının kinetik parametreler, mitokondriyal membran potansiyeli, plazma membran ve akrozom bütünlüğü ile korelasyonunun belirlenmesidir. İnsanlarda rutin olarak kullanılan SMPT, tez çalışmasında nispeten yeni bir yöntem olan payet yöntemi kullanılarak uygulanmıştır. Elde edilecek olan sonuçlar doğrultusunda boğa sperması üretim istasyonlarında da rutin kullanıma uygunluğunun ortaya konulması hedeflenmiştir. Çalışmada 140 farklı ejakülata ait dondurulmuş sperma numuneleri kullanılmıştır. Servikal mucus draminski dedektörü ile kızgınlıkları belirlenen dişilerden toplanarak, uzama değerinin tespit edilmesi amacıyla Spinnbarkeit testine tabi tutulmuşlardır. Payetler 15,0-17,5 mm (PA1), 32,5-35,0 mm (PA2) ve 50,0-52,5 mm'ler (PA3) olmak üzere penetrasyon aralıklarının belirlenmesi amacıyla işaretlenmiştir. İşaretli payetler steril tüpler içerisindeki sperma numuneleri ile 37 °C'de 45 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında spermatozoonları bulundukları noktada tespit etmek amacıyla örnekler sıvı azot buharında dondurulmuştur. Belirlenen aralıklardaki spermatozoonlar total motilite (TM) bakımından değerlendirilmiş, sonrasında PA3 aralığına ulaşabilen spermatozoon yüzdeleri hesaplanarak kaydedilmiştir. Her üç PA bölgesinde de en yüksek spermatozoon varlığı gösteren numuneler >%50 TM değerine sahip olanlardır. Bu durum PA1 ve PA2 bölgelerinde %40-%50 ve <%40 TM grupları arasında anlamlı fark çıkmaması şeklinde sonuçlanmış, farklı TM değerleri için, PA1 ve PA2 bölgelerinde yakın sayıda spermatozoon varlığı saptanmıştır. PA3 grubunda en az spermatozoon bulunan grup <%40 TM değerindeki numuneler olmuştur. Düşük mitokondriyal membran potansiyeli (DMMP), PA3 >%50 grubunda %37,73, PA3 %40-%50 grubunda %40,96 ve PA3 <%40 grubunda %69,01 olarak PA3 <%40 grubunda diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Yüksek mitokondriyal membran potansiyeli (YMMP) PA3 >%50 grubunda %65,00, PA3 %40-%50 grubunda %58,94 ve PA3 <%40 grubunda %30,77 olarak PA3 <%40 grubunda diğer gruplara göre daha düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Plazma membran ve akrozom bütünlüğü sonuçlarına göre (PMAB) (PA3 >%50; %56,91, PA3 %40-%50; %47,68 ve PA3 <%40; %25,60) üç grup arasında da fark belirlenmiştir ($p<0,001$). TM (PA3 >%50; %73,95, PA3 %40-%50; %65,02 ve PA3 <%40; %40,17) ve progresif motilite (PM) (PA3 >%50; %27,45, PA3 %40-%50; %23,40 ve PA3 <%40; %11,74) bakımından her üç grup arasında da fark belirlenmiştir ($p<0,001$). Kinetik parametreler incelendiğinde PA3 >%50, PA3 %40-%50 ve PA3 <%40 grupları için sırasıyla ortalama hız (VAP) (98,80 $\mu\text{m/s}$, 97,03 $\mu\text{m/s}$, 91,12 $\mu\text{m/s}$) ve eğrisel hız (VCL) (178,02 $\mu\text{m/s}$, 175,01 $\mu\text{m/s}$, 164,77 $\mu\text{m/s}$) değerleri için PA3 <%40 grubunda, eğrisel yol doğrusallığı (LIN) (%39,80, %41,07, %42,20) değeri için PA3 >%50 grubunda fark belirlenmiştir. Doğrusallık (STR) kinetik değerinde ise (PA3 >%50; %69,55, PA3 %40-%50; %71,66 ve PA3 <%40; %73,30) her üç grup arasında da fark belirlenmiştir ($p<0,01$) ($p<0,001$). Doğrusal hız (VSL), spermatozoon başının yanal sapma genliği (ALH), ve çapraz geçiş frekansı (BCF) bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak fark belirlenmemiştir. Bu bulgular doğrultusunda kinetik parametre, MMP ve PMAB değerlerinin spermatozoonların servikal mucus içerisindeki penetrasyon ve migrasyon yetenekleri üzerinde etkili olduğu bu sebeple SMPT sonuçlarını etkilediği ve sperma kalite parametrelerinden PMAB, YMMP, VAP ve VCL ile arasında pozitif korelasyon olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Boğa, Sperma, SMPT, CASA, Akım Sitometri.

SUMMARY

Evaluation of Cervical Mucus Penetration Ability of Breeding Bull's Semen

The aim of the thesis; to evaluate bull sperm motility and viability using cervical mucus penetration test (SMPT) determination of correlation of results with computer-assisted sperm analysis (CASA) kinetic parameters, mitochondrial membrane potential, plasma membrane and acrosome integrity. SMPT, which is routinely used in humans, has been applied using the sequin method, a relatively new organisation in this study. It is aimed to demonstrate the suitability for routine use in bull stations. In this study, 140 different ejaculate frozen semen samples were used. Cervical mucus, which was subjected to the Spinnbarkeit test to determine the elongation value, was collected from females whose estrus was determined with a draminski detector. Straws are marked 15.0-17.5 mm (PA1), 32.5-35.0 mm (PA2) and 50.0-52.5 mm (PA3) to determine the penetration ranges. Marked straws were left for 45 minutes of incubation at 37 ° C with semen samples in sterile tubes. After incubation, samples were frozen in liquid nitrogen vapour to detect spermatozoa at their location. First of all, spermatozoa in specified ranges were evaluated in terms of total motility (TM and Percentages of spermatozoa reaching PA3 range were calculated and recorded. Samples with the highest presence of spermatozoa in all three PA regions are those with a TM value of > 50%. There is no significant difference between the 40% -50% and <40% TM groups in the PA1 and PA2 regions. However, for different TM values, a close number of spermatozoa were detected in the PA1 and PA2 regions. The <40% TM group in the PA3 group contains the least spermatozoa. Low mitochondrial membrane potential (DMMP) was 37.73% in the PA3 > 50% group, 40.96% in the PA3 40-50% group and 69.01% in the PA3 <40% group, higher in the PA3 <40% group than in the other groups was found ($p < 0.001$). High mitochondrial membrane potential (HMMP) was found to be 65.00% in the PA3 > 50% group, 58.94% in the PA3 40-50% group, and 30.77% in the PA3 <40% group, lower in the PA3 <40% group compared to the other groups ($p < 0.001$). According to the plasma membrane and acrosome integrity results (PMAB) (PA3 > 50%; 56.91%, PA3 40-50%; 47.68% and PA3 <40%; 25.60%), statistically significant difference was determined between the three groups ($p < 0.001$). TM (PA3 > 50%; 73.95%, PA3 40% -50%; 65.02% and PA3 <40%; 40.17%) and progressive motility (PM) (PA3 > 50%; 27.45%, PA3 40-50%; 23.40% and PA3 <40%; 11.74%), a difference was determined between the three groups ($p < 0.001$). Moreover, the kinetics parameters were examined, the kinetic parameters are examined, the average velocity (VAP) (98.80 $\mu\text{m} / \text{s}$, 97.03 $\mu\text{m} / \text{s}$, 91.12 $\mu\text{m} / \text{s}$) for the PA3 > 50%, PA3 40% -50% and PA3 <40% groups, respectively. curvilinear velocity (VCL) (178.02 $\mu\text{m} / \text{s}$, 175.01 $\mu\text{m} / \text{s}$, 164.77 $\mu\text{m} / \text{s}$) for PA3 <40% group, and the curvilinear path linearity (LIN) value (39.80%, 41.07%, 42.20%), a difference was determined in the PA3 > 50% group. In linearity (STR) kinetic value (PA3 > 50%; 69.55%, PA3 40% -50%; 71.66% and PA3 <40%;

73.30%), a difference was determined between all three groups ($p < 0.01$) ($p < 0.001$). On the other hand, there was no statistically significant difference between the groups in terms of linear velocity (VSL), lateral deviation amplitude of the spermatozoon head (ALLAH), and crossover frequency (BCF). Overall, it was found that the kinetic parameter, MMP and PMAB values were effective on the penetration and migration abilities of spermatozoa in the cervical mucus. It was concluded that it affects the results of SMPT, and there is a positive correlation with PMAB, YMMP, VAP and VCL, which are among the sperm quality parameters.

Keywords: Bull, Semen, CMPT, CASA, Flow cytometry.



KAYNAKLAR

- ADNANE M, MEADE KG, O'FARRELLY C (2018). Cervico-vaginal mucus (CVM) e an accessible source of immunologically informative biomolecules. *Vet Res Commun*, **42**: 255e63.
- AGBUBGA LC, OYEWUNMI AO, IBIAM AO, LEIGH OO (2019). Vaginal mucus resistivity evaluation in cattle: Reliability of the swine estrous detector probe during 16th-Hour insemination following ovulation synchronization. *Nigerian Veterinary Journal*, **40(3)**: 186–189.
- AHMED M, CHOWDHURY MK, RAHMAN M, BHATTACHARJEE J, BHUIYAN MMU (2017). Relationship of electrical resistance of vaginal mucus during oestrus. *Bangladesh J Vet Med*, **15(2)**: 113–117.
- AHMADI MR, NAZIFI S, SAJEDIANFARD J, MOATTARI G (2007). Impact of estrous synchronization methods on cellular proportions in cervical mucus and serum hormone concentrations. *Theriogenology*, **67**: 598-604.
- AITKEN RJ, BOWIE H, BUCKINGHAM D, HARKISS D, RICHARDSON DW, WEST KM (1992). Sperm penetration into a hyaluron acid polymer as a means of monitoring functional competence. *J Androl*, **13**: 44-54.
- AKÇAY E, REILAS T, ANDERSON M, KATILA T (2006). Effect of seminal plasma fractions on stallion sperm survival after cooled storage. *J Vet Med*, **53(9)**: 481- 485. Doi: 10.1111/j.1439-0442.2006.00882.x
- AKSOY M (2010). Etinil Östradiol (0.30 mg) ve Drospirenon (3mg) içeren oral kontraseptiflerin servikal mukus mukoprotein içeriği üzerine etkisi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıpta Uzmanlık Tezi, Trabzon.
- AKSOY M, GÜVEN S, TOSUN I, AYDIN F, KART C (2012). The effect of ethinyl estradiol and drospirenone-containing oral contraceptives upon mucoprotein content of cervical mucus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **164**:40–3.
- ALGHAMDI AS, LOVAAS BJ, BIRD SL, LAMB GC, RENDAHL AK, TAUBE PC, FOSTER DN (2009). Species-specific interaction of seminal plasma on sperm-neutrophil binding. *Anim Reprod Sci*, **114**: 331-344.
- AL-QARAWI A, ABDEL-RAHMAN HA, EL-MOUGY SA, EL-BELELY MS (2002). Use of a new computerized system for evaluation of spermatozoal motility and velocity characteristics in relation to fertility levels in dromedary bulls. *Anim Reprod Sci*, **74(1-2)**: 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(02\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(02)00163-X).
- ANDRADE AFC, ARRUDA RP, CELEGHINI ECC, NASCIMENTO J, MARTINS SMMK, RAPHAEL CF, MORETTI AS (2007). Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. *Reprod Dom Anim*, **42**:190–4.
- ANONİM (2021). Sims-Huhner testi örneği. Kaynak Erişim Adresi: <https://www.slideserve.com/emil/infertility>, Erişim Tarihi: 19.01.2021.
- APLIN J (1996). The cell biology of human implantation. *Placenta*, **17**: 269–275.
- APOSTOLOPOULOS V, VASSAO S, GARGOSKY SE (2015). MUC1 (CD227): a multi- 703 tasked molecule. *Cell Mol Life Sci*, **72**: 4475-500.

- AVDATEK F, GÜNDOĞAN M, YENİ D (2010). Functional tests in semen quality determination. *J Anim Vet Adv*, **9(5)**: 862–871.
- BAFNA S, KAUR S, BATRA SK (2010). Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene*, **29**: 2893–2904.
- BAHAT A, TUR-KASPA I, GAKAMSKY A, GIOJALAS LC, BREITBART H, EISENBACH M (2003). Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nature Medicine*, **9**: 149–150 (doi:10.1038/nm0203-149)
- BARTLEWSKI PM, BEARD AP, RAWLINGS NC (1999). The relationship between vaginal mucous impedance and serum concentrations of estradiol and progesterone throughout the sheep estrous cycle. *Theriogenology*, **51**: 813–827.
- BARTLEWSKI PM, CANDAPPA IBR (2015). Assessing the usefulness of prostaglandin E2 (Cervidil®) for transcervical artificial insemination (TCAI) in ewes. *Theriogenology*, **84**: 1594–1602.
- BAUMBER J, VO A, SABEUR K, BALL BA (2002). Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology*, **57**: 1025–1033. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00710-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00710-5).
- BAZER FW, WU G, SPENCER TE, JOHNSON GA, BURGHARDT RC, BAYLESS K (2010). Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Molecular human reproduction*, **16(3)**: 135–52. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap095> PMID: 19880575; PubMed Central PMCID: PMC2816171.
- BECHER N, WALDORF KA, HEIN M, ULDBJERG N (2009). The cervical mucus plug: Structured review of the literature. *Acta Obstet Gynecol Scand*, **88(5)**: 502–513. <https://doi.org/10.1080/00016340902852898>
- BENNUR PC, HONNAPPAGOL SS, TANDLE MK (2004). Effect of physico-chemical properties of cervico-vaginal mucus on fertility in cows. *Indian Vet J*, **81(9)**: 1069.
- BERGMAN P (1960). Sexual cycle, time of ovulation, and time of optimal fertility in women. *Acta Obst Gynec Scand*, **29(4)**: 6–139.
- BERNARDI SF, SAVIA CL, De PAZ LJ, RODRIGUEZ J, MARINI PR (2018). Physical properties and ionic concentration of the bovine cervical mucus at the moment of inseminating: spontaneous estrous and induced estrous. *Journal of Veterinary Science and Technology*, **9(2)**: 545–549.
- BIGELOW JL, DUNSON DB, STANFORD JB, ECOCHARD R, GNOTH C, COLOMBO B (2004). Mucus observations in the fertile window: a better predictor of conception than timing of intercourse. *Hum Reprod*, **19**: 889–892.
- BIRADAR S, TANDLE MK, HARIBABU Y, USTURGE SM, PATIL NA, SURANAGI MD (2014). Study on efficacy of Co-Synch and Ovsynch protocol on fertility in repeat breeder buffaloes. *Indian J Adv Plant Res*, **1(5)**: 1–3.
- BLAIR GWS, FOLLEY S, MALPRESS F, COPPEN F (1941). Variations in certain properties of bovine cervical mucus during the oestrous cycle. *Biochem J*, **35(8–9)**: 1039.
- BORNHÖFFT KF, REBL A, GALLAGHER ME, VIERGUTZ T, ZLATINA K, REID C, GALUSKA SP (2019). Sialylated cervical mucins inhibit the activation of neutrophils to form neutrophil extracellular traps in bovine in vitro model. *Front Immunol*, **10**: 2478.
- BOTELLA LJ, VELASCO RV (1960). Postcoital test in vitro. *Int J Fertil*, **5**: 301–306.
- BOTTA D, ARRUDA RP, WATANABE YF, BALIEIRO JC, ROMANELLO N, BARRETO A, PANTOJA MH, GIRO A, CARVALHO CPT, OLIVERIA A, GARCIA AR (2019). Influence of postthawing thermal environment on bovine sperm characteristics and in vitro fertility. *Andrologia*, **51**: e13266.

- BRAYMAN M, THATHIAH A, CARSON DD (2004). MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol*, **2**: 4.
- BROEKHUIJSE MLWJ ŠOŠTARIC E, FEITSMA H, GADELLA B (2012). Application of computer-assisted sperm analysis to explain variations in pig fertility. *J. Anim. Sci.* **90**:779–789.
- BRUNELLI R, PAPI M, ARCOVITO G, BOMPIANI A, CASTAGNOLA M, PARASASSI T, SAMPAOLESE B, VINCENZONI F, De SPIRITO M (2007). Globular structure of human ovulatory cervical mucus. *Faseb J*, **21**: 3872–3876.
- CARLSTEDT I, SHEEHAN JK (1984). Macromolecular architecture and hydrodynamic properties of human cervical mucins. *Biorheology*, **21**: 225–233.
- CARLSTEDT I, SHEEHAN JK (1989). Structure and macromolecular properties of cervical mucus glycoproteins. In: Chantler E, Ratcliffe NA (eds), *Mucus and Related Topics*. Society for Experimental Biology, Cambridge, pp: 289–316.
- CARMICHAEL R, JEAFFRESON DL (1939). Basal cell in the epithelium of the human cervical canal. *J Pathol Bact*, **49**: 63.
- CARNEIRO LC, CRONIN JG, SHELDON IM (2016). Mechanisms linking bacterial infections of the bovine endometrium to disease and infertility. *Reprod Biol*, **16**:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2015.12.002>.
- CARR DW, USSELMAN MC, ACOTT TS (1985). Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biol Reprod*, **33**: 588–595.
- CELEGHINI ECC, ARRUDA RP, ANDRADE AFC, NASCIMENTO J, RAPHAEL CF (2007a). Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Dom Anim*, **42**: 479-88.
- CELEGHINI ECC, ARRUDA RP, ALBUQUERQUE R, SILVA FHA, FARIA DE, ANDRADE AFC, NASCIMENTO J, RAPHAEL CF (2007b). Utilization of fluorescent probe association for simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes of rooster spermatozoa. *Braz J Poult Sci*, **9**:143-9
- CELEGHINI ECC, ARRUDA RP, ANDRADE AFC, NASCIMENTO J, RAPHAEL CF, RODRIGUES PHM (2008). Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci*, **104**:119-31.
- CELEGHINI ECC, ANDRADE AFC, RAPHAEL CF, NASCIMENTO J, TICIANELLI JS, ARRUDA RP (2010a). Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. *Braz Arch Biol Technol*, **53(6)**: 1285-1292.
- CELEGHINI ECC, NASCIMENTO J, RAPHAEL CF, ANDRADE AFC, ARRUDA RP (2010b). Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. *Arq Bras Med Vet Zootec*, **62**:536-543.
- CENTOLA GM (2018). Laboratory evaluation of sperm in cervical mucus. In *Encyclopedia of Reproduction* (Second Edi, Vol. 5).
- CHONG AP, WALTERS CA, WEINRIED SA (1983). The neglected laboratory test. The semen analysis. *J Androl*, **4**: 280–282.
- CONTRI A, GLORIA A, ROBBE D, VALORZ C, WEGHER L, CARLUCCIO A (2013). Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Anim Reprod Sci*, **136**: 252–259.
- COOPER C, NONNECKE E, LÖNNERDAL B, MURRAY J (2014). The lactoferrin receptor may mediate the reduction of eosinophils in the duodenum of pigs consuming milk containing recombinant human lactoferrin. *Biometals*, **27**: 1031–1038. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9778-8>.

- CORRALES RM, NARAYANAN S, FERNANDEZ I, MAYO A, GALARRETA DJ, FUENTES-PAREZ G, CHAVES FJ, HERRERAS JM, CALONGE M (2011). Ocular mucin gene expression levels as biomarkers for the diagnosis of dry eye syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**: 8363–8369.
- CORREA JR, PACE MM, ZAVOS PM (1997). Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*, **48**: 721–31.
- CORTES ME, GONZALEZ F, VIGIL P (2014). Crystallization of bovine cervical mucus at oestrus: An Update. *Rev Med Vet*, **28**: 103–116.
- COPPOLA G, DI CAPRIO G, WILDING M, FERRARO P, ESPOSITO G, DI MATTEO L, DALE R, COPPOLA G, DALE (2013). “Digital holographic microscopy for the evaluation of human sperm structure,” *Zygote*, **22 (4)**: 446-454. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0967199413000026>.
- COX JF, MONTENEGRO V, RODRIGUEZ- MARTINEZ H (2006). Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*, **66(4)**: 860-867. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.062>.
- COX JF, ZAVALA A, SARAVIA F, RIVAS C, GALLARDO P, ALFARO V (2002). Differences in sperm migration through cervical mucus in vitro relates to sperm colonization of the oviduct and fertilizing ability in goats. *Theriogenology*, **58(1)**: 9–18. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00919-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00919-6).
- CURLIN M, BURSAC D (2013). Cervical mucus: from biochemical structure to clinical implications. *Front Bio*, **62(5)**: 1–7.
- ÇEVİK M, SELÇUK M, DOĞAN S (2010). Comparison of pregnancy rates after timed artificial insemination in comparison of pregnancy rates after timed artificial insemination in ovsynch, heatsynch and CIDR-based synchronization protocol. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **16(1)**: 85–89.
- DAŞKIN A, TEKİN N, YURDAYDIN N, KAYA M, SELÇUK M (1996). İnek ve düvelerde östrus beldekleri tohumlama zamanı ve döl verimi ilişkisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **43**: 73-79.
- DAVID MP, AMIT A, BERGMAN A, YEDWAB G, Paz GF, HOMONNAI ZT (1979). Sperm penetration in vitro: correlations between parameters of sperm quality and the penetration capacity. *Fertil Steril*, **32**: 676-680.
- DEMİRHAN A, TEKİN K, DAŞKIN A, UYSAL O (2020). Assessment of Morphological Features of Bull Semen Thawed at Various Temperatures and Periods of Time with CASA. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, **13(3)**: 286-293. <https://doi.org/10.30607/kvj.722620>.
- DEKKER J, ROSSEN JW, BULLER HA, EINERHAND AW (2002). The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci*, **27**: 126–131. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)02052-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)02052-7)
- DI CAPRIO G, FERRARA MA, MICCIO L, MEROLA F, MEMMOLO P, FERRARO P, COPPOLA G (2015). Holographic imaging of unlabelled sperm cells for semen analysis: a review. *Journal of Biophotonics*, **8**: 779–789.
- DI CAPRIO G, GIOFFR M, SAFFIOTI N, GRILLI S, FERRARO P, PUGLISI R, BALDUZZI D, GALLI A, COPPOLA G (2010) “Quantitative label-free animal sperm imaging by means of digital holographic microscopy,” *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron*, **16(4)**: 833–840.
- DICKEY RP, PYRZAK R, LU PY, TAYLOR SN, RYE PH. (1999). Comparison of the sperm quality necessary for successful intrauterine insemination with World Health Organization threshold values for normal sperm. *Fertil Steril*, **71**: 684-689.
- DOODY MC, GOOD MC (1993). The postcoital test: a quantitative method. *J Androl*, **143**: 149 –54.
- DRUART X (2012). Sperm interaction with the female reproductive tract. *Reprod Domest Anim*, **47(4)**: 348–352.

- DUBEY V, MYTHIRAYEE S, TIWARI RK, GAHARWAR U, PAL M, REDDY S (2016). Cervical mucus helps in the fertilization in women. *Sciences*, **5(10)**: xxx-xxx. <https://doi.org/10.20959/wjpps201610-7765>.
- DUCOT B, SPIRA A, FENEUX D, JOUANNET P (1988). Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. II. Study of clinical characteristics & practical consequences. *Int. J. Androl*, **11**: 395-404.
- EGGERT-KRUSE W, GERHARD I, TILGEN W, RUNNEBAUM B (1989). Clinical significance of crossed in vitro sperm-cervical mucus penetration test in infertility investigation. *Fertil Steril*, **52(6)**: 1032–1040.
- EISENBACH M, GIOJALAS LC (2006). Sperm guidance in mammals an unpaved road to the egg. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **7**: 276–285. (doi:10.1038/nrm1893).
- EL-NAGGAR MA, BAKSAI-HORVATH E (1971). The sugar content of the cervico-vaginal mucus of cattle during the sexual cycle, with special reference to fructose. *Acta Vet Acad Sci Hung*, **21(1)**: 15-20.
- ELWEZA AE, EZZ MA, ACOSTA TJ, TALUKDER AK, SHIMIZU T, HAYAKAWA H, SHIMADA M, IMAKAWA K, ZAGHLOUL AH, MIYAMOTO A (2018). A proinflammatory response of bovine endometrial epithelial cells to active sperm in vitro. *Mol Reprod Dev*, **85**: 215–226.
- EZZ MA, MAREY MA, ELWEZA AE, KAWAI T, HEPPELMANN M, PFARRER C, BALBOULA AZ, MONTASER A, IMAKAWA K, ZAABEL SM (2019). TLR2/4 signaling pathway mediates sperm - induced inflammation in bovine endometrial epithelial cells in vitro *Plos One*, **14**: e0214516 doi:10.1371/journal.pone.0214516.
- FORERO-GONZALEZ RA, CELEGHINI ECC, RAPHAEL CB, ANDRADE AFC, BRESSAN FF, ARRUDA RP (2012). Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia* (Berlin), **44**:154-9.
- FRIEDRICH BM, RIEDEL-KRUSE IH, HOWARD J, JULICHER F (2010). High-precision tracking of sperm swimming fine structure provides strong test of resistive force theory. *J Exp Biol*, **213**: 1226–1234.
- GALHOTRA AP, TYAGI RPS, BENERJEE I (1971). Cytology of cervical mucus during oestrus in buffaloes. *Ceylon Vet J*, **19(3)**: 57-61.
- GALLI A, BASSETTI M, BALDUZZI D, MARTIGNONI M, BORNAGHI V, MAFFI M. (1991) Frozen bovine semen quality and bovine cervical-mucus penetration test. *Theriogenology*, **35**: 837–844.
- GARCIA-HERREROS M, LEAL CL (2014). Sperm morphometry: a tool for detecting biophysical changes associated with viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia*, **46**: 820–2
- GARCIA-VAZQUEZ FA, GADEA J, MATAS C, HOLT WV (2016). Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian J Androl*, **18**: 844. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.186880>.
- GIBBONS RA, GLOVER FA (1959). The physicochemical properties of two mucoids from bovine cervical mucin. *Biochem J*, **73(2)**: 217–225.
- GLIOZZI TM, TURRI F, MANES S, CASSINELLI C, PIZZI F (2017). The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*, **1**–8. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000684>.
- GILLAN L, EVANS G, MAXWELL WMC (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, **63(2)**: 445–457. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.024>.

- GILLAN L, KROETSCH T, CHIS MAXWELL WM, EVANS G (2008). Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim Reprod Sci*, **103(3–4)**: 201–214. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.12.010>.
- GIPSON IK (2001). Mucins of the human endocervix. *Front Biosci*, **1**;6:D1245-1255.
- GIPSON IK (2005). Human endocervical mucins. Ernst Schering Research Foundation Workshop. **52**:219-244.
- GIPSON IK, BLALOCK T, TISDALE A, SPURR-MICHAUD S, ALLCORN S, STAVREUS-EVERS A, GEMZELL K (2008). MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive human endometrium: in vitro evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence. *Biol Reprod*, **78**: 134–142.
- GIPSON IK, SPURR-MICHAUD S, MOCCIA R, ZHAN Q, TORIBARA N, HO SB, ANTONIO R, GARGIULO JA, HILL III (1999). MUC4 and MUC5B Transcripts Are the Prevalent Mucin Messenger Ribonucleic Acids of the Human Endocervix. *Biol Reprod*, **60**:58–64.
- GIPSON IK, MOCCIA R, SPURR-MICHAUD S, ARGUESO P, A. R. GARGIULO JA, HILL III, OFFNER GD, KEUTMANN HT (2001). The amount of MUC5B mucin in cervical mucus peaks at midcycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, **86**:594
- GIPSON IK, SPURR-MICHAUD S, TISDALE A, MENON BB (2014). Comparison of the transmembrane mucins MUC1 and MUC16 in epithelial barrier function. *Plos One*, **9**: e100393.
- GLIOZZI TM, TURRI F, MANES S, CASSINELLI C, PIZZI F (2017). The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*, 1–8.
- GOMEZ MONTOTO L, VAREA SANCHEZ M, TOURMENTE M, MARTÍN-COELLO J, LUQUE-LARENA JJ, GOMENDÍO M, ROLDAN ERS (2011). Sperm competition differentially affects swimming velocity and size of spermatozoa from closely related muroid rodents: head first. *Reproduction*, **142**: 819–30.
- GOOVAERTS IGF, HOFLACK GG, VAN SOOM A, DEWULF J, NICHÌ M, KRUÏF A, BOLS PEJ (2006). Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. *Theriogenology*, **66(2)**: 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.11.018>
- GRAHAM JK (2001). Assessment of sperm quality: A flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci*, **68(3–4)**: 239–247.
- GRAY T, NETTESHEIM P, LOFTIN C, KOO JS, BONNER J, PEDDEDA S, LANGERBACH R (2004). Interleukin-1 β -induced mucin production in human airway epithelium is mediated by cyclooxygenase-2, prostaglandin E2 receptors, and cyclic AMP-protein kinase a signaling. *Mol Pharmacol*, **66**: 337–346. <https://doi.org/10.1124/mol.66.2.337>.
- GROVER P, NATH S, NYE MD, ZHOU R, AHMAD M, MUKHERJEE P (2018). SMAD4-independent activation of TGF β signaling by MUC1 in a human pancreatic cancer cell line. *Oncotarget*, **9(6)**: 6897–6910.
- GRÖTTER LG, CATTANEO L, ESTELA P, KJELLAND ME, FERRE LB (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reprod Domest Anim*, **54**: 655–665.
- GUIDOBALDI HA, TEVES ME, UNATES DR, ANASTASIA A, GIOJALAS LC (2008). Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *Plos One*, **3**: e3040. (doi:10.1371/journal.pone.0003040)
- GUIDOBALDI HA, TEVES ME, UNATES DR, GIOJALAS LC (2012). Sperm transport and retention at the fertilization site is orchestrated by a chemical guidance and oviduct movement. *Reproduction*, **143**:587–596. [http:// dx.doi.org/10.1530/REP-11-0478](http://dx.doi.org/10.1530/REP-11-0478)

- HAFEZ ESE, HAFEZ B (2000). Reproduction in Farm Animals. 7th Edition, p: 82-96. ISBN 0-683-30577-8.
- HAN L, TAUB R, JENSEN JT (2017). Cervical mucus and contraception: what we know and what we don't. *Contraception*, **96(5)**: 310–321.
- HANSON FW, OVERSTREET JW, KATZ DF (1982). A study of the relationship of motile sperm numbers in cervical mucus 48 h after artificial insemination with subsequent fertility. *Am J Obstet Gynecol*, **143**: 85–90.
- HANUMANT D, TIWARI RP, CHATURVEDANI AK, PAIKRA D (2019). Analysis of corporeal characteristics of cervico-vaginal mucus in cows. *Pharma J*, **8(3)**: 261–264.
- HARPER MJK (1973). Stimulation of sperm movement from the isthmus to the site of fertilisation in the rabbit oviduct. *Biol Reprod*, **8**:369–377.
- HAWK HW (1983). Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *J Dairy Sci*, **66(12)**: 2645–2660.
- HEALY LL, CRONIN JG, SHELDON IM (2015). Polarized epithelial cells secrete interleukin 6 apically in the bovine endometrium. *Biol Reprod*, **92**: 151. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.127936>.
- HERNANDEZ-CARAVACA I, SORIANO-UBEDA C, MATAS C, IZQUIERDO-RICO MJ, GARCIA-VAZQUEZ FA (2015). Boar sperm with defective motility are discriminated in the backflow moments after insemination. *Theriogenology*, **83**: 655–61.
- HIRANO Y, SHIBAHARA H, OBARA H, SUZUKI T, TAKAMIZAWA S, YAMAGUCHI C, SATO I (2001). Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *J Assist Reprod Genet*, **18(4)**: 215–220. <https://doi.org/10.1023/A:1009420432234>.
- HOLMES E, BJÖRNDAL L, KVIST U. (2019). Post-ejaculatory increase in human semen osmolality in vitro. *Andrologia*, **51**: e13311. <https://doi.org/10.1111/and.13311>
- HOLT C, HOLT WV, MOORE HD, REED HC, CURNOCJ RM (1997). Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J Androl*, **18**: 312–323.
- HOLT WV, FAZELI A (2016). Sperm selection in the female mammalian reproductive tract. Focus on the oviduct: hypotheses, mechanisms, and new opportunities. *Theriogenology*, **85**: 105–12.
- HONMODE J, PAEHLAG SV (1973). Time of ovulation and chloride content of vaginal mucus during oestrus in sheep. *Indian J Anita Sci*, **43**: 136-140.
- HOORENS PR, RINALDI M, LI RW, GODDEERIS B, CLAEREBOU E, VERCRUYSSSE J, GELDHOF P (2011). Genome wide analysis of the bovine mucin genes and their gastrointestinal transcription profile. *BMC Genomics*, **12**: 140. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-140>.
- HUHNER M (1913). Sterility in the Male and Female. New York, Rebman.
- HUNTER RHF, WILMUT I (1984). Sperm transport in the cow: periovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod Nutr Dev*, **24**:597–608.
- HUNTER RHF, COOK B, POYSER NL (1983). Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian steroids and prostaglandins: a mechanism to influence sperm transport. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **13**:225–232.
- HUNTER RHF (1995). Ovarian endocrine control of sperm progression in the Fallopian tubes. *Oxford reviews of reproductive biology*, **17**: 85–125.

- IBANESCU I, SIUDA M, BOLLWEIN H (2020). Motile sperm subpopulations in bull semen using different clustering approaches – Associations with flow cytometric sperm characteristics and fertility. *Anim Reprod Sci*, **215**(1), 106329. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106329>.
- IVIC A, ONYEAKA H, GIRLING A, BREWI I, OLA B, HAMMADIEH N, PAPAIOANNOU S, BARRATT CLR (2002). Critical evaluation of methylcellulose as an alternative medium in sperm migration tests. *Hum Reprod*, **17**(1): 143–149. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.1.143>.
- İLERİ İK, AK K, PABUÇÇUOĞLU S, BİRLER S (1998). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. Ders Notu. İstanbul Üni., Vet. Fak. Yayını.
- İLERİ K, AK K, PABUCCUOĞLU S, BİRLER S (2002). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. Ders Notu No, 133, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, İstanbul.
- İNANÇ ME, TEKİN K, DAŞKIN A (2015). Relationship between casa motility and kinetic parameters on bull fertility. *Cryobiology*, **71**(3): 568.
- İNANÇ ME, ÇİL B, TEKİN K, ALEMDAR H, DAŞKIN A (2018). The combination of CASA kinetic parameters and fluorescein staining as a fertility tool in cryopreserved bull semen. *Turk J Vet Anim Sci*, **42**(5): 452–458. <https://doi.org/10.3906/vet-1801-83>.
- JIANG H, KWON JW, LEE S, JO YJ, NAMGOONG S, YAO XS, YUAN B, ZHANG JB, PARK YK, KİM NK (2019). Reconstruction of bovine spermatozoa substances distribution and diff between Holstein and Korean native cattle using three-dimensional refractive index tomography. *Sci Rep*, **9**: 8774.
- JOHNSON GA, BAZER FW, JAEGER LA, KA H, GARLOW JE, PFARRER C, SPENCER TE, BURGHARDT RC (2001). Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. *Biol Reprod*, **65**: 820–828.
- JOKINIEMI A, MAGRIS M, RITARI J, KUUSIPALO L, LUNDGREN T, PARTANEN J, KEKALAINEN J (2020). Post-copulatory genetic matchmaking: HLA-dependent effects of cervical mucus on human sperm function. *Proc R Soc B*, **287**: 20201682.
- JOTANOVIĆ S, ŠAHINOVIĆ R, STANČIĆ I, MIJATOVIĆ R, VEKIĆ M, SAVIĆ Đ. (2011). Relationship between electrical resistance of vaginal mucus in the moment of insemination and cow's pregnancy rate. *Serb J Agri Sci*, **60**(1–2): 1–254.
- 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.
- KASIMANICKAM RK, KASIMANICKAM VR, ARANGASAMY A, KASTELIC JP (2019). Sperm and seminal plasma proteomics of high- versus low-fertility Holstein bulls. *Theriogenology*, **126**: 41–48.
- KATILA T (2012). Post-mating inflammatory responses of the uterus. *Reprod Domest Anim*, **47**(5):31–41. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02120.x> PMID: 22913558.
- KATZ DF, OVERSTREET JW, HANSON FW (1992). A new quantitative test for sperm penetration into cervical mucus. *Fertil Steril*, **130**: 179–86.
- KATZ DF, SLADE DA, NAKAJIMA ST (1997). Analysis of preovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability. *Adv Contracep*, **13**: 143–151.
- KAWANO N, ARAKI N, YOSHIDA K, HIBINO T, OHNAMI N, MAKINO M, KANAI S, HASUWA H, YOSHIDA M, MIYADO K, UMEZAWA A (2014). Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proc Natl Acad Sci*, **111**: 4145–50.
- KEDIA NK, TIWARI RP, MISHRA GK, AWASTHI MK, SAHU SB (2013). Effect of post thaw incubation on quality of frozen Tharparkar bull semen. *Indian Journal of Animal Reproduction* **34**(2): 9–12.

- KIZILAY F, ALTAY B (2019). Spermatogenez, spermiyogenezis ve klinik yansımaları. *Androl Bul*, **21**: 177-184.
- KIM SH, BAEK JS, LEE HJ, MIN KS, LEE DH, YOON JT (2012). Detection of matrix metalloprotease-9 and analysis of protein patterns in bovine vaginal mucus during estrus and pregnancy. *J Embr Transfer*, **27**:93-100.
- KOGA K, MOR G (2008). Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci*, **15**(3): 231–42.
- KOSTOV I, BODUROV N, TODOROVA I (1984). Electronic indicators for determining the optimum moment for inseminating cows and sheep. *Veterinarsko-Meditsinski Nauki*, **21**(5):86-92.
- KREMER JA (1965). Simple sperm penetration test. *Int J Fertil*, **10**:209.
- KREMER J, JAGER S (1976). The sperm cervical mucus contact test: a preliminary report. *Fertil Steril*, **27**(3): 335–340.
- KRISHNAN G, THANGVEL A, LOGANATHASAMY K, VEERAPANDIAN C, KUMARASAMY P, KARUNAKARAN M (2016). Sperm mitochondrial membrane potential and motility pattern in the Holstein bull semen positive for heparin binding proteins. *Indian J Vet Sci*, **86** (5): 528–534.
- KUNZ G, BEİL D, DEININGER H, WILDT L, LEYENDECKER G (1996). The Dynamics of rapid sperm transport through the female genital tract: evidence from vaginal sonography of uterine peristalsis and hysterosalpingoscintigraphy. *Hum Reprod*, **11**: 627–632.
- KURODA H, MUN M, OKUMURA S, NAKAGAWA K (2012). Segmentectomy for giant pulmonary sclerosing haemangiomas with high serum KL-6 levels. *Interact CardioVasc Thorac Surg*, **15**: 171–173
- LARDY HA, PHILLIPS PH (1941). The interrelation of oxidative and glycolytic processes as sources of energy for bull spermatozoa. *Am. J. Physiol.*, **133**: 602-609
- LAU SK, WEISS LM, CHU PG (2004). Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites: an immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol*, **122**(1): 61-9.
- LAYEK SS, MOHANTY TK, KUMARESAN A, BEHERA K, CHAND S (2013). Cervical mucus characteristics and periestrual hormone concentration in relation to ovulation time in Zebu (Sahiwal) cattle. *Livestock Sci*, **152**(2–3): 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.12.023>.
- LEE CH, WANG Y, SHIN SC, CHIEN YW (2002). Effects of chelating agents on the rheological property of cervical mucus. *Contraception*, **65**: 435–440.
- LEWIS RA, TAYLOR D, NATAVIO MF (2010). Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on cervical mucus quality and sperm penetrability. *Contraception*, **82**:491–6.
- LOFSTEDT R, RICHARDSON G, GILBERT R, WILSON W (1991). Examination of vaginal mucus in mammals. *Theriogenology*, handbook GT-1.
- LOPEZ-GATIUS F (2000). Site of semen deposition in cattle: a review. *Theriogenology*, **53**:1407–1414.
- LOVE CC (2018). Sperm quality assays: how good are they? The horse perspective. *Anim Reprod Sci*, **194**: 63–70.
- LUKTUKE SN, ROY DJ (1967). Studies on the cervical mucus pattern in relation to fertility in bovine. *Indian J Vet Sci*, **37**: 26-31.
- LUONGO C, ABRIL-SANCHEZ S, HERNANDEZ JG, GARCIA-VAZQUEZ FA (2019). Seminal plasma mitigates the adverse effect of uterine uid on boar spermatozoa. *Theriogenology*, **136**: 28–35.

- LYONS EA, TAYLOR PJ, ZHENG XH, BALLARD G, LEVI CS, KREDENTSER JV (1991). Characterization of subendometrial myometrial contractions throughout the menstrual cycle in normal fertile women. *Fertil Steril*, **55**:771–774.
- MA X, PAN Q, FENG Y, CHOUDHURY BP, MA Q, GAGNEUX P, MA F (2016). Sialylation facilitates the maturation of mammalian sperm and affects its survival in female uterus. *Biology of Reproduction*, **94**: 123. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.137810>.
- MANES J, GLENDA R, FIORENYINO MA, UNGERFELD R (2016). Vaginal mucus from ewes treated with progestogen sponges affects quality of ram spermatozoa. *Theriogenology*, **85**: 856–861.
- MANN T, POLGE C, ROWSON LEA (1956). Participation of seminal plasma during the passage of spermatozoa in the female reproductive tract of the pig and horse. *J Endocrinol*, **13**: 133–140.
- MATOUSEK J, RIHA J, SRSEN V, VESELSKY L, LOUDA F (1989). Penetration of cervical mucus and other body fluids by bull sperm in capillary tubes. *Anim Reprod Sci*, **18**(1–3): 161–166. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(89\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0378-4320(89)90018-3).
- MAREY MA, LIU J, KOWSAR R, HANEDA S, MATSUI M, SASAKI M, TAKASKI S, HAYAKAWA H, WIJAYAGUNAWARDANE MP, HUSSEIN FM, MIYAMOTO A (2014). Bovine oviduct epithelial cells downregulate phagocytosis of sperm by neutrophils: prostaglandin E2 as a major physiological regulator. *Reproduction*, **147**: 211–219.
- MARTINEZ-RODRIGUEZ C, ALVAREZ M, ORDAS L, CHAMORRO CA, MARTINEZ-PASTOR F, ANEL L, de PAZ P (2012). Evaluation of ram semen quality using polyacrylamide gel instead of cervical mucus in the sperm penetration test. *Theriogenology*, **77**:1575–86.
- MARTINEZ-RODRIGUEZ H (2007). Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*, **68**(1): 138–S146.
- MATTNER PE (1966). Formation and retention of the spermatozoan reservoir in the cervix of the ruminant. *Nature*, **212**: 1479–80.
- MAXWELL WMC, EVANS G, MORTIMER ST, GILLAN L, GELLATLY ES, McPHIE CA (1999). Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*, **11**(2): 123–126. <https://doi.org/10.1071/rd99046>.
- McAULEY JL, LINDEN SK, PNG CW, KING RM, PENNINGTON HL, GENDLER SJ, FLORIN TH, HILL GR, KOROLIK V, McGUCKIN MA (2007). MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J Clin Invest*, **117**: 2313–2324.
- MEENA RS, SHARMA SS, PUROHIT GN (2003). Efficiency of vaginal electrical resistance measurements for oestrous detection and insemination in Rathi cows. *Br Soc Anim Sci*, **76**: 433–437, 2003.
- MESEGUER M, APLIN JD, CABALLERO-CAMPO P, O’CONNOR JE, MARTIN JC, REMOHI J, PELLICER A, SIMON C (2001). Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod*, **64**: 590–601.
- MIKI K, CLAPHAM DE (2013). Rheotaxis Guides Mammalian Sperm. *Current Biology*, **23**: 443–452.
- MILLS RN, KATZ DF (1978). A flat capillary tube system for assessment of sperm movement in cervical mucus. *Fertil Steril*, **29**:43–47.
- MOGHISSI KS (1972). The function of the cervix in fertility. *Fertil Steril*, **23**:295–306.
- MOGHISSI KS, DABICH D, LEVINE J, NEUHAUS OW (1964). Mechanism of sperm migration. *Fertility and Sterility*, **15**:15–23.
- MONIAUX N, ESCANDE F, PORCHET N, AUBERT JP, BATRA SK (2001). Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci*, **1**:6:D1192–206.

- MORTIMER ST, (2000). CASA- Practical Aspects. *J Andrology*, **21**:515-524.
- MULLINS KJ, SAACKE RG (1989). Study of the functional anatomy of bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport. *Anat Rec*, **225**:106–117
- NAGY SZ, HAZAS G, BALI PAPP A, IVANCSICS J, SZASZ F, SZASZ F Jr, KOVACS A, FOOTE RH (1999). Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Theriogenology*, **52**: 1153–1159.
- NAGY A, POLICHRONOPOULOS T, GASPARDY A, SOLTI L, CSEH S (2015). Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Veterinaria Hungarica*, **63 (3)**: 370–381.
- NAKANO FY, LEAO RDBF, ESTEVES SC (2015). Esteves, Insights into the role of cervical mucus and vaginal pH in unexplained infertility. *MedicalExpress*, **2(2)**: 1-8.
- NASCIMENTO J, RAPHAEL CF, ANDRADE AFC, ALONSO MA, CELEGHINI ECC, ARRUDA RP (2008). Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. *J Equi Vet Sci*, **28**:351-8.
- NASR-ESFAHANI MH, ABOUTORABI R, ESFANDIARI E, MARDANI M (2002). Sperm MTT viability assay: A new method for evaluation of human sperm viability. *J Assist Reprod Genet*, **19(10)**: 477–478.
- NICOVICH PR, MACARTNEY EL, WHAN RM, CREAM AJ (2015). Measuring sperm movement within the female reproductive tract using fourier analysis. *Microscopy and Microanalysis*, **21(1)**: 256–263.
- NONGBUA T, UTTA A, AM-IN N, SUWIMONTEERABUTR J, ANDERS JA, MORRELL JM (2020). Effects of season and Single Layer Centrifugation on bull sperm quality in Thailand. Asian-Australas. *J Anim Sci*, **33**: 1411-1420 <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0624>.
- OLA B, AFNAN M, PAPAIOANNOU S, SHARIF K, BJORND AHL L, COOMARASAMY A (2003). Accuracy of sperm - Cervical mucus penetration tests in evaluating sperm motility in semen: A systematic quantitative review. *Hum Reprod*, **18(5)**: 1037–1046. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg209>.
- OLIVEIRA BMM, ARRUDA RP, THOME HE, FILHO MM, OLIVEIRA GC, FATIMA GUIMARAES C, SILVA LA, NICHIM, CELEGHINI ECC (2014a). Artificial insemination causes uterine hemodynamic alterations in suckled beef cows subjected to an ovulation synchronization program. *Livestock Science*, **167**: 449-454.
- OLIVEIRA BM, ARRUDA RP, THORNE HE, FILHO MM, OLIVEIRA G, GUIMARAES C, NICHIM, SILVA LA, CELEGHINI ECC (2014b). Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. *Theriogenology*, **82**:767–72.
- OVERSTREET JW (1986). Evaluation of sperm-cervical mucus interaction. *Fertil Steril*, **45(3)**: 324–326. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)49210-1](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)49210-1).
- PAOLI D, GALLO M, RIZZO F, BALDI E, FRANCILLA S, LENZI A, LOMBARDO F, GANDINI L (2011). Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertility and Sterility*, **95 (7)**: 2315–2319.
- PARDEDE BP, SUPRIATNA I, YUDI Y, AGIL M (2020). Decreased bull fertility: Age-related changes in sperm motility and DNA fragmentation. *E3S Web Conf.*, **151(01010)**: 1-3.
- PHILLIPS NJ, MCGOWAN MR, JOHNSTON SD, MAYER DG (2004). Relationship between 30 post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian AI sires. *Anim Reprod Sci*, **81**: 47–61.

- PINI T, FARMER K, DRUART X, TEIXERIA-GOMES AP, TSIKIS G, LABAS V, LABAS V, LEAHY T, GRAAF S (2018). Binder of Sperm Proteins protect ram spermatozoa from freeze-thaw damage. *Cryobiology*, **82**:78-87.
- PLUTA K, IRWIN JA, DOLPHIN C, RICHARDSON L, FITZPATRICK E, GALLAGHER ME, REID CJ, CROWE MA, ROCHE JF, LONERGAN P, CARRINTON SD, EVANS ACO (2011). Glycoproteins and glycosidases of the cervix during the periestrous period in cattle. *J Anim Sci*, **89**: 4032–4042.
- PLUTA K, McGETTIGAN PA, REID CJ, BROWNE JA, IRWIN JA, THARMALINGAM T, CORFIELD A, BAIRD A, BRENDAN JL, EVANS ACO, CARRINGTON SD (2012). Molecular aspects of mucin biosynthesis and mucus formation in the bovine cervix during the periestrous period. *Physiol Genomics*, **44(24)**: 1165–1178.
- QUAYLE AJ (2002). The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol*, **57(1–2)**: 61–79. PMID: 12385834.
- RAMSAUER VP, PINO V, FAROOQ A, CAROTHERS CARRAWAY CA, SALAS PJ, CARRAWAY KL (2006). Muc4-ErbB2 complex formation and signaling in polarized CACO-2 epithelial cells indicate that Muc4 acts as an unorthodox ligand for ErbB2. *Mol Biol Cell*, **17**: 2931–2941.
- RANGNEKAR MN, DHOBLE RL, GACCHE MG, INGANWALE MV, SAWALE AG, JADHAV JM (2002). Physical properties of estrual cervical mucus in repeat breeding crossbreed (HF) cows with reference to fertility. *Indian J Anim Sci*, **72(12)**: 1122-1124.
- RAO KSPB, ROBERTS TK, MASSON PL, HEREMANS JF (1973). Lactoferrin, a major soluble protein of bovine oestrous cervical mucus. *J Reprod Fertil*, **32(1)**: 89-92.
- RATH D, SCHUBERTH HJ, COY P, TAYLOR U (2008). Sperm interactions from insemination to fertilization. *Reprod Domest Anim*, **43(5)**: 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01250.x> PMID: 19068027.
- RAY K, GHOSH BB (2013). Semen ejaculates characteristics, in vitro fertility and their interrelationships in sahiwal bull semen. *Int J Arts Sci*, **3(3)**: 483-489.
- RICHARDSON L, HANRAHAN JP, O'HARA L, DONOVAN A, FAIR S, O'SULLIVAN M, CARRINGTON SD, LONERGAN P, EVANS ACO (2011). Ewe breed differences in fertility after cervical AI with frozen–thawed semen and associated differences in sperm penetration and physicochemical properties of cervical mucus. *Anim Reprod Sci*, **129**: 37–43.
- ROBAYO I, MONTENEGRO V, VALDES C, COX JF (2008). CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reprod Domest Anim*, **43(4)**: 393–399. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00920.x>.
- ROBERTS SJ, LEIN DH, FOOTE RH, DROST M (1986). Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriogenology), 3rd edn. Published by the authors; distributed by David and Charles, North Pomfret, VT
- RODRIGUEZ-MARTINEZ H (2007). State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev*, **19**: 91–101.
- RORIE RW, BILBY TR, LESTER TD (2002). Reproductive management of cattle. *Theriogenology*, **57(01)**: 137–148.
- RUTLLANT J, LOPEZ-BEJAR M, LOPEZ-GATIUS F (2005). Ultrastructural and rheological properties of bovine vaginal fluid and its relation to sperm motility and fertilization: A review. *Reprod Domest Anim*, **40(2)**: 79–86. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00510.x>.

- SAINI M, SHEORAN S, VIJAYALAKSHMY K, RAJENDRAN R, KUMAR D, KUMAR P, SHARMA RK, KUMAR R, MOHNATY TK, SELOKAR NL, YADAV PS (2020). Semen parameters and fertility potency of a cloned water buffalo (*Bubalus bubalis*) bull produced from a semen-derived epithelial cell. *PLoS ONE*, **15(8)**: 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237766>
- SCHUBERT HJ, TAYLOR U, ZERBE H, WABERSKI D, HUNTER R, RATH D (2008). Immunological responses to semen in the female genital tract. *Theriogenology*, **70**: 1174–81.
- SCHUTTE B (1987). Penetration ability of human spermatozoa into standardized bovine cervical mucus (Penetrak@*) in patients with normal and pathological semen samples. *Andrologia*, **19**, 217–224.
- SENGER PL (1999). Pathways to Pregnancy and Parturition. 1st revised ed., The Mack Printing Group-Science Press, Ephrata, PA. p: 254-272.
- SHARMA S, SHARMA H, DHAMI AJ, BHONG CD (2008). Physicomicrobial properties of cervico-vaginal mucus and its antibiotic sensitivity pattern in repeat breeding buffaloes. *Indian J Anim Reprod*, **29(1)**: 19-26.
- SHELDON IM, CRONIN J, GOETZE L, DONOFRIO G, SCHUBERT HJ (2009). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod*, **81**: 1025–1032.
- SHINOHE D, KOBAYASHI A, GOTOH M, TANAKA K, OHTA Y (2017). Long-term inhibition of cyclophilin D results in intracellular translocation of calcein AM from mitochondria to lysosomes. *Arch Biochem Biophys*, **613**: 53–60.
- SHOJEI H, KROETSCH T, WILDE R, BLONDIN P, KASTELIC JP, THUNDATHIL JC (2012). Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points postthaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. *Theriogenology*, **77**: 940–951.
- SIMS JM (1866). Uterine Surgery. New York, Wm. Woods Co.
- SINGH AK, BRAR PS, CHEEMA RS (2016). Relationship between sperm penetration distance in cervical mucus and frozen semen characteristics vis-vis buffalo bull fertility. *Ind J Anim Sci*, **82(12)**: 1405–1408.
- SIREGAR T, AGUSTINA I, MASYITAH D, AZHAR A, DASRUL D, THASMI C, SULAIMAN R, DAUD R (2017). Physical properties of cervical mucus of repeat breeder aceh cattle. *Jurnal Vet*, **18(3)**: 378–382. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2017.18.3.378>.
- STALHAMMAR E, JANSON L, PHILIPSSON J (1993). The in preselected dairy bulls rate. *Reprod Nutr Dev*, **34**: 37–45.
- SOTO SIB (2008). Resistencia electrica en mucus vaginal durante el ciclo estral es vacas, Valdivia. Chile. 2008.
- SONAR BP, TIWARI RP, Poyam MR, MISHRA GK, PANDEY AK, NAIR AK, SAHASRABUDHE SA (2016). Characteristics and freezability of Gir bull semen. *Indian J Anim Sci*, **86**: 264-272.
- SUAREZ SS (2006). Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd ed., p.: 113–145, Elsevier, St. Louis.
- SUAREZ SS, BROCKMANN K, LEFEBVRE R (1997). Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod*, **56(2)**: 447–453
- SUAREZ SS, PACEY AA (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Rep*, **12(1)**: 23-37.
- SUAREZ SS (2015). Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell Tissue Res*, **363**:185–194.

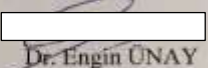
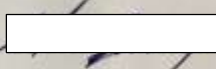
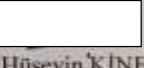
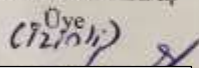
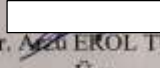
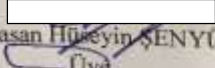
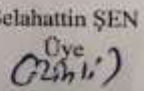
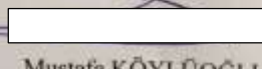
- SURVEYOR GA, GENDLER SJ, PEMBERTON L, DAS S, CHAKRABORTY I, JULIAN J, PIMENTAL R, WEGNER C, DEY S, CARSON D (1995). Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology*, **136**: 3639–3647.
- SÖNMEZ M (2010). Reprodüksiyon & Suni Tohumlama & Androloji Ders Notları, Elazığ. 3.Basım. p: 62-219.
- SWAMI DS, KUMAR P, MALIK RK, SAINI K, KUMAR D, JAN MH (2017). The cryoprotective effect of iodixanol in buffalo semen cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, **179**: 20–26. doi:10.1016/j.anireprosci.2017.01.012.
- TANG S, CHEN HS, LEE JN, TSAI EM (2005). Simplified mathematical model to evaluate sperm concentration in Kremer's capillary tube test: A preliminary study report. *Obstet Gynecol*, **44(1)**: 36-41
- TAŞ M (2003). Sperma servikal mukus penetrasyon testinde farklı ısı ve süreli inkübasyonların etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, İstanbul.
- TAŞ M, CİRİT Ü, BACINOĞLU S, AK K, İLERİ K (2006). Boğaların potansiyel fertilitelerinin belirlenmesinde yeni bir servikal mukus penetrasyon test tekniği (Payet Yöntemi). *F Ü Sağ Bil Derg*, **20(5)**: 351–356.
- TAŞ M, BACINOĞLU S, CİRİT U, ÖZDAŞ OB, AK K (2007). Relationship between bovine fertility and the number of spermatozoa penetrating the cervical mucus within straws. *Anim Reprod Sci*, **101**:18–27.
- TEJADOR AG, DOCEL GF, BALLAGH SA, ARCHER DF (2000). Evaluation of human spermatozoa in cervical mucus: Comparison of different microscopic and extraction techniques. *Contraception*, **62(5)**: 231–237.
- TEKİN K, DAŞKIN A. (2016). Effect of different extenders on motility and some sperm kinematics parameters in Norduz goat semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **40(4)**, 490–495. <https://doi.org/10.3906/vet-1509-5>.
- TEKİN K, DAŞKIN A (2019). Effect of polyvinyl alcohol on survival and function of Angora buck spermatozoa following cryopreservation. *Cryobiology*, **89**: 60-67.
- TEKİN K, ÇİL B, ALEMDAR H, OLGAC KT, TIRPAN MB, DASKIN A, STELLETTA C (2020). Semen collection by trans-rectal digital stimulation and insemination campaign in goat. *Andrologia*, **52(2)**: e13458. <https://doi.org/10.1111/and.13458>
- TEKİN N, DAŞKIN A, UYSAL O, AKÇAY E, TIRPAN MB, ÇEBİ ŞEN Ç (2016). Dondurulmuş boğa spermalarında spermatolojik parametrelerin konvansiyonel ve CASA Bilgisayar destekli sperm analiz yöntemiyle değerlendirilmesi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **42(1)**: 20-25.
- TEVES ME, BARBANO F, GUIDOBALDI HA, SANCHEZ R, MISKA W, GIOJALAS LC (2006). Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertility and Sterility*, **86**: 745–749. (doi:10. 1016/j.fertnstert.2006.02.080).
- TIRPAN MB, GÜRLER H, OLGAC KT, DAŞKIN A (2018). Effects of boron added bull semen extender on post-thaw spermatological parameters. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **65**: 123-128.
- TIWARI A, SINGH P, JAITLEY P, SHARMA S, PRAKASH A, MANDIL, CHOUDHURY S, GANGWAR NK, GARG SK (2018). Eucalyptus robusta leaves methanolic extract suppresses inflammatory mediators by specifically targeting TLR4/TLR9, MPO, COX2, iNOS and inflammatory cytokines in experimentally-induced endometritis in rats. *J Ethnopharmacol*, **213**: 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.10.035> PMID: 29104078.
- TOLLNER TL, VENNERS SA, HOLLOX EJ, YUDIN AI, LIU X, TANG G, XIANG H, KAYS RJ, LAU T, OVERSTREET JW, XU X, BEVINS CL, CHERR GN (2011). A common mutation in

- the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility. *Sci Transl Med* 3, 92ra65.
- TOURMENTE M, GOMENDIO M, ROLDAN ER (2011). Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evol Biol*, 11: 12.
- TOURMENTE M, VILLAR-MOYA P, RIAL E, ROLDAN ER (2015). Differences in ATP generation via glycolysis and oxidative phosphorylation and relationships with sperm motility in mouse species. *J Biol Chem* **290**: 20613–26.
- TRIAGIL AL, ISMUDIONO I, SETIVAN B, DAMAYONTI L, SAMIK A, OTOMO B (2020). Relationship between the value of the estrous detector measurement result and serum progesterone level in Etawa crossbred goats after estrous synchronization. *Ovozoa*, **9(3)**: 82-85.
- TSILIGIANNI T, KARAGIANNIDIS A, BRIKAS P, SARATSIS P (2001). Chemical properties of bovine cervical mucus during normal estrus and estrus induced by progesterone and/or PGF2 α . *Theriogenology*, **56(1)**:41-50.
- TSILIGIANNI T, KARAGIANNIDIS A, SARATSIS P, BRIKAS P (2003). Enzyme activity in bovine cervical mucus during spontaneous and induced estrus. *Can J Vet Res*, **67(3)**:189-93.
- TUNG CK, ARDON F, FIORE AG, SUAREZ SS, WU M (2014). Cooperative roles of biological flow and surface topography in guiding sperm migration revealed by a microfluidic model. *Lab Chip*, **14(7)**:1348–1356.
- TUNG CK, HU L, FIORE AG, ARDON F, HICKMAN DG, GILBERT RO, SUAREZ SS, WU M (2015). Microgrooves and fluid flows provide preferential passageways for sperm over pathogen *Tritrichomonas foetus*. *Proc Natl Acad Sci*, **112(17)**:5431–5436.
- TUNG CK, LIN C, HARVEY B, FIORE AG, ARDON F, WU M, SUAREZ SS (2017). Fluid viscoelasticity promotes collective swimming of sperm. *Scientific Reports*, **7**: 3152. (<https://doi.org/10.1038/s41598-017-03341-4>)
- VAN DER SLUIS M, DE KONING BAE, DE BRUIJN ACJM, VELCICH A, MEIJERINK JPP, VAN GOUDOEVEER JB, BULLER HB, DEKKER J, VAN SEUNINGEN I, RENES IB, EINERHAND AWC (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, **131**: 117–129. (<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.020>).
- VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, ONCLIN K (2002). Computer assisted sperma analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, **57**:149-179.
- VINCENTE FS, PALACIN I, SANTOLARIA P, YANIZ JL (2013). A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). *Anim Reprod Sci*, **139**: 182–9.
- VISHWANATH R (2003). Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, **59**:571–584.
- VOYNOW JA, RUBIN BK (2009). Mucins, mucus, and sputum. *Chest*, **135**: 505–512. (<https://doi.org/10.1378/chest.08-0412>)
- WESSELING J, VAN DER VALK SW, VOS HL, SONNENBERG A, HILKENS J (1995). Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Biol*, **129**: 255–265.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (5th edn.). Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- WROBEL KH, CORTEZ R, FAUCI L (2014). Modeling viscoelastic networks in Stokes flow. *Phys Fluids*, **26**:113102.

- WYKES M, MacDONALD KP, TRAN M, QUIN RJ, XING PX, GENDLER SJ, HART DN, McGUICKIN MA (2002) MUC1 epithelial mucin (CD227) is expressed by activated dendritic cells. *J Leukoc Biol*, **72**: 692–701.
- XU B, SUN X, LI L, WU L, ZHANG A, FENG Y (2012). Pinopodes, leukemia inhibitory factor, integrin-beta3, and mucin-1 expression in the peri-implantation endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*, **98**: 389–395.
- YANAGIMACHI R (1996). Mammalian fertilization in physiology of reproduction. 2nd Edition. Vol. 1, p: 189-318. E.Knobel and J.D. Neill, eds. Raven Press, Ltd., New York. ISBN 0-7817-0086-8.
- YANIZ JL, PALACIN I, VICENTE-FIEL S, SANCHEZ-NADAL JA, SANTOLARIA P (2015). Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Anim Reprod Sci*, **156**: 128–34.
- YANIZ JL, PALACIN I, CAYCHO KS, SOLER C, SILVESTRE MA, SANTOLARIA P (2018). Determining the relationship between bull sperm kinematic subpopulations and fluorescence groups using an integrated sperm quality analysis technique. *Reprod Fertil Dev*, **30(6)**: 919–923. <https://doi.org/10.1071/RD17441>
- YAVAŞ T, DAŞKIN A (2012). Effect of alternative cryopreservation procedures on bull semen. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **59**: 231-234.
- YOGEV L, GAMZU R, PAZ G, KLEIMAN S, BOTCHAN A, HAUSER R, LESSING JB, YAVETZ H (1999). Improvement in the cervical mucus penetration test by using standard sperm control. *Archives of Andrology*, **43(3)**: 253–257. <https://doi.org/10.1080/014850199262580>
- YOUSEF MS, MAREY MA, HAMBRUCH N, HAYAKAWA H, SHİMİZU T, HUSSEİN HA, ABDEL-RAZEK AK, PFARRER C, MIYAMOTO A (2016). Sperm binding to oviduct epithelial cells enhances TGFB1 and IL10 expressions in epithelial cells as well as neutrophils in vitro: prostaglandin E2 as a main regulator of anti-inflammatory response in the bovine oviduct. *Plos One*, **11**: e0162309.
- ZAMAN MI, SHARMA U, KUMAR S, KUMAR S (2013). Studies on physical properties of cervical mucus of repeat breeding crossbred cows. *Ind J Anim Reprod*, **34(2)**: 6–12.

EKLER

Ek- 1: Etik Kurul Belgesi

BAŞVURU DEĞERLENDİRME FORMU		
Evrak Kayıt	: 984	
Geliş Tarihi	: 25.06.2018	
Karar Tarihi ve Sayısı	: 38.06.2018-153	
Araştırma Yürütücüsü : Dr. Öğr. Üyesi M. Borge TIRPAN		
Projenin Adı: Damızlık Boğa Spermalarının Servikal Mukus Penetrasyon Yeteneğinin Değerlendirilmesi		
Hayvan türleri ve sayıları: Sığır (Esmer), 10 (on) baş		
Araştırma daha önce yapılmış mı?	Evet ☐	Hayır ☒
Araştırma için seçilen hayvan türü uygun mu?	Evet ☒	Hayır ☐
Araştırma için öngörülen hayvan sayıları yeterli mi?	Evet ☒	Hayır ☐
Mümkün olan en az sayıda hayvan kullanımı amaçlanmış mıdır?	Evet ☒	Hayır ☐
Hayvanlar için optimum şartlar sağlanmış mıdır?	Evet ☒	Hayır ☐
Araştırmacıların deney hayvanı sertifikası / yetkisi var mı?	Evet ☒	Hayır ☐
Araştırma protokolünde hayvanlara en az ağrı ve acı verecek önlemler alınmış ve bu konudaki standartlar gözetilmiş mi?	Evet ☒	Hayır ☐
Araştırmada çevre ve/veya iş sağlığını tehdit edecek kimyasal, biyolojik radyoaktif maddelerin bulaşması riski var mıdır?	Evet ☐	Hayır ☒
Araştırma sonunda hayvanlara yapılacak işlemler konusunda gerçekçi tespitler yapılmış mıdır?	Evet ☒	Hayır ☐
Hayvanlara ötenazi yapılacak ise en uygun yöntem seçilmiş midir?	Evet ☐	Hayır ☐
Araştırma sonunda hayvanlar ağrısız ve acısız ötenazi yapılacak ise en uygun yöntem seçilmiş midir?	Evet ☐	Hayır ☐
Araştırma sonunda hayvanlar ağrısız ve acısız ötenazi edildi ise atıkların imhası için gerekli önlem alınmış mıdır?	Evet ☐	Hayır ☐
<i>Açıklamalar: Proje, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü personeli tarafından türleri ve sayıları belirtilmiş hayvanlarda uygulanacaktır. Müdürlüğümüzün "Deney Hayvanı Üretici, Kullanıcı ve Tedarikçi Kuruluşlara Mahsus Çalışma İzni" mevcuttur.</i>		
Tarafımızdan değerlendirilen bu çalışma Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Çalışma Yönergesi'nde belirtilen ilkelere göre uygun bulunmuştur.		
 Dr. Engin UNAY Kurul Başkanı	 Mehmet Ali YILMAZ Sorumlu Veteriner Hekim	
 Dr. Hüseyin KINET Üye	 Dr. Vedat KARAKAŞ Üye	
 Dr. Mustafa EROL TUNÇ Üye	 Dr. Hasan Hüseyin ŞENYÜZ Üye	
 Selahattin ŞEN Üye	 Mustafa KÖYLÜOĞLU Üye	

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Derya
Soyadı : ŞAHİN
Doğum yeri ve tarihi :
Uyruğu : T.C
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresi ve telefonu : Ankara

II- Eğitimi

2014- 2020 : Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
Doktora Programı/Ankara
2007 – 2012 : Harran Üniversitesi/Şanlıurfa
2002– 2006 : Mehmet Akif ERSOY Lisesi/Tokat
1995 –2002 : Bahçelievler İlköğretim Okulu/ Şanlıurfa
Yabancı dil : İngilizce

III- Ünvanları

2012 : Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

Şubat 2013 – Nisan 2014 : Sultansuyu Tarım İşletmesi Müdürlüğü
Nisan 2014 – Devam ediyor : Ulusal Hayvancılık Araştırma ve Eğitim
Merkezi Müdürlüğü

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

1. Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Bilim Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Makaleler

1. **ŞAHİN D**, BAŞTAN İ, ÇİL B, TEKİN K, AKÇAY E, DAŞKIN A, STELLETTA C (2020). The number of false mounting affects the quality of semen in bulls. *Livestock Studies*, **60 (1)**: 9-14.
2. TIRPAN MB, **ŞAHİN D**, KORKMAZ F (2020). The Main Aspects of Andrological Evaluation of Bucks. *Livestock Studies*, **60 (2)**: 74-80.

Sözlü Bildiriler

1. KORKMAZ F, BAŞTAN İ, **ŞAHİN D**, YIRTICI S (2019). Lalahan Model in Commercial Anatolian Buffalo Semen Production. 12th World Buffalo Congress, İstanbul.
2. YIRTICI S, BAŞTAN İ, **ŞAHİN D**, KORKMAZ F, BAS B, STELLETTA C, BAYRAKTAROĞLU AG, KILIC B, ŞENYÜZ HH, SATILMIŞ M, KİNET H (2019). Effects of Endocrine-disrupting Chemicals Bisphenol A on Body Weights, Some Blood Values and Liver Enzymes in Neonatal Ankara Goats. I.International Livestock Science Congress, Antalya.
3. **ŞAHİN D**, KORKMAZ F, BAŞTAN İ, YIRTICI S, ÇİL B, KİNET H (2019) Effects of Semen Concentration on Motility During Collection of Bull Semen. I.International Livestock Science Congress, Antalya.
4. KORKMAZ F, **ŞAHİN D**, BAŞTAN İ, YIRTICI S, KAYA U, GRAM A (2019). The Effect of Toll Like Receptor 4 (TLR4) Inhibitor (TAK-242) on Cryopreserved Bovine. I.International Livestock Science Congress, Antalya.

Poster Sunumları

1. BAŞTAN İ, **ŞAHİN D**, TEKİN K, STELLETTA C, KİNET H, DAŞKIN A, AKÇAY E (2016). Treatment assisted autoimmune therapy of traumatic penis injury

in a Bull. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni tohumlama Bilim Kongresi 5-9 Ekim, Antalya.

2. **ŞAHİN D**, BAŞTAN İ, TEKİN K, STELLETTA C, KİNET H, AKÇAY E, DAŞKIN A (2016). The Number of False Mounting Effect of Sperm Quality and Freezability in Bulls. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni tohumlama Bilim Kongresi 5-9 Ekim, Antalya.

3. **ŞAHİN D**, BAŞTAN İ, ÇİL B, TEKİN K, STELLETTA C, SATILMIŞ M, AKÇAY E, DAŞKIN A (2017). Annual Control Chart of Bull Semen Freezability. Proceedings of the 33rd Meeting of the Association of Embryo Transfer in Europe (AETE); Bath, United Kingdom 8th and 9th, 2017.

4. TEKİN K, STELLETTA C, **ŞAHİN D**, BASTAN İ, PARILDAR O.O, DASKIN A. Ultrasound Monitoring reproductive organs in Angora bucks. Proceedings of the 30th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); FozdoIguaçu, PR, Brazil, August 25th to 27th, 2016, and 32nd Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE); Barcelona, Spain, September 9th and 10th, 2016.

5. TEKİN K, ÇİL B, **ŞAHİN D**, BAŞTAN İ, STELLETTA C, DAŞKIN A (2017). Effects of Polyvinyl Alcohol on Fresh and Post-Thawing Physiological Motion Characteristics of Angora Goat Semen. Proceedings of the 33rd Meeting of Association of Embryo Transfer in Europe (AETE); Bath, United Kingdom 8th and 9th, 2017.

6. İ BAŞTAN, F KORKMAZ, **D ŞAHİN**, S YIRTICI, H KİNET, M SATILMIŞ, M TEKERLİ (2018). İlk Ticari Amaçlı Anadolu Mandası Sperması Kriyoprezervasyonu ve Rekto-vaginal Yöntemle Suni Tohumlama Uygulaması. 9. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, Hatay.

7. **D ŞAHİN**, K TEKİN, Z GÜLERYÜZLÜ, İ BAŞTAN, S YIRTICI, F KORKMAZ, K DÜZGÜN, C STELLETTA, E AKÇAY (2018). Bir Boğada Persiste Penil Frenektomi Olgusu. 9. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, Hatay.

8. S YIRTICI, **D ŞAHİN**, F KORKMAZ, İ BAŞTAN, H KİNET. Ülkemizde Üretilen ve İthalatına İzin Verilen Dondurulmuş Boğa Spermalarının Yoğunluk ve Motilite Değerlerinin Karşılaştırılması. 9. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, Hatay (2018).

9. F KORKMAZ, S YIRTICI, İ BAŞTAN, **D ŞAHİN**, B ÇİL, H KİNET, M SATILMIŞ. Simental ve Esmer Irklara Ait Suni Tohumlama Boğalarında Reaksiyon

Sürelerinin (RS) Karşılaştırılması. 9. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, Hatay (2018).

10. İ BAŞTAN, F KORKMAZ, **D SAHİN**, S YIRTICI. Semen Characteristics of The Anatolian Buffalo. I.International Livestock Science Congress, Antalya (2019).

11. ŞAHİN D, BAŞTAN İ, KORKMAZ F, YIRTICI S, KAYA U, KİNİT H. Farklı Dozlarda Dondurulan Anadolu Manda Boğası Spermasının Bazı Spermatolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi. 12th World Buffalo Congress, İstanbul (2019).

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeler:

1. Farklı Antioksidanlar ile Dondurulan Boğa Spermasının Değerlendirilmesi. (Proje Lideri), TAGEM/HAYSUD.
2. Ankara Keçilerinde Bisphenol A'nın Başlıca Androlojik Parametreler Üzerine Etkisi. (Araştırmacı), TAGEM/HAYSUD
3. Gen Bankası Oosit Saklama Modeli Oluşturulması-1: Prepubertal Ankara Keçilerinden Laparoskopik Ovum Toplama (LOPU) Yöntemiyle Elde Edilen Oositlerin Dondurulması ve Çözüm Sonu Kalitelerinin Belirlenmesi. (Araştırmacı), TAGEM/HAYSUD.
4. Doku Kültürü Medyumu'na Katılan Bazı Antioksidanların Dondurulmuş Horoz Sperması Üzerine Etkileri. (Araştırmacı), TAGEM/HAYSUD.

Verdiği Seminerler:

1. Bilgisayar Destekli Sperma Analizi ve Kullanılan Parametreler. Doktora Semineri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 2017.
2. Koyunlarda İleri Üreme Teknikleri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 2020.

VIII- Diğer Bilgiler

Aldığı Diğer Eğitimler

1. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, 2015.
2. Sığırlarda Recto-Vaginal Metotla Suni Tohumlama, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, 2015.
3. Sığırlarda Embriyo Transferi, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, 2016.

