

VETERİNER HEKİMLİĞİNDE REPRODÜKTİF BİYOTEKNOLOJİLER

Editör
ALPER KOÇYİĞİT



BİDGE Yayınları

VETERİNER HEKİMLİĞİNDE
BİYOTEKNOLOJİLER

REPRODÜKTİF

Editör: ALPER KOÇYİĞİT

ISBN: 978-625-372-852-6

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 09.12.2025

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya /
Ankara



İÇİNDEKİLER

REPRODÜKTİF BİYOTEKNOLOJİLERE GENEL BAKIŞ.....	5
ALPER KOÇYİĞİT.....	5
SPERMANIN İŞLENMESİ VE SAKLANMASINDA GÜNCEL GELİŞMELER.....	19
BARIŞ ATALAY USLU	19
SALİH NARLIÇAY.....	19
SPERM VE EMBRİYODA CİNSİYET TAYİNİ	56
MESUT ÇEVİK.....	56
BURCU ESİN.....	56
CUMALİ KAYA	56
MERVE DENİZ TANRIKULU	56
DİŞİ HAYVANLARDA GENİTAL SİSTEM ANATOMİSİNE KLİNİK YAKLAŞIM	96
SÜLEYMAN YÜKSEL.....	96
SIĞIRLARDA REPRODÜKTİF BİYOTEKNOLOJİLER	125
BARIŞ ATALAY USLU	125
SALİH NARLIÇAY.....	125
KOYUN VE KEÇİLERDE REPRODÜKTİF BİYOTEKNOLOJİLER.....	159
ALPER KOÇYİĞİT.....	159
MANDALARDA REPRODÜKTİF BİYOTEKNOLOJİLER	208

MURAT SELÇUK	208
MUSTAFA YİĞİT NİZAM.....	208
KÖPEKLERDE REPRODÜKTİF BİYOTEKNOLOJİLER.....	238
BURCU ESİN	238
CUMALİ KAYA	238
MESUT ÇEVİK.....	238
BALIKLARDA REPRODÜKTİF BİYOTEKNOLOJİLER	267
MERVE DENİZ TANRIKULU	267

REPRODÜKTİF BİYOTEKNOLOJİLERE GENEL BAKIŞ

ALPER KOÇYİĞİT¹

Giriş

Reprodüktif biyoteknolojiler veteriner hekimliği alanında hayvanlardaki üreme potansiyelinin artırılması, genetik ilerlemenin hızlanması ve biyolojik çeşitliliğin korunması amacıyla geliştirilmiş teknik ve stratejiler bütünüdür. Bu tekniklerin kökeni 18. ve 19. yüzyıllarda başlayan suni tohumlama çalışmalarıyla atılmış olup, 20. yüzyıl boyunca embriyo transferi ve in vitro fertilizasyon (IVF) gibi yaklaşımların geliştirilmesiyle ivme kazanmıştır (Ferré ve ark., 2020; Younas 2024). Araştırmaların kökeni 18. yüzyılda Spallanzani'nin memelilerde fertilizasyonu deneysel olarak kanıtladığı çalışmalarla ilişkilendirilmekte, 19. yüzyıl sonu ve 20. yüzyıl başında suni tohumlamanın uygulanmaya başlamasıyla da bilimsel bir temele oturtulmaktadır (Foote, 2002; Cassou, 1964). 20. yüzyılın ilk yarısında suni tohumlama büyükbaş ve küçükbaş hayvanlarda yaygınlaştırılmıştır. 1949 yılında Polge, Smith ve Parkes tarafından gliserolün spermayı düşük sıcaklıklarda

¹Doç. Dr., Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Orcid:0000-0001-9639-5497

koruyucu etkisinin keşfi ile kriyobiyoloji alanında yeni bir dönem başlamıştır. Bu gelişme, spermanın dondurulup çözülmesi sonrasında fertil kapasitesinin korunabildiğini göstererek, reproduktif biyoteknolojilerin hızla ilerlemesine zemin hazırlamıştır (Polge ve ark., 1949). Bu keşiflerin sayesinde günümüzde sütçü damızlıkların tamamına yakınında suni tohumlama uygulanmaktadır (Thibier ve ark., 2002). Kriyoprezervasyonun sistematik hale gelmesiyle, sperm ve embriyo bankacılığı kavramı da veteriner hekimliğinde yerleşmeye başlamıştır (Watson, 1995).

Embriyo transferinin temelleri ise 1890'da tavşanlarda gerçekleştirilen deneylerle atılmıştır. 20. yüzyıl ortalarında embriyo yıkama ve transfer tekniklerinin rafine edilmesiyle birlikte, 1970'li yıllarda dondurulmuş sığır embriyolarından buzağı elde edilmesi mümkün olmuştur. Bu dönemde kurulan International Embryo Technology Society (IETS), embriyo biyoteknolojilerinin standardizasyonu, kalite kontrolü ve uluslararası ticareti açısından belirleyici bir rol oynamıştır (Betteridge, 2003; Stringfellow & Seidel, 1990).

İn vitro fertilizasyon (IVF) çalışmalarının kökeni ise 1959 yılında Chang'ın tavşan oositleri üzerinde gerçekleştirdiği deneylere dayanmaktadır. Bu bulgular, memelilerde fertilizasyon sürecinin laboratuvar koşullarında sağlanabileceğini göstermiştir. 1981 yılında Brackett ve çalışma arkadaşları tarafından ilk IVF kökenli buzağının elde edilmesi, büyükbaş hayvanlarda in vitro embriyo üretimi (IVP) çağını başlatmıştır (Chang, 1959; Brackett ve ark., 1982). 1980'lerin sonlarına doğru transvaginal ultrasonografi eşliğinde oosit toplama (OPU) yönteminin geliştirilmesi, in vivo oosit elde etme sürecini kolaylaştırmış ve OPU-IVM-IVF zinciri günümüzdeki endüstriyel embriyo üretim platformlarının temelini oluşturmuştur (Pieterse ve ark., 1991).

Kriyobiyolojide 1985 yılında Rall ve Fahy tarafından vitrifikasyon tekniğinin tanımlanmasıyla, buz kristali oluşmaksızın embriyoların -196°C 'de canlılığını koruyabildiği gösterilmiştir (Rall & Fahy, 1985). Mazur'un 1970'lerde soğutma ve çözme hızlarının biyolojik yapılar üzerindeki etkilerini açıklaması modern kriyoprezervasyon protokollerinin teorik temelini oluşturmuştur (Mazur, 1970).

1980'lerin sonunda flow sitometri kullanılarak X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoaların DNA içerik farkına göre ayrılması, cinsiyet belirleme teknolojilerinin başlangıcı olmuştur (Johnson ve ark., 1989). Bu yöntemin geliştirilmesiyle, özellikle süt sığırcılığında dişi yavru oranının artırılması amacıyla cinsiyeti belirlenmiş spermalar ile suni tohumlama uygulamaları 2000'li yıllarda yaygınlaşmıştır (Garner, 2001).

Somatik hücre çekirdek transferi (SCNT) kavramı ise 1996 yılında Dolly isimli koyunun klonlanmasıyla geniş yankı uyandırmıştır. Bu gelişme, erişkin somatik hücre çekirdeğinden canlı bir organizma elde etmenin mümkün olduğunu göstermiş ve genetik olarak üstün bireylerin korunması ile çoğaltılmasında yeni bir dönemi başlatmıştır (Wilmut ve ark., 1997).

Sonraki süreçte bilgisayar destekli sperm analiz sistemlerinin (CASA) geliştirilmesi, sperm motilitesi ve kinematik parametrelerinin objektif ve tekrarlanabilir şekilde değerlendirilmesine olanak sağlamıştır (Mortimer, 2000).

Günümüzde ise reproduktif biyoteknolojiler; omik teknolojilerin entegrasyonu, yapay zekâ destekli görüntüleme sistemleri ve gen düzenleme tekniklerinin (örneğin CRISPR/Cas9) uygulanmasıyla çok disiplinli bir yapıya evrilmiştir. Son otuz yılda omik verilerin üreme biyoteknolojilerine entegrasyonu, görüntü işleme ve makine öğrenimi tabanlı karar destek uygulamaları ve gen düzenleme gibi alanlar, popüler araştırma alanlarını oluşturmaktadır.

Bu çalışmaların, biyoetik ve yasal çerçeveye ilişkin yeni değerlendirmeleri de beraberinde getirdiği vurgulanmaktadır (Lonergan 2018; Ferré ve ark., 2020; Younas, 2024).

Bu tarihsel gelişim süreci, reprodüktif biyoteknolojilerin deneysel araştırma döneminden endüstriyel uygulamaya, oradan da veri odaklı bir araştırma alanına dönüşümünü göstermektedir. Günümüzde reprodüktif biyoteknolojiler hem hayvansal üretim verimliliği hem de genetik kaynakların korunması açısından veteriner hekimliğin en dinamik ve stratejik disiplinlerinden biri haline gelmiştir.

Reprodüktif Biyoteknolojilerin Kavramsal Temelleri

Reprodüktif biyoteknolojiler üremenin biyolojik süreçlerine yönelik kontrollü müdahaleler olarak kavramsallaştırılmaktadır. Bu çerçevede gamet ve embriyo biyolojisi, manipüle edilebilir bir “biyolojik altlık” olarak ele alınmakta; laboratuvar ve saha koşullarındaki teknolojik uygulamalar ise bu altlık üzerinde zamanlama, kalite ve verimlilik bakımından öngörülebilir sonuçlar üretmeyi amaçlayan araçlar bütünü olarak konumlandırılmaktadır. Bu yaklaşımla reprodüktif biyoteknolojiler sistemi; biyolojik zemin (gamet–embriyo), müdahale ve işleme basamakları (toplama, değerlendirme, işleme, saklama, transfer), karar-destek katmanı (veri ve standardizasyon) ve etik boyutu (refah, biyoetik ve mevzuat) olmak üzere dört bileşenli bir mimari şeklinde değerlendirilmektedir (Stringfellow & Seidel, 1990).

Bu teknolojilere duyulan ihtiyaç, evcil ve yabani türlerde üreme fizyolojisinin doğal sınırlılıkları ile modern hayvansal üretim gereksinimlerinin kesişiminde ortaya çıktığı için bilimsel ve pratik gerekçelerle temellendirilmektedir. Memelilerde gebelik süresinin uzunluğu, döl veriminin sınırlı oluşu, siklus senkronizasyonundaki zorluklar, postpartum anöstrus ve mevsimsellik gibi biyolojik kısıtlar, genetik ilerleme hızını doğal seleksiyon ve geleneksel ışlah

yaklaşımlarının temposuyla sınırlamaktadır. Ancak sahada sürekli artan verim ve ürün talebi karşısında bu kısıtların aşılmasında hızlandırıcı bir araç olarak reprodüktif biyoteknolojiler konumlandırılmaktadır. Genetik açıdan üstün bireylerden daha fazla verim elde edilmesi, istenmeyen varyasyonun azaltılması, suni tohumlama ve embriyo transfer teknolojilerinin temel bilimsel gerekçeleri arasında sayılmaktadır (Betteridge, 2003; Ferré ve ark., 2020).

Buna paralel olarak biyogüvenlik ve hastalık kontrolü gereksinimleri de güçlü bir itici güç olarak değerlendirilmektedir. Canlı hayvan hareketlerinin azaltılması, patojen taşınım risklerinin düşürülmesi ve uluslararası ticarete sağlık sertifikasyonunun kolaylaştırılması, gamet ve embriyo materyalinin işlenmesi ve saklanmasıyla mümkün hâle gelmektedir. Bu noktada standardizasyon ve izlenebilirliğin IETS kılavuzlarıyla kurumsallaştırılması sürecin başarısını güçlendirmektedir (Stringfellow & Seidel, 1990; Watson, 1995).

Hayvancılıkta kaynak verimliliği de kavramsal çerçevenin ayrılmaz bir boyutu olarak ortaya konmaktadır. Cinsiyeti belirlenmiş sperma gibi teknolojilerle hedeflenen yavru cinsiyet oranının ayarlanabilmesi, yem ve işgücü girdilerinin çıktılarla daha iyi eşleştirilmesine olanak vermekte, böylece birim zamanda elde edilen genetik ilerleme ve ekonomik geri dönüş artırılmaktadır (Garner, 2001; Ferré ve ark., 2020). Laboratuvar ve saha arasında karşılaştırılabilir ölçümler sağlayan bilgisayar destekli analiz ve kalite kontrol yaklaşımları, karar süreçlerinin objektifleştirilmesi ve tekrarlanabilirliğin artırılması bakımından bilimsel bir zorunluluk olarak görülmektedir (Mortimer, 2000).

Kriyoprezervasyon perspektifinden bakıldığında, tehdit altındaki türlerde gamet ve embriyo materyalinin toplanması, saklanması ve gerektiğinde kullanılması yoluyla genetik çeşitliliğin

sürdürülmesi hedeflenmektedir. Popülasyonların genetik darboğazlara karşı dayanıklılığının güçlendirilmesi amaçlanmaktadır. Bu yönüyle reprodüktif biyoteknolojiler, yalnızca üretim odaklı değil, aynı zamanda tür ve ekosistem düzeyinde biyolojik çeşitliliğin güvence altına alınmasına hizmet eden uygulamalar olarak değerlendirilmektedir (Younas, 2024).

Sonuç olarak reprodüktif biyoteknolojiler biyolojik süreçleri kontrol edilebilir hâle getiren müdahale odaklı bir sistem olarak ele alınmalıdır. Bu teknolojiler genetik ilerleme, biyogüvenlik, kaynak verimliliği ve türlerin korunması hedeflerinin eşzamanlı olarak gerçekleştirilmesini vadetmektedir (Betteridge, 2003; Stringfellow & Seidel, 1990; Mazur, 1970; Watson, 1995; Garner, 2001; Mortimer, 2000; Ferré ve ark., 2020).

Reprodüktif Biyoteknolojilerin Fizyolojik Temelleri

Gametogenez ve fertilizasyon gibi temel fizyolojik süreçlerin anlaşılması, reprodüktif biyoteknolojilerin işleyişi ve saha etkinliği açısından önkoşul olarak değerlendirilmektedir. Memelilerde reproduksiyona ilişkin süreçler biyoteknolojik uygulamaların dayandığı biyolojik altyapıyı oluşturmaktadır (Hafez & Hafez, 2000; Ferré ve ark., 2020).

Spermatogenez; seminifer tübüllerdeki kök hücre kaynaklı spermatogonyumların mitotik çoğalması, mayozla haploid spermatidlerin oluşumu ve spermiogenezle olgun spermatozoaya dönüşümü olarak tanımlanmaktadır. Bu olaylar dizisinin, Sertoli hücrelerinin yapısal desteği, Leydig hücrelerinden salınan testosteron ve hipotalamo-hipofizer eksenden gelen gonadotropinlerin koordinasyonu ile yürütüldüğü bildirilmektedir. Kan-testis bariyerinin ise mayoz ve postmayotik evrelerde gelişen germ hücrelerini immunolojik ve toksik etkilere karşı koruyarak farklılaşmayı kolaylaştırdığı bilinmektedir (Griswold, 2016).

Oogenez; ftal dönemde oogonyumların çoğalması ve primer oositlerin mayoz I profazında durdurulması ile başlatılan; puberte sonrası seçilen folliküllerde oosit büyümesi ve olgunlaşma yeterliliğinin kazanılmasıyla ilerleyen bir süreç olarak ele alınmaktadır (Edson ve ark., 2009; Richards & Pangas, 2010).

Folliklogenez; primordial havuzdan follikül seçimiyle başlayıp primer, sekonder ve antral evreler üzerinden dominant follikülün belirlenmesi, ovulasyon ya da atrezi ile sonuçlanan aşamalı bir süreç olarak tanımlanmaktadır (McGee & Hsueh, 2000; Monniaux, 2016).

Fertilizasyon; dişi genital kanalında başarılı zigot oluşumuyla sonuçlanan ardışık olaylar bütünü olarak tanımlanmaktadır. Spermatozoonun kapasitasyonu sırasında membran hiperpolarizasyonu, iyon homeostazında pH ve Ca^{2+} artışı, kolesterol kaybı ve sinyal yollarının düzenlenmesi ile hiperaktivasyonun ortaya çıktığı bilinmektedir. Ardından zona pellusidaya bağlanma ve akrozom reaksiyonunun gerçekleştiği bilinmektedir. Zona değişiklikleriyle polispermiye karşı hızlı ve yavaş blokların tesis edildiği, ardından oosit aktivasyonu ve pronkleer füzyonla zigot çekirdeğinin oluşturulduğu bildirilmektedir. Bu karmaşık olay örgüsünün zamanlaması ve biyokimyasal ayrıntıları türler arasında benzerlikler ve farklılıklar gösterebilmektedir (Takei ve ark., 2024).

İnfertilite; klinik ve epidemiyolojik bağlamda belirli bir süre içinde gebelik elde edilememesi ile karakterize edilmekte ve erkek, dişi veya dış faktörlü etiyolojilerle açıklanmaktadır. Erkek faktöründe spermatogenezin endokrin düzeninde bozulmalar, termal stres ve oksidatif hasar, epididimal maturasyon anormallikleri ile kapasitasyon-akrozom reaksiyonu eksikliklerinin motilite, morfoloji ve fonksiyon parametrelerine yansdıı bildirilmektedir. Dişi faktöründe ovulasyon disfonksiyonları, oosit kalitesinde yetersizlik,

luteal faz yetmezliği ve uterin-oviduktal patolojiler ile inflamatuvar ve enfeksiyöz süreçler öne çıkmaktadır. Beslenme dengesizlikleri, ısı-nem stresi, toksinler ve sistemik hastalıklar gibi çevresel ve yönetimsel etmenlerin her iki cinsiyette de subfertilite riskini artırdığı ve implantasyonu etkilediği değeriendirilmektedir (Hafez & Hafez, 2000).

Bu fizyolojik çerçevenin, reprodüktif biyoteknolojilerin dayandığı biyolojik temelleri tanımladığı ve uygulama yolu, zamanlama, doz gibi parametrelerinin optimize edilmesinde referans oluşturduğu kabul edilmektedir. Gamet ve zigot biyolojisinin aydınlatılmasının reprodüktif teknoloji ve protokollerin etkililiğinin artışı ile doğrudan ilişkili olduğu açıktır (Hafez & Hafez, 2000; Ferré ve ark., 2020).

Gelecek Projeksiyonu

Veteriner hekimliğinde reprodüktif biyoteknolojilerin son yıllarda önemli bir kavramsal dönüşüm geçirdiği izlenmektedir. Bu dönüşümün, özellikle omik teknolojiler ile yapay zekâ temelli analizlerin hızla gelişmesi sonucunda ivme kazandığı ve üreme biyolojisinin değeriendirilme biçimini kademeli olarak yeniden şekillendirdiği anlaşılmaktadır. Mevcut eğilimler doğrultusunda hem araştırma gündeminin hem de yakın ve orta vadeye ilişkin projeksiyonların bu teknolojik entegrasyon çerçevesinde belirgin biçimde farklılaştığı değeriendirilmektedir.

Omik teknolojiler bağlamında genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik ve epigenomik yaklaşımların üreme biyolojisinin karmaşık doğasını çözümlemeyi mümkün kıldığı; gamet ve embriyo kalitesinin moleküler düzeyde daha yüksek duyarlılık ve özgüllükle tanımlanabildiği bildirilmektedir. Genomik seçimin ve gen düzenlemelerinin, verim özelinde fenotiplerde seçim hızını artırma potansiyeli taşıdığı bildirilmektedir. Buna paralel olarak omik uygulamalar ile ovaryumda folikülogenezis süreçlerinin

haritalandırılabilirdiği vurgulanmaktadır (Wadood ve ark., 2025; Gong ve ark., 2022). Omik verilerin kültür ortamı metabolitleri ve embriyo sekresyon profilleriyle ilişkilendirilmesiyle non-invaziv kalite değerlendirmesi için aday biyobelirteç panellerinin geliştirildiği, bu sayede embriyo seçiminin öngörü gücünün artırılmasının hedeflendiği bildirilmektedir (Kim ve ark., 2022; Tsopp ve ark., 2025). Gen düzenleme teknolojilerinin, özellikle CRISPR/Cas sistemlerinin, reproduktif fenotiplerde hedeflenen özelliklerin kazandırılması bakımından güçlü bir deneysel araç olarak konumlandığı değerlendirilmektedir. Ancak bu çalışmaların etik ve biyogüvenlik boyutları nedeniyle denetimli bir çerçevede ele alınmasının gerektiği değerlendirilmektedir (Wang ve ark., 2025; Kim ve ark., 2025).

Yapay zekâ teknolojileri, görüntü işleme, sensör tabanlı izlem ve çoklu veri kaynaklarının makine öğrenmesiyle bütünleştirilmesi sonucunda reproduktif biyoteknolojilerin etkinliğinin yükseltildiği bildirilmektedir. Embriyo görüntülerinden derin öğrenme ile geliştirilen modellerin, embriyo canlılığı ve implantasyon potansiyelinin tahmininde insan gözlemine yakın ya da onu aşan performans sergileyebildiği; embriyologlar arası sınıflandırma değişkenliğinin bu yaklaşımlarla azaltılabildiği ifade edilmektedir (Boucret ve ark., 2025; Saraniya ve ark., 2025; Wells ve ark., 2025). Benzer biçimde, bilgisayar destekli sperm analizinin yapay zekâ ile zenginleştirilmesiyle motilite, morfoloji ve DNA bütünlüğü ölçümlerinin doğruluk ve hızının artırıldığı; bu sayede spermatolojik analizlerin standart bir zemine taşındığı değerlendirilmektedir (Baldán ve ark., 2025; Belala ve ark., 2024). Saha tarafında, kızgınlık tespiti için davranış, ısı ve fizyolojik verileri sürekli toplayan sensörlerin makine öğrenmesiyle analiz edilmesiyle, zamanlama hatalarının azaltıldığı ve suni tohumlama zamanının daha iyi yakalandığı bildirilmektedir (Merkelyt ve ark., 2025).

Özetle reprodüktif biyoteknolojiler alanında üç eksenle belirgin bir yakın geleceğin şekillendiği öngörülmektedir. Birincisi, omik, görüntüleme ve sensör kaynaklı verilerinin birlikte modellendiği, yapay zekâ yaklaşımlarıyla desteklenen karar sistemlerinin yaygınlaşacağı ve bu sayede embriyo ve gamet seçiminin bireyselleştirilmiş bir çerçeveye taşınacağı değerlendirilmektedir (Wadood ve ark., 2025; Kim ve ark., 2022; Boucret ve ark., 2025). İkincisi in vitro kültür koşullarının dinamik olarak yönetileceği mikroakışkan sistemlerle embriyo-maternal etkileşimin daha gerçekçi bir şekilde taklit edilmesinin hedefleneceği belirtilmektedir (Kim ve ark., 2022; Tsopp ve ark., 2025). Üçüncüsü, gen düzenleme çalışmalarının, reprodüktif fonksiyonların temel mekanizmalarının aydınlatılması ve hastalıklara direnç gibi karmaşık özelliklerin değerlendirilmesine yoğunlaşacağı öngörülmektedir (Wang ve ark., 2025; Kim ve ark., 2025). Bu eğilimlerin, standardizasyon, etik ve mevzuat ilkeleri ile birlikte yürütülmesi gerektiği de unutulmamalıdır (Belala ve ark., 2024; Baldán ve ark., 2025).

Reprodüktif biyoteknolojilerin yakın gelecekte “ölç, modelle, yönlendir” döngüsü etrafında olgunlaşacağı; çoklu omik verilerle tanımlanan biyolojik hedeflerin dijital fenotipleme ve yapay zekâ destekli modellerle birleştirilerek uygulama kararlarına dönüştürüleceği öngörülmektedir. Bu sebeple veteriner hekimlerin ve araştırmacıların, reprodüktif biyoteknolojiler alanındaki yetkinliklerini sürekli güncellemesiyle hayvansal üretimde verimlilik, refah ve sürdürülebilirlik eksenlerinde kazanımların artacağı açıktır.

Kaynakça

Baldán, F. J., Nasel, C., & Schuff, J. (2025). Revolutionizing sperm analysis with AI: A review of computer-aided sperm analysis systems. *Algorithms*, 13(6), 132.

Belala, R., et al. (2024). The use of computer assisted sperm analysis (CASA) in animals: A review. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 30(1), 1–12.

Betteridge, K. J. (2003). A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal Reproduction Science*, 79(3–4), 203–244.

Boucret, L., et al. (2025). Deep-learning model for embryo selection using time-lapse imaging: A self-supervised approach. *Scientific Reports*, 15, 10531.

Brackett, B. G., Younis, A. I., & Fayrer-Hosken, R. A. (1982). Enhanced viability after in vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro. *Journal of Animal Science*, 55(1), 43–49.

Cassou, R. (1964). Artificial insemination in cattle: Techniques and results. Paris: Institut National Agronomique.

Chang, M. C. (1959). Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*, 184(4682), 466–467.

Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*, 30(6), 624–712.

Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Recent advances in bovine in vitro embryo production: Reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991–1004.

Foote, R. H. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*, 80(E Suppl_2), E22–E32.

Garner, D. L. (2001). Sex-sorting mammalian sperm: Concept to application in animals. *Journal of Andrology*, 22(4), 519–526.

Gong, X., et al. (2022). Application of single-cell RNA sequencing in ovarian research. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 9855652.

Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The commitment to meiosis. *Physiological Reviews*, 96(1), 1–17.

Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2000). *Reproduction in farm animals* (7th ed.). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

Johnson, L. A., Flook, J. P., & Hawk, H. W. (1989). Sex preselection in rabbits: Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biology of Reproduction*, 41(2), 199–203.

Kim, B., et al. (2025). CRISPR/Cas-based genome editing technology in animal research: Current status and perspectives. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 40(3), 109–124.

Kim, J., et al. (2022). Non-invasive evaluation of embryo quality for the selection of viable embryos. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 49(4), 273–286.

Lonergan, P. (2018). Review: Historical and futuristic developments in bovine semen technology. *Animal*, 12, s4–s18.

Mazur, P. (1970). Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science*, 168(3934), 939–949.

McGee, E. A., & Hsueh, A. J. W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200–214.

Merkelytė, I., et al. (2025). The role of sensor technologies in estrus detection: A review. *Animals*, 15(15), 2313.

Monniaux, D. (2016). Driving folliculogenesis by the oocyte–somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(6), 647–660.

Mortimer, S. T. (2000). CASA—Practical aspects. *Reproduction, Fertility and Development*, 12(1–2), 25–33.

Pieterse, M. C., Kappen, K. A., Kruip, T. A. M., & Taverne, M. A. M. (1991). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 35(1), 19–24.

Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172), 666.

Rall, W. F., & Fahy, G. M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313(6003), 573–575.

Richards, J. S., & Pangas, S. A. (2010). The ovary: Basic biology and clinical implications. *Nature Reviews Endocrinology*, 6(7), 461–471.

Saraniya, M., et al. (2025). Deep learning-based embryo quality assessment: A dual-stage segmentation and classification approach. *Reproductive Medicine and Biology*, 25, 77–89.

Stringfellow, D. A., & Seidel, S. M. (1990). *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Champaign, IL: IETS.

Takei, G. L. (2024). Molecular mechanisms of mammalian sperm capacitation, and its regulation by sodium-dependent

secondary active transporters. *Reproductive Medicine and Biology*, 23(1), e12614.

Thibier, M., & Wagner, H. G. (2002). World statistics for artificial insemination in cattle. *Livestock Production Science*, 74(2), 203–212.

Tsopp, E., et al. (2025). Metabolomic biomarkers in bovine embryo culture media: Towards non-invasive embryo selection. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(5), 2362.

Wadood, A. A., et al. (2025). Integrating omics approaches in livestock biotechnology: Innovations in production and reproductive efficiency. *Frontiers in Animal Science*, 6, 1551244.

Wang, J., et al. (2025). Application of gene editing technology in livestock: Progress and prospects. *Agriculture*, 15(20), 2155.

Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871–891.

Wells, C., et al. (2025). Advancing embryo evaluation: Machine learning to standardize morphology-based assessment. *Journal of In Vitro Fertilization Worldwide*, 4(2), 123–135.

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), 810–813.

Younas, K. (2024). The role of assisted reproductive biotechnology (ARTs) in the conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*, 99(3–4), 223–243.

SPERMANIN İŞLENMESİ VE SAKLANMASINDA GÜNCEL GELİŞMELER

**BARIŞ ATALAY USLU¹
SALİH NARLIÇAY²**

Giriş

Spermanın dondurularak saklanması, reproduktif biyoteknolojinin en köklü uygulamalarından biri olduğu bilinmektedir. Spermilerin düşük sıcaklıkta biyolojik özelliklerini koruyabileceğine yönelik fikirler 18. yüzyıla uzansa da bilimsel temele dayalı ilk başarılı çalışmalar 20. yüzyılın ortalarında ortaya çıkmıştır. 1949 yılında Polge ve arkadaşlarının gliserolün spermatolojik yapıları koruyabildiğini göstermesi, kriyoprezervasyon kavramını laboratuvar deneyinden klinik ve endüstriyel düzeye taşımıştır. Dondurulmuş spermanın suni tohumlama programlarında kullanılmasını mümkün kılmıştır. Kısa sürede hayvan yetiştiriciliği politikalarını değiştiren bir dönüm noktası haline gelmiştir (Polge, Smith & Parkes, 1949: 666).

¹ Prof. Dr., Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Orcid: 0000-0003-1866-932X

² Dr. Öğretim Üyesi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Orcid: 0000-0001-8043-3807

İlerleyen yıllarda farklı türlere ait spermanın dondurulup çözdürülmesi üzerine geniş bir literatür oluşmuştur. Sığır yetiştiriciliğinde sperma saklanması, genetik ilerlemenin hızlanmasına olanak sağladığı bildirilmiştir. Boğalar arasındaki üstün genetik hatların dünya çapında yayılmasına fırsat verdiği saptanmıştır. Benzer yaklaşımlar koyun, keçi, at, kedi ve köpek gibi evcil türlerde de geliştirilmiş ve hala en az zararlı spermanın saklanması için çalışmalar devam etmektedir. Bu süreç, yalnızca damızlık yönetimini değil, üremenin denetlenmesi gereken her alanı etkilemiştir (Watson, 2000: 489).

Sperma saklanması'nın önemi, günümüzde daha geniş bir perspektifle değerlendirilmektedir. İnsan tıbbında kanser tedavisi öncesinde gametlerin saklanması, çiftlik hayvanlarında genetik ıslah programları, yaban hayatı koruma çalışmalarında nesli tehlikede türlerin genetik materyalinin geleceğe taşınması gibi uygulamalar, kriyobiyolojiyi stratejik bir araç haline getirmektedir. Özellikle nesli tükenmekte olan türlerde, sınırlı sayıdaki erkek bireyden alınan spermanın dondurularak saklanması, risk taşıyan genetik varyasyonların korunmasını mümkün kılmaktadır (Comizzoli, 2018: 31). Spermanın dondurularak saklanması amaçlansa da kriyojenik süreç her zaman ideal sonuçlar vermemektedir. Çözdürme sonrası motilite, DNA bütünlüğü, akrozom yapısı ve mitokondriyal fonksiyon gibi parametrelerde kayıplar sık görülmektedir. Bu durum, klasik protokollerin biyolojik sınırlarını ortaya çıkarmakta ve yeni yöntem arayışlarını teşvik etmektedir (Rodríguez-Martínez, 2013: 269). Son yıllarda araştırmalar, spermanın yalnızca fiziksel yapısını korumakla yetinmeyip hücre metabolizma, membran lipid düzeni, epigenetik işaretler ve sperm fonksiyonunu belirleyen moleküler ağları da muhafaza etmeyi hedefleyen bir noktaya yönelmiştir. Dondurma protokolleri, kriyoprotektan seçimi ve soğutma hızı gibi teknik ayrıntıların ötesine geçmektedir. Nanoteknoloji ile zenginleştirilmiş sulandırıcılar, membran

stabilitesini güçlendiren lipid taşıyıcı sistemler, oksidatif hasarı hedefleyen antioksidan stratejileri, mikro hacimlerde vitrifikasyon teknikleri, yönlü dondurma sistemleri ve oda sıcaklığında saklamayı amaçlayan liyofilizasyon tabanlı yaklaşımlar bu dönüşümün merkezindedir. Böylece spermayı koruma yöntemleri, biyoteknolojinin diğer alanlarıyla ortak bir dil oluşturmakta ve daha bütüncül bir çerçeveye taşımaktadır (Najafî & ark., 2020: 123), (Aray, 2022: 2), (Narlıçay & Ataman, 2022: 44), (Dural & Narlıçay, 2024: 254), (Castro & ark., 2025: 3), (Kumar & ark., 2025: 385), (Ozturk & ark., 2025: 2).

Sperma Kriyoprezervasyonunun Temel Prensipleri

Sperm, diğer somatik hücrelerden oldukça farklı yapısal ve işlevsel özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir. Bu farklılıklar spermin dondurularak saklanmasıdaki kırılganlığı açıklayan önemli temeller sunmaktadır. Spermin baş kısmı yoğun olarak kromatin ve akrozom içeren özel bir yapıda olduğu belirtilmiştir. Kromatin yoğun kompakt yapıdadır, bu da DNA'nın fertilizasyon öncesi korumasını sağlamaktadır. Bunun yanı sıra akrozom, zona pellusida geçişi için gerekli enzimleri içermektedir. Bu yapıların tamamı spermin fonksiyonu için kritik önem arz etmektedir. Sperm membranının lipid kompozisyonu, fosfolipit ve kolesterol dengesi hem membran akışkanlığı hem de dondurma-çözdürme sırasında membran stabilitesi açısından kritik öneme sahiptir. Soğuk ve donma stresine karşı koruma kapasitesini doğrudan etkilemektedir. (Upadhyay & ark., 2021: 2) (Castro & ark., 2025: 3). Sperm kuyruğunun orta kısmında yer alan mitokondri sarmalı, motilite ve enerji üretimine gerek duymaktadır. Sperm, ATP üretmek için oksidatif fosforilasyon yapan mitokondrilere ihtiyaç duymaktadır. Spermin dondurma sırasında oksidatif stres ve mitokondriyal hasara karşı hassasiyetini arttığı bildirilmiştir. Dondurma-çözdürme işlemi sonrası mitokondriyal hasar, motilite ve canlı sperm oranında düşüşe

yol açabilmektedir. (Hezavehei & ark., 2018: 330) (Figueroa & ark., 2019: 8) (Öztürk & ark., 2019: 82)

Sperm hücrelerinin biyokimyasal savunma mekanizmaları oldukça düşük seviyededir. Spermin sitoplazma ve su içeriği düşük, antioksidan enzim kapasitesi azdır (Kowalczyk, 2022: 1387). Dondurma çözündürme sırasında artan reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ile lipid peroksidasyonu, protein hasarını ve DNA fragmentasyon riskini artırabilmektedir (Borate & Meshram, 2022: 2). Sperm kromatin yapısının kompaktlığı ve stabilitesi dondurma sonrası genetik bütünlüğün korunmasında kilit noktalardan biri olduğu bilinmektedir. Literatürde, kriyoprezervasyonun kromatin kondansasyonu, DNA stabilitesi ve epigenetiği üzerinde olumsuz etkileri olabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Bu özellikler yoğun kromatin, membran lipid kompozisyonu, yüksek mitokondri bağımlılığı, sınırlı antioksidan savunma mekanizması spermleri dondurma ve çözündürme işlemlerine karşı hem yapısal hem de fonksiyonel olarak bozulmalara yol açabilmektedir. Spermanın dondurulması için geliştirilen protokoller, bu temel yapı ve fizyoloji bilgisine dayalı olmalıdır (Hezavehei & ark., 2018: 330) (Upadhyay & ark., 2021: 2) (Tamburrino & ark., 2023: 4).

Spermanın dondurulma ve çözündürülme süreci, yalnızca sıcaklık düşüşü ya da yükselişi olarak değerlendirilememektedir. Hücresel yapıları, membran bütünlüğünü ve metabolik aktiviteleri doğrudan etkileyen karmaşık biyofiziksel ve biyokimyasal olaylar bütünü olarak söylenmektedir. Bu süreçte sperm, karmaşık bir dizi fiziko-kimyasal ve biyolojik stresle karşılaşmaktadır. Bu streslerin tümü uygun şekilde kontrol edilmezse, “kriyohasar” adı verilen bir dizi olumsuz etkinin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Drobnis & ark., 1993: 434) (Kumar & ark., 2019: 605) (Ozmic, Ban-Frangez & Stimpfel, 2023: 4717). Sperm plazma membranı, olgunlaşma sürecinde belirgin bir lipid bileşimi kazanmaktadır. Fosfolipitler, glikolipitler, kolesterol ve bazı proteinler, membran

yapısını ve işlevselliğini düzenlemektedir (García & ark., 2011: 812). Membranın yapısı, normal fizyolojik sıcaklıklarda kararlı olsa da ani ve ciddi sıcaklık düşüşlerinde lipid faz geçişi adı verilen biyofiziksel değişimlere maruz kalmaktadır. Membranın sıvı-kristal durumdan jel duruma geçmesine yol açmaktadır. Lipid akışkanlığı azalır, membran yapısı sertleşir, membran proteinlerinin konformasyonu değişebilmektedir. Membran bütünlüğünün bozulması, iyon dengesinin kaybı, akrozom ve kuyruk yapılarında hasar gibi sonuçlara neden olabilmektedir (Gautier & Aurich, 2022: 2). Çeşitli memelilerde membran lipid bileşiminin türler arası farklılıkları vardır. Örneğin sperm membranı yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içeren türlerde hem sıvı faz akışkanlığı yüksektir hem de soğuk şok sonrası stabilize olamama riski artırmaktadır. Membran bileşimi kriyotoleransı belirleyen en temel parametrelerden biri olarak bildirilmektedir (Gautier & Aurich, 2022:3). Son yıllarda yapılan lipid analizleri incelediğinde, dondurma öncesi, sırası ve sonrası değişiklikler göstermiştir. Kriyoprezervasyon sırasında membran lipitleri arasında sterol-fosfolipit etkileşimlerinde bozulma, kolesterolün membran dışına çıkışı ve fosfolipit dengesinde değişiklik gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu değişiklikler membran stabilitesini zayıflatarak, membran geçirgenliğini artırır ve sperm canlılığı ile motilitesini olumsuz etkilemektedir (Castro & ark., 2025:3).

Kriyoprezervasyonda, sperma sulandırıcısına farklı farklı kriyoprotektanlar eklenebilmektedir. Bu ajanlar hücre içindeki su ile yer değiştirerek sıvı yoğunluğunu değiştirmektedir. Dondurma öncesi hızlı su çıkışıyla hücre büzülmesine, çözündürme sırasında hızlı su girişiyle hücre şişmesine neden olabilmektedir. Hücredeki hacim değişimleri, membran gerilimine, sitoskeleton streslerine, akrozom ve kuyruk segmentlerinde yapısal bozulmalara neden olabilmektedir (Öztürk & ark., 2019: 82). Özellikle penetran kriyoprotektanlarla birlikte kullanılan penetran olmayan maddeler bu osmotik

dalgalanmayı şiddetlendirebilmektedir. Bu nedenle kriyoprotektan seçimi, eklemesi, oranı, çözündürme hızı ve equilibasyon süreleri kritik önem taşımaktadır (Hernández-Avilés, 2024: 2). Osmotik stres yalnızca mekanik olarak membrana zarar vererek bir gerilme yaratmaz. Hücre içi iyon dengesini etkileyerek, mitokondri ve membran proteinlerinin etki mekanizmasını bozabilmekte, hücrel metabolizmayı olumsuz etkileyebilmektedir. Enerji üretimi ve hücrel fonksiyonların devamlılığında da sorun oluşturabilmektedir (Rajamanickam, Kastelic & Thundathil, 2017: 1168). Hücre içi ve dışı buz kristalleri, kriyoprezervasyonun en tehlikeli aşaması olarak söylenmektedir. Hücre dışı buz kristalleri, hücre dışı çözeltide suyu dondururken çözeltinin konsantrasyonunu artırmaktadır. Hücre dışı ortamı osmotik açıdan değiştirmekte ve hücreleri su yoğunluğunu azaltmaktadır. Hücre içi buz kristalleri ise doğrudan plazma membranını, organelleri ve sitoplazmik yapılarına mekanik olarak zarar verebilmektedir. Bu tip hasarlar, genellikle hücre için ölümcül olmakta veya hücrenin daha sonra işlev görmesini engelleyebilmektedir (Kumar & ark., 2019: 8) (Öztürk & ark., 2019: 78). Buz kristali oluşumu riski, soğutma hızı, kriyoprotektan konsantrasyonu, hacim, örnek yoğunluğu gibi fizikokimyasal parametrelere bağlı olduğu bilinmektedir. Dondurma protokolleri oluşturulurken bu parametrelerin titizlikle optimize edilmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmalar incelediğinde çok hızlı dondurma (vitrikasyon) ile yavaş dondurma yöntemleri arasında bu riskin dağılımı değişkenlik göstermektedir. Standart dondurma protokollerinde bile uygun sulandırıcı, soğutma hızı ve kriyoprotektan madde olmazsa buz kristal hasarının oluşumunun kaçınılmaz olduğu bildirilmektedir (Pegg, 2005: 232) (Moore & ark., 2006: 215).

Soğuk şoku, osmotik stres ve buz kristalleri fiziksel zarar potansiyeli taşıırken, bunlara eşlik eden kimyasal stresler spermin hayatta kalma şansını daha da azaltmaktadır. Dondurma çözündürme

sürecinde, özellikle membran bütünlüğü bozulduğunda ve mitokondriyal fonksiyon etkilendiğinde, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi artmaktadır (Öztürk & ark., 2019: 82). Lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, membran hasarı ve DNA fragmentasyonuna elverişli bir ortam oluşturmaktadır. Lipid peroksidasyonu, özellikle sperm membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerine zarar vermektedir. Bu da membran akışkanlığının bozulması, membran geçirgenliğinde artış, akrozom reaksiyonunun bozulması, motilitede düşüş ve fertilite kaybıyla sonuçlanabilir (Gautier & Aurich, 2022: 2) (Fleming & Thomson, 2025: 2). Oksidatif hasar, DNA bütünlüğünü de tehdit etmektedir. Çeşitli çalışmalarda, kriyoprezervasyon sonrası sperm DNA fragmentasyon oranlarının anlamlı biçimde arttığı, kromatin yapısında bozulmalar ve protamin-DNA etkileşimlerinde zayıflama olduğu saptanmıştır. Bu genetik hasar, hücre canlılığına, fertiliteye ve olası epigenetik düzenlemelere zarar verebilmektedir (Bodu & ark., 2025: 2).

Bazı güncel çalışmalar, kriyohasarı sadece pasif fiziksel-oksidatif bir bozulma olarak görmek yerine, hücre tarafından tetiklenen apoptoz veya benzeri hücresel süreçleri de içerdiğini öne sürmektedir. Sperma kriyoprezervasyonunun basit bir dondurma çözündürme prosedürü değil, hücresel hayatta kalma mücadelesi olduğu görüşünü güçlendirmiştir (Sicherle & ark 2020: 1) (Khan & ark., 2021: 2).

Yeni Nesil Sulandırıcılar ve Koruyucu Maddeler

Sperm kriyoprezervasyonunun en zayıf halkası, dondurma-çözündürme sürecinde oluşan biyolojik hasarı en düşük düzeye indirecek sulandırıcı ve koruyucu madde formülasyonlarının geliştirilmesi olmuştur. Gliserol-tris bazlı sulandırıcılar çoğu zaman yeterli olduğu, ancak membran hasarı, oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ve DNA bütünlüğü kaybı gibi hasarlara karşı tam koruma sağlayamamaktadır. Son yıllarda literatürde birçok yeni

nesil katkı stratejisi öne çıkmış ve dikkat çekmeye başlamıştır (Kumar & ark., 2019: 385).

Kombine kriyoprotektanların kullanımı, sperma kriyoprezervasyonunda tek bileşenli koruma stratejilerinin yetersiz kaldığı noktada ortaya çıkmış bir yaklaşım olmuştur. Bu yöntem, hem hücre içine nüfuz edebilen kriyoprotektanların hem de membran stabilitesini artıran dış koruyucu bileşenlerin birlikte kullanımıyla yapılmaktadır. Gliserol, etilen glikol, dimetil sülfoksit, propilen glikol, trehaloz, kolesterol türevleri ve çeşitli antioksidanların benzer formülasyonda yer aldığı sulandırıcılar ile yapılan çalışmalarda, dondurma sonrası motilite, canlılık oranı ve akrozom bütünlüğünün belirgin şekilde arttığı bildirilmektedir (Akalin & ark., 2015: 9) (Macedo & ark., 2018: 520) (Teixeira & ark., 2021: 3) (Ahmet & ark., 2025: 2). Kombine sistemlerin temel avantajı, buz kristali oluşumu, osmotik stres ve lipid peroksidasyonu gibi birbirinden farklı hasar mekanizmalarını eş zamanlı olarak hedef alabilmektedir (Drobnis & ark., 1993: 434). Bununla birlikte, çok bileşenli formülasyonların geliştirilmesi yüksek düzeyde optimizasyon gerektirmiş, bileşenler arası etkileşimlerin doza bağlı toksisite riskini artırabildiği rapor edilmiştir. Her türdeki spermin membran yapısı, lipid profili ve metabolik toleransı farklı olduğundan, kombine kriyoprotektan içeren sulandırıcıların tür-spesifik uyarlanması zorunlu hale geldiği anlaşılmaktadır (Gautier & Aurich, 2022: 2).

Dondurma-çözdürme sırasında artan reaktif oksijen türleri üretiminden kaynaklanan oksidatif stres; membran lipid peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna ve DNA fragmentasyonuna yol açmakta, sulandırıcı içerisine ilave edilen antioksidan maddeler bu hasarları azaltabilmektedir (Borate & Meshram, 2022: 2). Güncel literatürler incelendiğinde, birçok memeli türünde dondurma sonrası motilite, membran bütünlüğü ve DNA stabilitesi üzerinde olumlu etkiler göstermiş olduğunu

bildirilmiştir. Antioksidan bileşimlerinin hangi tür için en uygun olduğu konusunda henüz kesin bir bilgiye ulaşılamamaktadır. Membran lipid kompozisyonunu stabilize eden katkılara odaklanmıştır. Membran kolesterol oranının artırılmasına dayalı kolesterol-yükli siklodekstrin uygulamaları, soğuk şok ve dondurma sürecinde zar akışkanlığını koruyabilmektedir. Membran yapısının hassas olduğu türlerde motiliteyi ve akrozom bütünlüğünü artırabilmiştir (Ahmet & ark., 2025: 2).

Nanoteknoloji tabanlı katkıların sulandırıcı formülasyonlarına eklenmesi güncel literatürlerde yer almaktadır. Metalik ya da lipid bazlı nanopartiküllerin antioksidan özelliklerinden faydalanılarak membran stabilizasyonu üzerine etkileri çalışılmıştır. Yapılan bazı çalışmalar, nanopartikül içeren sulandırıcıların kısa süreli veya uzun süreli saklanmış sperm üzerine motilite, canlılık ve membran bütünlüğünü koruduğu ortaya koymuştur (Dural & Narlıçay, 2024: 254) (Ozturk & ark., 2025: 8). Bu teknoloji yalnızca oksidatif stresi azaltmamış; aynı zamanda membranın esnekliğini artırarak genel kriyotoleransı yükselttiği bildirilmiştir (Narlıçay & Kıvrak, 2023: 143).

Bitkisel fenolik bileşikler, flavonoidler ve karotenoid türevleri de son yıllarda sulandırıcılara entegre edilen katkılar arasında yer almaktadır. Antioksidan özellikleri sayesinde bu maddeler, kriyoprezervasyon sırasında oluşan hasarı azaltmış, bazı çalışmalarda sığır spermasında dondurma sonrası akrozom bütünlüğü, motilite ve canlılık oranlarında anlamlı yüksek oranda koruma sağladığı tespit edilmiştir (Bodu & ark., 2024: 135).

Tüm bu bileşenlerin bir arada kullanıldığı kombine formülasyonlar üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Antioksidan, kolesterol, nano-taşıyıcı sistemler ve kriyoprotektanların birlikte kullanıldığı çok bileşenli sulandırıcılar geliştirilerek koruyucu etkinliklerin birbirini tamamlayan mekanizmalar üzerinden

güçlendirilmiştir. Yeni nesil yaklaşımların sınırlılıkları da bulunmuştur. Nanopartikül katkıları yüksek dozlarda toksisite gösterdiği, kolesterol eklemenin bazı türlerde membran yapısını kalınlaştırarak akrozom stabilitesini bozabildiği bildirilmiştir. Türler arası biyolojik farklılıklar, geliştirilen bir sulandırıcının başka bir türde aynı etkiyi göstermemesine neden olmuştur. Bu nedenle her yeni formülasyon için optimizasyon, standartizasyon ve kriyotolerans testleri zorunlu hale gelmektedir (Lee & ark., 2015: 129) (Narlıçay & Kıvrak, 2023: 144). Sulandırıcı çalışmalarının bundan sonraki evrede omik verilerle desteklenmesi hedeflenmektedir. Lipidomik, proteomik ve metabolomik analizler sayesinde tür veya bireye özgü sulandırıcı-kriyoprotektan kombinasyonlarının oluşturulması mümkün olabilmektedir (Hitit & ark., 2021: 14) (Bodu, Hitit & Memili, 2025: 8).

Spermanın Dondurulması ve Saklanması Kullanılan Teknikler

Spermanın dondurularak saklanması, reproduktif biyoteknolojinin en temel uygulama alanlarından biri olarak gelişmiş ve hem evcil hayvan yetiştiriciliğinde hem de insan tıbbında genetik materyalin korunmasına olanak sağlamıştır. Amaç, spermin yapısal bütünlüğünü, motilitesini ve fertilizasyon yeteneğini uzun süre muhafaza etmektir. Başlangıçta yalnızca sıvı azotta depolamaya dayanan geleneksel yöntemler kullanılmış, ancak zamanla spermin dondurma-çözdürme sırasında maruz kaldığı soğuk şok, osmotik stres, buz kristali oluşumu ve oksidatif hasar gibi biyolojik sorunlar, yeni tekniklerin geliştirilmesine gerek duymuştur. Dondurma protokolleri yalnızca sıcaklığın düşürülmesi yaklaşımını aşmış, spermin hücresel yapısını korumaya yönelik kontrollü soğutma sistemleri, yönlü dondurma uygulamaları, vitrifikasyon tabanlı teknikler, enkapsülasyon temelli yaklaşımlar, liyofilizasyon yöntemleri ve oda sıcaklığında saklama stratejileri gibi birbirinden

farklı alternatifler ortaya çıkmıştır (Matsumura, Bae & Hyon, 2010: 691) (Santiani & ark., 2017: 1) (Narlıçay & Ataman, 2022: 44).

Sıvı Azot Buharında Dondurma

Sperm kriyoprezervasyonunda en yaygın kullanılan tekniklerden biri, dondurma ortamını payetlerde hazırlayıp, payetlerin önce azot buharı fazında soğutulması ardından sıvı azot içine aktarılması temeline dayanmaktadır. Bu yöntem, uygun sulandırıcı ve kriyoprotektan ile hazırlanan spermanın kontrollü soğutma ve dondurma adımlarından geçmesiyle sağlanmaktadır. Spermli uzun süreli depolamak için -196°C’de saklanabilmektedir (Narlıçay & Ataman, 2022: 44). Özellikle tarım hayvanları ve çiftlik yönetiminde, elit damızlık spermalarının uzun vadeli saklanması ve taşınması için standart prosedür hale gelmiştir (Borate & Meshram, 2022: 2). Soğutma hızı, payet hacmi, sperm yoğunluğu, sulandırıcı bileşimi gibi parametrelerin optimal şekilde kontrol edilmemesi halinde, buz kristali oluşumu, osmotik stres ve membran hasarı gibi kriyohasar riskleri artmaktadır Coşkun & Karaca, 2016: 33). Özellikle bazı çalışmalarda, sıvı azot buharı yöntemiyle dondurulan spermde çözme sonrası DNA fragmentasyonu ve motilite kaybı bildirilmiştir (Borate & Meshram, 2022: 4) (Ozimic, Ban-Frangez & Stimpfel, 2023: 4722).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, geleneksel “yavaş dondurma” yönteminin hala yaygın kullanıldığı; ancak alternatif yöntemlerin de değerlendirildiği görülmektedir. Bu durum, payet yönteminin güvenilirliğini koruduğunu, ancak daha hassas biyolojik parametreleri korumak isteyen çalışmalar için optimize edilmiş protokollere gerek olduğunu göstermektedir (Ozimic, Ban-Frangez & Stimpfel, 2023: 4729).

Yönlü Dondurma Yöntemi (Directional Freezing)

Yönlü dondurma tekniği, sperm kriyoprezervasyonunda özellikle büyük hacimli spermaların tek seferde dondurulmasına olanak veren bir yaklaşım olarak tanımlanmaktadır. Klasik küçük hacimli payet ve yavaş/karma soğutma yöntemlerinin hacim sınırları ve dondurma sırasında heterojen buz kristali oluşumu gibi dezavantajları bulunmaktadır. Isı gradyanı ile kontrollü donma sağlayan yönlü dondurma sistemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde tipik olarak 2–10 ml hacimli tüpler ya da geniş yüzeyli kaplar kullanılmaktadır. Bu kaplar sayesinde tek ejakülat ile klasik yöntemlere göre çok daha fazla sperma dondurulabilmektedir. (Narlıçay & Ataman, 2022: 44) Isı akışının kontrollü olması, donma cephesinin homojen ilerlemesine olanak vererek, hücre içi suyun düzenli dehidrasyonu ve hücre dışı buzlanmanın kademeli oluşumu sağlanmaktadır. İntraselüler buz kristali oluşumu ve mekanik hasar riski azaltılmıştır (Bojic & ark., 2021: 2).

Çeşitli memeli türlerinde yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda yönlü dondurmanın, payet + yavaş dondurma yöntemine kıyasla dondurma çözdürme sonrası motilite, canlılık ve membran bütünlüğü açısından üstün sonuçlar verdiği rapor edilmiştir (Arav & Saragusty, 2016: 10). Yönlü dondurma yöntemi cinsiyeti belirlenmiş sperm, nesli tükenmekte olan türler ya da yaban hayvanlarının gen kaynaklarının saklanması gibi yüksek hacim ve özgün gereksinimler taşıyan uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Arav & Saragusty, 2016: 7). Bu yöntemin yaygınlaşmasını kısıtlayan bazı nedenler bulunmaktadır. Kontrollü ısı gradyanı ve dondurma aşamasının stabilitesini sağlamak için özel cihazlar gerekmektedir. Bu da teknik altyapı, maliyet ve deneyim gerekliliğini artırmaktadır (Narlıçay & Ataman, 2022: 44). Farklı türlerin sperm hücre membran yapısı, hacim/yoğunluk toleransı ve kriyoprotektan duyarlılığı farklılık gösterdiğinden, her tür için protokol

optimizasyonu yapılması zorunlu olmuştur (Puglisi & ark., 2017: 404).

Enkapsülasyon ve Mikroçevre Temelli Saklama Yaklaşımları

Enkapsülasyon tekniği, spermilerin polimerik ve biyoyumlu bir matriks içerisine alınarak kontrollü bir mikroçevrede korunmasını esas alan modern bir saklama yaklaşımıdır. Bu yöntemde sperm hücreleri, genellikle aljinat, kitosan veya jelatin temelli hidrojel sistemleri içerisine gömülmüş ve yarı geçirgen bir membran ile çevrelenmiştir. Böylece çevresel ısı değişimleri, osmotik dengesizlik ve buz kristallerinin mekanik etkileri gibi kriyohasar oluşturan stres faktörleri azaltılmıştır. Aljinat esaslı kapsüllerin sperm mikroenkapsülasyonu için yaygın şekilde tercih edilmesinin nedeni, iyonik çapraz bağlanma yoluyla kısa sürede jel matriks oluşturabilmesi ve besin, gaz ile metabolit geçişine izin verebilmesidir. Çalışmalarda, kalsiyum ve baryum iyonlarının aljinat zincirleri ile etkileşimi sonucu oluşan bu polimer duvarın, spermanın dış ortamla kontrollü bir madde alışverişi yapmasını sağladığı bildirilmiştir (Narlıçay & Ataman, 2022: 45) Bu kapsülasyon yapısı, spermanın akrozomal bütünlüğünü korurken, immün sistem kaynaklı yüzey hasarlarını ve oksidatif stres etkilerini de sınırlandırmaktadır (Perteghella & ark., 2015: 99; Gadella & Luna, 2014: 77).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, enkapsülasyonun yalnızca dondurma aşamasında değil, dondurma-çözme sürecinde sperm fonksiyonlarını koruma açısından da avantaj sağladığını gösterilmiştir. Ibrahim. (2024: 17), aljinat kapsüllerine alınmış boğa spermasında çözündürme sonrası motilite ve membran stabilitesinin klasik payet yöntemine göre daha yüksek olduğunu rapor etmiştir. Gosálvez ve ark (2021: 3) ise DNA bütünlüğü kaybının anlamlı şekilde azaldığını bildirmiştir. Yaban domuzlarında yapılan başka bir çalışmada, baryum-aljinat kapsülleriyle taşınan spermilerin

polispermi riskini azalttığı ve fertilizasyon bölgesine daha kontrollü ulaşım sağladığı ortaya konmuştur (Narlıçay & Ataman, 2022: 46).

Enkapsülasyon sistemlerinin spermayı sadece fiziksel olarak korumakla kalmadığı, aynı zamanda kademeli kriyoprotektan alımı sağlayarak toksisite riskini azalttığı da belirtilmektedir. Özellikle DMSO, gliserol veya etilen glikol gibi penetran kriyoprotektanların ani girişine bağlı oluşan membran yırtılması ve osmotik şok problemlerine karşı önemli bir avantaj sağlamaktadır. Teknolojinin son versiyonlarında elektrostatik ekstrüzyon ve koaksiyel hava akımı gibi hassas mikrodamlacık oluşturma tekniklerinin kullanılması, kapsül boyutunun ve geçirgenliğinin kontrol edilebilir hale gelmesini mümkün kılmıştır (Narlıçay & Ataman, 2022: 46). Kullanılan polimerlerin biyolojik uyumluluk farklılıkları, çözünme sürelerinin türler arasında değişmesi ve enkapsülasyon cihazlarının her laboratuvarda bulunmaması yaygın kullanımın önünde engel teşkil etmektedir. Kapsül membranının parçalanma hızının fertilizasyon zamanlamasıyla uyumlu tasarlanması, yöntemin başarısı açısından kritik görülmektedir (Taouzin et al., 2021:8).

Liyofilizasyon (Dondurarak Kurutma) Yöntemi

Liyofilizasyon, spermanın sıvı azot gereksinimi olmaksızın uzun süre saklanabilmesi amacıyla geliştirilmiş alternatif bir kriyobiyolojik yöntem olarak tanımlanmaktadır. Uygulama, dondurma, esas kurutma (süblimasyon) ve son kurutma olmak üzere üç aşamada yürütülmektedir. Bu yöntemde sperm önce çok düşük sıcaklıklara kadar dondurulmuş, ardından kontrollü basınç düşürülmesiyle hücrelerdeki suyun katı fazdan gaz fazına geçmesi sağlanmıştır. İşlemin temel amacı, hücre içi serbest suyun uzaklaştırılmasıyla buz kristali oluşumunu önlemek, böylece klasik dondurma yöntemlerinde görülen mekanik ve osmotik hasar riskini azaltmaktır. Liyofilizasyon işleminde, sperm hücresindeki suyun yaklaşık %70–90'ının hücresel yapıların hem metabolik

faaliyetlerini sürdüren hem de bozulma süreçlerine aracılık eden bir molekül olduğu ifade edilmektedir. Bu nedenle hidrasyon düzeyinin kontrollü biçimde giderilmesi, spermanın biyolojik yapısının korunması açısından kritik görülmektedir (Narlıçay & Ataman, 2022: 46).

Uygulamada önce seminal plazmanın uzaklaştırılması ya da spermanın uygun tampon çözeltileriyle hazırlanması önerilmektedir. Bu aşamada fetal sığır serumu, monosakkarit veya disakkarit şekerler, pirüvat, aminoasitler, EDTA ve antibiyotik içeren sulandırıcıların tercih edildiği bildirilmiştir. Spermanın ayrıştırılma aşaması türler arasında farklılık göstermiş; özellikle koç spermasında ayrıştırma işleminin ek bir stres faktörü oluşturduğu ve bu nedenle kapsülleme yapılmaksızın liyofilizasyona alındığı rapor edilmiştir (Narlıçay & Ataman, 2022: 46).

Dondurma aşaması, sıvı azot içerisinde -196°C 'de 20–30 saniye veya sıvı azot buharında -140°C 'de 5 dakika uygulanan hızlı soğutma protokolleriyle gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamada buz kristallerinin geniş hacimli oluşması hedeflenmekte, böylece sonraki kurutma basamağında suyun daha etkin uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Esas kurutma evresinde sıcaklık 37°C 'ye yükseltilirken basınç 0,03 mbar seviyesine düşürülerek hücredeki suyun yaklaşık %90'ı süblimasyonla uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Son kurutma aşamasında bağlı suyun uzaklaştırılmasıyla yapısal bütünlük korunmuştur. Liyofilize edilen spermiler ışık ve nemden korunmuş, vakumlu tüplerde saklanmış ve yöntemin $+25^{\circ}\text{C}$, $+4^{\circ}\text{C}$, -20°C ve -80°C gibi farklı sıcaklıklarda depolama imkanı sunduğu bildirilmiştir (Narlıçay & Ataman, 2022: 46). Böylece sıvı azot bağımlılığı ortadan kalkmış, tedarik, depolama maliyetleri ve lojistik sorunlar önemli ölçüde azalmıştır. Liyofilizasyonun yalnızca saklama kolaylığı sağlamadığını, aynı zamanda fertilizasyon yeteneğinin belirli koşullar altında korunabildiğini bildirilmiştir. Gil ve ark. (2014: 77), kurutularak

saklanan spermelerde DNA bütünlüğünün belirli oranlarda korunabildiğini rapor etmiştir. Palazzese ve ark. (2018: 399) ise liyofilize spermle yapılan ICSI uygulamalarında embriyo gelişim başarısının elde edilebildiğini belirtmiştir. Yöntemin sınırlılıklarının başında ise plazma membranı bütünlüğü ve post-rehidrasyon motilitesinde kayıplar yer almıştır. Bu nedenle, liyofilize spermin doğrudan yapay döllemede değil, daha çok ICSI destekli fertilizasyon proseslerinde kullanılabileceği bildirilmektedir.

Spermanın Vitrifikasyonu ve Mikrovölüm Tabanlı Yaklaşımlar

Vitrifikasyon, spermanın buz kristali oluşumuna fırsat vermeden cam benzeri bir yapı kazanacak şekilde ani soğutulması esasına dayanan ileri bir kriyobiyolojik yaklaşımdır. Klasik yavaş dondurma protokolünde hücre içi ve dışı buz kristalleri, zar yapısında geri dönüşü olmayan fiziksel tahribatlara neden olabilmekteyken; vitrifikasyonda yüksek soğutma hızları ve kriyoprotektan kombinasyonları sayesinde bu risk büyük ölçüde ortadan kaldırılmaktadır. Dondurma-çözdürme sürecinde spermin membran stabilitesi, DNA bütünlüğü ve mitokondri fonksiyonunun korunma ihtimali artırmaktadır (Aizpurua & ark., 2017: 2008).

Vitrifikasyon tekniklerinin gelişimini tetikleyen en önemli faktörlerden biri, mikrovölüm esaslı dondurma sistemlerinin ortaya çıkmasıdır. Geleneksel payet hacimlerinin aksine, vitrifikasyonda sperm örneği 0.5–20 µL arasında değişen çok küçük hacimlerde işleme alınmakta, bu sayede ısı transferi hızlanmakta ve camlaşma daha etkin gerçekleşebilmektedir (Aizpurua & ark., 2017: 2008).

Vitrifikasyon işleminde kriyoprotektan kullanımı iki farklı yaklaşımla ele alınmıştır:

- **Penetran ajanların düşük konsantrasyonda kullanıldığı protokoller** (gliserol, etilen glikol, DMSO, propilen glikol vb.)

- **Kriyojenik toksisiteyi azaltmayı hedefleyen penetran içermeyen veya minimal penetran içeren sistemler:** Penetran maddelerin osmotik baskısı ve toksik etkilerini azaltmak için sakkaroz, trehaloz ve aminoasit türevleri gibi non-penetran maddeler sıklıkla tercih edilmiştir. Bu strateji spermin çözme sonrası motilite ve akrozom bütünlüğünü koruduğu saptanmıştır.

Son yıllarda geliştirilen mikrodamlacık vitrifikasyon platformları, spermin yüzey alanını keskin biçimde artırarak soğutma hızının 20.000-40.000°C/dk seviyelerine ulaşmasını mümkün kılmaktadır. Boğa ve koç spermasında bu yöntemin kullanılması sonucunda embriyo gelişim oranlarını arttırdığı rapor edilmiştir (Tajimi & ark., 2018: 1195). Benzer şekilde insan spermasında yapılan çalışmalarda vitrifiye edilen hücrelerin DNA bütünlüğünü klasik dondurma yöntemine göre daha iyi koruyabildiği bildirilmiştir (Aizpurua & ark., 2017: 2013).

Mikrovolüm tabanlı yaklaşımların dikkat çeken bir diğer uygulaması, hücre seçici vitrifikasyon platformlarıdır. Bu sistemlerde yalnızca morfolojik ve fonksiyonel olarak kaliteli spermeler vitrifiye edilmekte, böylece işlem sonrası örneğin genetik değer kaybı azaltılmaktadır. Yaban hayatı koruma programlarında genetik materyalin kaybolma riskini düşürmesi nedeniyle bu yöntem, nesli tehlike altındaki türlerin sperma bankacılığında stratejik bir rol üstlenmiştir (Aizpurua & ark., 2017: 2013) (Tajimi & ark., 2018: 1195).

Sperma Seçimi ve İşlenmesinde İleri Teknolojiler

Geleneksel sperma değerlendirme yöntemleri; motilite, morfoloji, canlılık ve konsantrasyon gibi temel parametrelerin mikroskopik incelemelere dayandığı manuel analiz yaklaşımları olarak bildirilmektedir (Narlıçay & Uslu, 2022: 113). Değerlendirmeyi yapan kişinin deneyimine bağımlı olması,

objektiflikten uzak olması ve spermelerin fonksiyonel farklılıklarını tespit etmekte yetersiz kalması nedeniyle günümüz reproduktif biyoteknoloji gereksinimlerini karşılamada sınırlı kalmaktadır. Sperm hücresinin yalnızca sayısal değil, biyokimyasal, moleküler ve fonksiyonel niteliklerini ortaya koyacak ileri teknoloji tabanlı analiz ve ayırma sistemlerinin geliştirilmesine zemin hazırlamıştır (Cayli & ark., 2003: 464) (Zhao, Yang & Wang, 2013: 5058) (Gadella & Luna, 2014: 77).

Son yıllarda sperma seçimi, klasik değerlendirme parametrelerinin ötesine geçerek; DNA bütünlüğü, kromatin kompaksiyonu, akrozomal stabilite, mitokondriyal aktivite, ROS düzeyi gibi hücresel biyobelirteçleri esas alan çok boyutlu analizlere dönüşmüştür (Bodu, Hitit & Memili, 2025: 8). Sperm yalnızca hareket eden hücre değil, genetik ve epigenetik aktarım potansiyeline sahip bir biyolojik taşıyıcı olarak ele alınmaya başlamıştır. İn vitro fertilizasyon (IVF), intrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI), sperma bankacılığı ve nadir türlerin genetik korunması gibi uygulamalarda önemli avantajlar sunmaktadır (Comizzoli, 2018: 31). İleri teknolojik sperm seçim yöntemlerinin temel amacı, ejakülat içindeki morfolojik olarak normal fakat genetik açıdan hasarlı veya fertilizasyon kapasitesi düşük spermleri elemektir. Bu amaçla geliştirilen sistemler üç ana strateji altında sınıflandırılabilir:

Hücre Dinamiğine ve Hareket Analizine Dayalı Seçim Teknolojileri: Bilgisayar destekli sperm analiz sistemi (CASA), hareket paternlerini objektif olarak değerlendirmekte ve sperm popülasyonundaki heterojenliği milisaniye ölçeğinde ölçebilmektedir. Bu teknoloji; **VCL, VSL, VAP, STR, BCF, ALH** gibi kinetik parametrelerle yalnızca toplam motiliteyi değil, fertilizasyon kapasitesi ile ilişkili spesifik hücre davranışlarını ortaya koymaktadır (Amann & Waberski, 2014: 9).

Fiziksel Özelliklere Dayalı Ayırma Platformları:

Mikroakışkan çipler, hücresel motilite kapasitesi, yüzey yükü özellikleri ve akış dinamikleri temelinde spermelerin yönlendirilmesini sağlayan biyomühendislik tabanlı platformlar olarak söylenebilmektedir (Knowlton, Sadasivam & Tasoglu, 2015: 222). Geleneksel “Swim-up” ve “Percoll gradient” yöntemlerine kıyasla yüksek DNA bütünlüğüne sahip spermeleri seçmede daha üstün bir performans sergilemektedir (Åkerlöf & ark., 1987: 664). Bu cihazlar, özellikle ICSI ve düşük sperm yoğunluğuna sahip ejakülatlarda klinik başarıyı artırma potansiyeli taşımaktadır.

Moleküler ve Fonksiyonel Biyobelirteçlere Dayalı

Teknolojiler: Flow sitometri, Raman spektroskopisi, konfokal mikroskopi, qPCR ve immüno Floresan temelli işaretleme sistemleri ile hücre yüzey proteinleri, ROS düzeyi, membran bütünlüğü, akrozom durumu ve kromatin yapısı değerlendirilebilmektedir. Sperm seçiminde fonksiyonel ve genetik kalite kontrolü sağlaması açısından kritik öneme sahip olduğu anlaşılmaktadır (Gillan, Evans & Maxwell, 2005: 447) (Zoladek & ark., 2010: 3211).

Bilgisayar Destekli Sperma Analizi (CASA)

CASA, spermanın hareket özelliklerini sayısal olarak değerlendiren, subjektif mikroskobik incelemelerin yerini alan objektif ve tekrarlanabilir bir analiz sistemi olarak önümüze çıkmaktadır. Subjektif değerlendirme yöntemlerinde motilite ve morfoloji parametreleri, gözlemcinin deneyimine bağlı olarak değişen sonuçlar verebilmektedir. Bu durum laboratuvarlar arası farklılıkları artırmış ve klinik uygulamalarda standartizasyonu güçleştirmiştir. CASA sistemleri ise yüksek çözünürlüklü kameralar, yazılım tabanlı veri işleme algoritmaları ve otomatik hücre tanıma bileşenleri sayesinde, spermanın bireysel ve toplu hareket dinamiklerini milisaniyeler düzeyinde kaydederek analiz edebilmektedir. CASA ile yalnızca toplam motilite değil,

fertilizasyon kapasitesiyle doğrudan ilişkili olan kapsamlı kinetik parametre setleri değerlendirilmektedir. Bu kapsamda ölçülen temel değişkenler şunlardır:

- **VCL:** Spermin izlediği gerçek eğrisel yol boyunca hızını ifade eder.
- **VSL:** Başlangıç ve bitiş noktası arasındaki doğrusal hızdır.
- **VAP:** Sperm hücresinin referans yol üzerindeki ortalama hızıdır.
- **STR:** VSL/VAP oranıdır ve hareket doğruluğunu gösterir.
- **BCF:** Sperm başının saniyedeki yalpalama sayısıdır.
- **ALH:** Baş salınım genliğini ifade eder ve hiperaktivasyon göstergesi olarak önemlidir.

Bu parametrelerin birlikte değerlendirilmesi, sperm hücresinin yalnızca canlı olup olmadığını değil; hedefe yönelme kabiliyetini, enerji metabolizmasını, zona pellucida ile etkileşime hazır olup olmadığını ve hiperaktivasyon potansiyelini ortaya koymaktadır. Bu nedenle CASA, özellikle IVF ve ICSI uygulamalarında embriyo gelişim başarısını tahmin etmede güçlü bir biyobelirteç haline gelmiştir (Amann & Waberski, 2014: 9).

Son yıllarda CASA sistemleri, klasik 2-boyutlu görüntülemekten 3D hareket analizine ve yapay zeka tabanlı veri sınıflandırmasına doğru evrilmektedir. Bu gelişme sayesinde sperm popülasyonundaki heterojenlik çok daha hassas bir şekilde ölçülebilmektedir. Yüksek ROS seviyesine sahip, DNA fragmentasyonu yüksek veya mitokondriyal fonksiyonu düşük spermilerin ayırt edilebilmesi mümkün kılmaktadır. Bazı çalışmalarda CASA sonuçlarının, gebelik oranlarının önceden tahmin edilmesinde geleneksel motilite analizlerine göre daha avantajlı olduğu rapor edilmiştir. CASA'nın en önemli sınırlılığı, laboratuvar koşulları ve

çekim parametrelerinin standartlaştırılmasını gerektirmesidir. Optik sistemdeki küçük farklılıklar, kayıt süresi, sıcaklık kontrolü, örnek derişimi ve analiz yazılımlarındaki algoritmik değişkenlik, sonuçları etkileyebilmektedir. Bu nedenle CASA verilerinin karşılaştırılabilir olması için cihaz kalibrasyonu, analiz protokolleri ve veri yorumlama kriterlerinin uluslararası düzeyde standartlaştırılması zorunlu görölmektedir. CASA, sperm analizi alanında subjektif değerlendirme dönemini kapatan, objektif biyometrik veri üretimini mümkün kılan ve reprodüktif biyoteknolojinin tüm klinik ve deneysel uygulamalarında vazgeçilmez hale geldiği anlaşılmaktadır. Sperm seçim stratejilerinin gelişmesiyle CASA'nın, geleceğin sperm kalite yönetim sistemlerinin ana bileşenlerinden biri olmaya devam edeceği öngörülmektedir (Raimundo & Cabrita, 2021: 445).

Flow Sitometri ve DNA Bütünlüğü Tabanlı Sperma Seçimi

Flow sitometri, tek tek hücrelerin ışık saçılım özellikleri ve floresan işaretleyicileri üzerinden hızlı, objektif ve çok parametrelili değerlendirilmesini sağlayan ileri bir hücresel analiz teknolojisidir. Spermanın yalnızca morfolojik yapısını değil; DNA bütünlüğü, kromatin paketlenmesi, membran yapısı, mitokondriyal aktivite, apoptoz göstergeleri ve akrozom durumu gibi fonksiyonel özellikleri aynı anda analiz edebilmesi nedeniyle, geleneksel sperma değerlendirme yöntemlerinden önemli ölçüde ayrılmaktadır (Gillan, Evans & Maxwell, 2005: 447).

Sperm hücreleri, DNA hasarını veya fonksiyonel bozuklukları belirleyen spesifik floresan boyalarla işaretlenmekte ve saniyede binlerce hücre analiz edilebilmektedir. Dondurma-çözme işlemlerinin veya oksidatif stres gibi çevresel faktörlerin spermin genetik yapısında oluşturabileceği hasarı ortaya koymak için yaygın biçimde uygulanmaktadır. Çeşitli çalışmalar, yüksek DNA fragmentasyonuna sahip spermelerin fertilizasyon sonrası embriyo gelişimini olumsuz etkileyebildiğini ve gebelik kayıplarıyla

ilişkilendirilebildiğini göstermiştir (Gillan, Evans & Maxwell, 2005: 452). Bu nedenle DNA bütünlüğü, günümüzde sperm kalitesinin yalnızca fizyolojik değil, genetik düzeyde de belirleyici bir kriteri haline gelmiştir.

Flow sitometrinin sperm seçimindeki en önemli yeniliklerinden biri, yalnızca analiz değil, sperm seçimi de yapabilmektedir. Bu teknoloji sayesinde hareketli, membran bütünlüğü yüksek ve DNA hasarı bulunmayan spermler seçilerek IVF veya ICSI uygulamalarında kullanılabilir (Johnson & Welch, 1999: 1335).

Mikroakışkan Çip Teknolojileri

Mikroakışkan çip teknolojileri, spermlerin seçim ve işleme süreçlerinde biyomühendisliğe dayalı yenilikçi bir yaklaşım sunan, sperm hücrelerini doğal üreme yollarına benzer mikrokanaallarda ayırmayı amaçlayan ileri düzey sistemlerdir. Geleneksel yöntemlerde spermler santrifüj gibi fiziksel işlemlere maruz kaldığından, hücre zarında yapısal bozulma, oksidatif stres artışı ve DNA bütünlüğünde kayıplar meydana gelebilmektedir. Mikroakışkan çipler ise spermi yerçekimi, akış direnci ve hidrodinamik akışkan prensipleri temelinde ayırdığı için, sperm hücreleri herhangi bir mekanik strese maruz kalmadan seçilebilmektedir (Knowlton, Sadasivam & Tasoglu, 2015: 222).

Mikroakışkan çiplerin en dikkat çekici avantajı, laboratuvar ortamında doğal seleksiyon mantığını taklit edebilmesidir. Uterusta karşılaşılan “biyolojik bariyer seçimi”, bu cihazlarda fiziksel akış koşullarına uyarlanmış ve sperm hücreleri bu engelleri aşabilme yeteneklerine göre ayrılmıştır. Bu durum, özellikle ICSI ve IVF protokollerinde kullanılan spermlerin biyolojik kalitesini artırarak embriyo gelişim oranlarında iyileşmeler sağlandığı farklı çalışmalar tarafından rapor edilmiştir (Knowlton, Sadasivam & Tasoglu, 2015: 221).

Raman Spektroskopisi ve Işıık Tabanlı Moleküler Tanımlama

Raman spektroskopisi, lazer ışığı ile hücre bileşenlerinin moleküler titreşimlerini analiz eden, etiketleme gerektirmeyen ve sperm hücresinin biyokimyasal yapısını doğrudan değerlendirebilen ileri düzey bir optik tanı teknolojisi olarak söylenmektedir. Bu yöntem, spermin yapısal bütünlüğünü bozmadan, DNA, protein, lipid ve karbonhidrat içeriklerini hücre seviyesinde tanımlayabildiğı için klasik mikroskobik incelemelerin ötesinde çok boyutlu bir kalite değerlendirme olanağı sunmaktadır. Raman spektroskopisinin temel avantajı, sperm hücrelerinin boya, floresan ajan veya işaretleyici kimyasallara ihtiyaç duyulmadan analiz edilebilmektedir. DNA kompaksiyonu, protamin düzeyi, membran lipid kompozisyonu ve oksidatif stres göstergeleri gibi kritik biyokimyasal parametreler, Raman sinyalindeki spesifik tepe noktaları üzerinden doğrudan ölçülebilmektedir. Bu sayede sperm hücresinin yalnızca morfolojik değil, moleküler ve fonksiyonel kalitesi de değerlendirilebilmektedir. Raman tabanlı analizlerin sperm seçiminde kullanılmasının öncelikli hedefi, fertilizasyon başarısını etkileyen gizli moleküler defektleri tespit edilebilmektir. Klasik değerlendirme parametrelerinde normal görünen ancak yüksek DNA fragmentasyonu, düşük protaminizasyon veya oksidatif stres hasarı taşıyan sperm, Raman spektrumlarındaki karakteristik değişiklikler sayesinde ayırt edilebilmektedir. Bu teknoloji, özellikle ICSI uygulamalarında kaliteli sperm hücresinin seçimini daha objektif hale getirmektedir. Raman spektroskopisi yalnızca moleküler tanımlama amacıyla kullanılmakla kalmamış, vitrifikasyon, soğuk şok, kriyoprotektan toksisitesi ve oksidatif stres gibi işlem basamaklarının sperm biyokimyasına etkisini izlemek için de tercih edilmiştir. Örneğin lipid doygunluk oranındaki değişim, membran geçirgenliği ve kromatin yapısındaki bozulmalar Raman spektrumundaki kaymalarla tespit edilebilmektedir. Bu durum

kriyoprezervasyon protokollerinin optimizasyonunda önemli katkılar sağlamıştır (Zoladek & ark., 2010: 3211).

Teknolojinin en dikkat çekici gelişme alanı ise Raman mikrospektroskopi ve yapay zeka entegrasyonudur. Makine öğrenmesi algoritmaları ile desteklenen Raman verileri, sperm sınıflandırmasını otomatik hale getirmiş ve fertilizasyon potansiyeli yüksek hücrelerin milisaniyeler içinde belirlenmesini mümkün kılmıştır. Bu yapay zeka destekli platformların, gelecekte klasik sperm seçim yöntemlerinin yerini alma potansiyeline sahip olduğu değerlendirilmektedir. Raman spektroskopisi sperm seçimi ve işlenmesinde hücresel biyokimyanın doğrudan ve hasarsız analizi ile modern reproduktif biyoteknolojinin en yenilikçi tanı araçlarından biri haline gelmiş, özellikle moleküler düzeyde kalite kontrol ihtiyacının arttığı yardımcı üreme teknikleri uygulamalarında büyük gelecek vaat eden bir teknoloji olarak konumlanmıştır (Sui & ark., 2025: 4).

Manyetik Hücre Belirleme (MACS) ve Apoptozis Temelli Seçim

MACS, spermadaki apoptotik veya apoptosis eğilimli spermleri seçilime yönelik geliştirilmiş ayırıcı bir biyoteknolojik yaklaşım olarak söylenmektedir. Morfolojik değerlendirmelerle tespit edilemeyen ancak fertilizasyon başarısını olumsuz etkileyen erken evre hücre ölüm sinyallerini belirlemeyi amaçlamaktadır. Sperm membranında apoptozis sırasında dışa dönen fosfatidilserin molekülünün işaretlenmesiyle yapılabilmektedir. Bu molekül, doğal olarak fosfatidilserine yüksek afinite gösteren Annexin-V proteinine bağlanır ve Annexin-V manyetik mikropartiküllerle etiketlendiğinde, apoptotik spermler manyetik alanda tutulurken sağlıklı spermler serbest bırakılır (Troya & Zorrilla, 2015: 67).

Bu işlem sonucunda ejakülat içinden mitokondriyal fonksiyonu yüksek, DNA fragmentasyonu düşük, membran bütünlüğü korunmuş spermler etkin şekilde seçilebilmektedir.

MACS ile ayrıştırılmış spermelerin hem motilite hem de fertilizasyon kapasitesinin daha yüksek olduğu çeşitli klinik ve deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Özellikle ICSI uygulamalarında, MACS sonrası kullanılan spermle elde edilen embriyolarda blastosist gelişim oranlarının arttığı ve erken embriyonik kayıpların azaldığı rapor edilmiştir (Troya & Zorrilla, 2015: 68).

MACS yönteminin önem kazandığı bir diğer alan, kriyoprezervasyon sonrası sperm kalitesinin değerlendirilmesidir. Dondurma-çözdürme işlemleri sırasında tetiklenen oksidatif stres ve membran hasarı nedeniyle apoptoz belirteçleri artmakta; bu durum fertilizasyon kapasitesini düşürmektedir. MACS ile bu hücrelerin seçilmesi, kriyoprezervasyonun olumsuz etkilerini telafi edebilmekte ve çözdürme sonrası örneklerde daha homojen ve stabil spermelerin elde edilmesini sağlayabilmektedir. Ancak işlem maliyeti, Annexin-V mikropartiküllerinin kullanımı, zaman alıcı hazırlık aşamaları ve bazı türlerde membran fosfolipid kompozisyonuna bağlı farklılıklar, yöntemin yaygın rutin uygulamaya geçişini kısıtlamaktadır. Ayrıca MACS'ın fiziksel bir seçim yöntemi olması, sperm DNA'sındaki tüm moleküler hasar tiplerini ortadan kaldırmadığı anlamına gelmediği de bildirilmektedir. Genellikle DNA bütünlüğü analizi, oksidatif stres ölçümleri veya hareket paternine dayalı seçim yöntemleriyle kombine edilmesi önerilmektedir (de Vantéry Arrighi & ark., 2009: 9).

Yapay Zeka Destekli Sperma Sınıflandırma Sistemleri

Yapay zeka tabanlı sperm sınıflandırma sistemleri, spermin sadece hareket ve morfolojik yapısını değil, aynı zamanda fonksiyonel ve moleküler özelliklerini de çok boyutlu olarak değerlendirebilen modern biyoinformatik yaklaşımlar olarak tanımlanmaktadır. Derin öğrenme ve görüntü işleme algoritmaları, sperm hücrelerinin hareket tiplerini, hiperaktivasyon davranışlarını

ve baş-kuyruk koordinasyonunu milisaniyeler içinde analiz edebilmekte, böylece fertilizasyon potansiyeli yüksek hücrelerin nesnel ve hızlı şekilde seçilmesine olanak tanımaktadır. Bu teknolojiler, laboratuvarlar arası farklılıkları azaltma ve insan gözlemine bağlı hataları ortadan kaldırma potansiyeli taşıdığı için, klasik değerlendirme yöntemlerine göre önemli bir avantaj sağlamaktadır (Cui, 2025).

Bununla birlikte yapay zeka sistemleri henüz öğrenme ve doğrulama aşamasındadır. Mevcut algoritmalar, eğitildikleri veri setleri ile sınırlı olduğundan biyolojik varyasyonları her zaman isabetli yorumlayamamaktadır. Ancak çalışmalar her geçen yıl yoğunlaşmakta, veri havuzları genişlemekte ve modellerin kendi kendine öğrenme kapasitesi artmaktadır. Bu nedenle yapay zekanın bugün insan uzmanlığını bütünüyle geçemese bile, yakın gelecekte en doğru sperm analizini yapan, hata payı en düşük değerlendirme platformuna dönüşme ihtimali oldukça yüksektir. Bir başka ifadeyle, yapay zeka şu an yolun başındadır, ancak gittiği yön bellidir ve bu yön, spermin değerlendirilmesinde standart referans noktası olma kapasitesine doğru ilerlemektedir.

Kaynakça

Ahmet, E., Ramazan, A., Selin, Y., İzem, S. A., Nur, E., Kamber, D., ... & Kemal, A. (2025). The Effect of Cholesterol-Loaded Cyclodextrin and Resveratrol Compounds on Post-Thawing Quality of Ram Semen. *Veterinary Medicine and Science*, 11(1), e70172. Doi: 10.1002/vms3.70172

Aizpurua, J., Medrano, L., Enciso, M., Sarasa, J., Romero, A., Fernández, M. A., & Gómez-Torres, M. J. (2017). New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. *Human Reproduction*, 32(10), 2007-2015. Doi: 10.1093/humrep/dex281

Akalın, P. P., Başpınar, N., Çoyan, K., Bucak, M. N., Ataman, M. B., Ömür, A. D., ... & Acibaeva, B. (2015). Metiyonin ve trehaloz içeren sulandırıcıların koç spermasının dondurma-çözdürme sonrası sperm akrozom bütünlüğü ve biyokimyasal parametreleri üzerine etkileri. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 3(1), 7-15.

Åkerlöf, E. V. A., Fredricson, B., Gustafsson, O., Lundin, A., Lunell, N. O., Nylund, L., ... & Pousette, Å. (1987). Comparison between a swim-up and a Percoll gradient technique for the separation of human spermatozoa. *International journal of andrology*, 10(5), 663-669. Doi: 10.1111/j.1365-2605.1987.tb00367.x

Amann, R. P., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5-17. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.004

Arav, A. (2022). Cryopreservation by directional freezing and vitrification focusing on large tissues and organs. *Cells*, 11(7), 1072. Doi: 10.3390/cells11071072

Arav, A., & Saragusty, J. (2016). Directional freezing of sperm and associated derived technologies. *Animal reproduction science*, 169, 6-13. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.02.007

Bodu, M., Hitit, M., & Memili, E. (2025). Harnessing the value of fertility biomarkers in bull sperm for buck sperm. *Animal Reproduction Science*, 272, 107643. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2024.107643

Bodu, M., Hitit, M., Sari, A., Kirbas, M., Bulbul, B., Ataman, M. B., ... & Memili, E. (2025). Sperm cellular and nuclear dynamics associated with ram fertility. *Frontiers in Veterinary Science*, 12, 1577004. Doi: 10.3389/fvets.2025.1577004

Bodu, M., Öztürk, A. E., Kılınç, Z., Hatipoğlu, Ö., Ataman, M. B., Bucak, M. N., & Kul, M. (2024). The effect of lycopene and ascorbic acid on the post thaw Angora buck semen parameters. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 9(2), 133-142. Doi: 10.31797/vetbio.1489224

Bojic, S., Murray, A., Bentley, B. L., Spindler, R., Pawlik, P., Cordeiro, J. L., ... & De Magalhães, J. P. (2021). Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC biology*, 19(1), 56. Doi: 10.1186/s12915-021-00976-8

Borate, G. M., & Meshram, A. (2022). Cryopreservation of sperm: a review. *Cureus*, 14(11). Doi: 10.7759/cureus.31402

Castro, M., Leal, K., Pezo, F., & Contreras, M. J. (2025). Sperm Membrane: Molecular Implications and Strategies for Cryopreservation in Productive Species. *Animals*, 15(12), 1808. Doi: 10.3390/ani15121808

Cayli, S., Jakab, A., Ovari, L., Delpiano, E., Celik-Ozenci, C., Sakkas, D., ... & Huszar, G. (2003). Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for

ICSI. *Reproductive BioMedicine Online*, 7(4), 462-468. Doi: 10.1016/S1472-6483(10)61891-3

Comizzoli, P. (2018). Biobanking and fertility preservation for rare and endangered species. *Animal Reproduction (AR)*, 14(1), 30-33. Doi: 10.21451/1984-3143-AR889

Coşkun, N., & Karaca, F. (2016). Dondurmanın (Kriyopreservasyon) Sperma Kalitesi ve Fertilité Üzerine Etkileri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 56(1), 32-39.

Cui, J. (2025). Exploration of the Clinical Application of Multimodal Artificial Intelligence in Sperm Screening: Identifying Opportunities and Addressing Challenges. Doi: 10.20944/preprints202503.1877.v1

de Vanterý Arrighi, C., Lucas, H., Chardonnens, D., & de Agostini, A. (2009). Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7(1), 1-12.

Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchordoguy, T. J., Overstreet, J. W., & Crowe, J. H. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*, 265(4), 432-437. Doi: 10.1002/jez.1402650413

Dural, M., & Narlıçay, S. (2024). The effect of nanoparticle addition to diluted dog semen on storage at 4°C. Doi: 10.3389/978-2-8325-5120-2

Figueroa, E., Lee-Estevez, M., Valdebenito, I., Watanabe, I., Oliveira, R. P. D. S., Romero, J., ... & Farías, J. G. (2019). Effects of cryopreservation on mitochondrial function and sperm quality in

fish. *Aquaculture*, 511, 634190. Doi:
10.1016/j.aquaculture.2019.06.004

Fleming, S. D., & Thomson, L. K. (2025). The oxidative stress of human sperm cryopreservation. *Antioxidants*, 14(4), 402. Doi: 10.3390/antiox14040402

Gadella, B. M., & Luna, C. (2014). Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology*, 81(1), 74-84. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.005

García, B. M., Fernández, L. G., Ferrusola, C. O., Rodríguez, A. M., Bolaños, J. G., Martínez, H. R., ... & Peña, F. J. (2011). Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 75(5), 811-818. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.10.021

Gautier, C., & Aurich, C. (2022). “Fine feathers make fine birds”–The mammalian sperm plasma membrane lipid composition and effects on assisted reproduction. *Animal Reproduction Science*, 246, 106884. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2021.106884

Gil, L., Olaciregui, M., Luño, V., Malo, C., González, N., & Martínez, F. (2014). Current status of freeze-drying technology to preserve domestic animals sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 72-81. Doi: 10.1111/rda.12396

Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2), 445-457. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.024

Gosálvez, J., López-Fernández, C., Fernández, J. L., & Johnston, S. (2021). Microencapsulation of human spermatozoa

increases membrane stability and DNA longevity. *Andrologia*, 53(2), e13924. Doi: 10.1111/and.13924

Hernández-Avilés, C. (2024). Stallion sperm cryopreservation: concepts in cryopreservation-induced sperm damage, processing, analysis, and utilization in assisted reproductive technologies. *Clinical Theriogenology*, 16. Doi: 10.58292/CT.v16.10832

Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmacili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive biomedicine online*, 37(3), 327-339. Doi: 10.1016/j.rbmo.2018.05.012

Hitit, M., Özbek, M., Ayaz-Guner, S., Guner, H., Oztug, M., Bodu, M., ... & Kaya, A. (2021). Proteomic fertility markers in ram sperm. *Animal Reproduction Science*, 235, 106882. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2021.106882

Ibrahim, M. A. (2024). Bull sperm cryopreservation: An overview on the current status and future perspectives. *German Journal of Veterinary Research*, 4, 9-22. Doi: 10.51585/gjvr.2024.1.0071

Johnson, L. A., & Welch, G. R. (1999). Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology*, 52(8), 1323-1341. Doi: 10.1016/S0093-691X(99)00220-4

Khan, I. M., Cao, Z., Liu, H., Khan, A., Rahman, S. U., Khan, M. Z., ... & Zhang, Y. (2021). Impact of cryopreservation on spermatozoa freeze-thawed traits and relevance OMICS to assess sperm cryo-tolerance in farm animals. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 609180. Doi: 10.3389/fvets.2021.609180

Knowlton, S. M., Sadasivam, M., & Tasoglu, S. (2015). Microfluidics for sperm research. *Trends in biotechnology*, 33(4), 221-229.

Kowalczyk, A. (2022). The role of the natural antioxidant mechanism in sperm cells. *Reproductive Sciences*, 29(5), 1387-1394. Doi: 10.1007/s43032-021-00795-w

Kumar, A., Andonissamy, J., Selokar, N. L., Thakur, N. S., KK, K., Aderao, G. N., ... & Rakshit, S. (2025). On the Evolution and Applications of Nanoparticles in Livestock Reproductive Biotechnology: A Comprehensive Review. *BioNanoScience*, 15(3), 385. Doi: 10.1007/s12668-025-02001-6

Kumar, A., Prasad, J. K., Srivastava, N., & Ghosh, S. K. (2019). Strategies to minimize various stress-related freeze–thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Biopreservation and biobanking*, 17(6), 603-612. Doi: 10.1089/bio.2019.0037

Lee, Y. S., Lee, S., Lee, S. H., Yang, B. K., & Park, C. K. (2015). Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on sperm viability and acrosome reaction in boar semen cryopreservation. *Animal reproduction science*, 159, 124-130. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.06.006

Macedo, S., Bliebernicht, M., Carnevalheira, J., Costa, A., Ribeiro, F., & Rocha, A. (2018). Effects of two freezing methods and two cryopreservation media on post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(2), 519-524. Doi: 10.1111/rda.13140

Matsumura, K., Bae, J. Y., & Hyon, S. H. (2010). Polyampholytes as cryoprotective agents for mammalian cell cryopreservation. *Cell transplantation*, 19(6-7), 691-699. Doi: 10.3727/096368910X50878

Moore, A. I., Squires, E. L., Bruemmer, J. E., & Graham, J. K. (2006). Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 26(5), 215-218. Doi: 10.1016/j.jevs.2006.03.003

Najafi, A., Kia, H. D., Mehdipour, M., Hamishehkar, H., & Álvarez-Rodríguez, M. (2020). Effect of quercetin loaded liposomes or nanostructured lipid carrier (NLC) on post-thawed sperm quality and fertility of rooster sperm. *Theriogenology*, 152, 122-128. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.04.033

Narlıçay, S., & Ataman, M. B. (2022). Spermanın Uzun Süreli Saklanması Kullanılan Güncel Yöntemler. *Turkish Veterinary Journal*, 3(2), 41-50. Doi: 10.51755/turkvetj.1203288

Narlıçay, S., & Kıvrak, M. B. (2023). Nanotechnology in the Treatment of Infertility. *Nanotechnol Reprod*, 139. Doi: 10.58830/ozgur.pub203

Narlıçay, S., & Uslu, B. A. (2022). Kangal Akkaraman Koçu Spermalarının Seminal Plazmasına Farklı Isı Uygulamalarının Kısa Süreli Saklanması Etkilerinin Araştırılması. *Institute of Health Sciences Journal*, 7(2), 112-117. Doi: 10.51754/cusbed.1115552

Ozimic, S., Ban-Frangez, H., & Stimpfel, M. (2023). Sperm cryopreservation today: approaches, efficiency, and pitfalls. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(6), 4716-4734. Doi: 10.3390/cimb45060300

Ozturk, A. E., Dadi, S., Bodu, M., Korkmaz, O., Atay, Y. E., Sariozkan, S., ... & Ocsoy, I. (2025). Evaluation of AFP III-Conjugated Fe₃O₄ Nanoparticles on Bull Sperm Cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 60(10), e70132. Doi: 10.1111/rda.70132

Öztürk, A. E., Bucak, M. N., Bodu, M., Başpınar, N., Çelik, İ., Shu, Z., ... & Gao, D. (2019). Cryobiology and cryopreservation

of sperm. In *Cryopreservation-Current Advances and Evaluations* (p. 75116). London, UK: IntechOpen.

Palazzese, L., Gosalvez, J., Anzalone, D. A., Loi, P., & Saragusty, J. (2018). DNA fragmentation in epididymal freeze-dried ram spermatozoa impairs embryo development. *Journal of reproduction and development*, 64(5), 393-400. Doi: 10.1262/jrd.2018-033

Pegg, D. E. (2005). The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. *Human Fertility*, 8(4), 231-239. Doi: 10.1080/14647270500054803

Perteghella, S., Vigani, B., Crivelli, B., Spinaci, M., Galeati, G., Bucci, D., ... & Chlapanidas, T. (2015). Sperm encapsulation from 1985 to date: technology evolution and new challenges in swine reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 98-102. Doi: 10.1111/rda.12538

Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172), 666-666.

Puglisi, R., Bornaghi, V., Severgnini, A., Vanni, R., Montedoro, M., & Galli, A. (2017). Evaluation of two prototype directional freezing methods and a 2ml flattened straw for cryopreservation of boar semen. *Animal Science Papers & Reports*, 35(4).

Raimundo, J. M., & Cabrita, P. (2021). Artificial intelligence at assisted reproductive technology. *Procedia Computer Science*, 181, 442-447. Doi: 10.1016/j.procs.2021.01.189

Rajamanickam, G. D., Kastelic, J. P., & Thundathil, J. C. (2017). Na/K-ATPase regulates bovine sperm capacitation through raft-and non-raft-mediated signaling mechanisms. *Molecular*

reproduction and development, 84(11), 1168-1182. Doi: 10.1002/mrd.22879

Rodríguez-Martínez, H. (2013). Sperm biotechnologies in domestic species: state of the art. *Animal Reproduction (AR)*, 10(3), 268-276.

Santiani, A., Evangelista-Vargas, S., Vargas, S., Gallo, S., Ruiz, L., Orozco, V., & Rosemberg, M. (2017). Cryopreservation of Peruvian Paso horse spermatozoa: dimethylacetamide preserved an optimal sperm function compared to dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerol. *Andrologia*, 49(6), e12672. Doi: 10.1111/and.12672

Sicherle, C. C., Souza, F. F. D., Freitas-Dell'Aqua, C. D. P., Mothé, G. B., Padovani, C. R., Papa, F. O., & Lopes, M. D. (2020). Effects of the cryopreservation process on dog sperm integrity. *Animal reproduction*, 17(1), e20190081. Doi: 10.21451/1984-3143-AR2019-0081

Sui, M., Si, L., Chen, Z., Lu, Y., & Li, H. (2025). Non-invasive applications of Raman spectroscopy in assisted reproduction. *Frontiers in Endocrinology*, 16, 1577702. Doi: 10.3389/fendo.2025.1577702

Tajimi, H., Yamazaki, T., Oike, S., Yoshida, T., Okada, K., Kuwayama, M., & Ushijima, H. (2018). Vitriification for bovine embryos with low-quality grade. *Animal Science Journal*, 89(8), 1194-1200. Doi: 10.1111/asj.13024

Tamburrino, L., Traini, G., Marcellini, A., Vignozzi, L., Baldi, E., & Marchiani, S. (2023). Cryopreservation of human spermatozoa: Functional, molecular and clinical aspects. *International journal of molecular sciences*, 24(5), 4656. Doi: 10.3390/ijms24054656

Taouzinet, L., Fatmi, S., Lahiani-Skiba, M., Skiba, M., & Iguer-Ouada, M. (2021). Encapsulation nanotechnology in sperm cryopreservation: Systems preparation methods and antioxidants enhanced delivery. *CryoLetters*, 42(1), 1-12.

Teixeira, D. O., Oliveira, E. S., Fernandes, J. S., Palomino, G. J. Q., Tabosa, B. E. A., Barbosa, H. T. S., ... & Silva, L. D. M. (2021). Histological evaluation of testicles from prepubertal dogs submitted to vitrification with different cryoprotectant associations. *Research, Society and Development*, 10(16), e258101. Doi: 10.33448/rsd-v10i16.23864

Troya, J., & Zorrilla, I. (2015). Annexin V-MACS in infertile couples as method for separation of sperm without DNA fragmentation. *JBRA Assisted Reproduction*, 19(2), 66-69. Doi: 10.5935/1518-0557.20150015

Upadhyay, V. R., Ramesh, V., Dewry, R. K., Kumar, G., Raval, K., & Patoliya, P. (2021). Implications of cryopreservation on structural and functional attributes of bovine spermatozoa: An overview. *Andrologia*, 53(8), e14154. Doi: 10.1111/and.14154

Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60, 481-492. Doi: 10.1016/S0378-4320(00)00099-3

Zhao, X., Yang, N., & Wang, T. (2013). Comparative proteomic analysis of generative and sperm cells reveals molecular characteristics associated with sperm development and function specialization. *Journal of Proteome Research*, 12(11), 5058-5071.

Zoladek, A. B., Johal, R. K., Garcia-Nieto, S., Pascut, F., Shakesheff, K. M., Ghaemmaghami, A. M., & Notingher, I. (2010). Label-free molecular imaging of immunological synapses between dendritic and T cells by Raman micro-

spectroscopy. *Analyst*, 135(12),
10.1039/c0an00508h

3205-3212.

Doi:

SPERM VE EMBRİYODA CİNSİYET TAYİNİ

MESUT ÇEVİK¹

BURCU ESİN²

CUMALİ KAYA³

MERVE DENİZ TANRIKULU⁴

Giriş

Nüfus artışıyla birlikte, hayvansal gıda ürünlerinin bulunabilirliğinin de aynı oranda artırılması gerekmektedir. 2050 yılına kadar dünya nüfusunun yaklaşık 9,6 milyara ulaşması ve hayvansal ürünlere olan talebin de %70 oranında artması beklenmektedir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) istatistiklerine göre, dünya genelinde 26 milyardan fazla canlı hayvan (sığır, manda, at, domuz, tavuk, koyun, keçi ve ördek) bulunmaktadır. Süt, et, yumurta ve deri, insan nüfusunun temel tüketim ve değer verdiği başlıca hayvansal ürünlerdir. FAO

¹ Prof. Dr., Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Orcid: 0000-0002-0754-6116

² Dr. Araş. Gör., Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Orcid: 0000-0002-5728-1478

³ Dr. Araş. Gör., Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Orcid: 0000-0002-0666-5359

⁴ Dr. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Orcid: 000-0002-7822-2100

verilerine göre, orta gelirli ülkelerde et talebinin 2030 yılına kadar %80, 2050 yılına kadar ise %200'ün üzerinde artması beklenmektedir. Hayvancılık sektörü, çok sayıda kırsal yoksul insanın geçimine katkı sağlamakta ve hayvan yetiştiren haneler için önemli bir gelir kaynağı oluşturmaktadır. Bu nedenle, artan küresel gıda talebini karşılayabilmek için sürdürülebilir hayvancılık üretimini teşvik edecek modern biyoteknolojik yöntemlerden yararlanmak büyük önem taşımaktadır (Baran, 2016; Yata, 2022; Sharma & Sharma, 2016).

Cinsiyet manipülasyonu teknolojileri, normal üreme sürecine müdahale ederek hayvan yavrularının cinsiyetini seçici biçimde önceden belirleyebilen biyoteknolojik yöntemlerdir. Bu teknolojiler, yalnızca gıda kıtlığı sorununa çözüm üretme potansiyeline sahip olmakla kalmayıp, aynı zamanda hadım etme gibi hayvan refahıyla ilgili etik sorunların da giderilmesine katkı sağlayabilmektedir (Xie & ark., 2020). Hayvancılık sektöründe, hayvanların cinsiyetinin önceden belirlenmesi, finansal avantajı nedeniyle nesiller boyunca üreticilerin temel hedefi olmuştur. Dişiler süt ürünleri ve buzağı üretimi için vazgeçilmezken, erkekler genellikle daha iyi yem dönüşüm verimliliği ve yağsız et/yağ oranı nedeniyle et üretimi için gereklidir. Ayrıca, suni tohumlama programlarında yüksek genetik değere sahip erkeklere hala ihtiyaç duyulmaktadır (Bora, 2022).

Dünyanın gıda ihtiyacını karşılamak için en verimli hayvancılık üretimini sağlamak amacıyla, hayvan yavrularında cinsiyetin önceden belirlenmesi zorunludur. Günümüzde, daha önceleri uygulanmayan yavruların cinsiyetinin belirlenmesi veya önceden bilinmesi büyük bir talep görmektedir. Embriyo cinsiyetini önceden belirlemek için kullanılan en son teknolojiler, esas olarak X veya Y kromozomunun varlığı arasındaki temel farka dayanmaktadır (Lakshmy & ark., 2018). Embriyoların cinsiyet tahmini ile cinsiyet oranının kontrolü, yalnızca hayvancılık yönetimi, üretimi ve üreme programları açısından değil, aynı zamanda doğum öncesi aşamada

genetik bozuklukların teşhisinde de faydalı olacaktır. Embriyoların implantasyon öncesi cinsiyet tayini, embriyo transferinin verimliliğini artırmanın yanı sıra istenen cinsiyetteki embriyoların transferini de kolaylaştırır. Cinsiyeti belirlenmiş sperm, bu gereksinimi karşılayan bir tekniktir, ancak oldukça pahalı ve daha az etkilidir (Garner, 2006; Jafar & Flint, 1996; Martinez, 2013; Rodriguez- Yata, 2022; Sachan & ark., 2020; Seidel, 2003; Sharma & ark., 2017; Singh & ark., 2017).

Birçok araştırmacı, farklı kütle ve hareketlilik, yüzme düzenleri, yüzey değişiklikleri, hacimsel farklılıklar, santrifüjlü karşı akım dağılımı ve immünolojik olarak ilgili özellikler ilkelerine dayalı çeşitli teknikler kullanarak X ve Y spermatozoasını ayırmaya çalışmıştır. Ancak, bu yöntemlerin hiçbiri verimli sperm popülasyonlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ayrılmasını sağlayamamıştır ve tekrarlanabilir değildir. X ve Y kromozomları taşıyan spermatozoalar, akış sitometrik sperm ayırıcı kullanılarak DNA temelinde ayrılabilir. Son yıllarda, spermin cinsiyetinin belirlenmesi araştırmadan ticari uygulamaya, insanlar ve sığırlar için ilerlemiştir (Baran, 2016; Rath & ark., 2013). Semende cinsiyet ön seçiminin etkinliği birçok tür için gösterilmiştir ve önümüzdeki birkaç yıl içinde hayvanat bahçeleri ve akvaryum hayvanları gibi nesli tükenmekte olan türler de dahil olmak üzere çeşitli türlerde uygulamalar bekleyebiliriz (Garner & Seidel, 2008; Seidel 2003). Bugüne kadar tavşanlar, domuzlar, sığırlar, koyunlar, atlar, köpekler ve ev kedileri, manda, çiftlik geyiği ve geyikleri, şişe burunlu yunuslar, insanlar ve goril, şempanze, babun ve marmoset gibi insan olmayan primatlar dahil olmak üzere çok çeşitli türlerde milyonlarca cinsiyeti önceden belirlenmiş yavru üretmiştir. Genel olarak, çağdaş sperm ayıklama prosedürleri, %85 ila %95 doğruluk oranıyla çarpık yavru cinsiyet oranlarıyla sonuçlanmaktadır (De Graaf & ark., 2009; Espinosa-Cervantes & Cordova-Izquierdo, 2013).

Cinsiyet Gelişiminin Genetik ve Hormonal Kontrolü

Genetik yapı, iç ve dış cinsel organ yapısı ile belirlenen cinsiyeti yalnızca tek bir başlık altında incelemek yeterli değildir. Cinsiyeti belirleyen özellikler oldukça karmaşık ve çok yönlü faktörlerin rol oynadığı, kendi aralarında da etkileşim gösteren gelişim süreçleridir. Cinsel farklılaşmanın temel amacı, herhangi bir cinsiyete özgü fiziksel ya da davranışsal özelliklerin gelişimi ve organizmalarda cinsel üreme oluşmasına izin vermek için gerekli anatomi ve fizyolojik olayların bütünüdür (Wilhelm & ark., 2007). Embriyonal dönemin normal cinsiyet gelişim sürecinde 3 önemli adım gerçekleşmektedir. Bu adımlar kromozomal, gonadal ve fenotipik olarak cinsiyet gelişimi mekanizmalarıdır (Esin & Çevik, 2020).

Kromozomal (Genotipik) Olarak Cinsiyetin Tanımlanması

XX veya XY cinsiyet kromozomunun oluşumu fertilizasyon sırasında meydana gelmekte ve primer germ hücresini taşıyan hücrelerin mitoz bölünmesi ile devam etmektedir. Memelilerde fertilizasyonu gerçekleştirebilecek olan spermatozoonların yarısı tek bir X kromozomu ve diğer yarısı da bir Y kromozomu içerir. Spermatozoonların aksine ovumlar ise sadece X kromozomuna sahiptirler. X kromozomuna sahip olan spermatozoon ile fertilizasyonu gerçekleşen ovumdan gelişen canlı dişi bir hayvan olurken (XX), Y kromozomuna sahip spermatozoonla fertilize olan ovumdan gelişen canlı ise erkek (XY) cinsiyete sahip olur. Cinsiyetin kromozomlar tarafından belirlenmesi, genotipik cinsiyet belirlenmesi olarak tanımlanır ve bu tanımlamada bireyin cinsiyeti, cinsiyet kromozomları üzerindeki genler tarafından gerçekleştirilir (Esin & Çevik, 2020; Wilhelm & ark., 2007).

Gonadal Cinsiyetin Gelişimi

Erken embriyonal dönemde gonadlar farklılaşmamış olup bu dönem “İndifferent Dönem” olarak adlandırılmaktadır. Eğer cinsiyet kromozomu XX ise indifferent gonad ilerleyen dönemde ovaryumlara dönüşmekte, XY ise testisler gelişmektedir. Bu dönemde testislerin gelişimi Y kromozomunda bulunan “*SRY gen bölgesi*” tarafından kontrol edilmektedir. 1960’larda memeli kromozomunun karyotiplendirilmesiyle ilgili tekniklerin gelişimiyle birlikte, memelilerde testisin gelişiminden sorumlu kromozomun Y kromozomu olduğu saptanmıştır (Esin & Çevik, 2020; A8). Canlı genotipinde kaç tane X kromozomu olursa olsun, Y kromozomunun varlığında canlı erkek, yokluğunda ise dişi olarak gelişecektir (Wilhelm & ark., 2007). Ancak 1990 yılında “*sex reversal syndrome*” (zıt cinsiyet sendromu) adı verilen bir hastalığa sahip, genotipik ve fenotipik cinsiyetleri zıt bireylerin incelenmesi ile konu yeni bir boyut kazanmıştır. Bu hastalığa sahip bireylerin XY kromozomlu olmalarına rağmen tamamen dişi olarak geliştiklerinin gözlenmesiyle birlikte, cinsiyeti belirleyen asıl faktörün tamamıyla Y kromozomunun değil, Y kromozomu üzerinde bulunan “*hareketli bir gen parçası*” olduğu keşfedilmiştir. Testis gelişiminden sorumlu olan bu gene “*Y kromozomu üzerinde cinsiyet belirleyen bölge*” (*Sex determining region Y gene*) SRY adı verilmiştir. SRY, Y kromozomunun kısa kolu üzerinde “*pseudoautosomal region I*” (PAR1) adı verilen bölgeye çok yakın bir pozisyonda bulunmaktadır. PAR1 adı verilen bölge mayoz bölünmenin profaz I aşamasında “*crossing over*” dediğimiz gen değişimi olayının en sıklıkla gerçekleştiği bölgedir ve bazen SRY’nin de gen değişimine katılması söz konusu olur. Bu nedenle embriyo XY kromozomuna sahip olmasına rağmen SRY’yi kaybettiği için dişi olarak, XX kromozomuna sahip bir embriyo ise SRY’yi kazandığı için erkek olarak gelişebilmektedir (Choudhary & ark., 2022). SRY geni, SRY gen transkripti olan TDF’yi (Testis Determining Factor: TDF) üreterek gonadların testis yönünde farklılaşmasını indüklemekte

iken, SRY geni ve SRY gen transkriptinin olmadığı durumda bipotansiyel gonadlar ovaryum olarak gelişmektedirler (Choudhary & ark., 2022; Esin & Çevik, 2020).

Fenotipik Cinsiyet Gelişimi

Gonadların cinsiyet kromozomlarına göre ovaryum veya testislere farklılaşmasının ardından internal ve eksternal genital kanalın oluşumu başlamaktadır. Erkek genital kanalın farklılaşması ve dış genital organların gelişmesi testislerde bulunan Sertoli hücreleri tarafından üretilen Anti-Müllerian hormon (AMH) ve Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron sayesinde olmaktadır. Gonadların testis yönünde farklılaşmasıyla AMH hormon, Müller kanalının gelişimi durdurmakta ve testosteron hormonunun etkisiyle Wolf kanalının gelişimi uyarılmakta ve böylece erkek genital kanalı gelişmektedir (Choudhary & ark., 2022). Leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteron, *5 α -redüktazın* etkisiyle dihidrotestosterona dönüştürülmekte ve erkek dış genital organlarının farklılaşması başlatılarak testislerde devam eden epididimis, duktus deferens ve vezikula seminalis gibi çift halindeki erkek genital kanal sistemi kısımlarının farklılaşması sağlanmaktadır. Erkek genital kanalının gelişimi, erkeklik hormonları etkisi altında gerçekleşen aktif bir süreçken, dişi genital kanalının gelişimi, erkeklik hormonlarının yokluğunda kendiliğinden gerçekleşen pasif bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Wilhelm & ark., 2007). Gonadların ovaryum yönünde farklılaşması durumunda ortamda testosteron bulunmayacağından Wolf kanalı körelir ve AMH salgılanmayacağı için Müller kanalı gelişerek uterus ve ovidukt'u meydana getirir. Dişi embriyoda fetal ovaryumlardaki foliküler hücrelerden (primitif granüloza hücreleri) ve plasentadan östrojen ve progesteron hormonları salınmasına rağmen, bu hormonların embriyonal dönemde cinsiyet gelişimi üzerine belirleyici etkileri bulunmamaktadır. Normal cinsiyet farklılaşma sürecinin herhangi bir basamağında meydana gelen her türlü

anormallik durumunda interseksüalite ya da hermafrodizm olarak adlandırılan gonadal cinsiyet anomalileri ortaya çıkabilmektedir (Esin & Çevik, 2020; Wilhelm & ark., 2007).

Spermada Cinsiyetinin Belirlenmesi

Spermin cinsiyetini belirlemek için farklı yaklaşımlar kullanılmıştır. Hücre yüzeyi özelliklerindeki kimyasal farklılıkların kullanımı bağlamında, erkek somatik hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen Y bağlantılı histokompatibilite antijeninin (H-Y antijeni) sperm plazma membranlarındaki varlığına büyük önem verilmiştir. H-Y antijeni ifadesi memeli Y kromozomundaki bir gen tarafından kontrol edilen minör bir histokompatibilite antijenidir. H-Y antijeninin bir zamanlar TDF için bir aday olduğu öne sürülmüştü. Ancak, bunun böyle olmadığı, H-Y ekspresyonundan sorumlu genin insan Y kromozomunun uzun kolunda veya sentromerik bölgesinde yer aldığı, TDF'nin ise kısa kolun distal kısmına eşlendiği gösterilmiştir. Bu sonuca uygun olarak, H-Y antijeni temelinde ayrılan spermatozoa, akış sitometrisi ile incelendiğinde cinsiyet oranında bir değişiklik göstermemiştir. X kromozomu, Y kromozomundan %2,9 ila %4,2 daha büyüktür ve X ile Y kromozomu taşıyan spermatozoalar arasındaki yoğunluk farkı yaklaşık 0,0007 g/cm³'dir; bu da bu temelde ayırmayı teorik olarak mümkün kılmaktadır. X taşıyan sperm hücreleri, Y taşıyanlardan daha hızlı göç ettiğinden, serbest akış elektroforezi kullanan tekniklerin X ve Y taşıyan spermatozoaları ayırdığı bildirilmiştir. İki sperm hücresi popülasyonunu ayırmak için ters akım santrifüjlemenin kullanılması, tutarlı bir şekilde tekrarlanabilir olmadığı için yaygın olarak kabul görmemiştir. X ve Y kromozomlarının sağladığı fiziksel farka dayanan Percoll gradyan santrifüjleme tekniğinin bir miktar başarı sağladığı iddia edilmiştir. Yukarıdaki yöntemlerin aksine, *akış sitometrisi* ve ardından in vitro fertilizasyon ile spermatozoa cinsiyetinin belirlenmesinde cesaret

verici sonuçlar elde edildi (Espinosa-Cervantes & Cordova-Izquierdo, 2013; Jafar & Flint, 1996; Rodriguez-Martinez, 2013).

Spermatozoa X ve Y taşıyan kromozomlarının kütle, immünolojik yapı, boyut, yüzme düzeni ve sperm yüzeyindeki yükler gibi çeşitli parametrelerindeki farklılığa dayanarak spermin cinsiyetini belirlemek için çok sayıda teknik geliştirilmiştir. Sperm cinsiyetinin belirlenmesinde akış sitometri yöntemi en etkili olanıdır ve ticari olarak cinsiyetlendirilmiş semen bu yöntemle üretilmektedir (Yata, 2022). Cinsiyet tayini için tasarlanan ilk sperm cinsiyet belirleme prosedürleri, DNA problarını, albümin gradyanlarını, Percoll gradyanlarını, Sephadex jel filtrasyon yöntemini ve yüzme (swim-up) prosedürlerini içeriyordu. Ancak, bu yöntemlerin çiftlik hayvanı yavrularının cinsiyet oranını bozmadaki etkinliği ikna edici olmamıştır. Ayrıca, tüm bu yöntemler sperm hareketliliğine zarar verebilmektedir. Bu nedenlerden dolayı akış sitometrisi ve immünolojik cinsiyet belirleme günümüzde hayvancılıkta kullanılan en etkili sperm ayırma teknolojileridir (Choudhary & ark., 2016; Esmailpour & ark., 2012; Xie & ark., 2020). Y ve X taşıyan spermatozoların ayrılması, akış sitometrisi ile tespit edilen fiziksel farklılıklar veya membran özelliklerindeki kimyasal farklılıkların tespiti temelinde gerçekleştirilebilir. Teknikler üç kriteri karşılamalıdır: İşlem, (i) *Y ve X taşıyan sperm popülasyonunun oranında önemli bir değişime yol açmalı*, (ii) *in vivo veya in vitro fertilizasyonu etkilememeli* ve (iii) *daha önce belirlenmiş Y ve X taşıyan spermatozoa oranlarını yansıtan yavrular (embriyolar veya canlı yenidoğanlar) ile sonuçlanmalıdır* (Jafar & Flint, 1996; Seidel, 2003).

X ve Y Kromozomu Taşıyan Spermlerdeki Farklılıklar

Boyut ve Şekil

Önceki yıllarda yapılmış olan çalışmalarda, X taşıyan boğa spermleri ile Y taşıyan boğa spermleri arasındaki yoğunluk farkının

yalnızca 0,0007 g/cm³ olduğunu bulunmuş, dolayısıyla bu özellik de eşey spermi için bir özellik olarak kullanılmaya uygun bulunmamıştır. Yapılan bir çalışmada, X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoanın kafa hacmindeki farklılık gözlenmiş ve bu farklılık DNA içeriği ile ilişkilendirilmiştir. Boğa spermatozoası üzerinde yapılan anatomik kuvvet mikroskopik çalışması, X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoalar arasında herhangi bir fark olmadığını göstermiştir. Irklar arasında ve bireyler arasında spermatozoanın baş bölgesi arasında bir fark olmadığı da yapılan çalışmalarda ortaya koyulmuştur. İnsan çalışmalarında X kromozomu taşıyan spermelerde daha fazla uzunluk, baş çevresi, boyun ve kuyruk uzunluğu gözlemlendiği de bildirilmiştir (Sharma & Sharma, 2016; Yata, 2022).

Hareketlilik ve Yüzme Modeli

İnsan sperma örneklerinde albümin gradyanlı sperm cinsiyet belirleme yöntemi üzerine yapılan önceki çalışmalar, Y sperminin X spermatozoasından daha yüksek bir hıza sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın aksine, X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoanın hızında anlamlı bir fark olmadığını göstermiş çalışmalarda vardır (Esmailpour & ark., 2012; Lucio & ark., 2012). İnsan sperma örneklerinde X ve Y kromozomu taşıyan spermelerin farklı hareketlilikleri Percoll gradyan ayırma yöntemi kullanılarak gözlemlendi, ancak diğer çalışmalar hiçbir önemli farklılık bildirmedi. Geleneksel swim-up yöntemi, X kromozomu taşıyan spermatozoanın %85'inin insan spermasında zenginleştiğini gösterirken, diğer çalışmalar, swim-up yöntemini kullanan önemli bir sperm cinsiyet ayrımı göstermedi (Sharma & Sharma, 2016; Yata, 2022).

DNA İçeriği

İlk çalışmalarda, boğa, domuz, koç ve tavşanların X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoalarının toplam DNA içeriği, akış

sitometri yöntemi kullanılarak ölçülmüştü. Boğalar, domuzlar, koçlar ve tavşanlar için X – Y zirve farkları sırasıyla %3,9, %3,7, %4,1 ve %3,9 olarak bulundu. Bu çalışma aynı zamanda Jersey, Holstein, Hereford, Angus ve Brahman boğalarındaki X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoanın DNA içeriğinde önemli farklılıklar bulmuştur (Garner & ark., 2013). Ayrıca keseli sıçan, boğa, köpek, koç, çinçilla, insan, tavşan, deve, fil, domuz, aygır, Kanada geyiği gibi çeşitli memelilerin X ve Y kromozomu taşıyan spermlerinde % 2 – 7 aralığında önemli DNA içeriği farklılığı gözlemlenmiştir. İnsanın X ve Y kromozomu taşıyan spermleri arasındaki DNA içeriği farklılıkları yaklaşık %2,8'dir; boğalar %3,8; domuzlar %3,8; koçlar %4,2; tekeler %4,4; köpekler %3,9; geyikler %3,8; aygırlar %3,7; Afrika filleri %4,0; hamadryas babunu %4,2; şempanze %3,4; ve zürafa %4,4 (Garner, 2006; Johnson & ark., 1987; Yata, 2022).

İmmünolojik Belirteçler

İmmünolojik cinsiyet belirleme, cinsiyetle ilgili proteinlerin tanımlanması ve ayrılması yoluyla elde edilir. Bu, esas olarak, H-Y antikoru kullanılarak Y taşıyan spermin plazma membranındaki H-Y antijeninin tespit edilmesiyle yapılır. Bu nedenle, şimdiye kadar fareler, tavşanlar ve koyunlar dahil olmak üzere birçok türden sperm başarıyla ayrılmıştır. Ek olarak, bu yöntemin basitliği, hızı, doğruluğu ve makul fiyatı nedeniyle, ayrılmış X ve Y taşıyan spermin saflığını doğrulamak için kullanılabilir temel belirteçlerdendir (Yata, 2022).

Yük Potansiyeli

Her spermin, boyut, şekil, kütle, özgül ağırlık ve hücre ile süspansiyon ortamı arasındaki yoğunluk farkı gibi fiziksel kuvvetlerden etkilenen kendine özgü bir sedimantasyon hızı olacaktır. Seçim, Y taşıyan spermatozoaları anoda, X taşıyan spermatozoaları ise katoda çekecek uygun bir mikro amper akımın

uygulanmasıyla daha da artırılabilir. X taşıyan spermatozoaların yüzeyindeki elektrik yükünün, Y taşıyan spermatozoalardan farklı olma olasılığına dayanan bu yöntem, spermatozoaları iki ana sınıfa ayırmak için bir elektrik alanı kullanır. Bu teknikle ayrılan spermlerle yapılan tohumlamalar hayal kırıklığı yaratan sonuçlar vermiştir. X taşıyan spermatozoalarla zenginleştirilmiş spermatozoa kullanılarak 1185 hayvan üzerinde yapılan tohumlamalarda %50,4 dişi buzağı doğum oranı tespit etmiştir. Bu tekniğin bir diğer dezavantajı, elektroforeze tabi tutulduktan sonra spermin hareketliliğinde meydana gelen azalmadır (Sharma & Sharma, 2016; Wongtawan & ark., 2020; Yata, 2022).

Geleneksel Sperm Cinsiyeti Belirleme Yöntemleri

Gradyan Santrifüjleme Yöntemi

Percoll gradyan santrifüjlemesi (PGC), koloidal silika partikül bazlı bir gradyan santrifüjlemesidir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Percoll sayesinde yukarıdan aşağıya giderek yoğunlaşan bir katman oluşturulur. Y kromozomları X kromozomlarından daha küçük ve daha hafif olduğundan, sperm taşıyan bu iki kromozom arasında santrifüjleme sırasında farklı bir yoğunluk oluşur. Daha ağır X kromozomu taşıyan sperm, daha yoğun alt katmanlara doğru daha hızlı hareket ederken, daha hafif Y kromozomu taşıyan sperm, orta katmanlara daha hızlı göç eder. İnsan, boğa, koç ve domuzdan seçkin kalitede sperm seçimi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Esmailpour & ark., 2012; Mothe & ark., 2018; Yata, 2022).

Yukarı Yüzme Yöntemi (Swim-up)

Tipik bir yüzme yönteminde, bir tüpün içine semen örneği alt katman, medyum ise üst katman olarak yerleştirilir. Bu tüp dikey pozisyonda 37°C'de yaklaşık 45 dakika süreyle inkübe edilir. Y kromozomu taşıyan spermlerin, X kromozomu taşıyan spermlere

göre düşük kütlesi ve yüksek hızı nedeniyle yukarı doğru hareket ettiği varsayılmaktadır. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, yüzme yöntemi kullanılarak cinsiyete göre ayrılmış spermada %81 erkek yavru görülmüştür. Başka bir çalışmada ise swim-up yöntemiyle elde edilen semenlerin ayıklanmasıyla dişi %86, erkek ise %89 başarı oranıyla doğmuştur (Lucio & ark., 2012). Yapılan bir çalışmada, erkek in vitro koyun embriyolarının %81'inin, swim-up yöntemiyle ayrıştırılan sperma kullanılarak üretildiği görülmüştür (Yata, 2022). Bir çalışmada Azizeddin & ark., (2014) değiştirilmiş bir yukarı yüzdürme yöntemi önermiştir ve buna Pipet yukarı yüzdürme yöntemi adı verilmektedir. Bu yöntem, kauçuk bir tıpa üzerine yerleştirilen 30 cm uzunluğunda 5 – 10 ml'lik bir pipette sperm cinsiyetinin belirlenmesini içerir. Semen numunesi pipetin alt kısmından enjekte edilir ve 45 dakikaya kadar inkübasyon yapılır. İnkübasyondan sonra pipetin tabanı için 1 ml fraksiyon toplanır. Bu modifiye edilmiş swim-up yöntemi, Y kromozomu taşıyan boğa spermatozoasında %62 oranında zenginleşme olduğunu göstermiştir (Azizeddin & ark., 2014).

Y-Kromozomal Doku Uyumluluğu (HY) Antijeni

Erkek greftleri, dişi farelere nakledildiğinde bir erkek minör doku uyumluluk antijeni tespit edilmiş ve bu antijen Y kromozomal histo-uyumluluk (HY) antijeni olarak adlandırılmıştır. Çünkü Y kromozomu varlığı, erkek ve dişi arasındaki en büyük farktır. Çok eski bir çalışmada, Y kromozomu doku uyumluluğunun sperm cinsiyet belirlemede yardımcı olabileceğini öne sürmüştür. Daha sonraki çalışmalar, erkek doku aşılansmış dişi farelerin antiserumlarının Y kromozomu taşıyan spermatozoayı bozduğunu kanıtlamıştır. HY antijeni üzerine yapılan bir araştırma, dışideki erkek aşı naklinin sperm hücrelerine sitotoksik olan antikorlar ürettiğini doğrulamış, HY antikoru ile muamele edilen sperma örnekleriyle erkek cinsiyet oranı biraz da olsa değiştirilebilmiştir. Söz konusu çalışmada, HY antikoru ile tedavi edilen sperma

örnekleri ile farelerin suni tohumlamasında %45,4 dişi ve %53,4 erkek yavru gözlemlendiği bildirilmiştir (Fernandez & ark., 2017).

Cinsiyetin Akış Sitometrisi (Flow Cytometry) ile Belirlenmesi

Akış sitometrisine dayalı sperm cinsiyet tayini, 20 yıl önce ilk kez uygulanmaya başlanmasından bu yana ayırıştırma verimliliği de bir dizi iyileştirmeden geçmiştir. Sperm, DNA'ya özgü bir boya ile hazırlanır (Hoechst 33342, nükleik asitlerin adenin-timin bölgesine bağlanabilir). Hoechst 33342 ile boyanmış sperm bir argon lazerinin 351 ve 364 nm çizgileriyle aydınlatıldığında floresan sinyalleri yayılır. Birbirlerine 90° açıyla yerleştirilen floresan dedektörleri, X ve Y kromozomları arasındaki DNA içeriği farkına göre ayırmayı sağlamak için spermin floresan sinyallerini ölçer. 90°deki sinyal, doğru değerlendirme için hangi sperm, doğru yönlendirildiğini belirlemek için kullanılırken, 0°deki sinyal DNA içeriğini belirlemek için kullanılır (Seidel, 2003). Böylece X kromozomu taşıyan sperm daha fazla DNA bağlayıcı boyayı adsorbe edecektir. Boyanan sperm daha sonra akış sitometrisine yerleştirilir. Sperm akış odasına birer birer girer ve daha sonra her sperm ayrı ayrı değerlendirilir. Boyanan sperm bir lazer ışınına tabi tutulur; Burada X kromozomu taşıyan sperm, floresan boyanın yüksek adsorpsiyonu nedeniyle daha yoğun ışık yayar. Bilgisayar bu ışık yoğunluğunu tanır ve spermi X veya Y olarak ya da belirsiz olarak atayabilir. Sperm daha sonra sırayla aparatın damlacık yükleme yakasından düşer ve burada damlacıklara yükleri atanır (pozitif veya negatif) (Garner, 2006; Johnson & ark. 1987). Sperm sırayla bir elektromanyetik alandan geçer ve burada atanan yüklerine bağlı olarak pozitif, negatif veya yüksüz tarafa çekilirler. Cinsiyete göre ayrılmış spermin ticari uygulaması akış sitometrisi ile spermatozoa cinsiyetinin belirlenmesi, gelecekteki hayvancılık endüstrisi üzerinde büyük olasılıkla etkisi olacak değerli bir araçtır. Mevcut teknoloji, her bir spermin DNA içeriği için ayrı ayrı sorgulanmasını gerektiriyor ve böylece sığır, koyun, domuz ve

atlarda ayrılmış X veya Y spermi sayısını saatte yaklaşık 12-20 milyon spermle sınırlıyor (de Graaf & ark. 2009; Espinosa-Cervantes & Cordova-Izquierdo, 2013; Xie & ark., 2020).

Akış sitometrisi ile sperma ayırma işlemi sırasında dört faktörden kaynaklanan stres faktörleri tanımlanmıştır: i) hidrodinamik odaklama ve enjeksiyon memesinden geçiş sırasında etki eden kesme kuvvetleri; ii) floresan boya bis-benzimid (Hoechst 33342) ve hücrenin ultraviyole ışık spektrumunun belirli dalga boylarına maruz kalmasının kombinasyonu; iii) sperm DNA içeriğine karşılık gelen tekrarlanan elektriksel doping ve iv) daha sonra elektrostatik sapma alanından geçiştir (Rath & ark., 2013). Spermatozoa üzerinde şekillenen hasarın tüm nedenlerini belirlemek zor olmakla birlikte, temel olarak kriyoprezervasyon işleminden kaynaklı strese ek olarak, spermier akış sitometrisinden geçiş sırasında birçok mekanik ve kimyasal strese maruz kalır (Garner & ark., 2013). Bu stres faktörleri şunları içerir: (1) spermin gelişmekte olan embriyoya çok az miktarda taşınan DNA bağlayıcı boya Hoechst 33342'ye maruz bırakılması; (2) spermier DNA içeriği için sorgulandığında lazer ışığından gelen elektromanyetik enerjiye ve yayılan floresansa maruz bırakılması; (3) spermier sıralayıcı nozuldan yaklaşık 90 km/saat hızla çıkarken elastik olmayan kesme kuvvetleri; (4) çıkan akım damlacıklara ayrılırken spermin gerilmesi; (5) sperm toplama tüpünün hava-sıvı arayüzüyle karşılaştığında 90 km/s'den 0 km/s'ye ani yavaşlama maruziyeti ve (6) spermi yoğunlaştırmak için santrifüjleme uygulaması gibi sıralama sonrası işlemler spermatozoa için stres yaratan temel faktörlerdir (Kobayashi & ark., 2004; Seidel, 2003; Singh & ark., 2017).

Cinsiyetin İmmünolojik Olarak Belirlenmesi

İmmünolojik cinsiyet belirleme, cinsiyetle ilgili proteinlerin tanımlanması ve ayrılması yoluyla elde edilir. Bu, esas olarak, H-Y

antikoru kullanılarak Y taşıyan spermin plazma membranındaki H-Y antijeninin tespit edilmesiyle yapılır. Bu nedenle, şimdiye kadar fareler, tavşanlar ve koyunlar dahil olmak üzere birçok türden sperm başarıyla ayrılmıştır. Ek olarak, bu yöntemin basitliği, hızı, doğruluğu ve makul fiyatı nedeniyle, ayrılmış X ve Y taşıyan spermin saflığını doğrulamak için kullanılabilir (Seidel, 2003). Bunlardan ilki, immünolojik bir yaklaşımdır. Bu prosedür, temel biyolojideki ilgi çekici yeni bulgulara dayanmaktadır. Bir denemede, sığır gametleriyle IVF için immünolojik olarak ayrılmış sperm kullanımı, embriyolarda çarpık cinsiyet oranlarına yol açmıştır. Bu yaklaşım şu anda aktif olarak takip edilmemektedir. İkinci yeni yaklaşım, girişim mikroskobu ile bireysel sperm hacminin belirlenmesine dayanmaktadır (Goldberg, 1988). Bu araştırmacılar, X kromozomu taşıyan sığır sperminin hacminin Y kromozomu taşıyan spermin hacminden yaklaşık %1 daha fazla olduğunu ikna edici bir şekilde gösterdiler. Bu yaklaşımın önemli bir teorik avantajı, DNA bağlayıcı boya kullanılmamasıdır; teorik dezavantajı ise, X veya Y spermi üretme prosedürünün doğruluğunun her zaman %80'den az, hatta muhtemelen önemli ölçüde daha düşük olmasıdır (Seidel, 2003; Xie & ark., 2020).

Sperm Cinsiyetinin Belirlenmesinde Yeni Yöntemler

İmmüno-Cinsiyetlendirme

İlk çalışmalarda, Y kromozomu taşıyan spermatozoanın plazma membranında eksprese edilen HY antijeni, X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoanın ayrılması için hedeflendi. Bu strateji, spesifik HY monoklonal antikörlerin üretilmesini, flöresan-konjuge keçi antikörlerinin konjugasyonunu ve ardından bir flöresanla aktifleştirilmiş hücre ayırıcı kullanılarak ayrılmasını içerir (Goldberg, 1988). Bu bulguların aksine, HY monoklonal antikörlere anlamlı bir sperm cinsiyeti gözlenmemiştir. Bunun nedeni, epididimal taşıma ve kapasitasyon sırasında HY antijeninin

uzaklaştırılması olabilir. İlginç bir çalışmada, cinsiyete göre ayrılmış sığır X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoa enjekte edilerek tavşanlara cinsiyete özgü antikorlar geliştirildi. Bu çalışma, sığır X kromozomu taşıyan spermatozoaya karşı 30-KDa proteinini tanımladı. Bu yöntem ayrıca antikorların konjugasyonunun spermin daha az hasarla cinsiyetlendirilmesine olanak sağlayacağını da öne sürdü. İki boyutlu elektroforez ve kütle spektrometrisi gibi son araştırma ilerlemeleri, diferansiyel olarak eksprese edilen sperm proteinlerinin ayrılması ve tanımlanmasına olanak sağladı. Bir çalışmada, insan normozoospermik spermatozoasının MALDI-TOF MS analizi ile birlikte iki boyutlu elektroforez, 98 farklı protein ortaya çıkardı (Yata, 2022).

Genomik Düzenleme

Spermatogenezis gelişim süreci mitotik, mayotik ve mayoz sonrası aşamalarını içerir. Bu gelişim süreci sırasında, X veya Y kromozomu taşıyan spermatozoanın gelişimi için gerekli olan bazı genler eksprese edilir. Cinsiyeti belirleyen genlerin bozulmasıyla ortaya çıkan cinsiyet çarpıklığı, memeli olmayan canlılarda incelenmiş ve sonuçlar memeliler için bazı çıkarımların önünü açmıştır. Zinc finger nucleases (ZFN), Transcription-activator like endonucleases (TALENs) ve CRISPR/Cas sistemi, çarpık cinsiyet oranında rol oynamaktadır (Xie & diğerleri, 2020). Yapılan bir çalışmada CRISPR/Cas9 sistemi tavşan SRY geninin yüksek hareketli grup bölgesini bozmuştur. Bu çalışma, tavşan modellerinde SRY genindeki mutasyonlar nedeniyle erkek ve dişi üreme organlarını etkileyen bir hastalık olan Hermafroditizm ile sonuçlanmıştır (Song & ark., 2016). Zinc finger X ve Zinc finger Y genleri cinsiyet belirlemede rol oynar ve bu genlerin RNAi bazlı bozulması, değişen cinsiyet oranına sahip yavrularla sonuçlanır (Fernandez & ark., 2017; Yata, 2022). Gen düzenleme teknolojisi oldukça yetenekli personel gerektirir ve çiftlik hayvanlarında cinsiyet belirlemede cinsiyet belirleyen genin net bir rolünün

olmaması, bu alandaki uygulamasını engellemektedir. Ancak, mevcut gen editörlerinin optimizasyonu, yeni gen editörlerinin geliştirilmesi ve cinsiyet belirleyen gen üzerine devam eden araştırmalar bu engelin aşılmasına yardımcı olacaktır. Yavruların cinsiyet oranını gen düzeyinde değiştirmek, yalnızca hayvancılık üretiminin gelişimini desteklemekle kalmaz, aynı zamanda insan hastalıkları için terapötik bir biyolojik model de sağlar. Spermatogenez sırasında cinsiyet belirlemeyi etkilediği bilinen Sry, zfy ve zfx gibi genler, hayvan yavrularının cinsiyet oranını etkilemek için RNAi aracılığıyla susturulabilir. Araştırmalar, RNAi vektörlerinin fare testisine enjekte edilmesinin yavruların cinsiyet oranını bozabileceğini göstermiştir (Fernandez & ark., 2017; Xie & ark., 2020).

Nanoteknoloji

Spermada cinsiyetin belirlenmesinde son yıllarda nanoteknolojiden de faydalanılmakta ve bu amaçla yaygın olarak başlıca altın nanopartiküller olmak üzere başkaca manyetik nanopartiküllerin kullanımları söz konusu olmuştur (Domínguez & ark., 2018; Feugang & ark., 2015).

Altın Nanopartiküller Kullanılarak Sperm Cinsiyet Belirleme

Bu teknik, morfolojik ve işlevsel olarak sağlam spermatozoadaki "Y" kromozomunun belirli dizilerini tespit etmek için işlevselleştirilmiş altın nanopartiküller (AuNPs) kullanır. İlk adım, AuNP'lerin sperm zarından girmesinden oluşur. Ardından, belirli bir DNA dizisinin sperm DNA'sının çift sarmalıyla invaziv olmayan bir şekilde birleşmesi gerçekleşir. Çiftleşme gerçekleştiğinde, sperm popülasyonunu tanımlamak için "Y" kromozomunun spesifik sinyal örüntüsü tanınır (Domínguez & ark., 2018; Feugang & ark., 2015; Gallardo & ark., 2024).

Manyetik Nanopartiküller Kullanılarak Sperm Cinsiyetinin Tayini

Bu teknik yalnızca eşek spermalarında cinsiyetin manipülasyonu amaçlı kullanıldığı bildirilmiştir; ancak daha sonra diğer türlerde de denemeler yapılmıştır. Manyetik nanopartiküller (MNPs) 50 nm çapındadır, silika ile kaplı bir demir manyetit çekirdekten oluşur ve negatif yüklüdür. MNP'ler spermayla karıştırılır ve 20 dakika boyunca bir miknatısa maruz bırakılır. MNP'lerin negatif yükü ile spermatozoanın elektriksel potansiyeli arasındaki etkileşim, "X" kromozomlu spermatozoa (20 mV) ve "Y" kromozomlu spermatozoa (16 mV) için farklılık arzeder. Bu teknolojiye göre miknatıs uygulamasıyla "Y" kromozomlu spermatozoa, MNP'lere daha yakın tutulacak ve aynı yüke sahip spermatozoadan oluşan bir spermatozoa birikimi meydana gelecek ve bu şekilde popülasyonlar birbirinden ayrılacaktır (Domínguez & ark., 2018; Feugang & ark., 2015; Gallardo & ark., 2024).

Sperm Hareketliliğinin Cinsiyete Özgü Değişimi

Yapılan bir çalışmada, sperm zarında bulunan *Toll benzeri reseptörlerin* (TLR) bakteriyel endotoksinlere bağlanabildiğini tanımlanmıştır (Fujita & ark., 2011). Bu çalışmada bakteriyel lipopolisakkaritler tarafından TLR 2 ve TLR 4'ün aktivasyonu üzerine sperm hareketliliğinin azaldığı ve apoptozun arttığı gözlemlenmiştir. Bu teoriden hareketle TLR'ye özgü ligandlar kullanarak TLR reseptörlerini aktive etmek suretiyle yeni bir sperm cinsiyet belirleme yöntemi geliştirilmiştir (Mothe & ark., 2018). Bu çalışma, belirli bir ligand tarafından TLR7/8 aktivasyonunun, X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoa içeren karışık semen örneklerinde X kromozomu taşıyan sperm hareketliliğini azalttığını gözlemlenmiştir. Bu stratejinin fare modellerinde başarılı bir şekilde gösterilmesinin ardından, boğa spermatozoası "*resiquimod*" ile muamele edilmiş ve in vitro fertilizasyon yöntemiyle sıgır

embriyosu üretilmiştir. Bu yöntemin, sığırlarda ve farelerde sperm cinsiyet belirlemede %80 – 90 başarı elde ettiği bildirilmektedir (Fujita ve ark. 2011; Yata, 2022).

Sperm Cinsiyetinin Belirlenmesinde Mikroakışkanlar

Mikroakışkanlar kullanılarak sperm cinsiyeti belirleme teknolojisinde, mikroakışkan cihazda bir elektrik alanının uygulanması üzerine X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoanın dielektroforezindeki farka dayanarak ayırım yapılır. Bu cihaz dielektroforetik ve mikrokanal katmanlardan oluşur. Dielektroforetik güç jeneratörüne ve mikrokanal silikon boruya bağlanır. Bu çalışma, 4 V ve 1 MHz ‘deki elektroforez sırasında, pozitif spermin elektrota bağlandığını ve negatif spermin elektrik alanında serbestçe hareket etmesi nedeniyle çıkışta toplandığı gözlemlenir. Bu çalışma, karışık bir spermatozoa popülasyonunda Y kromozomu taşıyan spermatozoanın %30 oranında azaldığını gözlemlenmiştir (Wongtawan & ark., 2020). Bu çalışma aynı zamanda X kromozomu taşıyan spermatozoa için en yüksek pozitif dielektroforezin 8 V ve 20 MHz’de, Y kromozomu taşıyan spermatozoa için ise en yüksek pozitif dielektroforezin 4 V ve 1 MHz’de olduğunu gözlemlenmiştir. Yakın zamanda *Yeni Zelanda merkezli start-up şirketi*, X ve Y kromozomu taşıyan spermleri ayırmak için mikroakışkan tabanlı bir cihaz geliştirdi. Bu yöntem, tek bir sperm hücresinin hareket yönünü değiştirmek için radyasyon basıncını kullanmakta olup, FACS bazlı sperm cinsiyet belirleme yöntemine benzemektedir. Bu yöntem, DNA’ya özgü bir floresan boya kullanarak X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoayı tespit eder. Ticari olarak temin edilebilen FACS bazlı sperm cinsiyet belirleme yöntemiyle karşılaştırıldığında bu yöntem daha ucuz ve daha az karmaşık olacaktır. Zeta potansiyeli çalışmaları, Y kromozomu taşıyan spermatozoanın, X kromozomu taşıyan spermatozoadan daha fazla negatif yük gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca bu çalışma, TALP tamponunun, HEPES ve TRIS

tamponları gibi diğer tamponlarla karşılaştırıldığında X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoa yükünde daha fazla farklılık gösterdiğini de ortaya koymaktadır (Wongtawan & ark., 2018; Yata, 2022; A17).

Sperm Cinsiyet Belirlemede Raman Spektroskopisi

Raman spektroskopisi ilk olarak insan sperm hücrelerine uygulanmış, normal ve anormal sperm hücrelerinde DNA paketlemesindeki farklılıkları göstermiştir (Huser & ark., 2009). Normal ve anormal sperm hücrelerini ayırt etmede duyarlılığı, özgüllüğü ve doğruluğu geliştirmek için Mikro-Raman spektroskopisi denemeleri de yapılmıştır. Çığır açan bir çalışmada, 900 sığır sperm hücresinin ortalama Raman spektrumu, X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoalarda önemli farklılıklar göstermiştir. 726, 785, 1095 ve 1581 cm⁻¹'deki Raman bantları, X kromozomu taşıyan spermatozoa için Y kromozomu taşıyan spermatozoaya göre daha yüksek pik alanı gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışma, Raman spektroskopisi kullanılarak sperm cinsiyetinin belirlenmesine kapı açmıştır (Song & ark., 2016). Raman spektroskopisindeki son gelişmeler, çözeltideki ve mikroakışkan akıştaki hücrelerin sınıflandırılmasını kolaylaştırmaktadır. Sperm cinsiyet belirlemede tek hücreli Raman spektrumlarının uygulanması, mevcut FACS bazlı sperm cinsiyet belirleme yöntemine noninvaziv ve potansiyel bir alternatif olacaktır (Yata, 2022).

Embriyo Cinsiyetinin Belirlenmesi

Sığır embriyolarının cinsiyetinin transferden önce belirlenebilmesi, özellikle süt endüstrisinde dişi buzağların tercih edildiği süt sığırcılığında, hayvancılık yönetiminde avantajlıdır. Embriyoların implantasyon öncesi cinsiyet tayini de embriyo transferinin başarısına yardımcı olur. Zigotun genetik cinsiyeti, dişi veya erkek olsun, yumurtanın X veya Y kromozomuna sahip

spermatozoa tarafından döl lenmesiyle belirlenir. Embriyoya en az zarar veren ve yüksek doğruluk sağlayan uygun ve kolay uygulanabilir cinsiyet tayini yöntemini bulmak için birçok çalışma yapılmıştır. Barr cisimciğı oluşumundan veya H-Y antijeninin saptanmasından önce, kullanılan yöntemler sitogenetik analize ve X kromozomuna bağı lı enzimlerin (glikoz-6-fosfataz dehidrogenaz, G6PD) seviyesinin ölçülmesine dayanıyordu. Çiftlik hayvanlarında embriyoların cinsiyet tayini için, embriyo hücresi biyopsisi gerekip gerekmediğı ne bağı lı olarak invaziv veya invaziv olmayan yöntemler kullanılarak çeşitli prosedürler geliştirilmiştir. İnvaziv olmayan yöntemler daha önemlidir çünkü embriyo bütünlüğü bozulmaz, yani embriyolar sağlam ve yaşayabilir kalır. Optimum ve normal embriyonik gelişimi sağlayabilir. Ancak invaziv olmayan cinsiyet tayini, invaziv teknikler kadar doğru değildir (Sharma & ark., 2017). Sitogenetik analiz ve Y kromozomuna özgü problemlerin kullanımıyla yüksek doğruluk elde edildiğı bulunmuştur, ancak bunlar invaziv yöntemlerdir. Moleküler biyoloji teknolojisi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve flöresan in situ hibridizasyon (FISH) gibi embriyo cinsiyet tayini için daha hızlı ve güvenilir teknikler sunmuştur (Sachan & ark., 2020).

Embriyolarda Cinsiyet Belirleme Yöntemleri

Evcil memelilerde, embriyo cinsiyetinin belirlenmesinin önemli ekonomik yönleri vardır ve bu soruna odaklanan çok sayıda çalışma yapılmıştır. Hayvan türlerinden elde edilen preimplantasyon embriyolarının cinsiyetinin belirlenmesi, transgenik ve embriyo transferi teknolojisinde büyük önem taşır, çünkü istenen cinsiyeti elde etmek için bir yol sağlar. Sitogenetik analiz ve Y-spesifik problemlerin kullanımı oldukça doğru sonuçlar verse de biyopsinin boyutuyla sınırlı invaziv yöntemlerdir. Sığı r ve manda endüstrisinin belirli sektörleri, özellikle sığı r yetiştiricileri olmak üzere, daha yüksek oranda erkek yavrudan faydalanmaktadır. Ancak çoğu durumda süt üretimi için dişi yavrular tercih edilmektedir.

Spermatozoaların cinsiyetinin belirlenmesi cinsiyet seçimi için en pratik yöntem olsa da, embriyo cinsiyetinin belirlenmesi daha başarılı olmuştur (Jafar & Flint, 1996).

Memeli embriyolarının blastomerleri her şeye kadirdir ve tam bir canlıya dönüşebilir. Dolayısıyla, her blastomer *Amg*, *Zfy* ve *Sry* gibi cinsiyet belirlemede rol oynayan genler de dahil olmak üzere, bir hayvanın gelişimi için gerekli tüm genleri içerir. Bu nedenle, nükleik asit probu, floresan in situ hibridizasyon (FISH), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve halka aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) gibi moleküler biyolojik tespit teknikleri, erkek özgü geni tanımlamak için kullanılabilir. Nükleik asit problemleri arasında, izotopik etiketli problemler yüksek doğruluğa sahiptir ancak çok sayıda embriyo hücresi ve zaman gerektirirken, biyotin etiketli problemler tespit için çok az zaman gerektirir ancak yalnızca birkaç embriyoyu ayırabilir (Xie & ark., 2020). PCR yaygın olarak kullanılır ve cinsiyete özgü genlerin amplifikasyon ürünlerine dayalı fenotipleri analiz etme yeteneğinin yanı sıra, ayrılmış X ve Y taşıyan spermilerin saflığını istatistiksel olarak doğrulayabilir. İkiz gebeliklerin cinsiyet manipülasyonu için uygun olmasa da araştırmalar, maternal plazmadaki serbest fetal hücrelerin DNA'sı kullanılarak yapılan cinsiyet manipülasyonunun hem SRY hem de AMEL gen dizileri için etkili olduğunu göstermiştir (Khamlor & ark., 2015; Saberivand & Ahsan, 2016; Xie & ark., 2020).

İnvaziv Olmayan Metotlar

İnvaziv olmayan bir yaklaşım, embriyonun bütünlüğünü koruduğu ve bu nedenle başarılı embriyo transferi ve implantasyonu potansiyelini bozma olasılığı daha düşük olduğu için optimal kabul edilir. İnvaziv olmayan yaklaşımda 3 teknik vardır: (1) *X kromozomu inaktivasyonundan önce X kromozomuna bağlı enzim aktivitesinin izlenmesi*, (2) *cinsiyete özgü bir antijene karşı antikoru embriyolarla immün reaksiyonlar* ve (3) *embriyoların bölünme ve*

gelişimlerine göre cinsiyet belirlemeleri yapılabilmektedir (Lakshmy & ark., 2018).

X Kromozomu Bağlantılı Enzim Aktivitesi

Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD), hipoksantin fosforibosil transferaz (HPRT) ve fosfoglisarat kinaz gibi bazı enzimler, X kromozomuyla bağlantılı veya ilişkili enzimlerdir (Wakchaure & ark., 2015). Bu enzimlerin üretimi, erkeklerde yalnızca bir X kromozomu bulunurken, dişilerde iki X kromozomu bulunduğundan, dişilerde erkeklere kıyasla daha fazladır. Bu enzimlerin konsantrasyonlarına dayanarak embriyolar cinsiyetlendirilebilir. Kadınlarda X kromozomlarından birinin büyük bir bölümünün gen üretimi, baskılanması veya inaktivasyonu, blastosist oluşumundan hemen sonra meydana gelir ve Barr cisimciğinin oluşumuna yol açar. Sığır embriyosunda embriyonik genom aktivasyonu 8 ile 16 hücreli aşama arasında gerçekleşir, ancak evcil hayvan embriyosunda X kromozomu inaktivasyonunun kesin zamanlaması bilinmemektedir, blastosist aşamasında meydana gelebilir. Embriyonik genomun aktivasyonu ile bir X kromozomunun inaktivasyonu arasındaki dönemde, X kromozomuna bağlı enzimlerin konsantrasyonları tahmin edilerek erkek ve dişi embriyo ayırt edilebilir (Bora, 2022; Lakshmy & ark., 2018; Sachan & ark., 2020; Sharma & ark., 2017).

Ancak bu tekniğin bazı sınırlamaları vardır:

Boyama yoluyla enzimlerin kantifikasyonu sırasında, yoğun enzim aktivitesi ve boyanın tutulmasından kaynaklanan toksisite nedeniyle embriyolarda yüksek ölüm oranları görülebilir.

Evcil türlerin çoğunda X kromozomu inaktivasyonunun kesin süresi bilinmemektedir.

Embriyonik genom aktivasyonu farelerde 8 hücreli aşama kadar geç, ineklerde ise 8 ile 16 hücreli aşama kadar geç gerçekleşir.

Bu nedenle bu tür analizlerde izlenen enzimlerin embriyonik transkripsiyonun sonucu olduğundan ve depolanmış maternal mRNA'nın translasyonundan kaynaklanmadığından emin olmak için dikkatli olunmalıdır.

H-Y antijeni Varlığı

Erkek spesifik hücre yüzey antijenine “*histokompatibilite-Y veya HY antijeni*” denir. Bu antijen, tüm türlerin heterogametik cinsiyetindeki somatik hücrelerde bulunur. H-Y antijeni, erkek hücrelerin yüzeyinde bulunan, ancak dişi hücrelerde bulunmayan bir doku uyumluluk antijenidir. Embriyolarda H-Y antijenini tespit etmek için *Sitotoksiste Testi* ve *İmmünofloresan Testi* gibi iki yöntem mevcuttur (Bora, 2022; Sachan & ark., 2020; Wakchaure & ark., 2015). Sitotoksiste testinde, embriyolar H-Y antiserumu ve tamamlayıcısına maruz bırakılır. H-Y antijeni ifade eden embriyolar bir dereceye kadar hücre lizisi gösterir ve bu nedenle erkek olarak sınıflandırılır. Bu yöntemde embriyo sağkalım oranı düşüktür ve bu da prosedürün en büyük dezavantajıdır. İmmünofloresan testinde ise embriyoların 30 dakika boyunca birincil H-Y antikoruna maruz bırakılmasını ve ardından flöresan izotiyosiyanatın (FITC) konjuge edildiği ikincil bir antikorla reaksiyona sokulmasını olaylarını içerir. Embriyolar daha sonra flöresan mikroskop altında FITC etiketinin varlığı veya yokluğu açısından değerlendirilir (Goldberg, 1988). Floresan mikroskopi incelemesi erkek embriyoların floresan verdiğini (H-Y pozitif) ve dişi embriyoların floresan vermediğini (H-Y negatif) göstermektedir. Bu iki immünolojik cinsiyet belirleme testinin en büyük sınırlaması, cinsiyet belirleme doğruluğunun %90'ı geçmemesidir. *Çünkü H-Y antijeni*, antijen-antikor reaksiyonu yoluyla tespit edilemeyecek kadar zayıf bir antijendir, sekonder antikorlar bazen spesifik olmayan bağlanma gösterebilir, H-Y antijeni yalnızca erkek embriyolarla sınırlı olmayabilir (Lakshmy & ark., 2018; Sharma & ark., 2017; Wakchaure ve ark., 2015).

Embriyo Bölünme ve Gelişimine Dayalı Cinsiyet Belirleme

Erkek embriyo hücrelerinde, morula ve blastosist aşamalarına ulaşmak için bölünme ve gelişim hızının dişi embriyo hücrelerine göre daha hızlı olduğu bildirilmektedir (Sharma & ark. 2017). Erkek embriyolarındaki hızlı büyümenin sebepleri, (i) Y kromozomu genlerinin neden olduğu daha hızlı gen ekspresyonundan, (ii) H-Y antijeni veya Y kromozomu büyüme faktörlerinin etkisinden, (iii) erkek embriyosunda daha az DNA bulunması nedeniyle çoğalma için daha az zamana ihtiyaç duyulmasından, yani kısa hücre döngüsünden kaynaklanıyor olabilir (Hamilton & ark., 2012). Bu embriyo cinsiyet belirleme yönteminin hala birçok sınırlaması vardır. Örneğin, in vivo üretilen embriyoların bölünme süresi bilinemez, ayrıca gelişme hızındaki fark çok küçüktür, hızlı ve yavaş embriyoların ayrılmasında yüksek beceri gerektirir. Y kromozomu taşıyan spermin embriyonik transkripsiyondan önce büyüme faktörlerini transkribe etmek için embriyonik genomu aktive ettiğini ve bu durumun erkek embriyolarda hücre bölünme ve gelişme hızını artırabileceğini öne sürmüştür (Sachan & ark., 2020; Wakchaure & ark., 2015).

İnvaziv Metotlar

Sitogenetik Analizler

Sitogenetik cinsiyet belirleme, cinsiyetlendirilmiş tavşan, buzağı ve koyun üretmek için kullanılan ilk yöntemdir. Bu teknik, kolşisin (*mitoz durdurucu bir madde*) içeren bir ortamda kültüre edilen az sayıda hücrenin biyopsisini gerektirir. Kolşisin, tübülüne bağlanır ve mikrotübül polimerizasyonunu durdurarak iğ ipliği toksini veya mitotik toksin görevi görür. Kolsemid (demoklosin olarak da bilinir), doğal alkaloid kolşisine yakın, ancak daha az toksik olan bir başka ajandır. Ayrıca mikrotübülleri depolimerize eder ve iğ ipliği oluşumunu inaktive eder, bu nedenle mitoz inhibitörü olarak da kullanılabilir (Sharma & ark., 2017). Hücreler

ozmotik olarak lize edilmek ve kromozomların dağılabilmesi için hipotonik bir çözeltiye tabi tutulur, böylece hücreler şişirilerek kromozomlar dağıtılır, slaytlar hazırlanır, sabitlenir ve Giemsa gibi kalıcı DNA boyasıyla boyanır ve son olarak slaytlar mikroskop altında incelenir. Metafaz aşamasında durdurulan hücreler, kendilerine özgü bant desenleriyle tanımlanabilen bir kromozom yayılımı oluşturur. Y kromozomu, küçük boyutu sayesinde kolayca tanımlanabilir. Tüm kromozomlar incelenir, X ve Y kromozomları küçük boyutları sayesinde kolayca tanımlanabilir. Bu analizde, iki X kromozomu veya bir Y kromozomunun tespiti, dişi embriyoda iki X kromozomu ve erkek embriyoda Y kromozomu yorumlanarak cinsiyetin belirlenmesi için yeterli bir gösterge olarak kabul edilir. Bu yöntemle cinsiyet tayini neredeyse %100'dür. Bu yöntemin sınırlamaları, kromozomların yüksek kalitede metafaz yayılımlarını gösteren biyopsilerin elde edilmesindeki zorluklar, eğitimli sitogenetikçilere duyulan ihtiyaç ve bu yöntemin zaman alıcı olmasıdır (Lakshmy & ark., 2018; Wakchaure & ark., 2015).

Avantajları:

- Ucuz ve uygulaması kolaydır
- Karmaşık ekipman gerektirmez
- Embriyolar transfer edilmeden önce kromozomal anormallikleri tespit edebilir.
- Karyotipleme yönteminin doğruluğu yüksektir.

Dezavantajları:

- Bu teknikler, hayatta kalan embriyoya zarar verebilir. Embriyoların yaşama ve gebe kalma oranlarını azaltır.
- Hazırlanabilen analiz edilebilir metafaz plakalarının nispeten az olması nedeniyle cinsiyetlendirilebilen embriyoların oranı düşüktür.

- Zaman alıcı bir işlemdir.
- İyi eğitimli personel gerektirir.

Y-Spesifik DNA Problemleri Kullanılarak Embriyo Cinsiyeti Belirleme

Sığır embriyosunun cinsiyetini belirlemenin en etkili yöntemi, erkek embriyoya işaret eden Y kromozomuna özgü bir DNA dizisinin varlığını veya yokluğunu bulmaktır. Bu teknik, embriyodan az sayıda hücrenin biyopsisini ve toplam hücresel DNA'nın Y kromozomuna özgü etiketli bir DNA dizisine (prob) hibridizasyonunu içerir (Lakshmy & ark., 2018; Sachan & ark., 2020). Proben bu şekilde etiketlenmesi, radyoaktif yöntem veya floresan in situ hibridizasyon gibi radyoaktif olmayan bir yöntemle yapılabilir. Pozitif hibridizasyon sonuçları, Y kromozomunun varlığını ve dolayısıyla embriyonun erkek cinsiyetini gösterir. Bu yöntem, DNA hazırlanması için embriyodan az miktarda materyal gerektirmesi ve cinsiyeti de %100 doğrulukla tespit etmesi nedeniyle oldukça caziptir. DNA hazırlama için gereken çok az miktarda materyal, işlemin en çekici özelliğidir; teknik olarak invaziv bir yöntem olmasına rağmen, Y'ye özgü prob yöntemi bu konuda sitogenetik testlerle aynı sorunları sunmaz (Wakchaure & ark., 2015). Y kromozomuna özgü DNA problemlerinin üretimi ve karakterizasyonu: (i) Y kromozomlarının izolasyonu, (ii) Y kromozomuna özgü dizilerin izolasyonu, (iii) dizi kopya sayısının belirlenmesi ve (iv) prob dizisinin Y kromozomu üzerindeki lokalizasyonu adımlarını gerektirir. İnsan embriyosunda, zona pellucidaya müdahale edilir ve in vitro fertilizasyondan 3 gün sonra, 6-10 hücre aşamasında tek bir blastomer çıkarılır. Y-spesifik DNA'sı, 149 baz çiftli Y kromozomu spesifik probun kısa segmentleri primer olarak kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılarak, miktarı büyük ölçüde artırılır. Çoğaltılan DNA elektroforeze tabi tutulur, etidyum bromürle boyanır ve UV ışığı

altında incelenir. Bu çoğaltma işleminden sonra Y-spesifik probun 149 bp'lik parçası açıkça görünürse embriyo erkek olarak değerlendirilir. Tüm işlem beş saat içinde tamamlanabilir ve sonuçlar karyotip analiziyle yakından ilişkilidir (Lakshmy & ark., 2018; Sharma & ark., 2017).

PCR Tabanlı Yaklaşımlarla Cinsiyet Belirleme

PCR kullanımı, embriyo cinsiyetinin belirlenmesi için yeni olanaklar yaratmıştır (Mara & ark., 2004). Şu anda, maternal plazmadan DNA parçası kullanılarak fetal cinsiyetin tahmin edilmesi için tercih edilen önemli bir yöntemdir. Y kromozomunun belirli DNA dizilerinin PCR kullanılarak sığırlarda çoğaltılmasıyla embriyonun cinsiyetinin belirlenmesi yöntemi, cinsiyet oranını etkilemek için etkili bir araç olduğunu kanıtlamaktadır (Da Cruz & ark., 2012; Kobayashi & ark., 2004). PCR kullanılarak embriyo cinsiyetinin belirlenmesi, embriyonun biyopsisini (1-4 blastomer), DNA parçalarının çoğaltılmasını (bir türe özgü ve bir erkeğe özgü) ve çoğaltılan ürünlerin elektroforezle analiz edildikten sonra yorumlanmasını içerir [Asadpour & ark., 2015; Pomp & ark., 1995]. Y kromozomuna özgü bir genin (Sry) ve otozomal bir genin (ör. Aml-X) birlikte çoğaltılması, farklı parça boyutlarında Y kromozomu ve otozomal ürünler elde etmek için PCR amplifikasyonunda yapılır. Amelogenin genlerinin farklı parçalarını çoğaltmak için tek bir primer çiftine ihtiyaç duyulduğundan, bu durum cinsiyet tahminini kolaylaştırır (Saberivand & Ahsan, 2016; Tavares & ark., 2016). Elektroforezde, Y kromozom parçasının varlığı erkeği, yokluğu ise dişi örneği gösterirken, otozomal parça her iki örnekte de mevcuttur. Otozomal gen, biyopsi ve uygun PCR koşullarının varlığı için dahili kontrol görevi görür. Bazen, prosedürde her iki parça da birlikte çoğaltıldığı için buna dubleks PCR denir. PCR kullanımı sığırlarda, koyun ve geyiklerde, keçilerde, domuzlarda, atlarda ve farelerde embriyoların cinsiyetini belirlemenin en güvenilir ve basit yöntemidir. Günümüzde PCR,

anne plazmasından elde edilen DNA kullanılarak erken gebeliklerde ftal cinsiyetin belirlenmesinde sık tercih edilen yöntem haline gelmiştir (da Cruz & ark., 2012; Mara & ark., 2004). Her ne kadar embriyodan hücre çıkarılmasını gerektirdiği için her açıdan ideal olmasa da PCR cinsiyet tayini neredeyse %100 doğrudur ve prosedür birkaç saat içinde gerçekleştirilebilir. Sığır embriyosu cinsiyet tayininde PCR yönteminin doğruluğunun, FISH (%86,66) ile karşılaştırıldığında daha iyi sonuç verdiği (%96,4) bildirilmiştir. PCR tabanlı cinsiyet tayini yöntemi genellikle uygun maliyetli, basit ve güvenilir olduğu için tercih edilmektedir (Hamilton & ark., 2012; Sachan & ark., 2020).

Y kromozomuna spesifik SRY, TSPY, FBNY, AMELY, ZFY genleri ile X kromozomuna spesifik ZFX, AMELX, F9, PLP gibi birkaç cinsiyet kromozomuna özgü gen, cinsiyet belirleme için belirteç olarak kullanılmıştır (Pomp & ark., 1995). Sığır erkek özgü hedef, çok düşük genomik DNA konsantrasyonlarında bile tespit edilebilmiştir. Daha sonra, sığır embriyosu cinsiyetinin belirlenmesi için benzersiz elektroforetik olmayan PCR geliştirilmiştir. Bu yöntemle cinsiyet belirleme doğruluğu, erkek embriyolar için %98,7 ve dişi embriyolar için %94,4'tür ve bu oran ftal ultrason cinsiyet belirleme ve buzağılama ile doğrulanmıştır (Tavares & ark., 2016). PCR amplifikasyonundan önce at embriyo biyopsilerinin ısıl işleme tabi tutulması (95 °C'de 10 dakika), cinsiyet belirleme oranında önemli bir artışa yol açmıştır. Tek blastomerden alınan 8 ile 16 hücreli evre sığır embriyolarının travmaya neden olmadan cinsiyetlendirilmesi için multipleks PCR, 8, 4, 2 ve 1 blastomerlik gruplarda sırasıyla %100,0, %96,3, %94,3 ve %92,1 cinsiyet belirleme verimliliğiyle başarılı olmuştur (Asadpour & ark., 2015; Singh & ark., 2017).

Flöresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ile Embriyo Cinsiyet Tayini

Metafaz veya interfaz hücre aşamasında, immünofloresan yöntemi, floresan in situ hibridizasyon (FISH) kullanarak tek tek kromozomlardan karmaşık DNA dizilerini analiz etmek için bir araçtır. Embriyo cinsiyet tayini için başarıyla kullanılan, tek hücreli kromozom moleküler tanısı için hassas bir yöntemdir (Sachan & ark., 2020; Singh & ark., 2017). Hayvan yetiştiricileri, özellikle biyopsi yapılmış blastomerlerden sığır fötüslerinin belirli kromozomları hedefleyen özel DNA problemleri kullanılarak yapılan kromozom cinsiyet tayininde, üreme öncesi ön seçime giderek daha fazla sürece müdahil olabilmektedirler. Bu yöntem, PCR'ye kıyasla, numune kontaminasyonu olasılığının daha düşük olduğunu göstermektedir. Floresan in situ hibridizasyonda (FISH), erkek ve dişi embriyolar Y kromozomuna özgü bir DNA probu kullanılarak izole edilebilir (Bora, 2022; Sharma & ark., 2017).

Floresan in situ hibridizasyon ve floresan tespiti olarak da adlandırılan tekniğin geliştirilmesi, spesifik nükleik asit dizilerinin hassas bir şekilde tespitini veya daha basit bir ifadeyle birçok farklı hücre tipinden metafaz ve interfaz çekirdeklerindeki bireysel kromozomların tanımlanmasını mümkün kılmaya başlamıştır (Kobayashi & ark., 2004). Embriyo cinsiyet tayini için PCR kullanıldığında, spesifik olmayan dizilerin çoğaltılması veya örneklerin kontaminasyonu ciddi bir sorun olabilirken, FISH tekniği ile bu sorun önemsiz hale gelmiştir. FISH embriyonun cinsiyetini belirlerken aynı zamanda mozaiklik durumu ve aneuploidiyi de tespit edebilmektedir (Singh & ark., 2017). Ayrıca, hücreler prosedür boyunca doğrudan görüntülenebilir ve embriyonik kökenli oldukları doğrulanabilmektedir. Embriyoların biyopsileri, zona pellucidayı kısmen kesen ve trofoblasttan birkaç hücreyi ayıran tek bir aşağı doğru hareketle embriyoları bir mikrotraş bıçağıyla keserek elde edilmekte ve cinsiyet belirlemede kullanılmaktadır. Genetik cinsiyet

belirleme, X ve Y kromozomlarındaki amelogenin geninin iki homolog kopyasında çok sayıda polimorfizm bulunması gerçeğine dayanır. Erkek çekirdekler Y kromozomuna özgü sinyaller gösterirken, dişi çekirdekler herhangi bir sinyal göstermez (Sharma & ark., 2017; Singh & ark., 2017).

Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ile Embriyo Cinsiyeti Tayini

Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP), 2000 yılında Eiken Chemical Co. Ltd. tarafından geliştirilen ve izotermal koşullar altında çalışan bir DNA amplifikasyon yöntemidir. Bu DNA amplifikasyon yöntemi oldukça spesifik, etkili ve hızlıdır. Ayrıca, gen amplifikasyonu ve tespiti tek adımda tamamlanabilir ve 15-60 dakikada 10^9 - 10^{10} kata kadar amplifikasyon yapılabilir. Son zamanlarda, duyarlılığı artırmak için çöktürme için polietilenimin (PEI) içeren LAMP primerleri optimize edildi ve doğruluğu artırmak için multipleks LAMP tekniği de kullanıldı (Hamilton & ark., 2012; Khamlor & ark., 2015; Xie & ark., 2020). LAMP, 60°C kadar düşük sıcaklıklarda belirli bir DNA dizisini çoğaltabilen bir DNA çoğaltma yöntemidir. Bir inek embriyosunun cinsiyetini belirlemenin en hızlı yolu, PCR döngü aracılı izotermal amplifikasyon yerine kullanılabilir. İzotermal koşullarda DNA'yı çoğaltmak için bir DNA polimeraz ve dört basit DNA primeri, ayrıca LAMP reaksiyonu ile bir grup halka primeri kullanılabilir (Tavares & ark., 2016; Yonekawa & ark., 2000). İç ve dış primerler, daha sonra bir otomatik döngü işlemi ile çoğaltılabilen iç nükleik asitleri oluşturmak için kullanılabilir. LAMP, en iyi senaryoda yaklaşık 15 dakikada bir hedef serisini çoğaltacaktır. Ayrıca, hedef dizisi beyaz bir magnezyum pirofosfat çökeltisi (DNA sentezinin bir yan ürünü) ürettiğinden, LAMP aracılı DNA çoğaltması, reaksiyon çözeltisinin bulanıklığının hesaplanmasıyla karakterize edilebilir. LAMP, çoğaltılan DNA parçalarını tespit etmek için elektroforeze ihtiyaç duymaz. Bu özellikler, sahada DNA analizi için PCR yerine

LAMP'ın daha güvenli bir alternatif olabileceğini göstermektedir (Sachan & ark., 2020; Wakchaure & ark., 2015).

Sonuç

Spermada ve embriyoda çeşitli yöntemlerle cinsiyet kontrollerinin sağlanması hem bilimsel hem de pratik açıdan büyük yarar sağlamaktadır. Cinsiyet ön seçimi yöntemleri, çiftlik hayvanlarında genetik iyileştirme programında ve istenen cinsiyette yavruların üretiminde büyük bir sıçrama sağlayabilir.

Ekonomik açıdan önemli bir hayvan olan sığırlarda ticari cinsiyet ön seçimi, süt ve sığır eti endüstrisi için son derece önemlidir.

Cinsiyet ön seçimi, üreme programları için elit boğaların üretiminde de faydalı olabilir.

Ayrıca, cinsiyet ön seçimi, sığır kesiminin kanunen yasak olduğu Hindistan gibi gelişmekte olan ülkelerde, gelecekte artan başıboş sığır (erkek) popülasyonunun kontrol altına alınması için umut verici bir potansiyele sahiptir.

FISH yaklaşımı, bireysel düzeyde sperm cinsiyetinin belirlenmesi ve implantasyon öncesi embriyolarda genetik anormalliklerin taranması açısından tüm canlılar için önemli avantajlara sahiptir.

PCR tabanlı cinsiyet belirleme, kantitatif gerçek zamanlı PCR, dijital damlacık PCR gibi yeni PCR tabanlı tekniklerin kullanımı, X ve Y sperm popülasyonunun ayrıştırılmamış spermada doğru bir şekilde tanımlanması veya başka bir yaklaşımla ayrıştırılan spermanın yeniden analizi için oldukça umut verici görünmektedir.

Ayrıca, cinsiyet ön seçimi cinsiyete bağlı kalıtsal hastalıkların önlenmesine yardımcı olabilir.

Kaynakça

Asadpour, R., Asadi, M.H., Joozani, R. & Hamidian, G.H. (2015). Ovine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA) and cervical mucous secretions. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(1): 65-69. [Doi: 10.1016/S2305-0500\(14\)60061-0](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(14)60061-0)

Azizeddin, A., Ashkar, F.A., King, W.A. & Revay, T. (2014). Enrichment of Y-chromosome bearing bull spermatozoa by swim-up through a column. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(1), e1–e4. Doi: 10.1111/rda.12252. Epub 2013 Nov 6.

Baran A. (2016). Sığır yetiştiriciliğinde cinsiyeti belirlenmiş sperma üretim tekniği ve kullanımı. *Türkiye Klinikleri, Journal of Reproduction and Artificial Insemination-Special Topics*, 2(2): 15-20.

Bhalakiya, N., Haque, N., Patel, D., Chaudhari, A., Patel, G., Madhavatar, M., Patel, P., Hossain, S. & Kumar, R. (2018). Sperm sexing and its application in livestock sector. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7: 259-272.

Bondioli, K.R. (1992). Embryo sexing: A review of current techniques and their potential for commercial application in livestock production. *Journal of Animal Science*, Volume 70, Issue suppl_2, Pages 19–29. [Doi: 10.2527/1992.70suppl_219x](https://doi.org/10.2527/1992.70suppl_219x)

Bora, S.K. (2022). Embryo sexing methods in bovine and its application in animal breed. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 37: 80-86. Doi: 10.12750/JARB.37.2.80

Bradley, M.P. (1989). Immunological sexing of mammalian semen: current status and future options. *Journal of Dairy Science*, 72: 3372–80. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79500-X.

Choudhary, K.K., Kavya, K.M., Jerome, A. & Sharma, R.K. (2016). Advances in reproductive biotechnologies. *Veterinary World*, 9(4): 388-395. Doi: 10.14202/vetworld.2016.388-395

Choudhary, R., Chand, S., Singh, T., Singhal, R.K., Chourasiya, V.K. & Indu. (2022). Sex Determination. Genetic Polymorphisms - New Insights. Editor: Mahmut Çalışkan. ISBN: 978-1-83968-811-9. Pages: DOI: 10.5772/intechopen.95195.

Ciani, F., Cocchia, N., Rizzo, M., Ponzio, P., Tortora, G., Avallone, L. & Lorizio, R. (2008). Sex determining of cat embryo and some feline species. *Zygote*, pp. 169–177. Doi:10.1017/S0967199408004681.

da Cruz, A.S., Silva, D.C., Costa, E.O.A, De M-Jr, P., da Silva, C.C., Silva, D.M. & da Cruz, A.D. (2012). Cattle fetal sex determination by polymerase chain reaction using DNA isolated from maternal plasma. *Animal Reproduction Science*, 131: 49-53. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.02.004.

de Graaf, S.P., Beilby, K.H., Underwood, S.L., Evans, G. & Maxwell, W.M.C. (2009). Sperm sexing in sheep and cattle: the exception and the rule. *Theriogenology*, 71: 89–97. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.014.

De Vries, A., Overton, M., Fetrow, J., Leslie, K., Eicker, S. & Rogers, G. (2008). Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 91: 847–856. Doi: 10.3168/jds.2007-0536.

Descoteaux, L., Gnemmi, G. & Colloton, J. (2009). Ultrasonography of the bovine female genital tract. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25: 733–52. Doi: 10.1016/j.cvfa.2009.07.009.

Domínguez, E., Moreno-Irusta, A., Castex, H.R., Bragulat, A.F., Ugaz, C., Clemente, H., et al. (2018). Sperm sexing mediated

by magnetic nanoparticles in donkeys, a preliminary in vitro study. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65:123-127. [Doi: 10.1016/j.jevs.2018.04.005](https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.04.005)

Esin, B. & Çevik, M. (2020). Gender determination and evaluation in mammals. *Journal of Animal Production*, 61 (1): 63-71. Doi: 10.29185/hayuretim.643715

Esmailpour, T., Elyasi, L., Bahmanpour, S., Ghannadi, A., Monabbati, A., Dehghani, F. & Kazerooni, M. (2012). Effect of combined density gradient centrifugation on X-and Y-sperm separation and chromatin integrity. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 10(5), 435.

Espinosa-Cervantes, R. & Córdova-Izquierdo, A. (2013). Sexing sperm of domestic animals. *Tropical Animal Health and Production*, 45: 1–8. Doi: 10.1007/s11250-012-0215-0

Fernandez, A., Josa, S. & Montoliu, L. (2017). A history of genome editing in mammals. *Mammalian Genome*, 28: 237–46. Doi: 10.1007/s00335-017-9699-2.

Feugang, J., Liao, S., Crenshaw, M., Clemente, H., Willard, S. & Ryan, P. (2015). Lectin-functionalized magnetic iron oxide nanoparticles for reproductive improvement. *Journal of Fertilization: In vitro - IVF-Worldwide, Reproductive Medicine, Genetics & Stem Cell Biology*, 3(145): 17–19. Doi: 10.4172/2375-4508.1000145

Fujita, Y., Mihara, T., Okazaki, T., Shitanaka, M., Kushino, R., Ikeda, C. & Shimada, M. (2011). Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis. *Human Reproduction*, 26(10): 2799–2806. Doi: 10.1093/humrep/der234

Gallardo, H.A., Duarte, D.U., Roque, A.V. & De La Torre Sánchez, J.F. (2024), Use and evolution of sperm sexing in cattle. A

Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 15(3): 641-668.
Doi: 10.22319/rmcp.v15i3.6372

Garner, D.L. (2006). Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, 65: 943–957. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.009

Garner, D.L., Evans, K.M. & Seidel, G.E. (2013). Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. *Methods Molecular Biology*, 927: 279–95. Doi: 10.1007/978-1-62703-038-0_26.

Garner, D.L. & Seidel, Jr. G.E. (2008). History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, 69:886-895. Doi: [10.1016/j.theriogenology.2008.01.006](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.006)

Goldberg, E.H. (1988). H-Y antigen and sex determination. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 322: 73–81. Doi: 10.1098/rstb.1988.0115.

Hamilton, C.K., Combe, A., Caudle, J., Ashkar, F., Macaulay, A., Blondin, P. & King, W. (2012). A novel approach to sexing bovine blastocysts using male specific gene expression. *Theriogenology*, 77: 1587-1596. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.11.027

Huser, T., Orme, C.A., Hollars, C.W., Corzett, M.H. & Balhorn, R. (2009). Raman spectroscopy of DNA packaging in individual human sperm cells distinguishes normal from abnormal cells. *Journal of Biophotonics*, 2(5): 322–332. Doi: [10.1002/jbio.200910012](https://doi.org/10.1002/jbio.200910012)

Jafar, S.I. & Flint, A.P.F. (1996). Sex selection in mammals: a Review. *Theriogenology*, 46: 191-200.

Johnson, L.A., Flook, J.P. & Look, M.V. (1987). Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an

improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Research*, 17: 203–12. Doi: 10.1002/mrd.1120170303.

Khamlor, T., Pongpiachan, P., Parnpai, R., Punyawai, K., Sangsritavong, S. & Chokesajjawatee, N. (2015). Bovine embryo sex determination by multiplex loop mediated isothermal amplification. *Theriogenology*, 83: 891-896. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.11.025

Kobayashi, J., Nagayama, H., Uchida, H., Oikawa, T., Numabe, T., Takada, N., Sasada, H. & Sato, E. (2004). Selection of sexed bovine embryos using rapid fluorescence in situ hybridization. *The Veterinary Record*, 154: 789-791. DOI: [10.1136/vr.154.25.789](https://doi.org/10.1136/vr.154.25.789)

Lakshmy, K.V., Manimegalai, J. & Lambe, U. (2018). Different methods of embryo sexing: A review. *The Pharma Innovation Journal*, 7(10): 170-172.

Lucio, A.C., Resende, M.V., Dernowseck-Meirelles, J.A., Perini, A.P., Oliveira, L.Z., Miguel, M.C.V. & Lima, V.F.M.H. (2012). Assessment of swim-up and discontinuous density gradient in sperm sex preselection for bovine embryo production. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64, 525–532. Doi: [10.1590/S0102-09352012000300001](https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000300001).

Mara, L., Pilichi, S., Sanna, A., Accardo, C., Chessa, B., Chessa, F., et al. (2004). Sexing of in vitro produced ovine embryos by duplex PCR. *Molecular Reproduction in Development*, 69: 35–42. Doi: 10.1002/mrd.20147.

Mothe, G.B., Scott, C., Sicherle, C.C., de Freitas Guitolini, C.R., Dell'aqua, C.D.P.F., Malossi, C.D. & de Souza, F.F. (2018). Sperm sexing with density gradient centrifugation in dogs. *Animal Reproduction Science*, 199, 84–92. [Doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.11.003](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.11.003)

Pomp, D., Good, B.A., Geisert, R.D., Corbin, C.J. & Conley, A.J. (1995). Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or-11 pig embryos. *Journal of Animal Science*, 73: 1408–15. Doi: 10.2527/1995.7351408x.

Rath, D., Barcikowski, S., de Graaf, S., Garrels, W., Grossfeld, R., Klein, S., Knabe, W., Knorr, C., Kues, W., Meyer, H., Michl, J., Moench-Tegeder, G., Rehbock, C., Taylor, U. & Washausen, S. (2013). Sex selection of sperm in farm animals: status report and developmental prospects. *Reproduction*, 145, R15–R30. Doi: 10.1530/REP-12-0151

Saberivand, A. & Ahsan, S. (2016). Sex determination of ovine embryos by SRY and amelogenin (AMEL) genes using maternal circulating cell free DNA. *Animal Reproduction Science*, 164: 9–13. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.10.011.

Sachan, V., Kumar, B., Agrawal, J.K., Kumar, A. & Saxena, A. (2020). Methods of embryo sexing in cattle breeding: A Review. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 10 (1): 1-8.

Seidel, G.E. (2003). Sexing mammalian sperm—intertwining of commerce, technology, and biology. *Animal Reproduction Science*, 79: 145–156. Doi:10.1016/S0378-4320(03)00162-3

Sharma, M. & Sharma, N. (2016). Sperm sexing in animals. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4(10): 543-549. Doi: 10.14737/journal.aavs/2016/4.10.543.549

Sharma, M., Singh, A., Sharma, N. & Rawat, S. (2017). Embryo sexing in cattle: Review. *International Journal of Current Innovation Research*, Vol. 3, Issue 12, pp 955-960.

Singh, J., Yadav, S.K., Gangwar, D.K. & Singla, S.K. (2017). Molecular approaches for gender identification and sperm sex ratio

determination in farm animals. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 5(9): 377-387. Doi: 10.17582/journal.aavs/2017/5.9.377.387

Song, Y., Yin, H. & Huang, W.E. (2016). Raman activated cell sorting. *Current Opinion in Chemical Biology*, 33: 1–8. Doi: [10.1016/j.cbpa.2016.04.002](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.04.002)

Tavares, K.C.S., Carneiro, I.S., Rios, D.B., Feltrin, C., Ribeiro, A.K.C., Gaudencio-Neto, S., et al. (2016). A fast and simple method for the polymerase chain reaction-based sexing of livestock embryos. *Genetic and Molecular Research*, 15: gmr.15017476. Doi: 10.4238/gmr.15017476.

Wakchaure, R., Ganguly, S., Kumar, P. & Mahajan T. (2015). Methods for embryos sexing and their applications in animal breeding: A review. *Octa Journal of Biosciences*, 3(2), 47-49.

Wilhelm, D., Palmer, S. & Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews*, 87: 1–28. DOI: [10.1152/physrev.00009.2006](https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2006)

Wongtawan, T., Dararatana, N. & Onnkhanond, B. (2018). Zeta potential of bovine X and Y sperm and its application for sperm sorting. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 48(Suppl): O25–O26.

Wongtawan, T., Dararatana, N., Thongkittidilok, C., Kornmatitsuk, S. & Onnkhanond, B. (2020). Enrichment of bovine X-sperm using microfluidic dielectrophoretic chip: A proof-of-concept study. *Heliyon*, 6(11): e05483. Doi: [10.1016/j.heliyon.2020.e05483](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05483)

Xie, Y., Xu, Z., Wu, Z. & Hong L. (2020). Sex manipulation technologies progress in livestock: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*, 7: 481. Doi: 10.3389/fvets.2020.00481

Yata, V.K. (2022). Sperm sexing and its role in livestock production. *Animal Biotechnology Centre National Dairy Research Institute (NDRI) Karnal, Haryana, India. Springer Nature Singapore Pte Ltd.* ISBN: 978-981-19-1789-9 and 978-981-19-1790-5 (eBook). Doi: 0.1007/978-981-19-1790-5

Yonekawa, T., Notomi, T., Watanabe, K., Masubuchi, H., Okayama, H., Amino, N., et al. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28: E63. Doi: 10.1093/nar/28.12.e63.

DİŞİ HAYVANLARDA GENİTAL SİSTEM ANATOMİSİNE KLİNİK YAKLAŞIM

SÜLEYMAN YÜKSEL¹

Giriş

Veteriner hekimliği alanında dişi genital sistemi, vücudun en dinamik ve değişken sistemlerinden biri olarak öne çıkmaktadır. Bu sistemdeki anatomik değişiklikler yalnızca türler arasında değil, bireyler arasında da yaşa, hormonal döngüye ve gebelik durumuna bağlı olarak büyük değişiklikler gösterebilmektedir. Bahsi geçen nedenlerden ötürü dişi hayvanlarda genital sistemin anatomisinin anlaşılması üç boyutlu ve fonksiyonel bir kavrayış gerektirir (Dyce, Sack & Wensing, 2009).

Evcil memelilerde dişi üreme kanalı sırasıyla, ovaryum, tuba uterina (salphinx), uterus, cervix, vagina ve vulva'dan oluşan tübüler bir yapıdır (Dursun, 2008; Dyce, Sack & Wensing, 2009; König & Liebich, 2020). Bu yapıların morfolojik özellikleri yalnızca yapısal bütünlük sağlamakla kalmaz, gametlerin taşınması, fertilizasyon, implantasyon ve doğum gibi karmaşık süreçlerin de sorunsuz bir

¹ Dr. Öğretim Üyesi, Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Anatomi Anabilim Dalı Orcid: 0000-0001-9692-0546

şekilde yerine getirilmesi için fonksiyonel bir altyapı oluşturur (Hafez & Hafez, 2013).

Dişi genital sistem anatomisinin klinik yaklaşımla birlikte öğrenilmesi, cerrahi müdahaleler, tanısal görüntüleme teknikleri ve patolojik durumların belirlenmesi açısından, hekimin becerilerini doğrudan etkilemektedir (Noakes, Parkinson & England, 2019; König & Liebich, 2020). Özellikle vaskülarizasyon, innervasyon ve komşu organlar ile olan ilişkilerinin vurgulanması, yapılan müdahalelerde oluşabilecek komplikasyonların en aza indirilmesine ve doğru tanı konulmasına büyük katkı sağlayacaktır (Fossum, 2018).

Organa Genitalia Feminina

Dişi genital sistemin morfolojisi ve iç yapıları, vivipar memeli türlerinde üreme metodu ile doğrudan ilişkilidir. Bu sistem içerisinde bulunan organlar yalnızca dişi üreme hücresi olan ovum'un üretimini sağlamaz, fertilizasyon sonrasında oluşan embriyonunda beslenmesi ve korunmasında da görev yapmaktadır (Nickel, Schummer & Seiferle, 1973).

Pubertanın ardından erkek genital organları çok büyük değişiklikler geçirmezken, dişiler için bu durum biraz daha farklıdır. Vivipar memeli türlerinde yapılan bazı çalışmalar genç dişilerde verimliliğin daha yüksek olduğunu savunurken (Zemunik & ark., 2003), bazı çalışmalar ise birkaç gebeliğin ardından özellikle uterus'un gelişmesi ile tam reproduktif kapasitelerine ulaşabileceklerini ortaya koymuştur (Kennedy & Kennedy, 1972; Nickel, Schummer & Seiferle, 1973; Buthelezi & ark., 2024). Dişi hayvanların genital sistem anatomilerini etkileyen bir diğer büyük etken ise östrus siklusudur. Siklusun evrelerine göre özellikle ovaryum, uterus ve vagina'da belirgin morfolojik değişimler görülmektedir (Nickel, Schummer & Seiferle, 1973; Downey, 1980; Mendoza-Rodríguez, González-Mariscal & Cerbón, 2005).

Dişı genital sistem organları fonksiyonel ve morfolojik olarak; gametleri üreten ve gametlerin taşınmasını ve saklanması sağlayan organlar olarak iki sınıfa ayrılır. Gametlerin üretilmesini sağlayan organ ovaryum, gametlerin taşınmasını ve saklanması sağlayan, diğeri adıyla tübüler organlar ise sırasıyla tuba uterina (salphinx, oviduct), uterus ve kopulasyon organıdır. Kopulasyon organı ise kendi içerisinde vagina, vestibulum vagina, vulva ve clitoris olmak üzere kısımlara ayrılır (Nickel, Schummer & Seiferle, 1973; Dyce, Sack & Wensing, 2009; Dursun, 2008; König & Liebich, 2020).

Ovaryum

Dişı genital sisteminin reproduktif bezi olan ovaryumlar hem dişı germ hücrelerinin üretiminde hem de endokrin bez olarak görev yapmaktadırlar (Nickel, Schummer & Seiferle, 1973; Dyce, Sack & Wensing, 2009).

Köpek ve kedide ovaryumlar, embriyonal dönemde geliştikleri bölge olan böbreklerin caudalinde ve cavum abdominis'in dorsalinde bulunur (Nickel, Schummer & Seiferle, 1973; Dyce, Sack & Wensing, 2009; König & Liebich, 2020). Köpeklerde sağ ovaryum, sol ovaryuma göre daha cranialde yer alır ve genellikle sağ böbreğin caudal ucu ile temas halindedir (Evans & De Lahunta, 2012). Doğum yapmamış ineklerde ovaryumlar apertura pelvis cranialis'in lateralinde bulunur ancak doğum sayısı arttıkça cavum abdominis'in ventraline sarkarlar (Sisson & Grossman, 1975). Küçük ruminantlarda ise konum olarak ineğe fazlasıyla benzemekle birlikte tamamen cavum abdominis içerisinde ve 4. veya 5. vertebrae lumbales hizasında bulunurlar (Dursun, 2008). Kısıraklarda ovaryumlar ruminantlardan farklı olarak apertura pelvis cranialis'e oldukça uzakta, 4. ve 5. vertebrae lumbales'in processus transversus'larının hizasında ve dorsal tarafta yer alırlar. Bahsi geçen konum ise böbreklerin yaklaşık olarak 8-10

cm caudalinde denk gelmektedir (König & Liebich, 2020). Genç domuzlarda ise diğer evcil memeli türlerinde olduğu gibi böbreklerin caudalinde ve apertura pelvis cranialis'in önünde bulunan ovaryumlar, hayvan doğum yaptıkça ventrale doğru sarkarak bağırsak kıvrımları arasında kaybolabilir (Dyce, Sack & Wensing, 2009).

Ovaryumların türlere göre değişen anatomik konumu, jinekolojik muayene tekniklerinin seçimi ve cerrahi yaklaşımların planlanması açısından büyük klinik önem taşır. Özellikle köpek ve kedilerde ovaryumların böbreklerin hemen caudalinde ve karın boşluğunun derin dorsal bölümünde bulunması, rutin ovariohisterektomi girişimlerinde cerrahi erişimi güçleştiren başlıca nedenlerden biridir. Bu derin yerleşim nedeniyle ovaryumun insizyon hattına doğru mobilize edilebilmesi için ligamentum suspensorium ovarii'nin gevşetilmesi ya da koparılması gerektiği vurgulanmakta olup, bu gereklilik sağ ovaryumun daha kranial konumu nedeniyle daha belirgindir (Fossum, 2018; Tobias & Johnston, 2012).

Büyük hayvanlarda ise ovaryumların lokalizasyonu tanısal değerlendirmeyi doğrudan şekillendirir. Sığırlarda ovaryumların apertura pelvis cranialis'e yakın veya çok doğum yapmış hayvanlarda daha ventral konumda bulunması, rektal palpasyonla follikül, corpus luteum veya kistlerin değerlendirilmesi için önemli bir bilgidir. İlerleyen yaş ve çoklu gebelikler sonucunda ovaryumların uterusla birlikte cavum abdominis'in derinine sarkması, rektal muayenede cervix'in geri çekilerek ovaryumların palpe edilebilir konuma taşınmasını gerektirebilir (Noakes, Parkinson & England, 2019). Kısıraklarda ise ovaryumların vertebrae lumbales'in altında, böbreklere komşu ve oldukça yüksek bir konumda yer alması, rektal palpasyon sırasında elin daha dorsale yönlendirilmesini zorunlu kılar. Bu yüksek yerleşim, kısırak ovaryektomisinde, kolpotomi ya da laparoskopik yöntemlerin daha

uygun seçenekler olarak tercih edilmesine de temel oluşturur (McKinnon & ark., 2011; Auer & Stick, 2019).

Evcil memelilerde ovaryumun en dış yüzeyi tek sıralı kübik ya da yassı hücrelerden oluşan ve terminolojik olarak uzun süredir hatalı biçimde “germinatif epitel” olarak adlandırılan epithelium superficiale tarafından örtülüdür. Bu tabakanın hemen altında, ovaryuma yapısal bütünlük kazandıran ve yoğun bağ dokusundan oluşan tunica albuginea bulunur (Eurell & Frappier, 2013). Organın daha derindeki bölümü ise stroma ovarii olarak adlandırılır ve işlevsel birimler olan foliküller ile corpus luteum’u barındıran periferik cortex ovarii ile damar ve sinirlerden zengin merkezi medulla ovarii olmak üzere iki ana alana ayrılır (Banks, 1993).

Sığırlarda tunica albuginea, ovulasyon sırasında folikülün yırtılması gereken fiziksel bir bariyer görevi görür ve bu yapının anormal şekilde kalınlaşması veya foliküler gelişim döngüsündeki bozukluklar, ineklerde yaygın bir infertilite nedeni olan kistik ovaryum dejenerasyonu vakalarında folikülün çatlayamamasına ve kist oluşumuna neden olabilir (Peter, 2004).

Kısıraklarda ise embriyonik döneme özgü anatomik tersleşme nedeniyle korteks içte, medulla dışta yer alır ve tunica albuginea oldukça gelişmiştir. Bu yapısal farklılık sonucunda foliküller ve corpus luteum yüzeye doğru değil, organın merkezine doğru büyür. Bu büyüme şekli nedeniyle kısıraklarda corpus luteum rektal palpasyonla tespit edilemez ve ovulasyon yalnızca korteksin yüzeye ulaştığı tek bölge olan fossa ovulationis üzerinden gerçekleşir (Ginther, 1992; König ve Liebich, 2020). Ayrıca ovaryum yüzey epitelinin invaginasyonları, yaşlı köpeklerde karşılaşılan ve neoplazi riskini artıran inklüzyon kistlerinin gelişiminde önemli bir kaynak olarak kabul edilmektedir (McEntee, 1990).

Evcil memelilerde ovaryumların makroskobik yapısı; türün genetik özellikleri, hayvanın yaşı ve içinde bulunduğu seksüel siklus

evresine bağılı olarak sürekli değişen bir morfoloji sergiler. Domuzlarda follikulogeneze sırasında çok sayıda folikülün seçilmesi ve ovulasyonla birlikte fazla sayıda corpus luteum'un oluşması, ovaryum yüzeyinde belirgin lob lasyonlara yol açar. Bu durum, ovaryuma karakteristik bir "dut" ya da " z m salkımı" görünümü kazandırır (Driancourt, 2001; Dyce, Sack & Wensing, 2009).

 nekte ovaryum temel olarak badem şeklinde; ancak bu şekil seksüel siklus boyunca sabit kalmaz. Özellikle luteal fazda gelişen corpus luteum'un hacim olarak ovaryumun önemli bir kısmını kaplaması, yüzeyde dışa doğru belirgin çıkıntılar oluşturur ve ovaryumun oval yapıdan asimetrik ve düzensiz bir görünüme geçmesine neden olur (Pierson & Ginther, 1984; Sisson & Grossman, 1975). Bu genel morfolojik düzenlemenin önemli bir istisnasını ise kısıraklar oluşturur. Kısırak ovaryumunda korteks ve medullanın yer değiştirmiş olması, folikül ve corpus luteum gelişiminin organın merkezine doğru ilerlemesine yol açar; böylece ovaryum yüzeyi, fossa ovulationis dışında, diğer türlerden farklı olarak pürüzsüz ve fasulye biçimli görünümünü korur (Ginther, 1992; König & Liebich, 2020).

Yaş faktörü de morfolojiyi belirleyen önemli bir unsurdur; puberta öncesi dönemde düz olan yüzey, ilerleyen yaşla birlikte tekrarlayan ovulasyonların bıraktığı skar dokuları nedeniyle giderek daha düzensiz ve sert bir yapı kazanır (Hafez & Hafez, 2013).

Evcil memelilerde ovaryumlar, karın boşluğunun dorsal duvarına ve genital kanalın diğer bölümlerine, ligamentum latum uteri'nin özelleşmiş kıvrımları ile çeşitli fibromusküler bağlar aracılığıyla tutunur. Bu destek yapılarının temelini, ovaryumu dorsolateral yönde asarak a. ve v. ovarica'yı taşıyan mesovarium oluşturur. Bununla birlikte, klinik açıdan en belirgin türsel farklılık, özellikle köpek ve kedilerde ovaryumun kranial ucunu son iki costae'nın vertebral uçlarına ve diyaframın crus bölümüne bağlayan

güçlü ligamentum suspensorium ovarii üzerinde ortaya çıkar (Evans & De Lahunta, 2012). Karnivorlarda lig. suspensorium ovarii'nin sağlam ve gergin yapısı, ovariohisterektomi sırasında ovaryumun insizyon hattına doğru eksteriorize edilmesini güçleştiren başlıca anatomik faktördür. Karşılaştırmalı cerrahi çalışmalar, köpeklerde bu bağın kısa ve dirençli yapısının ovaryum pedikülüne güvenli ligatür konulmasını zorlaştırdığını ve bağın koparılması ya da gevşetilmesinin cerrahi erişim için zorunlu olduğunu bildirmektedir (Van Goethem & ark., 2003). Bununla birlikte, anestezi altındaki hastalarda bu bağın gerilmesi veya koparılması sırasında oluşan anisoseptif uyarımın kalp hızı ve kan basıncında belirgin artışlara neden olabileceği ve bu nedenle operasyonun bu aşamasında etkin analjezi sağlanmasının kritik olduğu belirtilmektedir (McMillan, 2016). Ruminantlar ve atlarda ise anatomik durum belirgin şekilde farklıdır. Sığırlarda lig. suspensorium ovarii büyük ölçüde körelmiş durumdadır; bu da ovaryumların daha caudal ve hareketli bir pozisyonda bulunmasına olanak tanır (Roberts, 1986; Noakes, Parkinson & England, 2019).

Bir diğer önemli sabitleyici unsur ise ovaryumun caudal kutbu ile uterus kornusunun ucunu birleştiren ligamentum ovarii proprium'dur (König & Liebich, 2020). Sığırlarda, rektal palpasyonda cornu uteri'nin izlenerek ligamentum ovarii proprium'a ulaşılması, ovaryumun lokalizasyonu için güvenilir bir anatomik kılavuz olarak kabul edilmektedir (Roberts, 1986; Noakes, Parkinson & England, 2019). Kısıraklarda ise mesovarium'un diğer türlere kıyasla oldukça uzun olması, ovaryuma geniş bir hareket olanağı kazandırır (Ginther, 1992). Bu özellik, laparoskopik ovariektomi sırasında ovaryumun manipülasyonunu kolaylaştırırken, rektal muayenede ovaryumun bazen bağırsak kıvrımları arasına yer değiştirmesine yol açarak lokalizasyonu zorlaştırabilir (Hendrickson, 2006).

Evcil memelilerde ovaryumların arteriyel beslenmesi temel olarak aorta abdominalis'ten ayrılan a. ovarica tarafından sağlanır. Ancak bu arterin ovaryuma doğru ilerlerken izlediği yol ve uterin damarlarla kurduğu ilişkiler, türler arasında reproduktif fiziyojijiyi doğrudan etkileyen önemli farklılıklar oluşturur.

Ruminantlar (inek, koyun, keçi) ve domuzlarda a. ovarica, ovaryuma yaklaşırken belirgin şekilde kıvrımlı bir yapı kazanır ve uterusun venöz dönüşünü sağlayan v. uteroovarica ile geniş bir komşuluk alanı oluşturur. Bu yakın anatomik ilişki, tanımlanan ters akım (counter-current) transfer mekanizması için yapısal temel sağlar. Bu mekanizma sayesinde endometriumdan salgılanan luteolitik PGF2 α , sistemik dolaşıma geçmeden doğrudan uterin venlerden a. ovarica'ya difüze olur ve böylece corpus luteum üzerinde hızlı ve doğrudan luteolitik etki gösterir (Ginther & Del Campo, 1974). Bu damar düzeneğinin bozulması durumunda PGF2 α 'nın yeterli düzeyde ovaryuma ulaşamaması, ineklerde persiste corpus luteum oluşumu gibi klinik tablolara yol açabilmektedir (McCracken & ark., 1972).

Kısraklarda ise bu vasküler organizasyon belirgin şekilde değişiklik gösterir. Kısraklarda a. ovarica daha düz bir seyir izler ve uterin ven ile olan teması oldukça sınırlıdır; dolayısıyla etkili bir lokal ters akım sistemi oluşmaz. Bu nedenle PGF2 α 'nın corpus luteum üzerinde luteolitik etki gösterebilmesi için sistemik dolaşımında daha yüksek konsantrasyonlara ulaşması gerekir (Ginther, 1992; Stabenfeldt & ark., 1981).

Karnivorlarda damar yapılarındaki asimetri cerrahi uygulamalarda kritik öneme sahiptir. Köpeklerde sol v. ovarica'nın v. renalis sinistra'ya, sağ v. ovarica'nın ise doğrudan vena cava caudalis'e açılması, özellikle sağ ovaryum pedikülünün ligatüründe yüksek basınçlı akım riski nedeniyle dikkat gerektirir (Evans & De Lahunta, 2012; MacPhail, 2013). Ayrıca a. ovarica ile a. uterina'nın

cranial dalı arasındaki güçlü anastomoz, ovaryumun cerrahi olarak çıkarılıp uterusun korunduğu operasyonlarda, uterin kanlanmanın devam etmesine neden olmaktadır (Arnold & ark., 2001).

Evcil memelilerde ovaryum parankiması ile tunica albuginea'dan başlayan lenf kılcalları, hilus bölgesinde birleşerek mesovarium içinde yoğun bir plexus oluşturur. Bu lenf damarları genellikle a. ovarica boyunca craniale yönelse de drenajın ulaştığı lenf merkezleri türler arasında farklılık gösterir (König & Liebig, 2020).

Karnivorlarda, özellikle köpek ve kedilerde, lenfatik akım daha cranial bir yöne sahiptir. Köpeklerde ovaryumdan gelen lenflerin doğrudan lnn. lumbales aortici'ye ve sıklıkla lnn. renales'e aktığı bildirilmiştir (Evans & De Lahunta, 2012). Bu durum klinik onkoloji açısından önemlidir; çünkü köpeklerde görülen granüloza hücreli tümörler veya ovaryum kaynaklı diğer malignitelerde metastazın ilk görüldüğü lenf yumruları, pelvis bölgesinde değil, böbreklere komşu nodlardır (McEntee, 1990).

Ruminantlar ve atlarda ise drenaj daha geniş ve dallı bir yapı gösterir. Sığırlarda ovaryuma ait lenflerin büyük bölümü lnn. lumbales aortici'ye yönelirken, bir kısmı lnn. iliaci mediales'e de ulaşabilir (Dyce, Sack & Wensing, 2009). Ayrıca fizyolojik dönemlere bağlı olarak lenf akımının değiştiği; örneğin östrus sırasında artan ovaryum hacmiyle birlikte lenfatik akışın hızlandığı, bunun da foliküler sıvı dinamiği ve ovulasyon sonrası ödemin çözülmesinde etkili olduğu ortaya konmuştur (Andersen, 1926; Morris & ark., 2010). Klinik olarak bu lenfatik yapı, uterustan ovaryuma ilerleyen enfeksiyonların taşınmasında alternatif bir yol olmakla birlikte, ovaryum kaynaklı hastalıkların yayılım paternini de ortaya koyar (Sisson & Grossman, 1975).

Tubuler Genital Organlar

Tübüler genital organlar tuba uterina, uterus, vagina, vestibulum vagina ve vulvadan oluşur. Bu yapıların türlere göre sınıflandırılmasında; Monotremata ve keseliler gibi ilkel memelilerde vagina duplex ve uterus duplex, tavşan ve kemirgen gibi daha gelişmiş türlerde vagina simplex ve uterus duplex, Türkiye’de veteriner anatomi eğitiminde ele alınan evcil memelilerde ise uterus bicornis tipi üreme kanalı görülür (Nickel, Schummer & Seiferle, 1973).

Tuba Uterina (Oviduct, Salpinx)

Evcil memelilerde salpinx veya oviduct olarak da adlandırılan tuba uterina, oositin ovaryumdan yakalanması, fertilizasyonun gerçekleşmesi ve erken dönemdeki embriyonun uterusu iletilmesini sağlayan kıvrımlı ve musküler bir kanaldır. Ligamentum latum uteri’nin bir kıvrımı olan mesosalpinx içerisinde yer alan bu organ, makroskopik olarak infundibulum, ampulla ve isthmus olmak üzere üç ana kısımda incelenir (Dyce, Sack & Wensing, 2009). Ovaryuma en yakın bölüm olan infundibulum, huni şeklinde olup serbest kenarında fimbriae adı verilen saçaklı uzantılar taşır; bu fimbrialar, ovulasyon sırasında oositi cumulus kütleleriyle birlikte ostium abdominale yönlendirerek kanala alır (Talbot & ark., 1999). Ampulla, kanalın en geniş ve kıvrımlı kısmı olup fertilizasyonun gerçekleştiği spesifik bölgedir. Buradan sonra daralan isthmus, kalın kas tabakası ile öne çıkar ve ampulla-isthmus birleşim bölgesi (ampullary-isthmic junction, AIJ), oosit ve embriyonun geçiş zamanlamasını düzenleyen fizyolojik bir sfinkter işlevi görür (Hunter, 2012). Isthmus epitelyum hücreleri ayrıca spermleri bağlayıp depolayarak 'sperm rezervuarı' işlevi görür; bu mekanizma, spermlerin ampullaya kontrollü geçişini sağlayarak polispermiyi önler (Hunter, 2012; Suarez, 2008).

Tuba uterina anatomisi türler arasında belirgin farklılıklar gösterir. Carnivorlarda tuba uterina ve ovaryum, bursa ovarica adı verilen periton kıvrımı içinde hapsolmuştur; bursa, ovaryumu çevreleyen yağ dokusu ile birleşerek sadece küçük bir açıklık bırakır ve cerrahi ulaşımı zorlaştırır (Evans & De Lahunta, 2012). Kısıraklarda UTJ, anatomik bir papilla üzerine açılır ve sadece döllenmiş embriyonun uterusu geçişine izin verir; döllenmemiş oositler bu bölgede tutulup dejenere olur (Weber & ark., 1991; Betteridge, 2000). Ruminantlarda UTJ, sperm seçiminde ilk bariyer olarak görev yaparken, mesosalpinx ile ovaryum arasında geniş ve açık bir bursa ovarica bulunur. İnce ve kıvrımlı lümen ile bursa arasındaki bu ilişki, tuba uterina'yı enfeksiyonlara ve tanısal görüntüleme hatalarına yatkın hale getirir (König & Liebich, 2020).

Klinik olarak tuba uterina patolojileri türlere özgü sorunlara yol açar. Sığırlarda, uterus enfeksiyonları tuba uterina'ya ulaşarak salpingitise neden olabilir; dar lümen ve inflamatuvar birikimler tıkanıklığı kolaylaştırır ve geniş bursa, periton veya bursa içinde fibrinöz adhezyonların oluşmasına zemin hazırlar; bu durum fimbria hareketini kısıtlayarak mekanik infertiliteye yol açabilir (McEntee, 1990; Noakes, Parkinson & England, 2019). Kısıraklarda paraovaryal kistler, fimbria yakınında sıkça görülür ve ultrasonografide erken dönem embriyonik vesiküllerle karışabilir; kistlerin sabit konumu ve büyümeme özelliği, mobilite kontrolü ile ayırt edilmesinde temel kriterdir (Ginther, 1992; König & Liebich, 2020). UTJ'de biriken döllenmemiş oositler ve hücrel döküntüler ise yaşlı kısıraklarda kollajen tıkaçlar oluşturarak lümeni tıkayabilir (Allen & Wilsher, 2011).

Karnivorlarda ise bursa ovarica'nın ovaryumu tamamen sarması ve bol yağ dokusu içermesi, OHE sırasında ovaryumun tamamen çıkarılmasını görsel olarak zorlaştırır; bursa içinde kalan mikroskobik ovaryum parçaları revaskülarize olarak ovaryum

kalıntısı sendromuna ve hayvanın tekrar östrus göstermesine yol açabilir (Hunter, 2012; Fossum, 2018).

Evcil memelilerde tuba uterina'nın beslenmesi, mesosalpinx içerisinde seyreden ve ramus tubarius olarak adlandırılan damarlar tarafından sağlanır. Bu vasküler ağ, ovaryumu besleyen arteria ovarica ile uterusu besleyen arteria uterina'nın dalları arasında kurulan güçlü bir anastomoz sisteminden köken alır (Dyce, Sack & Wensing, 2009). Türler arasındaki temel fark, bu anastomozun derecesi ve damarların kıvrım yapısında ortaya çıkar.

Carnivorlarda, arteria ovarica'dan ayrılan ramus tubarius, tuba uterina boyunca caudale doğru ilerler ve arteria uterina'nın kranial dalı ile doğrudan birleşir. Evans & De Lahunta (2012), köpeklerdeki bu anastomozun oldukça geniş çaplı olduğunu ve ovaryumun cerrahi olarak alındığı durumlarda, geride kalan tuba uterina ve cornu uteri'nin beslenmesinin a. uterina yoluyla kesintisiz devam edebildiğini belirtir. Ancak bu güçlü bağlantı, ovariohisterektomi operasyonlarında pedikül ligatürlerinin gevşemesi durumunda retrograd kanama riskini artırır; zira kan hem ovaryum tarafından hem de uterus tarafından basınçla gelmeye devam eder (Fossum, 2018).

Ruminantlarda ve domuzlarda ise vasküler yapı daha karmaşıktır. Tuba uterina'yı besleyen arteriyel dallar, arteria ovarica'nın aşırı kıvrımlı yapısından çıkar. Ginther & Del Campo (1974), bu bölgedeki arter ve venlerin birbirine çok yakın seyrettiğini ve tuba uterina'nın venöz kanının, ovaryumun venöz drenajı ile plexus pampiniformis benzeri bir ağ oluşturarak vena cava caudalis'e döküldüğünü göstermiştir. Klinik açıdan bu venöz ağın bütünlüğü, lokal hormon transportu için hayati öneme sahiptir. Cerrahi manipülasyonlar sırasında mesosalpinx damarlarının zedelenmesi, sadece kanamaya değil, aynı zamanda post-operatif fibrinöz adhezyonlara da yol açar. Tuba uterina çevresinde oluşan bu

ince yapışıklıkların, fimbria hareketini kısıtlayarak infertiliteye neden olan en yaygın iyatrojenik komplikasyon olduğu belirtilmiştir (McEntee, 1990).

Kısıraklarda ise arteria ovarica'nın daha düz seyirli olması ve mesosalpinx'in geniş yapısı, damarların izolasyonunu kolaylaştırır. Ancak kısıraklarda venöz genişlemelerin tuba uterina duvarında daha sık görülmesi, yaşlı hayvanlarda lümen daralmalarına ve olası transport bozukluklarına predispozisyon oluşturabilir (Ginther, 1992).

Evcil memelilerde tuba uterina'nın lenfatik drenajı, vasküler yapıya paralel çift yönlü bir akış paterni izler. Tunica mucosa ve tunica serosa'dan kaynaklanan lenf kılcalları, mesosalpinx'te birleşerek zengin bir plexus oluşturur. Genel olarak, organın cranial segmentinin lenfleri ovaryum damarlarına katılarak doğrudan lnn. lumbales aortici'ye yönelirken, caudal segmentin lenfleri uterin lenf ağıyla birleşip lnn. iliaci mediales veya türüne bağlı olarak lnn. hypogastrici'ye dökülür (König & Liebich, 2020).

Türler arası farklılıklar, klinik yaklaşımları belirler. Carnivorlarda tuba uterina'nın lenf akışı çoğunlukla cranial yöndedir ve arteria ovarica'yı izleyerek böbreklerin caudalındaki lenf düğümlerine ulaşır (Evans & De Lahunta, 2012). Bu anatomik düzen, ovaryum kaynaklı tümörlerin tuba uterina'ya veya tam tersi yönde yayılımının, pelvis girişindeki lenf düğümlerinden ziyade, retroperitoneal ve palpasyonu zor abdominal nodlara olacağını gösterir (Withrow & ark., 2013).

Memelilerde lenfatik sistem, organ hacminin ve ödemin kontrolünde kritik rol oynar. Östrus sırasında mesosalpinx'te artan kan akışı ile ortaya çıkan transudat ve ödemin uzaklaştırılmasında lenfatik drenaj önemlidir (Hunter, 2012). Klinik açıdan ise, özellikle ineklerde uterus enfeksiyonlarının lenfojen yolla tuba uterina'ya taşınması salpingitis ve hydrosalpinx'e neden olabilir; lenf

drenajının inflamasyon veya yapışıklıklar nedeniyle engellenmesi, silyar aktivitenin bozulmasına ve oosit transportunun aksamasına yol açarak kalıcı infertiliteye neden olabilir (McEntee, 1990; Noakes, Parkinson & England, 2019).

Uterus

Evcil memelilerde uterus, embriyonun implantasyonu, beslenmesi ve doğum sırasında dışarı atılmasını sağlayan, içi boş, musküler ve genişleyebilen bir organdır. Cavum pelvis ile cavum abdominis sınırında yer alan uterus, cornu, corpus ve cervix olmak üzere üç ana bölümden oluşur; bu bölümlerin büyüklük ve şekilleri türün politok (çoklu doğum) veya monotok (tekli doğum) olmasına bağlı olarak değişiklik gösterir (Dyce, Sack & Wensing, 2009).

Cornua uteri, politok türlerde çok sayıda fetüse yer sağlayacak şekilde uzamıştır. Karnivorlarda kornular düz ve ‘V’ harfi biçimindeyken, domuzlarda bağırsak kıvrımlarını andıran uzun kornular görülür (König & Liebich, 2020). Ruminantlarda kornular, kendi üzerlerine kıvrılarak karakteristik “koç boynuzu” formunu alır ve dorsal ile ventral ligamentum intercornuale rektal palpasyonda uterusun fiksasyonu ve manipülasyonu için güvenilir bir referans noktası oluşturur (Noakes, Parkinson & England, 2019). Kısırakta ise kornular daha kısa ve küt uçludur, uterus genellikle ‘T’ veya ‘Y’ biçimindedir.

Tavşan ve kemirgenlerde corpus uteri yoktur; karnivorlar ve domuzlarda çok kısa iken, kısıraklarda yaklaşık 20 cm uzunluğundadır; gebeliğin büyük kısmı burada gerçekleşir (Ginther, 1992). Cervix uteri, uterusun vajinaya açıldığı ve dış ortamdan izolasyonu sağlayan sfinkter yapısıdır. İneklerde lümeni kapatan 3–4 adet plicae circulares bulunur ve suni tohumlama kateterinin geçişi bu sirküler yapılar nedeniyle zordur. Domuzlarda servikal mukoza, pulvini cervicales adı verilen ve fermuar gibi birbirine kilitlenen yastıkçıklar oluşturur. Kısırak ve köpekte ise mukoza plicae

longitudinales yapar. Ayrıca kısırakların serviksi östrus sırasında belirgin şekilde gevşeyip yere doğru sarkar (Hafez & Hafez, 2013).

Uterus genel olarak vesica urinaria'nın dorsalinde ve rektum'un ventralinde yer alır. Boş uterus, inek ve kısıraklarda pelvis boşluğu girişinde veya hemen önünde bulunurken, carnivorlarda cornular böbreklerin caudalinden başlayarak lumbal bölge boyunca karın boşluğuna uzanır. Gebelik ilerledikçe, tüm türlerde uterus ventrale doğru hareket eder; ineklerde ileri gebelikte sağ karın duvarına yaslanması tipiktir (Sisson & Grossman, 1975).

Uterus duvarı üç katmandan oluşur. Perimetrium (tunica serosa), ligamentum latum uteri'nin devamı olan periton katmanıdır. Myometrium (tunica muscularis) dışta longitudinal, içte sirküler kas liflerinden oluşur; bu katmanlar arasında damarların bulunduğu zengin bir stratum vasculare yer alır ve doğum sırasında oksitosin etkisiyle güçlü kasılmaları sağlar. Myometrial aktivitenin kalsiyum kanalları üzerinden düzenlendiği ve doğum güçlüklerinde bu katmanın yorgunluğunun birincil faktör olduğu belirtilmiştir (Wray & Prendergast, 2019). Endometrium (tunica mucosa) fonksiyonel tabakadır. Ruminantlarda endometrium yüzeyinde bez içermeyen mantar şeklinde çıkıntılar olan carunculae bulunur ve plasentanın fetal kotiledonları buraya tutunarak placentome'u oluşturur (Senger, 2012). Kısıraklarda endometriumda endometrial cups adı verilen ve fetal kökenli trofoblast hücrelerinden oluşan geçici yapılar şekillenir, bu yapılar gebeliğin 35–120. günleri arasında eCG salgılayarak ikincil corpus luteum'ların oluşumunu destekler (Allen & Wilsher, 2011).

Uterusta, özellikle diöstrus döneminde köpeklerde endometrium bezlerinin kistik dejenerasyonu ve bakteriyel enfeksiyon sonucu pyometra oluşur; eğer bu durumda serviks kapalıysa uterus rüptür riski taşır (Fossum, 2018). İneklerde, uterusun asıcı bağlarının gevşekliği ve cornuların asimmetrik

büyümesi gebelik sırasında torsiyona yol açabilir; rektal palpasyonda ligamentum latum'un gergin ve çapraz olarak palpe edilmesi tanı konulmasında önemlidir (Roberts, 1986). Cerrahi yaklaşımda ise anatomik katmanlar belirleyicidir; ineklerde genellikle fossa paralumbalis sinistra ile curvatura majör uteri üzerinden insizyon yapılırken (Schultz & ark., 2008), köpeklerde linea alba üzerinden corpus veya cornu açılır (Conze & ark., 2022).

Evcil memelilerde uterus, cavum abdominis ve cavum pelvis içinde ligamentum latum uteri tarafından asılı olarak konumlanır. Bu iki yapraklı parietal periton kıvrımı, uterus cornuları, gövdesi ve serviksi boyunca lateral karın duvarı ve pelvis yan duvarına tutunarak organı destekler (Dyce, Sack & Wensing, 2009). Bağın yapısı ve içerdiği fibromusküler bantlar, türler arasındaki klinik farklılıkları belirler.

Ruminantlarda, özellikle ineklerde, ligamentum latum uteri cornular boyunca spiral bir kıvrım gösterir ve dorsal ile ventral olarak yerleşmiş Ligamentum intercornuale uterusun manipülasyonu, geri çekilmesi ve fiksasyonu için güvenilir bir referans noktasıdır (Noakes, Parkinson & England, 2019). Ancak ventral karın duvarına sınırlı tutunması, uterusun mobilitesini artırır; gebeliğin son döneminde bu asimetrik asılma, uterusun kendi ekseninde dönmesine yol açabilecek bir predispozisyon oluşturur (Frazer & ark., 1996).

Carnivorlarda, özellikle köpekte, ligamentum latum uteri bol miktarda yağ dokusu içerir ve cerrahi sırasında damarların görünmesini güçleştirir. Uterusun asıcı sisteminde öne çıkan yapı, ovaryumun caudalinden başlayıp canalis inguinalis aracılığıyla vulva dudaklarının deri altına kadar uzanan ligamentum teres uteri'dir. Bu bağ, nadiren inguinal fıtıkların içeriğine uterusun dahil olmasına sebep olabilir (Evans & De Lahunta, 2012).

Kısraklarda ligamentum latum, lumbal bölgeye daha dorsal ve yüksek bir noktadan tutunur, bu da uterusun karın boşluğu içinde daha gergin ve yukarıda durmasını sağlar. Sonuç olarak, kısraklarda uterus torsiyonu ineklere göre daha az görülse de torsiyon meydana geldiğinde ligamentin gerginliği nedeniyle doku nekrozu ve strangülasyon hızla ilerler (Ginther, 1992; König & Liebich, 2020).

Evcil memelilerde uterusun arteriyel beslenmesi, üç ana arterin anastomotik ağıyla sağlanmaktadır. Cranialde arteria ovarica, corpus boyunca arteria uterina ve caudalde arteria vaginalis (Dyce, Sack & Wensing, 2009).

Ruminantlarda, özellikle sığırlarda arteria uterina genellikle arteria iliaca interna'nın dalı olan arteria umbilicalis'ten köken almaktadır. Gebeliğin ilerlemesiyle damar duvarında artan kan akışı ve elastik gerilim, damar üzerinde palpasyonla hissedilebilen ve fremitus uteri olarak adlandırılan karakteristik titreşimleri oluşturur. Bu titreşimler, rektal palpasyonda gebeliğin 90-120. günleri arasında güvenilir bir kardinal belirti olarak kullanılır (Bollwein & ark., 2016; Noakes, Parkinson & England, 2019).

Kısraklarda ise arteria uterina, sığırlardan farklı olarak arteria iliaca externa'dan veya doğrudan aortadan ayrılır. Yaşlı ve çok doğum yapmış kısraklarda damar duvarının dejenerasyonu, doğum sırasında intra-abdominal basınç değişiklikleri sonucunda anevrizma ve yırtılma riski artar. Bu nedenle arteria uterina rüptürü, kısraklarda doğum sonrası ani ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir ve cerrahi müdahale sırasında kontrolü oldukça zordur (Munsterman, 2021; Auer & Stick, 2019).

Carnivorlarda ise arteria uterina, arteria vaginalis'in bir dalı olarak gelişir. Pyometra gibi inflamatuvar durumlarda uterus duvarındaki damarlar belirgin şekilde genişler; cerrahi sırasında servikal ligatürlerin gevşemesi durumunda arteria ovarica ile

kurulan güçlü anastomozlar nedeniyle retrograd kanamalar ciddi ve potansiyel olarak ölümcül olabilir (Fossum, 2018).

Vagina ve Vestibulum

Evcil memelilerde kopulasyon organı ve doğum kanalının son kısmı olan tübüler sistemin son kısmı, anatomik ve fonksiyonel olarak iki ana segmente ayrılır: Serviksten ostium urethrae externum'a kadar uzanan vagina (vagina propria) ve ostium urethrae externum'dan vulva dudaklarına kadar uzanan hem genital hem de üriner sistemin ortak açıklığı görevi gören vestibulum vaginae (König & Liebich, 2020).

Carnivorlarda, vagina ve vestibulum anatomisi suni tohumlama ve sistoskopik muayenelerde zorluk çıkarabilir. Köpek vajinası karına doğru uzundur ve mukoza tavanında plica mediana dorsalis adlı belirgin bir kıvrım vardır; bu yapı kateter yönlendirilmesini yanıltabilir ve serviks girişini gizleyebilir (Moxon & ark., 2025). Vestibulumun duvarındaki bulbus vestibuli, erektile bir dokudur ve çiftleşme sırasında "kilitlenme" mekanizmasına katkı sağlar (Dyce, Sack & Wensing, 2009).

Ruminantlar ile domuzda bölgede üretra açıklığının hemen altında diverticulum suburethrale bulunur. Kateter uygulamasında, sondanın ucu bu anatomik boşluğa yanlışlıkla girebilir; kateter devam ettirilmeye zorlanırsa perforasyona ve idrarın periton boşluğuna sızmasına yol açabilir (Turner & Alibhai, 2022). Bu riski önlemek için, ineklerde kateterizasyon sırasında divertikulumun parmakla kapatılması veya sondanın dorsale yönlendirilmesi önerilir (Sedeek & ark., 2009).

Bazı türlerde vestibulum duvarlarında bulunan bezler de önemli patolojik potansiyel taşır. Örneğin inek ve kedilerde glandulae vestibulares majores (Bartholin bezleri) bulunur; bu

bezlerin kistik dejenerasyonu (Bartholin kisti) üreme performansını olumsuz etkileyebilir (Noakes, Parkinson & England, 2019).

Evcil memelilerde vagina ve vestibulum, ovaryum veya uterus gibi belirgin bir mesenteriumla karın tavanına asılı değildir. Bu organların pelvik boşluktaki stabilitesi, çevresel fiksasyon mekanizmaları aracılığıyla sağlanır; bunlar arasında pelvik fasya, retroperitoneal bağ dokusu ve perineal kas grubu (m. constrictor vestibuli ve m. constrictor vulvae) yer alır. Ancak bu yapısal desteklerin gücü ve esnekliği türlere göre değişiklik gösterir ve çeşitli klinik predispozisyonlara zemin hazırlar (Dyce, Sack & Wensing, 2009).

Ruminantlarda, vagina ve vestibulumun çevresindeki paravajinal bağ dokusu ile pelvik fasya, östrojen ve relaksin hormonlarının etkisiyle özellikle gebeliğin son döneminde belirgin biçimde gevşer. Bu gevşeme, karın içi basınç artışıyla birleştiğinde vajinal tabanın caudale kaymasına ve vajinal prolapsusa yol açabilir. Miesner & Anderson (2008), özellikle Hereford ve Simental ırkı ineklerde bu anatomik değişikliğin önemli bir risk faktörü olduğunu bildirmiştir. Bunlar dışında vajinanın gevşek fiksasyonu da doğum sonrası uterus prolapsusu için de uygun bir ortam yaratır.

Kısıraklarda perineal destek anatomisi pozisyonel öneme sahiptir. Vagina ve vestibulumun birleşim yeri olan vestibulovajinal halka, centrum tendineum perinei tarafından desteklenir ve bu yapı anüs ile vulva arasındaki fibromusküler düğüm işlevi görür. Yaşlı veya çok doğum yapmış kısıraklarda bu destek zayıflayabilir; anüs kraniale doğru çöker ve vulvanın dorsal kısmı yataylaşır. Bu konformasyon bozukluğu, havanın ve dışkı partiküllerinin vestibulum içine girmesine yol açar ve kısırak infertilitesinin başlıca nedenlerinden biri olarak kabul edilir. Bu nedenle Caslick operasyonu ile vulva dudaklarının cerrahi olarak kapatılması yaygın bir tedavi yöntemidir (Pascoe, 1979; Auer & Stick, 2019).

Karnivorlarda (köpek) vestibulumu çevreleyen fiksasyon, esas olarak kas tonusuna bağlıdır. *M. constrictor vestibuli*, çiftleşme sırasında *bulbus glandis*'in kilitlenmesini sağlar. Ancak proöstrus ve östrus döneminde östrojen artışı, vajinal mukozada ödem ve şişkinliğe yol açar. Bazı köpeklerde vagina tabanının ventraldeki gevşek fiksasyonu, ödemli dokunun vulvadan sarkmasına izin verir ki bu durum sıklıkla gerçek prolapsus ile karıştırılabilir (Johnston & ark., 2001).

Evcil memelilerde vagina ve vestibulumun arteriyel beslenmesi, pelvik boşluğun ana damarı olan *arteria iliaca interna*'nın iki dalı aracılığıyla sağlanır. Bu dallardan biri, vagina duvarını besleyen *arteria vaginalis*; diğeri ise daha caudalde vestibulum ve vulvayı besleyen *arteria pudenda interna*'dır. Bu damarların kökenleri ve oluşturdıkları vasküler yataklar, türler arasında cerrahi yaklaşımı doğrudan etkileyen önemli farklar gösterir (Dyce, Sack & Wensing, 2009).

Carnivorlarda, *arteria vaginalis*'in seyri, uterus cerrahisinde kritik öneme sahiptir. *Arteria uterina*, büyük hayvanların aksine doğrudan ana damar olarak değil, *arteria vaginalis*'in bir dalı şeklinde ortaya çıkar. Bu durum, vagina ve uterus damarları arasında güçlü bir kollateral dolaşım yaratır ve ovariohisterektomi veya vajinal tümör cerrahilerinde kanamanın hem cranial hem caudal uçlardan basınçlı şekilde gelmesine yol açar. Ayrıca, köpeklerde *bulbus vestibuli* gelişmiş bir erektil doku içerir ve venöz drenajı yoğun bir plexus aracılığıyla *v. pudenda interna*'ya bağlanır (Evans & De Lahunta, 2012).

Kısıraklarda, vestibulum yan duvarlarındaki vasküler yapı klinik açıdan travmatik perineal yaralanmalarda önem kazanır. Köpeklerdeki *bulbus vestibuli*'ye homolog olan bu yapı, daha geniş bir venöz plexus oluşturur. Bu venöz ağ, zor doğumlar veya Caslick operasyonları sırasında yırtılırsa, kontrolü güç ve masif kanamalara

yol açabilir. Ayrıca yaşlı kısıraklarda vena pudenda interna dallarında varisleşmeler sık görülür ve bu durum doğum kanalında spontan rüptür riskini artırır (Ginther, 1992; Auer & Stick, 2019).

Ruminantlarda, arteria vaginalis ve arteria uterina arasındaki caudal anastomozlar, geniş bir vasküler ağ oluşturarak uterus ve vajinanın beslenmesine katkı sağlar. Bu zengin kanlanma, vajinal prolapsus onarımları veya derin vajinal yırtıkların cerrahi dikilmesi sırasında iyileşmeyi hızlandırırsa da cerrahi sahada görülen sızıntı tarzı kanamalar teknik zorluklar yaratabilir (Noakes, Parkinson & England, 2019).

Vulva ve Clitoris

Vulva (pudendum femininum) ve erektile doku karakteri taşıyan organ clitoris, türler arasında anatomik farklılıkların en belirgin olduğu alanlardandır. Vulva dudakları (labia pudendi) arasındaki açıklık (rima pudendi), dışkı ve hava kaynaklı kontaminasyona karşı ilk savunma hattını oluştururken; commissura ventralis’de bulunan clitoris, hem duyuşal işlev görür hem de patojenler için potansiyel bir rezervuardır (König & Liebich, 2020).

Kısıraklarda clitoris yapısı, uluslararası at taşımacılığı ve üreme yönetimi açısından belirleyicidir. Glans clitoridis, fossa clitoridis adı verilen derin bir mukozal çukur içerisinde yer alır ve dorsal ile lateral yüzeylerde sinus clitoridis adı verilen kör keseler bulunur. Bu anatomik yapılar, Taylorella equigenitalis (Bulaşıcı At Metritisi-CEM) bakterisinin saklanması için uygun mikro-aerofilik ortam sağlar, bu nedenle asemptomatik taşıyıcı kısıraklarda bu bölgelerden sürüntü alınması zorunludur (Schulman & ark., 2013).

Ruminantlarda vulva dudakları kalın ve küt uçludur ve commisura ventrale’de karakteristik bir kıl çıkıntısı bulunur. Clitoris, özellikle freemartin tanısında klinik öneme sahiptir. Dövelerde erkek ikizinin hormonlarına maruz kalma durumunda

clitoris androjenik etkiyle büyür ve vulvadan dışarı sarkarak penise benzeyen bir yapı oluşturur; bu durum infertilitenin erken fiziksel göstergesidir (Padula, 2005).

Karnivorlarda clitoris, derin bir fossa clitoridis içinde bulunur ve yağ dokusu açısından zengin vulva dudaklarıyla örtülüdür. Bazı köpeklerde glans clitoridis içerisinde kemikleşmiş bir yapı (os clitoridis) görülebilir. Klinik açıdan sık karşılaşılan durum, dışardan uygulanan steroidler veya adrenal tümörler (Cushing Sendromu) nedeniyle gelişen yalancı hermafroditizm ve clitoral hipertrofidir (Feldman & Nelson, 2015).

Vulva ve clitoris, pelvik boşluğun ana arteriyel gövdesi arteria iliaca interna'dan ayrılan terminal dal arteria pudenda interna tarafından beslenir. Bu damar, perineal bölgeye ulaştığında vulva dudaklarını besleyen ramus labialis ile clitorisin erektile dokusunu besleyen arteria clitoridis dallarını verir (Dyce, Sack & Wensing, 2009). Klinik açıdan ise daha önemli olan arter sistemi değil, türler arasında farklılık gösteren venöz plexus yoğunluğu ve erektile doku dağılımıdır.

Kısıraklarda vasküler anatomi obstetrik ve cerrahi açıdan en yüksek riski taşır. Vulva ve vestibulum duvarları, yoğun venöz ağlardan oluşan ve erektile doku özellikleri taşıyan bulbus vestibuli ile çevrilidir. Yaşlı kısıraklarda bu venöz yapıların varisleşme eğiliminde olduğu, zor doğum veya vulvoplasti sırasında bu genişlemiş venöz göletlerin yırtılması sonucunda şiddetli perineal hematomlara yol açabildiği bildirilmiştir (Auer & Stick, 2019). Ayrıca CEM eradikasyonu için yapılan klitoral sinüslerin çıkarılması sırasında elektrokoterizasyonun hemostaz açısından zorunlu olduğu vurgulanmıştır (Schulman & ark., 2013).

Karnivorlarda, vasküler yapı epizyotomi tekniğini doğrudan şekillendirir. Köpeklerde vulva dudaklarının yan duvarları, gelişmiş bulbus vestibuli ve güçlü kavernöz erektile dokular içerir. Bu nedenle

median hatttan yapılan insizyonlar cerrahide altın standart olarak kabul edilmektedir; lateral insizyonların ise kanama açısından risk taşıdığı belirtilmiştir (Fossum, 2018).

Ruminantlarda vulva ve clitorisın venöz drenajı, vena pudenda interna üzerinden gerçekleşir; ancak periparturient dönemde oluşan ödem damarların konumunu değiştirebilir. İneklerde vulva veya vajina yırtıklarında, arteria clitoridis'in yüzeyel dallarının hasar görmesi, doğum sonrası inatçı sızıntı kanamalarıyla sık karşılaşılan bir neden olarak bildirilmiştir (Noakes, Parkinson & England, 2019).

Kaynakça

Allen, W. R., & Wilsher, S. (2011). The equine oviduct: Structure, function and surgical intervention. *Equine Veterinary Education*, 23(5), 248-250.

Andersen, D. H. (1926). *Lymphatics and blood-vessels of the ovary of the sow* (Contributions to Embryology, Vol. 17, No. 88). Washington, DC: Carnegie Institution.

Arnold, S., Reichler, I., & Hubler, M. (2001). Ovariectomy vs. ovariectomy. *Veterinary Medicine*, 11, 4-11.

Auer, J. A., & Stick, J. A. (2019). *Equine surgery* (5th ed.). St. Louis, MO: Elsevier.

Banks, W. J. (1993). *Applied veterinary histology* (3rd ed.). St. Louis, MO: Mosby.

Betteridge, K. J. (2000). Comparative aspects of equine embryonic development. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 691-702.

Bollwein, H., Weber, F., Wulff, D., & Janett, F. (2016). Uterine blood flow during pregnancy in cows. *Theriogenology*, 86(1), 220-226.

Buthlezi, N. L., Mtileni, B., Nephawe, K. A., Modiba, M. C., Mpedi, H., Idowu, P. A., & Mpofu, T. J. (2024). Effects of parity, season of birth, and sex on within-litter variation and pre-weaning performance of F1 Large White× Landrace pigs. *Veterinary World*, 17(7), 1459.

Conze, T., Büttner, K., & Wehrend, A. (2022). Parameters in canines after cesarean sections. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, Article 886691.

Downey, B. R. (1980). Regulation of the estrous cycle in domestic animals—a review. *The Canadian Veterinary Journal*, 21(11), 301.

Driancourt, M. A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55(6), 1211-1239.

Dursun, N. (2008). *Veteriner anatomi II*. Ankara: Medisan Yayınevi.

Dyce, K. M., Sack, W. O., & Wensing, C. J. G. (2009). *Textbook of veterinary anatomy* (4th ed.). St. Louis, MO: Elsevier Health Sciences.

Eurell, J. A., & Frappier, B. L. (2013). *Dellmann's textbook of veterinary histology* (6th ed.). Ames, IA: Wiley-Blackwell.

Evans, H. E., & De Lahunta, A. (2012). *Miller's anatomy of the dog* (4th ed.). St. Louis, MO: Elsevier Health Sciences.

Feldman, E. C., & Nelson, R. W. (2015). *Canine and feline endocrinology and reproduction* (4th ed.). St. Louis, MO: Elsevier.

Fossum, T. W. (2018). *Small animal surgery* (5th ed.). Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences.

Frazer, G. S., Fubini, S. L., & Ward, D. E. (1996). Uterine torsion in cattle: Clinical observations and anatomic considerations. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 10(5), 298–303.

Ginther, O. J. (1992). *Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects* (2nd ed.). Cross Plains, WI: Equiservices Publishing.

Ginther, O. J., & Del Campo, C. H. (1974). Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the

uterus: Cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 35(2), 193-203.

Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (Eds.). (2013). *Reproduction in farm animals* (7th ed.). Philadelphia, PA: John Wiley & Sons.

Hendrickson, D. A. (2006). Laparoscopic ovariectomy in the standing mare. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 22(3), 735-750.

Hunter, R. H. F. (2012). The oviduct of the horse: Structure and function. *Equine Veterinary Journal*, 44(S44), 1-9.

Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R., & Olson, P. N. S. (2001). *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia, PA: Saunders.

Kennedy, T. G., & Kennedy, J. P. (1972). Effects of age and parity on reproduction in young female mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, 28(1), 77-84.

König, H. E., & Liebich, H. G. (2020). *Veterinary anatomy of domestic animals: Textbook and color atlas* (7th ed.). Stuttgart, Germany: Thieme.

MacPhail, C. (2013). Surgery of the reproductive system. In T. W. Fossum (Ed.), *Small animal surgery* (4th ed., pp. 780-834). St. Louis, MO: Mosby.

McCracken, J. A., Carlson, J. C., Glew, M. E., Goding, J. R., Baird, D. T., Green, K., & Samuelsson, B. (1972). Prostaglandin F_{2α} identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nature New Biology*, 238(83), 129-134.

McEntee, K. (1990). *Reproductive pathology of domestic mammals*. San Diego, CA: Academic Press.

McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., & Varner, D. D. (2011). *Equine reproduction* (2nd ed.). Ames, IA: Wiley-Blackwell.

McMillan, M. (2016). Pain behaviors in anesthetized animals. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 43(5), 459-460.

Mendoza-Rodríguez, C. A., González-Mariscal, L., & Cerbón, M. (2005). Changes in the distribution of ZO-1, occludin, and claudins in the rat uterine epithelium during the estrous cycle. *Cell and Tissue Research*, 319(2), 315-330.

Miesner, M. D., & Anderson, D. E. (2008). Management of uterine and vaginal prolapse in the bovine. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(2), 409-419.

Morris, B. (2010). Lymphatic drainage of the ovary. In P. C. K. Leung & E. Y. Adashi (Eds.), *The ovary* (3rd ed., pp. 29-41). San Diego, CA: Academic Press.

Moxon, R., Freeman, S. L., Payne, R. M., Corr, S., & England, G. C. (2025). A prospective study investigating the health outcomes of bitches neutered prepubertally or post-pubertally. *Animals*, 15(2), 167.

Munsterman, A. (2021). Hemorrhage and shock in the post-parturient mare. In K. A. Sprayberry & N. E. Robinson (Eds.), *Robinson's current therapy in equine medicine* (8th ed., pp. 697-701). St. Louis, MO: Elsevier.

Nickel, R., Schummer, A., & Seiferle, E. (1973). *The viscera of the domestic mammals*. Berlin, Germany: Springer-Verlag.

Noakes, D. E., Parkinson, T. J., & England, G. C. W. (2019). *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics* (10th ed.). London, UK: Saunders.

Padula, A. M. (2005). The freemartin syndrome: An update. *Animal Reproduction Science*, 87(1-2), 93-109.

Pascoe, R. R. (1979). Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the

mare. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 27, 299-305.

Peter, A. T. (2004). An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(1), 1-7.

Pierson, R. A., & Ginther, O. J. (1984). Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*, 21(3), 495-504.

Roberts, S. J. (1986). *Veterinary obstetrics and genital diseases* (Theriogenology). Woodstock, NY: S.J. Roberts.

Schulman, M. L., May, C. E., Keys, B., & Guthrie, A. J. (2013). Contagious equine metritis: Artificial insemination, antibiotic treatment and elimination of carrier state. *Equine Veterinary Journal*, 45(S45), 12-16.

Schultz, L. G., Tyler, W. S., & Moll, H. D. (2008). Surgical approaches for cesarean section in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), 129–136.

Sedeek, A. M., Bakr, H. A., & Hassan, M. S. (2009). Retrograde catheterization of the urinary bladder of calves. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 55(121), 1-12.

Senger, P. L. (2012). *Pathways to pregnancy and parturition* (3rd ed.). Redmond, OR: Current Conceptions.

Sisson, S., & Grossman, J. D. (1975). *The anatomy of the domestic animals* (5th ed.). Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company.

Stabenfeldt, G. H., Kindahl, H., Hughes, J. P., Neely, D. P., Liu, I., & Pascoe, D. (1981). Control of luteolysis in the mare. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum*, 77, 159-170.

Suarez, S. S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update*, 14(6), 647-657.

Talbot, P., Geiske, C., & Knoll, M. (1999). Oocyte pickup by the mammalian oviduct. *Molecular Biology of the Cell*, 10(1), 5-8.

Tobias, K. M., & Johnston, S. A. (2012). *Veterinary surgery: Small animal*. St. Louis, MO: Elsevier Saunders.

Turner, A., & Alibhai, H. (2022). *Small animal and large animal clinical techniques*. St. Louis, MO: Elsevier.

Van Goethem, B., Schaefers-Okkens, A., & Kirpensteijn, J. (2003). Making a rational choice between ovariectomy and ovari hysterectomy in the dog: A discussion of the benefits of either technique. *Veterinary Surgery*, 32(2), 136-143.

Weber, J. A., Woods, G. L., Freeman, D. A., & Vanderwall, D. K. (1991). Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. *Biology of Reproduction*, 45(4), 544-548.

Withrow, S. J., Vail, D. M., & Page, R. L. (2013). *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology* (5th ed.). St. Louis, MO: Elsevier.

Wray, S., & Prendergast, C. (2019). The myometrium: From excitation to cellular coupling and the changes associated with labour. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, 231, 23–45.

Zemunik, T., Peruzovic, M., Capkun, V., Zekan, L., Tomic, S., & Milkovic, K. (2003). Reproductive ability of pubertal male and female rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, 871-877.

SIĞIRLARDA REPRODÜKTİF BİYOTEKNOLOJİLER

**BARIŞ ATALAY USLU¹
SALİH NARLIÇAY²**

Giriş

Sığır yetiştiriciliği, dünya genelinde hem et hem de süt üretiminin temel dayanak noktalarından biri olup, hızla artan nüfus, gıda güvenliği gereksinimleri ve sürdürülebilir üretim beklentileri ile birlikte önemli bir dönüşüm sürecine girmiştir. Bu dönüşümün merkezinde reprodüktif biyoteknolojiler yer almakta, özellikle son 20 yılda bu teknolojiler klasik uygulamaların ötesine geçerek genetik ilerleme, sürü verimliliği, hastalık direnci ve ekonomik karlılık gibi alanlarda stratejik bir araç haline gelmiştir (Moore & Hasler, 2017: 10314). Bugün artık sığır yetiştiriciliğinde rekabet gücü büyük ölçüde, işletmelerin biyoteknolojik yenilikleri ne ölçüde etkin ve sürdürülebilir bir şekilde uygulayabildiğine bağlıdır (Granleese & ark., 2015: 2) (Moore & Hasler, 2017: 10314).

¹ Prof. Dr., Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Orcid: 0000-0003-1866-932X

² Dr. Öğretim Üyesi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Orcid: 0000-0001-8043-3807

Historik olarak reprodüktif biyoteknolojiler; östrus senkronizasyonu, suni tohumlama, süperovulasyon ve embriyo transferi uygulamaları ile şekillenmiştir. Bu teknolojiler sürü verimliliğinde devrim niteliğinde gelişmeler sağlamış, özellikle suni tohumlama sayesinde genetik materyalin küresel ölçekte hızlı ve ekonomik biçimde yayılmasına olanak tanımıştır. Ancak günümüzde reprodüktif biyoteknolojilerin kapsamı bu klasik uygulamaların çok ötesine geçmiştir. Modern yaklaşımlar artık ovum pick-up ve in vitro embriyo üretimi (OPU–IVEP), genomik seleksiyon, sperm ve embriyo cinsiyetlendirme, kriyoprezervasyon teknolojileri, mikroakışkan sperm seçim sistemleri, non-invaziv embriyo değerlendirme yöntemleri ve CRISPR temelli gen düzenleme uygulamaları ile genişlemiştir (DeJarnette & ark., 2011: 3477) (Moore & Hasler, 2017; 10315) (Ferré & ark., 2020: 991).

Güncel araştırmalar ayrıca hayvan refahı, çevresel sürdürülebilirlik ve iklim değişikliği ile mücadele gibi kavramları da reprodüktif biyoteknolojilerle ilişkilendirmektedir. Genetik ilerleme sayesinde daha az sayıda hayvandan daha yüksek verim elde edilmesi, işletmelerin karbon ayak izinin azalmasına katkı sağlamaktadır. Hastalık direnci artırılmış hatların geliştirilmesiyle ilaç kullanımını azaltmaktadır. Bu yönüyle reprodüktif biyoteknolojiler, yalnızca üretim verimliliğini değil, aynı zamanda küresel sürdürülebilirlik hedeflerini destekleyen bir araç olarak öne çıkmaktadır (Devolder, 2021: 3) (McManus, Paiva & Faria, 2020: 481) (Workman, Heaton & Vander Ley, 2025: 1).

Klasik Reprodüktif Biyoteknolojiler

Sığır yetiştiriciliğinde reprodüktif verimliliğin artırılmasına yönelik büyük olarak sayılabilecek biyoteknolojik gelişmeler, östrus kontrolü, suni tohumlama ve süperovulasyon temelli embriyo transferi uygulamalarıyla başlamıştır. Bu teknikler, modern üretim sistemlerinin temelini oluşturmuş ve günümüzde halen sıklıkla

kullanılmaktadır. Klasik biyoteknolojiler olarak adlandırılan bu uygulamalar genetik ilerleme hızını artırmakla birlikte sürü yönetimini daha sürdürülebilir hale getirmiştir (Windsor & Agerholm, 2009: 193) (Toral & ark., 2023: 288) (Silva & ark., 2024: 2).

Östrus senkronizasyonu: Sığırların doğal östrus siklusu ortalama 21 gün sürmekte, östrus süresi ise ortalama 12–18 saat arasında değişmektedir. Yüksek verimli ineklerde daha kısa ve sessiz östruslar görülebildiğinden, östrus belirtilerine dayanarak tohumlama yapmak güç olabilmektedir. Senkronizasyon uygulamaları bu sorunu ortadan kaldırarak sabit zamanlı tohumlamayla hayvanların belirlenen saatte tohumlanması sağlanmaktadır (Semacan & ark., 2015: 29).

Senkronizasyon protokollerinin temeli ovaryumun hormonal olarak düzenlenmesine dayanmaktadır. Progesteron implantları luteal fazı taklit ederek ovulasyonu baskılar. İmplantın çıkarılması ve PGF₂ α uygulamasıyla progesteron düzeyi hızla düşer. Bu hormonal ortam dominant folikülün graaf folikülüne olgunlaşmasını sağlayarak zamanlanmış ovulasyonun gerçekleşmesine olanak tanımaktadır (Pursley & ark., 1997: 296).

Ovsynch, Pre-Synch–Ovsynch ve Double-Ovsynch gibi protokoller, ovulasyonun belirli bir zaman aralığında kontrol edilmesini sağlar ve özellikle büyük sürülerde tohumlamanın planlı şekilde yapılmasına yardımcı olur. İş gücü kullanımını kolaylaştırır ve gebelik oranlarının daha homojen yönetilmesine katkı sağlar (Pursley & ark., 1997: 299). Çalışmalar, Double-Ovsynch gibi gelişmiş protokollerin özellikle düvelerde ve doğum sonrası ineklerde gebelik oranlarını artırdığını göstermektedir (Giordano & ark., 2012: 644) (Carvalho, Wiltbank & Fricke, 2015: 8805).

Östrus senkronizasyonu amacının yalnızca tohumlama başarısını artırma olarak değerlendirilmemektedir. Doğum–ilk

tohumlama aralığı, gebelik elde etme süresi ve buzağılama aralığı gibi reprodüktif parametreleri de iyileştirmektedir. Östrus göstermeyen veya metabolik stres yaşayan ineklerde ovaryum aktivitesinin yeniden başlamasına yardımcı olarak yüksek verimli süt ineklerinde avantaj sağlamaktadır (Bisinotto. Ribeiro & Santos, 2014; 154)

Suni tohumlama: Sığır yetiştiriciliğinde boğadan alınan spermanın doğal çiftleşme olmaksızın dişilere uygulanmasıyla fertilizasyonun sağlandığı en temel reprodüktif biyoteknolojilerden biridir. Genetik ilerlemenin hızlandırılması ve hastalık kontrolünün güçlendirilmesi açısından modern sığır yetiştiriciliğinin merkezinde yer almaktadır. Suni tohumlamada zamanlama büyük önem taşımaktadır. Östrus tespitine dayalı geleneksel uygulamalar zamanlama hatalarına açık olduğundan, günümüzde östrus senkronizasyon protokolleri ile kombine edilen sabit zamanlı suni tohumlama yaklaşımı yaygın şekilde kullanılmaktadır (Ambrose, Colazo & Kastelic, 2010: 391).

Genetik ilerleme yönünden suni tohumlama, modern ıslah programlarının temelini oluşturmaktadır. Genomik seleksiyon sayesinde genç boğaların genetik değeri yüksek doğrulukla belirlenebilmekte ve performans göstermeden tohumlama programlarına dahil edilebilmektedir. Böylece nesil aralığı kısaltmakta, süt verimi, döl verimi, hastalık direnci ve yapısal özellikler gibi çok sayıda parametre üzerinde hızlı genetik kazanımlar elde edilmektedir (Bouquet & Juga 2013: 706).

Suni tohumlama, hastalık kontrolü açısından da önemli avantaj sunmaktadır. Doğal çiftleşme ile bulaşabilen birçok genital enfeksiyonun riski azalmakta; işletmelerde boğa bulundurma gerekliliğinin ortadan kalkması hem biyogüvenliği hem de iş güvenliğini artırmaktadır. Ayrıca boğaların agresif davranışlarına bağlı yaralanmaların önlenmesi hayvan refahı ve işletme güvenliği

açısından önemli bir katkı sağlamaktadır (Pryce & Daetwyler 2012: 109) (VanRaden 2020: 5298).

MOET ve Embriyo Transferi: MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer), genetik olarak üstün dişilerden kısa sürede daha fazla embriyo elde etmeyi amaçlayan ve sığır ıslah programlarının temelini oluşturan klasik bir embriyo üretim yöntemidir. Bu yöntemde donör hayvanlarda FSH veya FSH etkili hormon uygulamaları ile çoklu ovulasyon oluşturulmakta, ardından doğal çiftleşme veya suni tohumlama ile fertilizasyon sağlanmaktadır (Araujo & ark., 2009: 382). Fertilizasyonu takiben 7. günde uterus yıkaması yapılarak kompakt morula ve blastosist dönemindeki embriyolar elde edilmektedir. Blastosist aşamasındaki embriyolar taze olarak transfer edilebilmekte ya da kriyoprezervasyon ile daha sonra kullanılmak üzere saklanabilmektedir (Lee & ark., 2012: 168).

MOET'in başarısı, donörün fizyolojik durumu, FSH protokolüne verdiği yanıt, tohumlama zamanı ve uterus yıkama tekniği gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (Araujo & ark., 2009: 380). Süperovulasyon yanıtı hayvandan hayvana farklılık gösterebilmekte, donör bazında elde edilen embriyo sayısı 4-10 arasında değişebilmektedir (Silva & ark., 2018: 442). Süperovulasyon ile embriyo transferi uzun yıllar boyunca embriyo temelli ıslah çalışmalarında "altın standart" yöntem konumunda bulunmuştur. Elde edilen embriyolar, genetik değeri yüksek hatların hızla çoğaltılmasına olanak tanımakta ve sürü içi genetik homojenliği artırmaktadır (Ferré & ark., 2020: 1000) (Singla & Singh, 2022: 207).

Klasik embriyo transferi ise donörden elde edilen embriyoların senkronize edilmiş taşıyıcı ineklere nakledilmesi esasına dayanmaktadır. Alıcı ineklerde luteal fazın donörle uyumlu olması embriyonun tutunması için kritik önem taşımaktadır. Transfer

işlemi genellikle korpus luteumun bulunduğu kornu uteri tarafına gerçekleştirilmekte ve başarı oranları embriyo kalitesi, alıcı inek kondisyonu ve uygulayıcının deneyimine bağlı olarak değişmektedir. Taze embriyolar genellikle dondurulmuşlara kıyasla daha yüksek gebelik oranları sağlamaktadır (Roque & ark., 2013; 6).

Hastalık kontrolü açısından da avantaj sunmakta, embriyo yoluyla patojen taşınma riskinin sperma ve canlı hayvan hareketlerine göre çok daha düşük olması biyogüvenliği artırmaktadır. Bu nedenle genetik materyalin uluslararası hareketliliğinde embriyo transferi güvenilir bir seçenek olarak değerlendirilmektedir (Wrathall, 1995: 85) (Givens, Gard & Stringfellow, 2007: 301). Son yıllarda OPU–IVP gibi modern embriyo üretim teknikleri MOET’in yerini kısmen alıyor olsa da MOET halen birçok ülkede donör seçiminde, genetik materyal üretiminde ve ticari damızlık programlarında aktif şekilde kullanılmaktadır. Özellikle dondurulmuş embriyo ticareti, yerli ırkların korunması ve adaptasyon kapasitesi yüksek hayvanların çoğaltılmasında klasik embriyo transferi önemli rol oynamaya devam etmektedir (Ferré & ark., 2020: 992).

OPU ve IVEP Sistemleri

Sığır yetiştiriciliğinde genetik kapasitesi yüksek donörlerden haftada 2 kez oosit toplanmasına ve bu oositlerin laboratuvar koşullarında fertilize edilerek embriyoya dönüştürülmesine olanak sağlayan embriyo üretim tekniği olarak tanımlanmaktadır. OPU işlemi ile donör hayvandan ultrason eşliğinde foliküler aspirasyon yapılmakta, elde edilen oositler laboratuvarda olgunlaştırılmakta, fertilize edilmekte ve in vitro kültür koşullarında embriyo gelişimi sağlanmaktadır (Galli & ark., 2001: 1342) (Bols & Stout, 2018: 212).

OPU–IVP sistemi, donörün fizyolojik döngüsünden bağımsız olarak düzenli aralıklarla oosit toplanmasına olanak sağlar ve özellikle haftada iki kez yapılan OPU uygulamalarının blastosist

sayısını artırdığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Ferré & ark 2023: 366). Bu özellik, MOET'e kıyasla çok daha sık embriyo üretilebilmesini ve genetik olarak üstün hayvanların verimliliğinin belirgin şekilde artırılmasını sağlamaktadır. Ayrıca OPU-IVP, süperovulasyon yanıtı zayıf olan veya yaşça genç-daha küçük folikül rezervine sahip donörlerde de etkili sonuçlar verebilmektedir (Looney & ark., 1994: 71) (Majerus & ark., 1999: 1172) (Galli & ark., 2001: 1343)

İn vitro embriyo üretiminde, donörden OPU ile elde edilen oositler önce laboratuvar ortamında olgunlaştırılmakta ve olgunlaşmış oositler uygun medyumlar içinde hazırlanmış sperm ile fertilize edilmektedir. Fertilizasyonun ardından zigotlar, gelişim sürecini desteklemek üzere özel olarak formüle edilmiş kültür medyumlarına aktarılmakta ve embriyo gelişimi düşük oksijen konsantrasyonunda, enerji substratlarının optimize edildiği kontrollü inkübasyon koşullarında takip edilmektedir (Kocyigit & Cevik, 2015: 65). Bu süreçte kullanılan modern laboratuvar sistemleri sıcaklık, gaz dengesi ve pH gibi kritik parametreleri sürekli olarak sabit tutarak embriyoların fizyolojik ortama en yakın koşullarda gelişmesine olanak tanımakta, embriyo kalitesi anlık olarak değerlendirilebilmektedir. Bu aşamaların tamamı, in vitro ortamda erken embriyo gelişimini mümkün kılan standart ve kontrollü bir üretim süreci oluşturmaktadır (Bavister & Poole, 2005: 128) (Gatimel & ark., 2020: 1025).

İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

ICSI, tek bir spermin mikromanipülatör yardımıyla oosit sitoplazmasına doğrudan enjekte edilmesi esasına dayanan ileri bir fertilizasyon tekniği olarak adlandırılmaktadır. İşlemin başarısı; oosit maturasyon seviyesi, sperm nükleer bütünlüğü, enjeksiyon mikro iğnesinin kalibrasyonu ve oosit aktivasyon protokolünün tür-spesifik olarak optimize edilmesi gerekmektedir (García-Roselló ve

ark., 2009: 143). Laboratuvar uygulamasında ilk basamak, metafaz II (MII) evresine ulaşmış oositlerin kumulus hücrelerinden hyaluronidaz kullanılarak tamamen soyulması ve polar cisimcik lokalizasyonu ile içcik (spindle) bölgesinin belirlenmesidir. Spindle bölgesine zarar verilmemesi için enjeksiyon pipeti genellikle ikinci polar cisimciğin karşı kutbundan yapılmaktadır (García-Roselló ve ark., 2009: 145).

Spermin hazırlanması aşamasında, epididimal veya ejekülat kökenli spermler mikropipet ile tutulabilecek tek hücre formatına getirilmektedir. Enjeksiyona geçilmeden hemen önce spermin plazma membranı mekanik olarak immobilize edilmektedir. (López-Saucedo ve ark., 2012: 132). Mikropipet uç çapı yaklaşık 3–10 µm olacak şekilde ayarlanır ve zona pellucida, negatif basınç uygulamasıyla minimal deformasyon oluşturacak şekilde penetre edilir. Bu aşamada pipet ucunun oolemma'yı geçerken kısa bir geri sıçrama hareketi gözlenmesi, membran bütünlüğünün açıldığını doğrulayan kritik bir gösterge olarak bildirilmektedir (Suttner & ark., 2000: 937) (López-Saucedo ve ark., 2012: 131).

ICSI'nin en önemli avantajı, fertilizasyonun gerçekleşmesi için çok az sayıda sperm hücresine ihtiyaç duyulmakta ve bu süreçte akrozomal reaksiyona gerek duyulmadığı bildirilmektedir. Bu nedenle epididimal spermler, testiküler spermatidler ve kriyoprezervasyon sonrası motilitesi düşmüş spermler bile fertilizasyon için kullanılabilir (Briski & Salamone, 2022: 3).

Genomik Seleksiyon, Sperm/Embriyo Cinsiyetlendirme ve Embriyo Genotipleme

Genomik seleksiyon, modern sığır ıslah programlarında hayvanların genetik değerlerinin DNA düzeyinde belirlenmesini sağlayan en gelişmiş yöntemlerden biri olarak öne çıkmaktadır. Bu yaklaşımda hayvanlardan alınan biyolojik örneklerden yüksek yoğunluklu tek nükleotidli polimorfizm (SNP) çipleri ile genotipleme

yapılmakta ve elde edilen genomik veriler fenotipik kayıtlar ve soy bilgisiyle birleştirilerek Genomik Tahminli Üreme Değeri (GEBV) hesaplanmaktadır (Hayes & ark., 2009: 2) (Erbe & ark., 2012: 4115) (Baby & ark., 2014: 1541). Genomik seleksiyon sayesinde genç boğaların ve düvelerin performans göstermesine gerek kalmadan genetik kapasiteleri yüksek doğrulukla belirlenebilmekte, böylece nesil aralığı kısaltmakta ve süt verimi, reproduktif verim, canlı ağırlık artışı, mastitis direnci ve doğum kolaylığı gibi çok sayıda özelliğe yönelik hızlı ve kontrollü genetik ilerleme sağlanmaktadır. Günümüzde birçok ülkede boğa katalogları genomik değerlere dayalı olarak oluşturulmakta ve çiftlik içi eşleşme kararları bu verilere göre planlanmaktadır (García-Ruiz & ark., 2016: E3396) (Doublet & ark., 2019: 3) (Gutierrez-Reinoso & ark., 2021: 10).

Spermilerin X ve Y kromozomuna göre ayrılması ise sürü yönetiminde genetik ve ekonomik hedeflerin daha etkili şekilde gerçekleştirilmesini sağlayan önemli bir biyoteknolojidir. Bu işlemden X ve Y kromozomu taşıyan sperm, flow sitometri kullanılarak DNA içerikleri arasındaki %3–4'lük fark temelinde ayrılmakta ve böylece %90'ın üzerinde doğrulukla dişi veya erkek buzağı elde edilmesi mümkün olabilmektedir (Johnson & Welch, 1999: 1323) (Garner, 2006: 945). X kromozom sperm seçilmesi özellikle süt sığırcılığında dişi düve ihtiyacını karşılamak için tercih edilmekte, erkek sperması ise etçi işletmelerde besi materyali üretiminde kullanılmaktadır. Cinsiyetlendirilmiş spermanın dondurma-çözme sonrası motilitesi ve fertilizasyon kapasitesi konvansiyonel spermaya göre bir miktar düşmekte, ancak günümüzde geliştirilen düşük basınçlı ayırma teknikleri ve optimize edilmiş sulandırıcılar bu dezavantajı azaltmaktadır (Schenk & ark., 1999: 1381) (Anel-López & ark., 2017: 209).

Embriyo cinsiyetlendirme ise genellikle embriyonun morula veya erken blastosist döneminde biyopsi alınarak yapılmaktadır. Embriyo biyopsisinde trofoektodermden birkaç hücre alınmakta ve

PCR temelli yöntemlerle X veya Y kromozomuna özgü gen bölgeleri çoğaltılarak embriyonun cinsiyeti belirlenmektedir. Bu teknik, özellikle kıymetli donörlerden elde edilen embriyoların hedeflenen cinsiyette buzağılar oluşturulmasına olanak tanımakta ve ekonomik açıdan yüksek değer taşımaktadır (Shea, 1999: 843) (Riera & ark., 2019).

Embriyo genotipleme, reproduktif biyoteknolojiler içinde en hızlı gelişen alanlardan biri olarak öne çıkmaktadır. Embriyo biyopsisinden elde edilen çok küçük hücre örnekleri genom amplifikasyonu (WGA) teknikleri kullanılarak çoğaltılmakta, ardından yüksek yoğunluklu SNP analizleri ile embriyonun genomik profili çıkarılmaktadır (Treff & ark., 2011: 336) (Volozonoka, Miskova & Gailite, 2022: 3). Bu yöntem sayesinde embriyoların GEBV'leri transfer öncesinde belirlenmekte ve sadece genetik olarak üstün bireylerin alıcı ineklere transfer edilmesi mümkün olmaktadır. Bu yaklaşım hem ekonomik verimliliği artırmakta hem de genetik seleksiyon basıncını güçlendirmektedir. Embriyo genotipleme ayrıca resesif genetik hastalıkların eliminasyonunda, taşıyıcı bireylerin tespitinde ve genetik çeşitliliğin korunmasında önemli avantajlar sunmaktadır (Shojaei Saadi & ark., 2014: 2) (Mullaart & Wells, 2018: 81) (Oliveira & ark., 2023: 5).

OPU–IVP sistemi, genomik seleksiyon ve embriyo biyopsisi ile birleştirildiğinde sürü ıslah programlarında büyük avantaj sağlamaktadır. Embriyo düzeyinde genotipleme yapılabilen, böylece sadece genetik olarak istenen özelliklere sahip embriyolar transfer edilmektedir (Kadarmideen & ark., 2018: 391) (Mullaart & Wells, 2018: 92).

Sperm hücresinin cinsiyetlendirilme işlemi, embriyo biyopsisi ve genomik seleksiyon tekniklerinin OPU–IVP sistemleriyle entegre şekilde kullanılması sığır ıslahında yeni bir dönemi temsil etmektedir (Humblot & ark., 2010: 6). Donörlerden

elde edilen oositlerin IVP ile embriyoya dönüştürülmesi, embriyoların genotiplenmesi ve hedeflenen bireylerin seçilerek transfer edilmesi, sürülerde hızlı ve kontrollü bir genetik ilerleme sağlamaktadır. Bu kombinasyon, özellikle ticari damızlık işletmelerinde ekonomik verimliliği belirgin şekilde yükseltmekte ve reproduktif biyoteknolojilerin en güçlü bileşimi olarak karşımıza çıkmaktadır (Sirard, 2018: R5) (Mueller & Van Eenennaam, 2022: 3).

Gelişmiş Sperm ve Embriyo Değerlendirme Yöntemleri

Günümüzde sperm ve embriyo değerlendirme yöntemleri klasik mikroskopik gözlemin ötesine geçmiş bulunmakta ve hücresel fonksiyonları daha detaylı düzeyde analiz eden gelişmiş teknolojiler kullanılmaktadır. Bu teknolojiler spermanın yalnızca motilitesini değil aynı zamanda membran bütünlüğünü, akrozomal yapısını, mitokondriyal aktivitesini, DNA bütünlüğünü ve metabolik profilini ayrıntılı biçimde değerlendirmektedir (Üstüner & ark., 2021: 27) (Bucak & ark., 2024: 4). Embriyolarda ise morfolojik değerlendirmenin ötesine geçilerek gelişim dinamikleri, metabolik aktiviteleri, genetik yapıları ve biyokimyasal işaretleyicileri objektif olarak analiz edilmektedir (Aydiner, Yetkin & Seli, 2010: 209) (Perkel & ark., 2015: 828) (Zhao & ark., 2021: 1373).

Bilgisayar destekli sperm analiz sistemi (CASA), sperm hareketinin objektif ve yüksek doğrulukla değerlendirilmesini sağlamaktadır. CASA sistemleri toplam ve progresif motiliteyi ölçmekte, ayrıca VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH ve BCF gibi kinematik parametreleri ayrıntılı biçimde kaydetmektedir. Bu parametreler spermanın fertilizasyon yeteneği ile yakından ilişkili olduğundan, CASA kullanımı fertilite tahmininde önemli avantaj sunmaktadır. CASA ayrıca dondurma-çözme protokollerinin optimizasyonunda, farklı sulandırıcı ve antioksidan uygulamalarının karşılaştırılmasında ve boğa seçiminde yaygın şekilde

kullanılmaktadır (Bucak & ark., 2024: 2) (Güngör & ark., 2025: 3) (Acısu & ark., 2025: 11).

Flow sitometri, spermanın hücresel yapısını ve fonksiyonel durumunu analiz etmekte kullanılan en güçlü teknolojilerden biri haline gelmiştir. Membran bütünlüğü, akrozom bütünlüğü, mitokondriyal membran potansiyeli, reaktif oksijen türleri düzeyi ve DNA bütünlüğü gibi parametreler floresan boyalar ile işaretlenmekte ve yüksek hassasiyetle ölçülmektedir (Tanga & ark., 2021: 1257). Spermilerin canlılık oranı PI veya SYBR-14 gibi boyaarla değerlendirilmekte; mitokondriyal aktivite JC-1 ile belirlenmekte; DNA fragmentasyonu TUNEL veya özel DNA kitleri ölçülebilmektedir. Flow sitometri, sperm kalitesinin klasik mikroskopik değerlendirmeye kıyasla çok daha ayrıntılı ve objektif olarak belirlenmesine olanak tanımaktadır (Cenariu & ark., 2023: 47).

Embriyo değerlendirme yöntemlerinde de önemli gelişmeler sağlanmaktadır. Morfolojik değerlendirme embriyo kalitesini anlamada sınırlı kalmakta ancak günümüzde anlık görüntüleme sistemleri ile embriyonun gelişim hızı, bölünme zamanları, sitoplazmik düzensizlikleri ve blastomer davranışları ayrıntılı biçimde takip edilmektedir. Bu sistemler, embriyo gelişiminin kritik dönemlerini anlık olarak kaydetmekte ve implantasyon başarı oranı ile ilişkili erken göstergelerin belirlenmesine yardımcı olmaktadır (Siristatidis & ark., 2015: 568) (Zaninovic, Irani & Meseguer, 2017: 723).

Omics teknolojileri (transkriptom, proteom ve metabolom analizleri) embriyo değerlendirmesinde giderek daha fazla kullanılmaktadır. Embriyo kültür medyumunda salınan metabolik ürünlerin analizi, embriyonun fizyolojik durumunu non-invaziv şekilde yansıtmaktadır. Metabolomik profiller embriyonun enerji kullanımını, oksidatif stres seviyesini ve gelişme potansiyelini

göstermekte; proteomik analizler ise embriyo kalitesini belirleyen moleküler işaretleyicilerin tanımlanmasını mümkün kılmaktadır. Transkriptom profilinin çıkarılması, gelişim potansiyeli yüksek embriyoların belirlenmesinde kritik bilgiler sunmaktadır (Thompson, Brown & Sutton-McDowall, 2015: 42) (Eldarov & ark., 2022: 16).

Son yıllarda yapay zeka ve makine öğrenimi algoritmaları sperm ve embriyo değerlendirme süreçlerinde önemli rol oynamaya başlamıştır. Yapay zeka destekli analiz sistemleri sperm hareketlerini otomatik olarak sınıflandırmaktadır. Embriyo görüntülerini yüksek doğrulukla değerlendirerek implantasyon potansiyelini tahmin etmektedir. Anlık görüntülerle birleştirildiğinde embriyonun morfolojik verilerini analiz etmekte ve blastosist gelişim başarısını öngörmektedir. Bu teknolojiler sayesinde değerlendirme süreci daha objektif, hızlı ve standart hale gelmektedir (Baldán, García-Gil & Fernandez-Basso, 2025: 1) (Phiphattanaphiphop, Letsakul, & Phatthanakun, 2025: 5).

Oosit ve Embriyo Kriyoprezervasyonunda Güncel Yaklaşımlar

Oosit ve embriyo kriyoprezervasyonu, reproduktif biyoteknolojilerin en kritik bileşenlerinden biri olarak hem genetik materyalin uzun süre korunmasını hem de embriyo transfer programlarının esnek bir şekilde yürütülmesini mümkün kılmaktadır. Kriyoprezervasyonun temel prensibi hücre içindeki suyun kontrollü biçimde uzaklaştırılması, buz kristali oluşumunun engellenmesi ve hücre yapılarının -196°C’de stabil şekilde korunmasıdır. Günümüzde kullanılan iki ana yöntemi kontrollü yavaş dondurma ve vitrifikasyon oluşturmaktadır. Vitrifikasyon, yüksek konsantrasyonda kriyoprotektan kullanılarak hücrenin camsı bir faza hızla geçirilmesini hedeflemekte ve özellikle oositlerde dondurma sonrası zararları azaltması nedeniyle yaygınlaşmaktadır

(Mogas, García-Martínez & Martínez-Rodero, 2024: 2)
(Netshirovha & ark., 2024).

Oosit kriyoprezervasyonu embriyoya kıyasla daha zorlu bir süreç oluşturmaktadır. Oositlerde büyük hücre hacmi, yüksek su içeriği, kortikal granüllerin duyarlılığı ve mayoz durumda olması soğuğa karşı hassas olması dondurma sonrası zarar riskini artırmaktadır. Bu nedenle modern protokoller oosit ağ yapısının korunmasına yönelik antioksidanlar, sitoskeletal stabilizatörler ve düşük toksisiteli kriyoprotektan kombinasyonları kullanılmaktadır (Coticchio & ark., 2007: 27). Son dönem çalışmalarda EG + DMSO kombinasyonlarının düşük dozlu kullanımı, sücroz ile desteklenen dehidrasyon süreçleri ve oosit çevresindeki zona pellucida bütünlüğünü koruyan hızlı soğutma teknikleri yaygın olarak değerlendirilmektedir (Reyes Palomares & Rodriguez-Wallberg, 2022: 2). Ayrıca mature (IVM) edilmiş oositlerde vitrifikasyon sonrası gelişim oranlarının, Mayoz II aşamasındaki toplanmış oositlere göre farklılık gösterdiği bilinmekte ve protokoller bu farklılıklara göre optimize edilmektedir (Khalili & ark., 2017: 1418).

Embriyo kriyoprezervasyonu ise oosite kıyasla daha başarılı sonuçlar vermektedir. Embriyoların hücre yapıları dondurmaya daha dayanıklı olmakta ve özellikle kompakt morula ve blastosist evreleri kriyoprotektana karşı daha toleranslı olduğu bilinmektedir. Güncel uygulamalarda hem yavaş dondurma hem de vitrifikasyon kullanılmakla birlikte, vitrifikasyon hızlı işlem süresi, yüksek canlılık oranı ve saha uygulamalarına uyumlu doğrudan transfer edebilme protokolleri nedeniyle daha yaygın hale gelmektedir (Pereira & Marques, 2008: 268).

Kriyoprezervasyon yaklaşımlarında kullanılan kriyoprotektanların toksisitesini azaltmaya yönelik stratejiler de önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Gliserol, etilen glikol, propilen glikol ve DMSO gibi hücre içine girebilen ajanlarla uygun

dozlarda kombine edilmekte, sükröz ve trehaloz gibi hücre dışına etki eden ajanlarla dehidrasyonu desteklenmektedir. (Hochi, 2022: 3).

Embriyo kriyoprezervasyonunda yeni eğilimlerden biri de non-invaziv embriyo değerlendirmesi ile kriyoprezervasyon entegrasyonu olmaktadır. Kriyoprezervasyondan önce embriyonun gelişim kinetiğinin, metabolik profilinin ve omics verilerinin incelenmesi çözdürme sonrası gelişim potansiyelinin daha doğru tahmin edilmesini sağlamaktadır. (Eldarov & ark., 2022: 6) (Rabel & ark., 2023: 13).

CRISPR ve Diğer Gen Düzenleme Teknolojilerinin Sığırlarda Kullanımı

Gen düzenleme teknolojileri, sığır yetiştiriciliğinde genetik ilerlemenin hızlandırılmasına, hastalık direncinin artırılmasına ve hayvan refahı ile çevresel sürdürülebilirliğin geliştirilmesine yönelik devrim niteliğinde yaklaşımlar sunmaktadır. Bu teknolojilerin merkezinde yer alan CRISPR-Cas9, genom üzerinde hedeflenen lokuslarda hassas kesim yaparak DNA dizisinin silinmesine, eklenmesine veya düzenlenmesine olanak tanımakta ve geleneksel seleksiyon yöntemlerine kıyasla çok daha hızlı, spesifik ve etkili sonuçlar sağlamaktadır (Petersen, 2017: 5). CRISPR sistemi rehber RNA (sgRNA) aracılığıyla Cas9 enzimini hedef DNA bölgesine yönlendirmekte, burada çift zincirli kesik oluşturmakta ve hücrenin onarım mekanizmaları aracılığıyla istenen genetik değişiklik elde edilmektedir (Petersen, 2017: 6) (Singh & Ali, 2021: 2).

Sığırlarda CRISPR uygulamalarının en dikkat çekici örneklerinden biri hastalık direncinin artırılması üzerine yapılan çalışmalardır. Özellikle tüberküloz (*Mycobacterium bovis*) ve mastitis (*Staphylococcus aureus*) gibi ekonomik kayıplara neden olan hastalıklarda hedef gen modifikasyonları başarılı sonuçlar vermektedir. Örneğin NRAMP1 geninin modifiye edilmesiyle

tüberküloz direncinin artırıldığı gösterilmektedir. Mastitis ile ilişkili CXCR1 ve laktoferrin genlerinde yapılan düzenlemelerle meme dokusunun enfeksiyona karşı savunma kapasitesinin iyileştirildiği bildirilmektedir (Islam & ark., 2020: 4) (Perisse & ark., 2021: 13) (Zemanova & ark., 2022: 374) (Wani & ark., 2023: 1).

CRISPR teknolojisi ayrıca boynuzsuzluk (polled) geninin heterozigot veya homozigot hale getirilmesinde kullanılmaktadır. Bu işlem sayesinde boynuz kesim işlemlerinin yol açtığı stres ve hayvanlarda boynuza bağlı yaralanmalar ortadan kaldırılmaktadır. Polled gen lokusunun gen düzenleme yöntemleri ile değiştirilmesi, buzağılarda boynuz oluşumunu genetik düzeyde engellemekte, böylece boynuz kesimi gibi stresli işlemlere ihtiyaç duyulmamasını sağlayarak hayvan refahını artırmakta ve süt sığırcılığı için önemli bir genetik avantaj oluşturmaktadır. Bu örnek, gen düzenlemenin fenotipik olarak belirgin özelliklerde ne kadar etkili olduğunu göstermektedir (Carlson & ark., 2016: 479).

Reprodüktif biyoteknolojileri açısından CRISPR ile yapılan bir diğer uygulama infertilite genlerinin modifikasyonu ve fertilite ile ilişkili lokusların düzenlenmesi olmaktadır. BMP15 veya GDF9 gibi folikül gelişiminde kritik rol oynayan genlerin hedeflenmesi ile ovulasyon kapasitesinin artırılması üzerine çalışmalar yürütülmektedir (Hajian & ark., 2025: 3). Ayrıca sperm motilitesi ve spermatogenez açısından önemli olan PRM1, PRM2, TNP2 ve CATSPER genlerinde düzenlemeler yapılmakta ve boğa fertilitatesinin genomik düzeyde iyileştirilmesi hedeflenmektedir (Fukuda & ark., 2013: 11) (Jiang & ark., 2015: 2).

CRISPR'ın kullanım alanlarından biri de sığır et ve süt veriminde metabolik düzenlemeleri hedefleyen gen modifikasyonlarıdır. Myostatin (MSTN) geninin çıkarılması ile çift kaslı fenotip elde edilmekte ve bu hayvanlarda et veriminin belirgin şekilde arttığı gözlenmektedir (Bellinge & ark., 2005: 2). Benzer

şekilde IGF1, GH ve GHR genlerinde yapılan düzenlemeler büyüme performansına doğrudan etki etmektedir (Silveira & ark., 2008: 874). Süt veriminde ise laktasyon fizyolojisi ile ilişkili STAT5 ve prolaktin reseptör yolları üzerinde CRISPR tabanlı modifikasyonlar değerlendirilmektedir (Metser & ark., 2016: 1053).

CRISPR'ın embriyo biyoteknolojileri ile entegre kullanılabilmesi büyük bir avantaj sağlamaktadır. ZFN ve TALEN gibi önceki nesil gen düzenleme tekniklerine kıyasla CRISPR çok daha hızlı uygulanmakta, IVP embriyolarında mikroenjeksiyon veya elektroporasyon ile hedef lokus modifikasyonları kolayca yapılabilmektedir. Bu embriyolar daha sonra transfer edilmekte ve düzenlenmiş genom yapısına sahip buzağılar elde edilmektedir. Bu yöntem “embriyo mikroenjeksiyon” ya da “CRISPR-IVP entegrasyonu” olarak adlandırılmakta ve modern ıslah çalışmalarının en yoğun kullanılan yöntemleri arasında yer almaktadır (Mashimo, 2014: 46) (Vicente & ark., 2021: 2) (Perisse & ark., 2021: 4)

CRISPR dışında TALEN ve ZFN gibi diğer gen düzenleme teknolojileri de sığırlarda kullanılmaya devam edilmektedir. TALEN'ler hedef DNA bölgesini tanımada yüksek spesifite sunmakta ve hedef genlerin dışındaki gen üzerine etkileri düşürmektedir. Özellikle büyük genom bölgelerinin düzenlenmesinde hala tercih edilmektedir. ZFN ise çinko parmak motifleri aracılığıyla DNA üzerinde hedef kesim yapmakta ve bazı karmaşık lokus düzenlemelerinde kullanılmaktadır (Jabbar & ark., 2021: 760). Ancak iki teknoloji de CRISPR'a kıyasla daha maliyetli ve daha zor tasarım gerektirmektedir (Sun & Zhao, 2013:1818) (Guha & Edgell, 2017: 5).

Gen düzenleme teknolojilerinin kullanımında etik, biyogüvenlik ve düzenleyici çerçeveler de önemli rol oynamaktadır. CRISPR ile düzenlenmiş sığırlar bazı ülkelerde GDO olarak

değerlendirilmemekte ve eğer düzenleme dışarıdan bir gen eklemeyi yapılmışsa farklı kategoride sınıflandırılmaktadır. Bu durum gen düzenlemenin hayvancılıkta yaygınlaşmasını kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte hedef genlerin dışındaki gen üzerine etkilerinin minimize edilmesi, modifiye edilen bireylerin sağlık ve refah durumunun uzun dönem takibi ve genetik çeşitliliğin korunması güncel araştırmaların odağında yer almaktadır (Carroll & ark., 2016: 478) (Van Eenennaam, Wells & Murray, 2019: 5) (Wray-Cahen, Hallerman & Tizard, 2024: 8).

Kaynakça

Acısu, T. C., Koca, R. H., Akarsu, S. A., Cihangiroğlu, A. Ç., Badıllı, N., Arkalı, G., ... & Gür, S. (2025). Effects of Apilarnil on Semen Parameters During Ram Semen Short-Term Storage. *Veterinary Sciences and Practices*, 20(1), 8-15. Doi: 10.17094/vetsci.1495903

Ambrose, D. J., Colazo, M. G., & Kastelic, J. P. (2010). The applications of timed artificial insemination and timed embryo transfer in reproductive management of dairy cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 383-392.

Anel-López, L., García-Álvarez, O., Parrilla, I., Del Olmo, D., Maroto-Morales, A., Fernández-Santos, M. R., ... & Garde, J. J. (2017). Effect of sex-sorting and cryopreservation on the post-thaw sperm quality of Iberian red deer spermatozoa. *Theriogenology*, 89, 206-213. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.010

Araujo, G. H. M., Rocha Filho, A. N., Lopes, E. P., Moya, C. F., & Alvarenga, M. A. (2009). Use of a low dose of equine purified FSH to induce multiple ovulations in mares. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(3), 380-383. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.01020.x

Aydiner, F., Yetkin, C. E., & Seli, E. (2010). Perspectives on emerging biomarkers for non-invasive assessment of embryo viability in assisted reproduction. *Current Molecular Medicine*, 10(2), 206-215. Doi: 10.2174/156652410790963349

Baby, S., Hyeong, K. E., Lee, Y. M., Jung, J. H., Oh, D. Y., Nam, K. C., ... & Kim, J. J. (2014). Evaluation of genome based estimated breeding values for meat quality in a berkshire population using high density single nucleotide polymorphism chips. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27(11), 1540. Doi: 10.5713/ajas.2014.14371

Baldán, F. J., García-Gil, D., & Fernandez-Basso, C. (2025). Revolutionizing Sperm Analysis with AI: A Review of Computer-Aided Sperm Analysis Systems. *Computation*, 13(6), 132. Doi: 10.3390/computation13060132

Bavister, B. D., & Poole, K. A. (2005). Duration and temperature of culture medium equilibration affect frequency of blastocyst development. *Reproductive biomedicine online*, 10(1), 124-129. Doi: 10.1016/S1472-6483(10)60813-9

Bellinge, R. H. S., Liberles, D. A., Iaschi, S. P. A., O'brien, P. A., & Tay, G. K. (2005). Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Animal genetics*, 36(1), 1-6. Doi: 10.1111/j.1365-2052.2004.01229.x

Bisinotto, R. S., Ribeiro, E. S., & Santos, J. E. P. (2014). Synchronisation of ovulation for management of reproduction in dairy cows. *animal*, 8(s1), 151-159. Doi: 10.1017/S1751731114000858

Bols, P. E., & Stout, T. A. (2018). Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval (OPU: Ovum Pick-Up) in cows and mares. In *Animal Biotechnology 1: Reproductive Biotechnologies* (pp. 209-233). Cham: Springer International Publishing. Doi: 10.1007/978-3-319-92327-7

Bouquet, A., & Juga, J. (2013). Integrating genomic selection into dairy cattle breeding programmes: a review. *Animal*, 7(5), 705-713. Doi: 10.1017/S1751731112002248

Briski, O., & Salamone, D. F. (2022). Past, present and future of ICSI in livestock species. *Animal Reproduction Science*, 246, 106925. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.106925

Bucak, M. N., Karaşör, Ö. F., Sarı, A., Bodu, M., Ili, P., Narlıçay, S., ... & Sari, F. (2024). Lipid mixtures (from a liposome kit) and melatonin improve post-thawed Angora goat sperm

parameters. *Cryobiology*, 115, 104897. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2024.104897

Carlson, D. F., Lancto, C. A., Zang, B., Kim, E. S., Walton, M., Oldeschulte, D., ... & Fahrenkrug, S. C. (2016). Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nature biotechnology*, 34(5), 479-481.

Carroll, D., Van Eenennaam, A. L., Taylor, J. F., Seger, J., & Voytas, D. F. (2016). Regulate genome-edited products, not genome editing itself. *Nature biotechnology*, 34(5), 477-479.

Carvalho, P. D., Wiltbank, M. C., & Fricke, P. M. (2015). Manipulation of progesterone to increase ovulatory response to the first GnRH treatment of an Ovsynch protocol in lactating dairy cows receiving first timed artificial insemination. *Journal of dairy science*, 98(12), 8800-8813. Doi: 10.3168/jds.2015-9968

Cenariu, D., Thor, B. J., Victor, G., Valentin, T., & Mihai, C. (2023). Flow cytometry and its use in modern human and veterinary andrology. *Cluj Veterinary Journal*, 28(2), 44-48. Doi: 10.52331/cvj.v28i2.49

Coticchio, G., Bonu, M. A., Sciajno, R., Sereni, E., Bianchi, V., & Borini, A. (2007). Truths and myths of oocyte sensitivity to controlled rate freezing. *Reproductive biomedicine online*, 15(1), 24-30. Doi: 10.1016/S1472-6483(10)60687-6

DeJarnette, J. M., Leach, M. A., Nebel, R. L., Marshall, C. E., McCleary, C. R., & Moreno, J. F. (2011). Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible?. *Journal of dairy science*, 94(7), 3477-3483. Doi: 10.3168/jds.2011-4214

Devolder, K. (2021). Genome editing in livestock, complicity, and the technological fix objection. *Journal of*

Agricultural and Environmental Ethics, 34(3), 16. Doi: 10.1007/s10806-021-09858-z

Doublet, A. C., Croiseau, P., Fritz, S., Michenet, A., Hozé, C., Danchin-Burge, C., ... & Restoux, G. (2019). The impact of genomic selection on genetic diversity and genetic gain in three French dairy cattle breeds. *Genetics Selection Evolution*, 51(1), 52. Doi: 10.1186/s12711-019-0495-1

Eldarov, C., Gamisonia, A., Chagovets, V., Ibragimova, L., Yarigina, S., Smolnikova, V., ... & Bobrov, M. (2022). LC-MS analysis revealed the significantly different metabolic profiles in spent culture media of human embryos with distinct morphology, karyotype and implantation outcomes. *International journal of molecular sciences*, 23(5), 2706. Doi: 10.3390/ijms23052706

Erbe, M., Hayes, B. J., Matukumalli, L. K., Goswami, S., Bowman, P. J., Reich, C. M., ... & Goddard, M. E. (2012). Improving accuracy of genomic predictions within and between dairy cattle breeds with imputed high-density single nucleotide polymorphism panels. *Journal of dairy science*, 95(7), 4114-4129. Doi: 10.3168/jds.2011-5019

Ferré, L. B., Alvarez-Gallardo, H., Romo, S., Fresno, C., Stroud, T., Stroud, B., ... & Kjelland, M. E. (2023). Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval in cattle: State-of-the-art and its impact on the in vitro fertilization embryo production outcome. *Reproduction in Domestic Animals*, 58(3), 363-378. Doi: 10.1111/rda.14303

Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991-1004. Doi: 10.1017/S1751731119002775

Fukuda, N., Fukuda, T., Sinnamon, J., Hernandez-Hernandez, A., Izadi, M., Raju, C. S., ... & Percipalle, P. (2013). The transacting factor CBF-A/Hnrnpab binds to the A2RE/RTS element of protamine 2 mRNA and contributes to its translational regulation during mouse spermatogenesis. *PLoS genetics*, 9(10), e1003858. Doi: 10.1371/journal.pgen.1003858

Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., & Lazzari, G. (2001). Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, 55(6), 1341-1357. Doi: 10.1016/S0093-691X(01)00486-1

García-Roselló, E., García-Mengual, E., Coy, P., Alfonso, J., & Silvestre, M. A. (2009). Intracytoplasmic sperm injection in livestock species: an update. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(1), 143-151. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.01018.x

García-Ruiz, A., Cole, J. B., VanRaden, P. M., Wiggans, G. R., Ruiz-López, F. J., & Van Tassell, C. P. (2016). Changes in genetic selection differentials and generation intervals in US Holstein dairy cattle as a result of genomic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(28), E3995-E4004. Doi: 10.1073/pnas.1519061113

Garner, D. L. (2006). Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, 65(5), 943-957. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.009

Gatimel, N., Moreau, J., Parinaud, J., & Léandri, R. D. (2020). Need for choosing the ideal pH value for IVF culture media. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 37(5), 1019-1028. Doi: 10.1007/s10815-020-01726-5

Giordano, J. O., Wiltbank, M. C., Guenther, J. N., Pawlisch, R., Bas, S., Cunha, A. P., & Fricke, P. M. (2012). Increased fertility in lactating dairy cows resynchronized with Double-Ovsynch

compared with Ovsynch initiated 32 d after timed artificial insemination. *Journal of dairy science*, 95(2), 639-653. Doi: 10.3168/jds.2011-4418

Givens, M. D., Gard, J. A., & Stringfellow, D. A. (2007). Relative risks and approaches to biosecurity in the use of embryo technologies in livestock. *Theriogenology*, 68(3), 298-307. Doi: 0.1016/j.theriogenology.2007.04.004

Granleese, T., Clark, S. A., Swan, A. A., & van Der Werf, J. H. (2015). Increased genetic gains in sheep, beef and dairy breeding programs from using female reproductive technologies combined with optimal contribution selection and genomic breeding values. *Genetics Selection Evolution*, 47(1), 70. Doi: 0.1186/s12711-015-0151-3

Guha, T. K., & Edgell, D. R. (2017). Applications of alternative nucleases in the age of CRISPR/Cas9. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2565. Doi: 10.3390/ijms18122565

Gutierrez-Reinoso, M. A., Aponte, P. M., & Garcia-Herreros, M. (2021). Genomic analysis, progress and future perspectives in dairy cattle selection: a review. *Animals*, 11(3), 599. Doi: 10.3390/ani11030599

Güngör, İ. H., Koca, R. H., Cinkara, S. D., Acısu, T. C., Erişir, F. E., Arkalı, G., ... & Türk, G. (2025). Changes in fatty acids, vitamins, cholesterol and amino acid profiles of ram semen by freeze-thawing process. *Reproductive Biology*, 25(1), 100953. Doi: 10.1016/j.repbio.2024.100953

Hajian, M., Pirali, A., Moghaddam, S. H. H., Moradi-Hajidavaloo, R., Varnosfaderani, S. R., Jozi, M., ... & Eghbalsaied, S. (2025). Efficient gene editing of BMP15, GDF9, and MSTN—but not the imprinted CLPG gene—in goat embryos via

electrotransfection and handmade cloning. *Functional & Integrative Genomics*, 25(1), 150. Doi: 10.1007/s10142-025-01644-8

Hayes, B. J., Bowman, P. J., Chamberlain, A. C., Verbyla, K., & Goddard, M. E. (2009). Accuracy of genomic breeding values in multi-breed dairy cattle populations. *Genetics Selection Evolution*, 41(1), 51.

Hochi, S. (2022). Cryodevices developed for minimum volume cooling vitrification of bovine oocytes. *Animal Science Journal*, 93(1), e13683. Doi: 10.1111/asj.13683

Humblot, P., Le Bourhis, D., Fritz, S., Colleau, J. J., Gonzalez, C., Guyader Joly, C., ... & Ponsart, C. (2010). Reproductive technologies and genomic selection in cattle. *Veterinary Medicine International*, 2010(1), 192787. Doi: 10.4061/2010/192787

Islam, M. A., Rony, S. A., Rahman, M. B., Cinar, M. U., Villena, J., Uddin, M. J., & Kitazawa, H. (2020). Improvement of disease resistance in livestock: application of immunogenomics and CRISPR/Cas9 technology. *Animals*, 10(12), 2236. Doi: 10.3390/ani10122236

Jabbar, A., Zulfiqar, F., Mahnoor, M., Mushtaq, N., Zaman, M. H., Din, A. S. U., ... & Ahmad, H. I. (2021). Advances and Perspectives in the Application of CRISPR-Cas9 in Livestock. *Molecular Biotechnology*, 63(9), 757-767. Doi: 10.1007/s12033-021-00347-2

Jiang, W., Sun, H., Zhang, J., Zhou, Q., Wu, Q., Li, T., ... & Xia, X. (2015). Polymorphisms in Protamine 1 and Protamine 2 predict the risk of male infertility: a meta-analysis. *Scientific reports*, 5(1), 15300. Doi: 10.1038/srep15300

Johnson, L. A., & Welch, G. R. (1999). Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum

efficiency. *Theriogenology*, 52(8), 1323-1341. Doi: 10.1016/S0093-691X(99)00220-4

Kadarmideen, H. N., Mazzoni, G., Watanabe, Y. F., Ströbech, L., Baruselli, P. S., Meirelles, F. V., ... & Nogueira, M. F. G. (2018). Genomic selection of in vitro produced and somatic cell nuclear transfer embryos for rapid genetic improvement in cattle production. *Animal Reproduction (AR)*, 12(3), 389-396.

Khalili, M. A., Shahedi, A., Ashourzadeh, S., Nottola, S. A., Macchiarelli, G., & Palmerini, M. G. (2017). Vitriification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 34(11), 1413-1426. Doi: 10.1007/s10815-017-1005-4

Kocyigit, A., & Cevik, M. (2015). Effects of leukemia inhibitory factor and insulin-like growth factor-I on the cell allocation and cryotolerance of bovine blastocysts. *Cryobiology*, 71(1), 64-69. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.05.068

Lee, W., Song, K., Lim, K., Lee, S., Lee, B., & Jang, G. (2012). Influence of factors during superovulation on embryo production in Korean Holstein cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(2), 167-174. Doi: 10.1292/jvms.11-0057

Looney, C. R., Lindsey, B. R., Gonseth, C. L., & Johnson, D. L. (1994). Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41(1), 67-72. Doi: 10.1016/S0093-691X(05)80050-0

López-Saucedo, J., Paramio-Nieto, M. T., Fierro, R., & Pina-Aguilar, R. E. (2012). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in small ruminants. *Animal reproduction science*, 133(3-4), 129-138. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.07.003

Majerus, V., De Roover, R., Etienne, D., Kaidi, S., Massip, A., Dessy, F., & Donnay, I. (1999). Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology*, 52(7), 1169-1179. Doi: 10.1016/S0093-691X(99)00209-5

Mashimo, T. (2014). Gene targeting technologies in rats: zinc finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases, and clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Development, growth & differentiation*, 56(1), 46-52. Doi: 10.1111/dgd.12110

McManus, C. M., Paiva, S. R., & Faria, D. (2020). Genomics and climate change. *Rev. Sci. Tech*, 39, 481-490. Doi: 10.20506/rst.39.2.3099

Metser, G., Shin, H. Y., Wang, C., Yoo, K. H., Oh, S., Villarino, A. V., ... & Hennighausen, L. (2016). An autoregulatory enhancer controls mammary-specific STAT5 functions. *Nucleic acids research*, 44(3), 1052-1063. Doi: 10.1093/nar/gkv999

Mogas, T., García-Martínez, T., & Martínez-Rodero, I. (2024). Methodological approaches in vitrification: Enhancing viability of bovine oocytes and in vitro-produced embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 59, e14623. Doi: 10.1111/rda.14623

Moore, S. G., & Hasler, J. F. (2017). A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of dairy science*, 100(12), 10314-10331. Doi: 10.3168/jds.2017-13138

Mueller, M. L., & Van Eenennaam, A. L. (2022). Synergistic power of genomic selection, assisted reproductive technologies, and gene editing to drive genetic improvement of cattle. *CABI Agriculture and Bioscience*, 3(1), 13. Doi: 10.1186/s43170-022-00080-z

Mullaart, E., & Wells, D. (2018). Embryo biopsies for genomic selection. *Animal Biotechnology 2: Emerging Breeding Technologies*, 81-94. Doi: 10.1007/978-3-319-92348-2

Mullaart, E., & Wells, D. (2018). Embryo biopsies for genomic selection. *Animal Biotechnology 2: Emerging Breeding Technologies*, 81-94. Doi: 10.1007/978-3-319-92348-2_5

Netshirovha, T. R., Makumbane, V., Sehlabela, L. D., Raphalalani, Z. C., & Mphaphathi, M. L. (2024). Cryopreservation of Oocyte in Livestock: Principles, Techniques and Updated Outcomes. Doi: 10.5772/intechopen.1006309

Oliveira, C. S., Camargo, L. S. A., Silva, M. V. G. B. D., Saraiva, N. Z., Quintão, C. C., & Machado, M. A. (2023). Embryo biopsies for genomic selection in tropical dairy cattle. *Animal Reproduction*, 20, e20230064. Doi: 10.1590/1984-3143-AR2023-0064

Pereira, R. M., & Marques, C. C. (2008). Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and tissue banking*, 9(4), 267-277. Doi: 10.1007/s10561-008-9075-2

Perisse, I. V., Fan, Z., Singina, G. N., White, K. L., & Polejaeva, I. A. (2021). Improvements in gene editing technology boost its applications in livestock. *Frontiers in Genetics*, 11, 614688. Doi: 10.3389/fgene.2020.614688

Perkel, K. J., Tscherner, A., Merrill, C., Lamarre, J., & Madan, P. (2015). The ART of selecting the best embryo: A review of early embryonic mortality and bovine embryo viability assessment methods. *Molecular reproduction and development*, 82(11), 822-838. Doi: 10.1002/mrd.22525

Petersen, B. (2017). Basics of genome editing technology and its application in livestock species. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 4-13. Doi: 10.1111/rda.13012

Phiphattanaphiphop, C., Letsakul, K., & Phatthanakun, R. (2025). A low-cost AI-driven microscope for bull sperm analysis. *Sensors and Actuators A: Physical*, 116881. Doi: 10.1016/j.sna.2025.116881

Pryce, J. E., & Daetwyler, H. D. (2012). Designing dairy cattle breeding schemes under genomic selection: a review of international research. *Animal Production Science*, 52(3), 107-114. Doi: 10.1071/AN11098

Pursley, J. R., Wiltbank, M. C., Stevenson, J. S., Ottobre, J. S., Garverick, H. A., & Anderson, L. L. (1997). Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *Journal of dairy science*, 80(2), 295-300. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)75937-X

Rabel, R. C., Marchioretto, P. V., Bangert, E. A., Wilson, K., Milner, D. J., & Wheeler, M. B. (2023). Pre-implantation bovine embryo evaluation—from optics to omics and beyond. *Animals*, 13(13), 2102. Doi: 10.3390/ani13132102

Reyes Palomares, A., & Rodriguez-Wallberg, K. A. (2022). Update on the epigenomic implication of embryo cryopreservation methods applied in assisted reproductive technologies with potential long-term health effects. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 881550. Doi: 10.3389/fcell.2022.881550

Riera, F. L., Roldán, J. E., Espinosa, J. M., Fernandez, J. E., Ortiz, I., & Hinrichs, K. (2019). Application of embryo biopsy and sex determination via polymerase chain reaction in a commercial equine embryo transfer program in Argentina. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(12), 1917-1925. Doi: 10.1071/RD19228

Roque, M., Lattes, K., Serra, S., Sola, I., Geber, S., Carreras, R., & Checa, M. A. (2013). Fresh embryo transfer versus frozen

embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and sterility*, 99(1), 156-162. Doi: 10.1093/humupd/dmy033

Schenk, J. L., Suh, T. K., Cran, D. G., & Seidel Jr, G. E. (1999). Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 52(8), 1375-1391. Doi: 10.1016/S0093-691X(99)00224-1

Semacan, A., Kaymaz, M., Fındık, M., Şirvanlı, A., & Köker, A. (2015). Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. *Medipres Matbaacılık, Malatya, Türkiye*.

Shea, B. F. (1999). Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. *Theriogenology*, 51(4), 841-854. Doi: 10.1016/S0093-691X(99)00030-8

Shojaei Saadi, H. A., Vigneault, C., Sargolzaei, M., Gagné, D., Fournier, É., de Montera, B., ... & Robert, C. (2014). Impact of whole-genome amplification on the reliability of pre-transfer cattle embryo breeding value estimates. *BMC genomics*, 15(1), 889.

Silva, J. C. C., Alvarez, R. H., Zanenga, C. A., & Pereira, G. T. (2018). Factors affecting embryo production in superovulated Nelore cattle1. *Animal Reproduction (AR)*, 6(3), 440-445.

Silva, M. C., Dos Anjos, M. M., de Camargo, H. S., Lollato, J. P. M., Lorenzetti, E., Barreiros, T. R. R., ... & Morotti, F. (2024). Use of Injectable Progesterone as a Pre-Synchronisation Strategy in a Timed Artificial Insemination Protocol Based on Gonadotropin-Releasing Hormone and Progesterone in Bos indicus Beef Cows in Anoestrous. *Reproduction in Domestic Animals*, 59(11), e14745. Doi: 10.1111/rda.14745

Silveira, L. G. G., Furlan, L. R., Curi, R. A., Ferraz, A. L. J., Alencar, M. M. D., Regitano, L. C., ... & Oliveira, H. N. D. (2008).

Growth hormone 1 gene (GH1) polymorphisms as possible markers of the production potential of beef cattle using the Brazilian Canchim breed as a model. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 874-879. Doi: 10.1590/S1415-47572008005000003

Singh, P., & Ali, S. A. (2021). Impact of CRISPR-Cas9-based genome engineering in farm animals. *Veterinary Sciences*, 8(7), 122. Doi: 10.3390/vetsci8070122

Singla, S. K., & Singh, B. (2022). Multiple ovulation and embryo transfer in livestock production. In *Frontier Technologies in Bovine Reproduction* (pp. 197-210). Singapore: Springer Nature Singapore.

Sirard, M. A. (2018). 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction*, 156(1), R1-R7. Doi: 10.1530/REP-18-0008

Siristatidis, C., Komitopoulou, M. A., Makris, A., Sialakouma, A., Botzaki, M., Mastorakos, G., ... & Palmer, G. A. (2015). Morphokinetic parameters of early embryo development via time lapse monitoring and their effect on embryo selection and ICSI outcomes: a prospective cohort study. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(4), 563-570. Doi: 10.1007/s10815-015-0436-z

Sun, N., & Zhao, H. (2013). Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnology and bioengineering*, 110(7), 1811-1821. Doi: 10.1002/bit.24890

Suttner, R., Zakhartchenko, V., Stojkovic, P., Müller, S., Alberio, R., Medjugorac, I., ... & Stojkovic, M. (2000). Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. *Theriogenology*, 54(6), 935-948.

Tanga, B. M., Qamar, A. Y., Raza, S., Bang, S., Fang, X., Yoon, K., & Cho, J. (2021). Semen evaluation: Methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment—A review. *Animal bioscience*, 34(8), 1253. Doi: 10.5713/ab.21.0072

Thompson, J. G., Brown, H. M., & Sutton-McDowall, M. L. (2015). Measuring embryo metabolism to predict embryo quality. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(2), 41-50. Doi: 10.1071/RD15340

Toral, F. L. B., Menezes, G. R. D. O., da Silva, L. O. C., Martin Nieto, L., de Souza Jr, M. D., & Torres Jr, R. A. D. A. (2023). Benchmarking in a beef cattle breeding program: Lessons from the best breeders. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 140(3), 287-294. Doi: 10.1111/jbg.12757

Treff, N. R., Su, J., Tao, X., Northrop, L. E., & Scott Jr, R. T. (2011). Single-cell whole-genome amplification technique impacts the accuracy of SNP microarray-based genotyping and copy number analyses. *Molecular human reproduction*, 17(6), 335-343. Doi: 10.1093/molehr/gaq103

Üstüner, B., Birler, S., Zık, B., Alçay, S., Öztürk, G. B., Guler, S., ... & Pabuccuoğlu, S. (2021). Effect of Freeze-Drying Extenders on Ram Sperm DNA Integrity. *Journal of Research in Veterinary Medicine*, 40(1), 25-30. Doi: 10.30782/jrv.903846

Van Eenennaam, A. L., Wells, K. D., & Murray, J. D. (2019). Proposed US regulation of gene-edited food animals is not fit for purpose. *npj Science of Food*, 3(1), 3.

VanRaden, P. M. (2020). Symposium review: How to implement genomic selection. *Journal of Dairy Science*, 103(6), 5291-5301. Doi: 10.3168/jds.2019-17684

Vicente, M. M., Chaves-Ferreira, M., Jorge, J. M., Proença, J. T., & Barreto, V. M. (2021). The off-targets of clustered regularly

interspaced short palindromic repeats gene editing. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 718466. Doi: 10.3389/fcell.2021.718466

Volozonoka, L., Miskova, A., & Gailite, L. (2022). Whole genome amplification in preimplantation genetic testing in the era of massively parallel sequencing. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4819. Doi: 10.3390/ijms23094819

Wani, A. K., Akhtar, N., Singh, R., Prakash, A., Raza, S. H. A., Cavalu, S., ... & Hashem, N. M. (2023). Genome centric engineering using ZFNs, TALENs and CRISPR-Cas9 systems for trait improvement and disease control in Animals. *Veterinary research communications*, 47(1), 1-16. Doi: 10.1007/s11259-022-09967-8

Windsor, P. A., & Agerholm, J. S. (2009). Inherited diseases of Australian Holstein-Friesian cattle. *Australian veterinary journal*, 87(5), 193-199. Doi: 10.1111/j.1751-0813.2009.00422.x

Workman, A. M., Heaton, M. P., & Vander Ley, B. L. (2025). CD46 Gene Editing Confers Ex Vivo BVDV Resistance in Fibroblasts from Cloned Angus Calves. *Viruses*, 17(6), 775. Doi: 10.3390/v17060775

Wrathall, A. E. (1995). Embryo transfer and disease transmission in livestock: a review of recent research. *Theriogenology*, 43(1), 81-88. Doi: 10.1016/0093-691X(94)00009-J

Wray-Cahen, D., Hallerman, E., & Tizard, M. (2024). Global regulatory policies for animal biotechnology: overview, opportunities and challenges. *Frontiers in Genome Editing*, 6, 1467080. Doi: 10.3389/fgeed.2024.1467080

Zaninovic, N., Irani, M., & Meseguer, M. (2017). Assessment of embryo morphology and developmental dynamics by

time-lapse microscopy: is there a relation to implantation and ploidy?. *Fertility and sterility*, 108(5), 722-729. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.10.002

Zemanova, M., Langova, L., Novotná, I., Dvorakova, P., Vrtkova, I., & Havlicek, Z. (2022). Immune mechanisms, resistance genes, and their roles in the prevention of mastitis in dairy cows. *Archives Animal Breeding*, 65(4), 371-384. Doi: 10.5194/aab-65-371-2022

Zhao, J., Yao, K., Yu, H., Zhang, L., Xu, Y., Chen, L., ... & Zhang, J. (2021). Metabolic remodelling during early mouse embryo development. *Nature Metabolism*, 3(10), 1372-1384. Doi: 10.1038/s42255-021-00464-x

KOYUN VE KEÇİLERDE REPRODÜKTİF BİYOTEKNOLOJİLER

ALPER KOÇYİĞİT¹

Giriş

Koyun ve keçilerde reproduktif biyoteknolojilerin anlaşılabilmesi için öncelikle bu türlerin üreme fizyolojisinin temel özelliklerinin ortaya konulması gerekmektedir. Küçük ruminantlarda üreme fonksiyonları, hipotalamus–hipofiz–gonad eksenini üzerinden, çevresel ve özellikle fotoperiyodik uyarılara duyarlı nöroendokrin mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir. Bu ekseninde hipotalamustan salınan gonadotropin salgılatıcı hormonun, hipofiz ön lobundan folikül uyarıcı hormon ve luteinize edici hormon salgısını tetiklediği, bu gonadotropinlerin de ovaryum düzeyinde folikülogenez, ovulasyon ve korpus luteum fonksiyonlarını yönettiği bilinmektedir (Jainudeen ve Hafez, 2000).

Bu mekanizmalar sonucunda ortalama 16–17 gün süren bir östrus siklusu, 24–36 saat devam eden östrus ve östrus

¹Doç. Dr., Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Orcid:0000-0001-9639-5497

başlangıcından yaklaşık 24–30 saat sonra gerçekleşen ovulasyon veya ovulasyonlar tanımlanmaktadır (Jainudeen ve Hafez, 2000).

Keçilerde ise östrus siklusunun ortalama 21 gün sürdüğü, östrus süresinin ve ovulasyon zamanlamasının benzer aralıklar gösterdiği bildirilmektedir (Fatet ve ark., 2011).

Küçük ruminantların reproduktif anatomisinin de biyoteknolojik uygulamalar açısından belirleyici olduğu açıktır. Koyunlarda serviksin belirgin fibröz halkalar ve kıvrımlardan oluşan, dar ve hassas bir yapı göstermesi; keçilerde ise servikal kanalın koyuna göre bir miktar daha geçirgen olmakla birlikte yine de belirgin bir anatomik bariyer oluşturması, klasik vajinal suni tohumlama tekniklerinin etkinliğini sınırlamaktadır (Tibary, 2005; Alexander ve ark., 2010).

Koyun ve keçilerin reproduktif fizyolojisi, büyükbaş hayvanlar ve diğer evcil türlerle karşılaştırıldığında hem siklus dinamikleri hem de mevsimsellik bakımından belirgin farklılıklar göstermektedir. Sığırlarda yıl boyu devam eden, mevsimselliğin minimal olduğu poliöstrik bir yapı söz konusudur (Jainudeen ve Hafez, 2000; Kaya, 2018). Bu durum, özellikle genetik materyalin yıl içindeki dağılımı, damızlık kullanım süresi ve biyoteknoloji uygulamalarının planlanması açısından küçük ruminantları sığırlardan ayıştırmaktadır.

Kısraklarda ise bunun tam tersi bir durum söz konusu olmakta, kısraklar mevsimsel poliöstrik olarak tanımlanmakta ve üreme aktivitesinin ilkbahar-yaz döneminde yoğunlaştığı kabul edilmektedir. Dolayısıyla atlarda fotoperiyodik düzenleme, koyun ve keçilerdekiyle benzer nöroendokrin prensiplere dayanmakla birlikte, çevresel sinyalin yönü ve mevsimsel üreme penceresi tamamen tersine dönmüş durumdadır (Gómez-Brunet ve ark., 2012).

Köpeklerde uzun ve belirgin luteal fazla karakterize, yılda bir veya birkaç kez ortaya çıkan, monoöstrik bir siklus tipi

tanımlanmaktadır. Kedilerde ise evcilleştirmenin etkisi ile östrusların mevsimle olan ilişkisi zayıflamıştır. Ayrıca kediler ovulasyonun çiftleşme refleksiyle tetiklendiği bir karakteri yansıtmaktadır. Bu özellikler, suni tohumlama ve embriyo biyoteknolojilerinin kedi-köpeklerde uygulanmasını fizyolojik olarak farklı sınırlara taşımakta, ancak koyun ve keçilerin daha “klasik” gonadotropin ve steroid hormon döngüleri, protokol tasarımı açısından ruminantlarla daha uyumlu bir zemin sunmaktadır.

Küçük ruminant yetiştiriciliğinde reproduktif biyoteknolojilere duyulan ihtiyaç hem biyolojik hem de sosyo-ekonomik düzlemde bir dizi sınırlayıcı etmenin bir araya gelmesiyle açıklanmaktadır. Dünya nüfusunun sürekli artması, iklim değişikliğinin otlatma alanları ve yem kaynakları üzerindeki baskısı, yerel genetik kaynakların korunma zorunluluğu ve sürdürülebilir üretim kriterleri, koyun ve keçi üretim sistemlerinde verimliliğin artırılmasını zorunlu kılmaktadır (Kaya, 2018).

Bununla birlikte küçük ruminantlarda düşük doğum ağırlığı, sınırlı laktasyon potansiyeli, mevsimsel üreme ve sıklıkla ekstansif yetiştirme koşulları, verim artışının yalnızca besleme ve barınak iyileştirmeleriyle sağlanmasını güçleştirmektedir.

Reproduktif biyoteknolojilerin temel kavramsal amacı, türün doğal biyolojik sınırlarının bir kısmını “yeniden düzenleyerek” genetik ilerleme hızını artırmak, birim zamanda elde edilen yavru sayısını çoğaltmak ve üstün genotiplerin bir popülasyona aktarımını hızlandırmak olarak özetlenmektedir (Menchaca, 2018; Freitas, 2010).

Küçük ruminantlarda mevsimsel üreme penceresinin sınırlı olması, yıl boyu düzenli ve öngörülebilir üretim hedefleyen entansif işletmelerde planlamayı zorlaştırmaktadır. Östrus senkronizasyonu ve ovulasyon resenkronizasyonu protokolleri aracılığıyla östrus

zamanının kontrol edilmesi, suni tohumlama ve embriyo transferi uygulamalarının belirli gün ve saatlere yoğunlaştırılmasına imkân tanımakta, böylece iş gücü organizasyonu, sürü yönetimi ve kayıt sistemleri daha etkin hâle getirilmektedir (Cosentino ve ark., 2023).

Ayrıca yerel ırkların korunması, bulaşıcı hastalıklarla mücadele, zoonozların kontrolü ve biyogüvenlik önlemleri açısından da reproduktif biyoteknolojiler kritik araçlar olarak değerlendirilmektedir. Dondurulmuş sperma ve embriyo bankaları, saha koşullarından bağımsız olarak genetik materyalin uzun süre saklanmasına olanak tanımaktadır (Lv ve ark., 2019; Kaya, 2018).

Reproduktif biyoteknolojilerin tarihçesine bakıldığında ilk büyük adımın suni tohumlamanın geliştirilmesiyle atıldığı bildirilmektedir. Köpek, tavşan ve diğer türlerde 18. ve 19. yüzyıllarda yapılan erken deneysel çalışmaların ardından; 20. yüzyılın başlarında, özellikle de 1930'lardan itibaren çiftlik hayvanlarında suni tohumlama uygulamalarının sistematik hâle geldiği ifade edilmektedir (Foote, 1999).

1940'lı ve 1950'li yıllarda gliserolün kriyoprotektan etkisinin keşfedilmesi ve spermanın sıvı azot içerisinde uzun süreli olarak saklanabileceğinin gösterilmesi, suni tohumlamanın gerçek anlamda bir "biyoteknoloji devrimi" hâline gelmesine zemin hazırlamıştır (Foote, 1999; Lv ve ark., 2019).

Koyun ve keçilerde suni tohumlamanın yaygın kullanımı, sığıra kıyasla daha geç bir dönemde ve daha sınırlı ölçekte gerçekleşmiştir. Bunun temel nedenleri arasında serviks anatomisinin trans-servikal uygulamalara elverişsizliği, dondurulmuş spermayla elde edilen gebelik oranlarının uzun yıllar boyunca düşük kalması ve çoğu küçük ruminant işletmesinin ekstansif yapısı sayılmaktadır (Alexander ve ark., 2010; Tibary, 2005).

Embriyo transferinin tarihsel gelişimi incelendiğinde, ilk başarılı deneysel çalışmaların 19. yüzyılın sonlarında ve 20. yüzyılın başlarında yapıldığı, ancak gerçek anlamda uygulamaya aktarılmasının 1940–1950’li yıllarda süperovulasyon ve cerrahi embriyo toplama tekniklerinin geliştirilmesiyle mümkün olduğu bildirilmektedir (Betteridge, 2003; Jelani, 2023).

Koyun ve keçilerde in vivo embriyo üretimine dayalı klasik multiple ovulasyon-embriyo transferi (MOET) protokollerinin 1960–1980 döneminde tanımlandığı; bu süreçte laparotomi ile ovaryum ve uterusun dışarı alınarak ovidukt ve uterustan embriyo toplandığı aktarılmaktadır (Falchi ve ark., 2022).

1980’li yıllar, küçük ruminantlarda hem suni tohumlama hem de embriyo transferi alanında laparoskopik tekniklerin devreye girmesiyle önemli bir dönüm noktası olarak değerlendirilmektedir. Laparoskopik suni tohumlama sayesinde uterusun laparoskopik görüntüleme eşliğinde doğrudan geçilmesine olanak tanıdığı; bu yolla dondurulmuş spermayla gebelik oranlarının anlamlı düzeyde yükseltildiği bildirilmektedir (Alexander ve ark., 2010). Benzer şekilde laparoskopik ovum pick-up (LOPU) ve laparoskopik embriyo transferi teknikleri, laparotominin getirdiği adezyon, operasyon süresi ve postoperatif komplikasyon risklerinin azaltılmasını mümkün kılmıştır (Fonseca ve ark., 2018).

1990’lı yıllardan itibaren in vitro embriyo üretimi (IVP) küçük ruminantlarda giderek daha fazla önem kazanmaya başlamıştır. Bu dönemde ovaryumlardan oosit toplanması, in vitro maturasyon, in vitro fertilizasyon ve in vitro kültür protokollerinin standardize edilmesi yönünde yoğun çalışmalar yürütülmüştür. İlk in vitro üretilmiş embriyolardan canlı yavru elde edilmesiyle birlikte IVP, araştırma laboratuvarlarından saha uygulamalarına doğru taşınmaya başlamıştır (Freitas, 2010; Tibary, 2005).

2000'li yıllarda laparoskopik oosit toplama ile kombine edilen IVP ve juvenil in vitro embriyo transferi yaklaşımları, prepubertal dişilerden oosit toplanarak kısa sürede yüksek genetik değere sahip yavru elde edilmesini mümkün kılan stratejiler olarak tanımlanmaktadır (Pasquariello ve ark., 2024).

Aynı dönemde servikal dilatasyon tekniklerinin, özel kateter tasarımlarının ve farmakolojik protokollerin geliştirilmesiyle cerrahi olmayan embriyo toplama ve transfer tekniklerinin koyun ve keçilerde uygulanabilir hâle getirildiği bilinmektedir. Bu gelişmelerin özellikle keçilerde ticari embriyo transfer programlarının yaygınlaşmasına katkı sağladığı ifade edilmektedir (Fonseca ve ark., 2018).

Bu tarihsel çerçeve içinde değerlendirildiğinde koyun ve keçilerde reproduktif biyoteknolojilerin; önce temel fizyolojik süreçlerin anlaşılmasına dayalı olarak suni tohumlama ve embriyo transferi ile şekillendiği, daha sonra in vitro embriyo üretimi, laparoskopik teknikler ve cerrahi olmayan yaklaşımlarla rafine edildiği, günümüzde ise genomik ve gen düzenleme araçları ile entegre edilerek yeniden görülmektedir.

ÖSTRUS SENKRONİZASYONU

Koyun ve keçilerde reproduktif performansın artırılmasında östrus ve ovulasyon zamanlamasının kontrol altına alınması temel araçlardan biridir. Özellikle büyük işletmelerde laktasyon ve besi dönemlerinin planlanması, kuzu/oğlakların partiler hâlinde elde edilmesi, damızlıkların daha verimli kullanılması ve ileri reproduktif biyoteknolojilerin (suni tohumlama, embriyo transferi, in vitro embriyo üretimi vb.) uygulanabilmesi için, sürüdeki dişilerin belirli bir zaman penceresi içerisinde eş zamanlı olarak östrusa girmesi ve ovule olması gerekmektedir (Kaya ve ark., 2018; Souza-Fabjan ve ark., 2023).

Koyun ve keçi işletmelerinin büyük bölümünde serbest aşım ya da elde aşım ile yürütülen klasik çiftleştirme sistemlerinde, östrusların doğal siklusa bırakılması durumunda doğumlar geniş bir zaman aralığına yayılmakta, bu durum hem işgücü organizasyonunu güçleştirmekte hem de yavruların homojen bir grup olarak büyütülmesini zorlaştırmaktadır. Ayrıca, sürü yönetiminde mevsimsellik önemli bir sınırlayıcı faktör olarak ortaya çıkmakta; bazı ırklarda belirgin, bazılarında ise zayıf düzeyde görülen mevsimsel poliöstrik yapı nedeniyle, belirli dönemlerde yavru verimi belirgin biçimde düşmektedir (Cosentino ve ark., 2023). Bu bağlamda, östrus senkronizasyonu sayesinde, mevsimsel anöstrusun etkilerinin azaltılması, doğum mevsiminin kaydırılması veya daraltılması, damızlık koç/teke kullanımının optimize edilmesi ve sabit zamanlı suni tohumlama (fixed-time AI; FTAI) programlarının rutin hâle getirilmesi mümkün hâle getirilmektedir (Cosentino ve ark., 2023; Kaya ve ark., 2018).

Son yıllarda, ilk senkronizasyon protokolü sonrasında gebe kalamayan dişilerde ovulasyonun yeniden senkronizasyonuna (resenkronizasyon) yönelik protokoller geliştirilmekte ve böylece gebelik oluşturulamayan siklusların sayısının ve süresinin azaltılması, dişilerin “üretim dışı” kaldığı günlerin kısaltılması ve sürü düzeyinde gebelik oranlarının yükseltilmesi hedeflenmektedir (Cosentino ve ark., 2023).

Küçük Ruminantlarda Seksüel Siklusların Hormonal Senkronizasyonu

Küçükbaş hayvanlarda seksüel siklusların düzenlenmesinde temel olarak dört ana yöntem kullanılmaktadır. Bunlar; fotoperiyot uygulamaları, besleme uygulamaları (flushing), koç etkisinden yararlanılması ve hormon kullanımıdır. Koyun ve keçilerde östrus ve ovulasyonun manipülasyonu esas olarak luteal fazın taklit edilmesi veya fonksiyonel korpus luteumun lize edilmesi yoluyla

gerçekleştirilmektedir. Güncel uygulamalarda en yaygın yaklaşımın, progestagen/progesteron içeren intravajinal araçlarla luteal fazın yapay olarak oluşturulması ve takiben östrus ve ovulasyonun indüklenmesi olduğu bildirilmektedir (Cosentino ve ark., 2023).

Progestagen temelli protokollerde, silikon esaslı intravajinal cihazlar (CIDR, DICO) veya medroksiprogesteron asetat (MAP) ya da flurogeston asetat (FGA) emdirilmiş intravajinal süngerler kullanılmaktadır. Cihaz veya süngerler genellikle 5–7 gün (kısa süreli protokoller) ya da 12–14 gün (uzun süreli protokoller) boyunca vajinada tutulmakta, çıkarılma anında veya hemen öncesinde prostaglandin F2 α (PGF2 α) analogu ile luteoliz desteklenmekte ve çoğu protokolda eş zamanlı olarak eksojen gonadotropin (çoğunlukla eCG/PMSG) uygulanarak ovulasyon oranı artırılmaktadır (Martemucci ve D'Alessandro, 2011; Fonseca ve ark., 2018; Cosentino ve ark., 2023).

Kısa süreli protokollerde, intravajinal P4/P4-analog araçları 5–7 gün süreyle vajinada tutulmakta; uygulamanın ilk gününde ve/veya cihazın çıkarılmasından 24 saat önce PGF2 α uygulanarak mevcut korpus luteumlar lize edilmektedir. Süngerlerin çıkarılmasına eş zamanlı veya hemen sonrasında verilen eCG, baskın follikülün büyümesini ve ovulasyon oranını artırmakta, aynı zamanda ovulatuar folliküllerden salgılanan östradiol düzeylerini yükselterek daha belirgin östrus belirtileri ve daha senkronize ovulasyon sağlamaktadır (Cosentino ve ark., 2023). Böylece suni tohumlamalar genellikle süngerin çıkarılmasını takiben 48–60. saatler arasında gerçekleştirilebilmektedir.

Bazı protokollerde, eCG yerine ya da eCG'ye ek olarak GnRH analogları (örn. buserelin, lecirelin) kullanılmaktadır. GnRH uygulaması ile kontrollü bir LH dalgası indüklenerek folliküler dalga yönetimi optimize edilmekte ve ovulasyonun zamanlaması daha öngörülebilir hâle getirilmektedir (Amiridis ve Cseh, 2012; Bó ve

ark., 2016; Cosentino ve ark., 2023). Mevsimsel anöstrus döneminde ise, ışık programları ve melatonin implantları ile pineal–hipotalamik eksenin modülasyonu yoluyla siklusların yeniden uyarılması ve ardından progestagen–gonadotropin kombinasyonlarının uygulanması yaygın bir strateji olarak bildirilmektedir (Luo ve ark., 2019).

Uzun süreli protokollerde, 12–14 gün süreyle uygulanan progestagen sünger veya CIDR tedavisini takiben PGF2 α ve eCG, süngerin çıkarılması sırasında veya hemen öncesinde verilmektedir. Bu yaklaşım özellikle doğal çiftleşme ile birleştirilen programlarda ve mevsime kuvvetle bağlı ırklarda halen yaygın biçimde kullanılmaktadır. Ancak uzun süreli düşük düzey progesteron maruziyetinin, kalıcı ve yaşlanmış ovulatör folliküllere ve fertilitede azalmaya yol açabileceğinden düşük doz ve kısa süreli protokollerin giderek daha fazla tercih edilmeye başlandığı bildirilmektedir (Alexander ve ark., 2010; Cosentino ve ark., 2023).

Resenkronizasyon protokollerinde, ilk suni tohumlama sonrasında gebeliği oluşmayan dişilerde, yeni bir luteal faz üzerine ikinci bir P4 cihazı yerleştirilmekte ve erken dönemde gebelik dışı dişilerin Doppler ultrasonografi ile belirlenmesini takiben yalnızca bu hayvanlarda PGF2 α ve eCG destekli yeni bir senkronizasyon siklusu başlatılmaktadır. Böylece arka arkaya suni tohumlama programları ile sezon içinde bir dişiye birden fazla gebelik şansı tanınmaktadır (Cosentino ve ark., 2023).

Süperovulasyon ve Senkronizasyon

Koyun ve keçilerde embriyo biyoteknolojilerinin temelini, süperovulasyon sonrası in vivo embriyo üretimine dayalı çoklu ovulasyon ve embriyo transferi (multiple ovulation and embryo transfer; MOET) programları oluşturmaktadır. Hem koyun hem de keçi, dünya genelinde üretilen embriyoların büyük çoğunluğunun hâlen MOET kaynaklı olduğu; in vitro embriyo üretiminin (IVEP)

ise özellikle keide son yıllarda belirgin artış gösterdiği, ancak toplam sayı içinde henüz MOET'i geçemediği bildirilmektedir (Alexander ve ark., 2010; Souza-Fabjan ve ark., 2023).

MOET programlarında ilk adım, donör dişilerde östrus ve ovulasyonların sıkı biçimde senkronize edilmesidir. Tipik bir protokolda, 14–17 gün süreyle intravajinal P4/progestagen cihazı uygulanır. Cihazın çıkarılmasından yaklaşık 48 saat önce başlayarak, günde iki kez olmak üzere 3–4 gün süreyle azalan dozlarda FSH enjeksiyonları yapılmaktadır (Alexander ve ark., 2010). Bu yaklaşım ile çok sayıda antral follikül eş zamanlı olarak uyarılmakta ve tek bir siklus içinde çoklu ovulasyon sağlanmaktadır. Östrus, progestagenin kesilmesini takiben beklenen zaman aralığında ortaya çıkmaktadır. Bu dönemde donör dişilere doğal aşım veya suni tohumlama uygulanmaktadır. Suni tohumlama sonrası 6–7. günde uterus yıkanarak morula/blastosist evresindeki embriyolar toplanmakta ve östrusları senkronize edilmiş taşıyıcı dişilere taze veya dondurulmuş olarak transfer edilmektedir (Alexander ve ark., 2010; Fonseca ve ark., 2016).

Keçilerde klasik süperovulasyon protokollerinin genellikle 11–18 günlük progesteron/progestagen uygulaması ile başladığı, sonrasında gonadotropin uygulamalarının progestagenin çekilmesinden önceki son 2–3 günde başlatıldığı ve bu protokollerin değişken yanıt ve prematür luteal regresyon gibi sorunlarla birlikte seyrettiği bildirilmektedir (Gordon, 2004). Bu nedenle, “day 0 protokolü” olarak adlandırılan, gonadotropin tedavisinin ovulasyondan hemen sonra, yeni folliküler dalganın ortaya çıktığı dönemde başlatıldığı protokoller geliştirilmiş ve hem ovulasyon sayısı hem de embriyo kalitesi bakımından klasik protokollere göre üstün sonuçlar elde edildiği ifade edilmektedir (Menchaca ve ark., 2018; Gordon, 2004).

Sütçü keçilerde pratiğe yansımış protokollerde, östrus senkronizasyonu için sıklıkla PMSG+CIDR veya FSH+CIDR kombinasyonlarının kullanıldığı, aynı kombinasyonların uygun doz ve zamanlamalarla süperovulasyon amacıyla da uygulandığı bildirilmektedir (Luo ve ark., 2019). Bununla birlikte, özellikle PMSG tekrarlı kullanımında ovaryumda yan etkiler, luteal fonksiyon bozuklukları ve döl veriminde azalma görülebilmektedir. Bu nedenle modern MOET programlarında FSH temelli protokollerin ve inhibin-nötralizasyonu gibi alternatif yaklaşımların ön plana çıktığı ifade edilmektedir (Gordon, 2004; Luo ve ark., 2019).

Östrus Senkronizasyonu ve Süperovulasyon Uygulamalarının Sınırlılıkları

Her ne kadar östrus ve ovulasyon senkronizasyonu küçük ruminant üretiminde vazgeçilmez araçlar hâline gelmiş olsa da, bu protokollerin önemli sınırlılıkları bulunduğu bildirilmektedir. İlk olarak, farklı ırklar ve hatta aynı ırk içerisindeki farklı sürüler arasında belirgin reproduktif mevsimsellik farklılıkları bulunur. Bu da standart hormon protokollerine verilen yanıtın oldukça değişken olmasına neden olmaktadır (Gómez-Brunet ve ark., 2012; Cosentino ve ark., 2023). Bazı ırklarda anöstrus döneminde senkronizasyon sonrası östrus oranları ve gebelik oranları belirgin biçimde düşmektedir. Özellikle düşük doz protokoller ve yalnızca progestagen-PGF2 α kombinasyonlarına dayanan şemalarda daha belirgin hâle gelmektedir.

İkinci olarak, hormon protokollerinin bileşimi, dozları ve uygulama süreleri arasında henüz tam bir standardizasyon sağlanamamıştır. Progestagen süngerlerin uzun süreli kullanımında P4 maruziyetine bağlı olarak persiste folliküller, düşük ovulatör follikül kalitesi ve fertilitede azalma gözlenebilmektedir (Oliveira ve ark., 2014). Öte yandan, kısa süreli protokollerde yetersiz progesteron baskılanması durumunda folliküler dalgalar yeterince

senkronize edilememektedir. Suni tohumlama sonrası gebelik oranlarında değişkenliğe yol açmaktadır (Cosentino ve ark., 2023).

Gonadotropin kullanımı da önemli sınırlılıklar içermektedir. PMSG/eCG'nin tekrarlı uygulamalarında anti-gonadotropin antikorlarının gelişmesi, ovaryum yanıtında azalma ve luteal fonksiyon bozuklukları ile ilişkilidir. Bu nedenle aynı hayvanda tekrarlı süperovulasyon uygulamalarının embriyo sayısı ve kalitesini kademeli olarak düşürdüğü bildirilmektedir (Luo ve ark., 2019). Koyun ve keçide MOET programlarının başarısını sınırlayan faktörler arasında gonadotropin kaynağı ve saflığı, uygulanma protokolü ve kullanılan progestagen rejiminin yanı sıra; yaş, ırk, vücut kondisyonu ve reproduktif durum gibi hayvana ait içsel faktörler de sayılmaktadır (Alexander ve ark., 2010).

Resenkronizasyon protokollerinde, P4 aracının gebelik durumu bilinmeden, erken luteal fazda yeniden uygulanmasının endojen korpus luteum fonksiyonunu olumsuz etkileyerek embriyo kayıplarına yol açabileceğı uzun süre önemli bir endişe konusu olmuştur. Ayrıca tüm dişilerin gebelik durumuna bakılmaksızın ikinci kez hormon uygulanması, gereksiz hormon kullanımı, gereksiz sperma tüketimi ve erken gebelik döneminde gereksiz hayvan manipölasyonu gibi sakıncaları beraberinde getirmektedir (Cosentino ve ark., 2023). Bu nedenle, Doppler ultrasonografi ile erken gebelik dışı dişilerin seçilmesi ve yalnızca bu gruba resenkronizasyon uygulanması yönünde protokoller geliştirilmektedir.

Üçüncü bir sınırlılık, senkronizasyon protokollerinin ekonomik ve çevresel maliyetleri ile ilgilidir. Hormon preparatlarının maliyeti, özellikle küçük ölçekli aile işletmelerinde programların rutin kullanımını kısıtlayabilmektedir (Kaya ve ark., 2018). Ayrıca, geniş sürülerde senkronizasyon programlarında kullanılan hormon ve sarf maddelerinin çevresel etkileri, hayvansal

Üretimde sürdürülebilirlik perspektifiyle birlikte değerlendirilmeye başlanmıştır. Tüketicilerin beklentileri ve hayvan refahına ilişkin duyarlılığın artması, daha düşük dozlu, daha kısa süreli ve mümkün olduğunca az müdahaleye dayalı senkronizasyon protokollerinin geliştirilmesini teşvik etmektedir (Souza-Fabjan ve ark., 2023).

Son olarak, senkronizasyon ve süperovulasyon uygulamalarının başarısı yalnızca hormonal protokole bağlı olmayıp, sürü yönetimi, besleme düzeyi, damızlık seçimi, koç/teke verimliliği, tohumlama tekniği ve embriyo biyoteknolojileri ile entegrasyon düzeyi tarafından belirgin biçimde etkilenmektedir. Bu nedenle, koyun ve keçilerde östrüs ve ovulasyon senkronizasyonu, izole bir işlem olarak değil, bütüncül bir reproduktif yönetim paketi içerisinde ele alınır. Sürü bazında genetik ışlah stratejileri, besleme programları ve sağlık yönetimi ile entegre edildiğinde en yüksek verimlilik düzeyine ulaşabilmektedir (Kaya ve ark., 2018; Souza-Fabjan ve ark., 2023).

KOYUN VE KEÇİLERDE SPERMANIN SAKLANMASI

Koyun ve keçilerde reproduktif biyoteknolojilerin etkin biçimde uygulanabilmesi için, ejakülatın kısa ve uzun süreli saklanmasına yönelik tekniklerin tür ve hatta ırk düzeyinde optimize edilmesi gerektiği değerlendirilmektedir. Suni tohumlama, in vitro embriyo üretimi ve embriyo transferi programlarında kullanılan spermanın kalitesi, büyük lęde saklama yöntemi, sulandırıcı bileşimi ve dondurma-ęzme koşulları tarafından belirlenmektedir (Alexander ve ark., 2010; Souza-Fabjan ve ark., 2023). Kğk ruminant spermasının, özellikle boğa spermasına kıyasla daha düşük kriyotolerans göstermesi, bu türlerde saklama protokollerinin geliştirilmesini zorlaştıran temel biyolojik sınırlılıklar arasında sayılmaktadır (Lv ve ark., 2019; Rizkallah ve ark., 2022).

Spermanın Kısa Süreli Saklanması

Kısa süreli saklama, ejakülatın genellikle 4–5 °C civarında, birkaç saatten 24–72 saate kadar değişebilen sürelerde muhafaza edilmesini kapsamaktadır. Bu yaklaşım, nativ spermayla suni tohumlama yapılan sürülerde, tohumlama zamanının esnek biçimde planlanmasını, aynı ejakülatın birden fazla tohumlama için kullanılmasını ve uzak mesafelerdeki işletmelere sperma taşınmasını mümkün kılmaktadır (Kaya, 2018; Luo ve ark., 2019).

Kısa süreli saklama protokollerinde genellikle Tris–sitratafruktoz veya Tris–sitrataglukoz tamponları, enerjiyi sağlayan karbonhidratlar, tamponlayıcı sistemler, antibiyotikler ve membranı stabilizasyon amacıyla yumurta sarısı, süt ürünleri veya fosfolipid içeren bileşenler kullanılmaktadır. Çeşitli çalışmalarda, koç spermasının 4–5 °C’de, farklı sulandırıcılarla 48–72 saate kadar kabul edilebilir motilite ve membran bütünlüğü ile saklanabildiği ancak fertilitenin özellikle ilk 12–24 saat içinde en yüksek düzeyde seyrettiği bildirilmektedir (López-Saéz ve ark., 2000; O’Hara ve ark., 2010; Menchaca ve ark., 2018).

Koç spermasının kısa süreli saklanmasında kullanılan sulandırıcıların karşılaştırıldığı çalışmalarda, yağsız süt bazlı sulandırıcıların, Tris-trehaloz veya fosfolipid içeren ticari sulandırıcılara benzer ya da bazı durumlarda daha yüksek düzeyde motilite ve membran bütünlüğü sağladığı belirtilmektedir. Bununla birlikte sulandırıcının bileşimi, saklama süresi ve sıcaklığı ile etkileşim içinde değerlendirildiğinde sonuçların değişkenlik gösterdiği belirtilmektedir (López-Saéz ve ark., 2000; O’Hara ve ark., 2010).

Kısa süreli saklama sırasında oksidatif stresin önemli bir zarar mekanizması olduğu, reaktif oksijen türlerinin membran lipidlerini, mitokondriyal fonksiyonu ve DNA bütünlüğünü bozduğu, bu nedenle sulandırıcılara antioksidanların eklenmesinin

hem koç hem de teke spermasında motilite ve membran bütünlüğünü koruyabildiği bildirilmektedir. Tris–yumurta sarısı sulandırıcısına katalaz ve Trolox ilavesinin koç spermasında canlılık ve fonksiyonel membran bütünlüğünü iyileştirdiği, benzer şekilde vitamin C ve vitamin E, taurine, glutatyon, trehaloz, melatonin, likopen ve benzeri antioksidanların kalite parametrelerini korumaya yardımcı olduğu rapor edilmektedir (da Silva Maia ve ark., 2009; Akhter ve ark., 2023; Bucak ve Tekin, 2007; Akalın ve ark., 2016).

Keçilerde kısa süreli saklama uygulamalarında, yumurta sarısı ve süt ürünlerine dayalı klasik sulandırıcılara ek olarak, bitkisel fosfolipid içeren ticari sulandırıcıların ve soya lesitin bazlı sulandırıcıların giderek daha fazla kullanıldığı bildirilmektedir (Lv ve ark., 2019; Silva ve ark., 2019).

Spermanın Uzun Süreli Saklanması

Uzun süreli saklama, spermanın dondurularak çok düşük sıcaklıklarda, genellikle sıvı azot içinde -196 °C’de teorik olarak süresiz sayılabilecek sürelerle muhafaza edilmesine dayanmaktadır. Kriyoprezervasyon, yüksek genetik değere sahip koç ve tekelerin genetik materyalinin uzun mesafelerde taşınmasına, gen bankalarının oluşturulmasına ve ileri reproduktif biyoteknolojilerle birlikte kullanılmasına imkân vermektedir (Lv ve ark., 2019; Kaya, 2018; Souza-Fabjan ve ark., 2023).

Klasik dondurma protokolü, ejakülatın önce uygun bir sulandırıcı ile gerekli spermatozoon konsantrasyonuna getirilmesini, ardından kademeli olarak oda sıcaklığından 4–5 °C’ye soğutulmasını içermektedir. Soğutma aşamasında genellikle önce gliserol içermeyen bir ön sulandırma yapılmakta, 4–5 °C’ye ulaşıldıktan sonra gliserol içeren ikinci bir fraksiyon eklenerek permeabl kriyoprotektanın hücre içine dengeli biçimde geçişi sağlanmaktadır. Bu aşamada spermanın belirli bir süre (çoğu protokolda 1–2 saat) dengeye gelmesi beklenir. Ardından sperma

0,25 veya 0,5 ml'lik payetlere doldurulmakta ve sıvı azot yüzeyinde buhar fazında belirli bir yükseklikte kademeli olarak dondurulmaktadır. Son aşamada pipetler sıvı azot içerisine daldırılarak uzun süreli depolamaya alınmaktadır (Lv ve ark., 2019; Alexander ve ark., 2010).

Son yıllarda, klasik yavaş dondurma yöntemine alternatif olarak vitrifikasyon ve freeze-drying gibi tekniklerin de araştırıldığı ancak bu yöntemlerin fertilizasyon için çoğu zaman intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu gibi ileri mikro manipülasyon tekniklerine ihtiyaç duyduğu bilinmektedir.

Koyun ve keçi spermasının dondurularak saklanması için kullanılan sulandırıcılar, temel olarak tampon sistemleri, enerji substratları, koruyucu kolloidler, permeabl ve nonpermeabl kriyoprotektanlar, antioksidanlar ve antibiyotiklerden oluşmaktadır. Tris-sitrat-fruktoz veya Tris-yumurta sarısı tabanlı sulandırıcılar koç sperması için uzun yıllar boyunca standart olarak kullanılmış, süt bazlı ve ticari fosfolipid içeren sulandırıcılar ile bu sistemler desteklenmiştir (da Silva Maia ve ark., 2009; Lv ve ark., 2019).

Permeabl kriyoprotektanlar arasında en yaygın kullanılan molekül gliseroldür. Bununla birlikte gliserol, özellikle koç spermasında yüksek osmotik stres ve toksisiteye yol açabilmekte, bu nedenle hem konsantrasyonun dikkatle ayarlanması gerektiği bildirilmektedir (Lv ve ark., 2019; Rizkallah ve ark., 2022).

Bazı çalışmalarda etilen glikol, dimetil sülfoksit ve propilen glikol gibi alternatif permeabl kriyoprotektanların da koç ve teke spermasında test edildiği ancak gliserolün fertilite açısından hâlen referans molekül konumunda olduğu belirtilmektedir (Lv ve ark., 2019).

Nonpermeabl kriyoprotektanlar arasında yumurta sarısı, yağsız süt, düşük yoğunluklu lipoprotein fraksiyonları, bitkisel fosfolipidler, şekerler ve proteinler sayılmaktadır. Yumurta sarısının,

özellikle phosvitin ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) fraksiyonları aracılığıyla sperm plazma membranı üzerinde koruyucu bir film oluşturduğu, membran fosfolipidlerinin stabilizasyonuna ve soğutma sırasında faz geçişlerinin tamponlanmasına katkı sağladığı bildirilmektedir. Tris–yumurta sarısı sulandırıcısına trehaloz, taurine, glutatyon gibi nonpermeabl kriyoprotektan–antioksidanların eklenmesinin dondurma–çözme sonrası motilite ve membran bütünlüğünü artırdığı gösterilmiştir (da Silva Maia ve ark., 2009; Bucak ve Tekin, 2007).

Keçi spermasında yumurta sarısı ve süt bazlı sulandırıcıların kullanımını sınırlayan önemli bir nokta, seminal plazmada bulunan fosfolipaz A aktivitesidir. Bu enzim, yumurta sarısı ve süt ürünlerindeki fosfolipidleri hidrolize ederek lizofosfolipidler ve serbest yağ asitleri oluşturmakta, bu moleküller sperm plazma membranında deterjan benzeri etki ile hasara yol açabilmektedir. Bu nedenle keçi spermasının kriyoprezervasyonunda seminal plazmanın sulandırma öncesi uzaklaştırılması ve hayvansal kökenli lipoproteinler yerine bitkisel fosfolipid içeren sulandırıcıların kullanılması önerilmektedir (Lv ve ark., 2019; Bodu ve ark., 2025).

Soya lesitini bazlı sulandırıcıların keçi spermasının dondurulması sırasında yumurta sarısı ve süt bazlı sulandırıcılar ile benzer veya daha iyi çözüm sonu motilitesi, plazma membranı bütünlüğü ve fertilite sağladığı bildirilmektedir (Forouzanfar ve ark., 2010; Silva ve ark., 2019; Tarig ve ark., 2017).

Son yıllarda hem koç hem de teke spermasının dondurulmasında sulandırıcı formülasyonlarının daha da geliştirilmesi amacıyla antifriz proteinler, kolesterol yüklü siklodekstrinler, vitaminler, antioksidanlar ve çeşitli nano partiküllerin kullanıldığı bildirilmektedir (Li ve ark., 2023; Bodu ve ark., 2025).

Koyun ve Keçilerde Kriyoprezervasyon İşleminin Sınırlılıkları

Küçük ruminantlarda sperma kriyoprezervasyonunun en belirgin sınırlılığı türlere özgü membran yapısı ve seminal plazma bileşimi nedeniyle koç ve teke spermasının boğa spermasına göre daha düşük kriyotolerans göstermesidir. Koç spermasının plazma membranında kolesterol/fosfolipid oranının düşük, çoklu doymamış yağ asidi oranının ise yüksek olduğu bilinmektedir. Bu yapısal özelliklerin membranı daha akışkan hâle getirdiği ancak soğutma ve dondurma sırasında faz geçişlerine, lipid yeniden düzenlenmesine ve oksidatif hasara karşı duyarlılığı artırdığı bildirilmektedir (Rizkallah ve ark., 2022; Evans ve ark., 1979).

Bu nedenle koç sperması, soğutma hızı, gliserol ekleme hızı ve dondurma eğrisi gibi parametrelerdeki küçük farklılıklara dahi hassas yanıt vermektedir. Bu durum laboratuvarlar ve saha koşulları arasında çözüm sonu spermatolojik parametrelerde önemli varyasyona neden olmaktadır.

Kriyoprezervasyon sırasında karşılaşılan başlıca zarar mekanizmaları arasında hücre içi ve dışı buz kristali oluşumu, ozmotik stres, soğuk şok, membran lipid faz geçişleri, akrozomal zar hasarı, mitokondriyal fonksiyon kaybı ve reaktif oksijen türlerine bağlı oksidatif stres yer almaktadır. Dondurma-çözme sonrası koç ve tekelerde motilite, plazma membranı ve akrozom bütünlüğünde belirgin azalma, DNA bütünlüğünde bozulma, erken akrozom reaksiyonu sıklığında yükselme bildirilmektedir. Bu değişikliklerin fertilizasyon kapasitesi ve embriyo gelişimi üzerinde olumsuz etki yaptığı, bu nedenle çözüm sonu motilitenin tek başına yeterli bir gösterge olmadığı vurgulanmaktadır (Souza-Fabjan ve ark., 2023).

Bir diğer sınırlılık, ejakülat kökenine göre kriyotolerans farklılıkları ile ilgilidir. Koç epididimal spermasının, ejakülat spermasına kıyasla ozmotik stres, soğuk şok ve kriyoprotektan maruziyetine daha dirençli olduğu, epididimal ortamda membran

lipid bileşiminin ve yüzey proteinlerinin farklı düzenlendiği gösterilmiştir (Martínez-Fresneda ve ark., 2019). Bu bulgu, özellikle post-mortem hayvanlardan epididimal sperm toplanarak genetik materyalin kurtarılması çalışmalarında önem taşımaktadır. Ancak saha koşullarında çoğunlukla ejakülat spermasının kullanılması nedeniyle bu potansiyel avantaj pratik uygulamada sınırlı kalmaktadır.

Son olarak, dondurulmuş sperma kullanımı suni tohumlama tekniklerinin etkinliğini sınırlamaktadır. Bu nedenle laparoskopik intrauterin suni tohumlama gibi daha invaziv yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum hem teknik altyapı ve maliyet açısından sınırlayıcı bir unsur olarak değerlendirilmektedir (Alexander ve ark., 2010; Gibbons ve ark., 2019; Kaya, 2018).

Genel olarak değerlendirildiğinde, koyun ve keçilerde sperma saklama tekniklerinin temel prensiplerinin diğer evcil türlerle benzerlik gösterdiği ancak membran lipid yapısı, seminal plazma kompozisyonu ve mevsimsel üreme fizyolojisi gibi tür spesifik özellikler nedeniyle hem kısa süreli saklama hem de kriyoprezervasyon protokollerinin bu türlere özgü olarak optimize edilmek zorunda olduğu açıktır.

KOYUN VE KEÇİLERDE SUNİ TOHURLAMA

Koyun ve keçilerde suni tohumlama, döl veriminin kontrolü ve genetik ıslahın hızlandırılmasına yönelik temel reproduktif biyoteknolojik uygulamalardan biridir. Ancak bu türlerde kullanılan uygulama teknikleri, başarı oranları ve saha kullanım yaygınlığı, büyükbaş hayvanlara kıyasla belirgin biçimde farklılık göstermektedir (Gibbons ve ark., 2019; Fonseca ve ark., 2018).

Vajinal tohumlama

Koyun ve keçilerde en basit ve en eski suni tohumlama yolu, vajinal–servikal tohumlamadır. Bu yöntemde, hayvanlarda

çoğunlukla östrus senkronizasyonu sonrası spekulum yardımıyla vajen ve serviks görüntülenmekte, ardından intravajinal veya serviks kanalının girişine kadar ilerletilen bir kateter ile sperma aktarılmaktadır (Gibbons ve ark., 2019).

Koyunda serviks anatomisi, çok sayıda ve düzensiz halkalar ile karakterize olduğu için, kateterin servikal halkaları aşarak uterusu ulaşması çoğu zaman mümkün olmamakta ve sperma çoğunlukla servikal os externum düzeyine veya daha kranial halkalara kadar verilebilmektedir. Özellikle dondurulmuş-çözdürülmüş koç sperması kullanıldığında servikal tohumlama sonrası gebelik oranlarının genellikle düşük ve değişken olduğu, birçok çalışmada %0–30 aralığında oranların bildirildiği ve bu nedenle dondurulmuş sperma ile servikal suni tohumlamanın yaygın bir saha uygulaması hâline gelemediği vurgulanmaktadır (Salamon ve Maxwell, 1995; Gibbons ve ark., 2019; Tekin ve ark., 2020). Buna karşın taze veya soğutulmuş “chilled” sperma ile yapılan servikal tohumlamalarda, uygun senkronizasyon ve zamanlamayla %40–60’a varan gebelik oranlarının elde edilebildiği bildirilmektedir (Gibbons ve ark., 2019).

Keçilerde ise serviks yapısının daha az kıvrımlı, halkaların daha az sayıda ve daha düzenli olması nedeniyle trans servikal tohumlamanın koyuna kıyasla daha kolay uygulanabildiği ifade edilmektedir (Leethongdee ve Ponglowhapan, 2014; Tekin ve ark., 2020).

Vajinal–servikal suni tohumlama tekniği ekipman gereksiniminin sınırlı oluşu, kısa sürede yüksek sayıda dışının tohumlanabilmesi ve özellikle soğutulmuş spermayla kabul edilebilir gebelik oranlarının elde edilebilmesi nedeniyle saha koşullarına görece daha uygun bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte koyun serviksinin anatomik yapısı, servikal mukus faktörü ve koç spermasının dondurulmaya

düşük toleransı, dondurulmuş sperma ile servikal tohumlamanın etkinliğini sınırlayan temel biyolojik faktörler olarak öne çıkmaktadır (Salamon ve Maxwell, 1995; Gibbons ve ark., 2019).

Laparoskopik suni tohumlama

Laparoskopik suni tohumlama, özellikle koyunlarda dondurulmuş sperma kullanımına bağlı fertilite kayıplarını telafi etmek amacıyla geliştirilmiş ileri bir intrauterin tohumlama tekniği olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemde, östrus senkronizasyonu yapılmış koyun veya keçilere sedasyon ve lokal anestezi uygulanmakta, hayvanlar çoğunlukla sırtüstü pozisyonda tohumlama sehparına alınmakta ve peritoneal kaviteye CO₂ ile pnömoperiton oluşturulduktan sonra karın duvarına yerleştirilen trokarlar üzerinden laparoskop ve tohumlama kanülleri yönlendirilmektedir (Gibbons ve ark., 2019; Kang ve ark., 2024).

Diğer yandan laparoskop yardımıyla uterin kornular görüntülenmekte, tohumlama kanülü veya özel iğneler ile her bir kornu uterin tuba uterin birleşme bölgesine küçük hacimde (genellikle 0,1–0,25 mL) sperma aktarılmaktadır. Dondurulmuş koç sperması kullanıldığında, doz başına 20–60×10⁶ motil spermatozoon içerecek şekilde protokoller önerilmektedir (Gibbons ve ark., 2019). Çeşitli çalışmalarda laparoskopik intrauterin tohumlama ile dondurulmuş sperma kullanıldığında gebelik oranlarının çoğunlukla %60–75 aralığında olduğu, hatta geniş ölçekli Merinos sürülerinde 28.000’in üzerinde koyunda ortalama %70 civarında gebelik oranının elde edildiği bildirilmektedir (Hill ve ark., 1998; Gibbons ve ark., 2019; Spanner ve ark., 2024). Bu nedenle laparoskopik tohumlama, koyunlarda dondurulmuş sperma ile suni tohumlamanın “altın standart” tekniği olarak değerlendirilmektedir (Gibbons ve ark., 2019).

Keçilerde laparoskopik intrauterin suni tohumlamanın klinik ve sahaya dayalı uygulamalarının sınırlı olmakla birlikte giderek

arttığı bildirilmektedir. Özellikle süt keçisi ıslah programlarında, laparoskopik yöntemle dondurulmuş sperma kullanımının, servikal tohumlamaya göre daha yüksek gebelik oranları sağladığı bilinmektedir. Ülkemizdeki bir saha çalışmasında Saanen keçilerde laparoskopik suni tohumlama ile primipar ve multipar hayvanlarda tatmin edici gebelik oranlarının elde edildiği rapor edilmiştir (Kulaksız ve Daşkın, 2012; Tekin ve ark., 2020). Bununla birlikte keçilerde serviks anatomisinin kateter geçişine daha elverişli olması, laparoskopik yöntemin çoğunlukla dondurulmuş sperma ile yüksek genetik değere sahip teke spermasının kullanılmak istendiği özel sürü programlarına özgü kalmasına neden olmaktadır (Leboeuf ve ark., 2008; Luo ve ark., 2019).

Laparoskopik tekniğin en önemli avantajı, dondurulmuş–çözdürülmüş spermayla servikal tohumlamaya kıyasla belirgin düzeyde daha yüksek gebelik oranı sağlaması ve bunun daha düşük sperm dozu ile başarılabilmesidir. Buna karşın genel anestezi ya da sedasyon gereksinimi, cerrahi girişim, karın duvarında trokar girişleri, pnömoperiton ve özel optik–ışık sistemi gibi ekipman gereksinimleri, maliyet ve hayvan refahı ile ilgili kaygılar, bu tekniğin özellikle küçük ölçekli işletmelerde yaygınlaşmasını sınırlayan başlıca faktörler olarak değerlendirilmektedir (Salamon ve Maxwell, 1995; Gibbons ve ark., 2019; Tekin ve ark., 2020).

Ülkemizde keçileri konu alan çalışmalar hem servikal hem de laparoskopik suni tohumlama tekniklerinin uygulanabilir olduğunu ve özellikle süt keçisi sürülerinde, iyi organize edilmiş ıslah programları ile entegre edildiğinde kabul edilebilir gebelik oranları sağlanabildiğini göstermektedir (Kulaksız ve Daşkın, 2012; Tekin ve ark., 2020). Ancak bu çalışmalar genellikle araştırma veya sınırlı sayıda çiftlikten elde edilmiş saha verilerine dayanmaktadır. Resmî istatistiklerin olmayışı nedeniyle, Türkiye’de koyun ve keçilerde suni tohumlamanın toplam çiftleştirmeler içindeki payının hâlihazırda çok düşük olduğu, işletmelerin büyük çoğunluğunda

hâlen doğal aşımın tercih edildiği değerlendirilmektedir (Kaya, 2018).

Bu noktada bir diğer sınırlayıcı faktör de bu türlere dondurulmuş sperma ithalatındaki sürekliliğin sağlanamamasıdır.

Koyun ve keçilerde suni tohumlama, uygun senkronizasyon protokolleri ile birlikte kullanıldığında, işletme düzeyinde ve ulusal ölçekte önemli avantajlar sunmaktadır. Öncelikle, yüksek genetik değere sahip koç ve tekelerin genetik materyalinin geniş sürü popülasyonlarına hızla yayılmasına olanak tanınmakta, bu sayede süt verimi, büyüme hızı, karkas kalitesi veya döl verimi gibi hedef özelliklerde genetik ilerleme hızının doğal çiftleşmeye göre belirgin biçimde arttığı bildirilmektedir (Leboeuf ve ark., 2008; Luo ve ark., 2019; Viana, 2022). Dondurulmuş sperma kullanımı, damızlık erkeklerin uzak bölgelere hatta uluslararası düzeyde genetik materyal transferini mümkün kılarak, taşıma maliyetlerini azaltmakta ve hayvanların nakline bağlı stres ve biyogüvenlik risklerini azaltmaktadır (Salamon ve Maxwell, 1995; Gibbons ve ark., 2019).

İkinci olarak, suni tohumlama, östrus senkronizasyonu ile birlikte uygulandığında doğumların belirli ve dar bir zaman penceresinde yoğunlaşmasını sağlamakta, bu da kuzu ve oğlakların benzer yaş ve ağırlıkta gruplar hâlinde yönetilmesine, aşılama, besleme ve pazarlama stratejilerinin daha planlı yürütülmesine imkân vermektedir (Faigl ve ark., 2012; Gibbons ve ark., 2019). Süt keçisi işletmelerinde laktasyon başlangıçlarının kümelenmesi, sağım planlaması ve iş gücü organizasyonu açısından ayrıca önemli görülmektedir (Leboeuf ve ark., 2008; Luo ve ark., 2019).

Üçüncü olarak, suni tohumlama, özellikle venereal yolla bulaşan enfeksiyonların kontrolü ve eradikasyon programlarında kritik bir araç olarak değerlendirilmektedir. Spermaların toplanması, işlenmesi ve dondurulması sırasında hijyen ve sağlık tarama

protokollerinin uygulanması, enfekte damızlık erkeklerin sürü popülasyonlarına doğrudan bulaşma riskini azaltmaktadır (Leboeuf ve ark., 2000; Parkinson, 2024).

Son olarak, suni tohumlama, laparoskopik ovum pick-up, in vitro embriyo üretimi ve embriyo transferi gibi ileri üreme biyoteknolojilerinin de ön koşulu olarak görülmektedir. Bu teknikler aracılığıyla seçilmiş dişilerden kısa sürede çok sayıda yavru elde edilmesi mümkün hâle gelmektedir (Cognie ve ark., 2003; Viana, 2022; Falchi ve ark., 2022). Dolayısıyla suni tohumlama, yalnızca tek başına bir teknoloji değil, aynı zamanda diğer reproduktif biyoteknolojilere giden yolun temel basamağı olarak konumlandırılmaktadır.

Suni Tohumlamanın Sınırlılıkları

Koyun ve keçilerde suni tohumlamanın yaygınlığının, sığır gibi türlere kıyasla sınırlı kalmasının temelinde teknik, biyolojik ve sosyoekonomik pek çok faktörün bulunduğu değerlendirilmektedir.

Sosyoekonomik açıdan bakıldığında, birçok ülkede küçük ruminant üretiminin hâlen geniş ölçüde küçük aile işletmeleri ve göçer–yarı göçer sistemler üzerine kurulu olması, kayıt sistemlerinin zayıf, organizasyon ve kooperatifleşmenin sınırlı olması, suni tohumlamanın organize programlar hâlinde yürütülmesini güçleştirmektedir (FAO, 1991; Kaya, 2018; Parkinson, 2024). Bu yapı içinde doğal aşım, hem düşük teknolojik gereksinimi hem de mevcut sürü yönetimi alışkanlıkları ile daha uyumlu olduğundan, çoğu işletmede hâlâ “varsayılan” çiftleştirme yöntemi olarak kullanılmaktadır.

Son olarak, suni tohumlama programlarının başarılı olabilmesi için östrus senkronizasyonu, vücut kondisyonu, besleme, sürü sağlığı, tohumlama zamanı ve sperma kalitesi gibi pek çok parametrenin birlikte ve hassas bir şekilde yönetilmesi

gerekmektedir. Gerek koyun gerekse keçilerde, farklı çalışmalar arasında bildirilen gebelik oranlarındaki büyük varyasyonun önemli bir kısmı bu yönetim faktörlerindeki farklılıklardan kaynaklanır. Özellikle saha koşullarında zamanlama hataları, yetersiz östrus senkronizasyonu ve sperm işleme protokollerindeki değişkenliğin başarıyı sınırlayan başlıca unsurlar olduğu bildirilmektedir (Donovan ve ark., 2004; Molina ve ark., 2012; Gibbons ve ark., 2019; Tekin ve ark., 2020).

Tüm bu nedenlerle koyun ve keçilerde suni tohumlamanın, özellikle organize süt keçisi sürüleri ve belirli koyun ıslah şemalarında kritik bir araç olarak kullanıldığı, ancak küçük ruminant yetiştiriciliğinin genel fotoğrafı içinde hâlen sınırlı düzeyde yer aldığını söylemek mümkündür.

KOYUN ve KEÇİLERDE EMBRİYO TRANSFERİ

Koyun ve keçilerde embriyo transfer uygulamalarındaki güncel bilgi birikiminin büyük ölçüde in vivo embriyo üretimine dayandığı, ancak in vitro embriyo üretimi ve juvenil donörlerden yararlanma stratejilerinin hızla önem kazandığı değerlendirilmektedir (Fonseca ve ark., 2016; Souza-Fabjan ve ark., 2023).

Koyun ve keçilerde in vitro embriyo üretimi uygun donörlerden oositlerin toplanması, in vitro maturasyon (IVM), in vitro fertilizasyon (IVF) ve in vitro kültür (IVC) aşamalarından oluşan çok basamaklı bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Bu türlerde oositler, çoğunlukla kesimhane materyalinden elde edilen ovaryumlardan, ya da canlı hayvanlarda laparoskopik ovum pick-up (LOPU) protokolleri ile toplanmaktadır. Bunu takiben standartlaştırılmaya çalışılan maturasyon ve kültür protokolleri uygulanmaktadır (Teixeira ve ark., 2011; Tervit, 1996; Falchi ve ark., 2022).

Mevcut veriler, küçük ruminantlarda in vitro embriyo üretimi (IVEP)'in son yıllarda en hızlı büyüyen reprodüktif biyoteknoloji olduğunu, ancak endüstriyel düzeyde embriyo üretiminin hâlâ ağırlıklı olarak multiple ovulasyon ve embriyo transferi (MOET) üzerine kurulu bulunduğunu göstermektedir (Fonseca ve ark., 2016; Souza-Fabjan ve ark., 2023). Uluslararası Embriyo Teknolojisi Derneği (IETS) bültenlerinde, koyunlarda 2021 yılı itibarıyla dünya çapında üretilen embriyoların yaklaşık tamamının in vivo kökenli olduğu, IVEP kaynaklı embriyoların ise toplam içindeki payının oldukça sınırlı kaldığı bildirilmektedir (Viana, 2022; Souza-Fabjan ve ark., 2023).

Oosit kalitesi, küçük ruminant IVEP programlarının en kritik bileşenlerinden biri olarak değerlendirilmektedir. Mevsimsel östrus ve foliküler dinamikler nedeniyle, özellikle mevsim dışı dönemde elde edilen oositlerin gelişim potansiyelinin düştüğü bilinmektedir. Dolayısıyla süperovulasyon ve senkronizasyon protokollerinin mevsime ve donör tipine göre uyarlanması gerekliliği vurgulanmaktadır (Paramio ve Izquierdo, 2016; Souza-Fabjan ve ark., 2023). Canlı hayvandan LOPU ile alınan oositler ile postmortem ovaryumlardan elde edilen oositler arasında kalite ve gelişim yeteneği bakımından heterojenliğin belirgin olduğu, bu heterojenliğin IVM ve IVC protokollerinin optimizasyonunu güçleştirdiği bildirilmektedir (Souza-Fabjan ve ark., 2023).

Kültür sistemlerinin modernizasyonu kapsamında klasik TCM-199 bazlı maturasyon medyumlarının yerine serum içeriği azaltılmış veya serumdan tamamen arındırılmış ortamların kullanımı, oksidatif stresin azaltılması için antioksidan ilavesi, düşük oksijen konsantrasyonlu (yaklaşık %5 O₂) inkübasyon koşulları ve folikül sıvısı, oviduktal epitel hücrelerinin kültüre eklenmesi gibi yaklaşımlar öne çıkmaktadır (Vajta ve Kuwayama, 2006; Falchi ve ark., 2022; Souza-Fabjan ve ark., 2023). Ayrıca embriyo gelişiminin zamana bağlı morfodinamiklerinin gerçek

zamanlı görüntüleme sistemleri ile izlenmesi ve bu verilerin yapay zekâ tabanlı sınıflandırma algoritmaları ile birleştirilmesi sayesinde, non-invaziv embriyo seçimi için yeni kriterler geliştirilmeye çalışılmaktadır (Falchi ve ark., 2022).

Embriyo seçimi halen büyük ölçüde morfolojik kriterlere dayandırılmaktadır. Seçimde blastomer sayısı, simetri, fragmentasyon oranı ve blastosist evresinde iç hücre kitlesi/trofektoderm ayrımı gibi parametreler kullanılmaktadır (Reproductive Technologies in Farm Animals, 2004; Fonseca ve ark., 2016). Ancak bu morfolojik skorların gebelik ve canlı doğumla olan korelasyonunun sınırlı olduğu, embriyo metabolomik profilleri ve kültür medyumunda biriken biyobelirteçler gibi moleküler verilerle desteklenmiş, çok parametrelili seçim sistemlerine ihtiyaç duyulduğu değerlendirilmekte, bu alanda omik teknolojilere ve makine öğrenmesi modellerine dayalı çalışmaların hız kazandığı bildirilmektedir (Falchi ve ark., 2022; Souza-Fabjan ve ark., 2023).

Kriyoprezervasyon açısından bakıldığında, koyun ve keçi embriyolarının, özellikle in vitro kökenli olanların dondurma-çözdürme işlemlerine duyarlılığının in vivo embriyolara kıyasla daha yüksek olduğu açıktır. Vitrifikasyon protokollerinin dahi canlılık ve gebelik oranlarında arzu edilen seviyeye ulaşmakta zorlandığı belirtilmektedir (Vajta ve Kuwayama, 2006; Falchi ve ark., 2022). Bunun, IVEP sistemlerinin ticari ölçekte yaygınlaştırılmasının önündeki önemli teknik bariyerlerden biri olduğu vurgulanmaktadır.

Juvenil in vitro embriyo üretimi (JIVET), prepubertal dişilerden oosit toplanarak, bu oositlerden in vitro embriyo üretilmesini ve embriyoların taşıyıcı dişilere transferini amaçlayan bir yaklaşım olarak tanımlanmaktadır (Tervit, 1996; Falchi ve ark., 2022). Bu strateji ile, henüz puberteye ulaşmamış dişi kuzu ve oğlakların genetik potansiyelinin erken yaşta kullanıma açılması ve

böylece jenerasyon aralığının belirgin biçimde kısaltılması hedeflenmektedir (Tervit, 1996; Torres-Rovira ve ark., 2014; Pasquariello ve ark., 2024). Prepubertal oositlerin sitoplazmik maturasyon açısından erişkin dişilerden elde edilenlere göre daha yetersiz olduğu, bunun da blastosist gelişim oranlarını ve son gebelik oranlarını olumsuz etkilediği bildirilmektedir (Torres-Rovira ve ark., 2014; Falchi ve ark., 2022). Bu nedenle, juvenil donörlerde FSH/eCG temelli stimülasyon protokollerinin, vitaminler, büyüme faktörleri ve oosit maturasyonunu destekleyici diğer katkılarla kombine edildiği, tür ve ırka özgü optimizasyon çalışmalarına ihtiyaç bulunduğu değerlendirilmektedir.

JIVET'in jenerasyon aralığı üzerine etkisi, özellikle genomik seleksiyon programları ile entegre edildiğinde belirgin hâle gelmektedir (Falchi ve ark., 2022; Pasquariello ve ark., 2024). Özellikle süt verimi, karkas kalitesi ve adaptasyon gibi kompleks özellikler için genomik seleksiyon ve JIVET entegrasyonunun, küçük ruminant ıslah programlarında stratejik bir araç olarak konumlanmakta olduğu değerlendirilmektedir (Caprine and ovine genomic selection, 2024; Pasquariello ve ark., 2024).

Bununla birlikte juvenil donörlerden oosit toplama prosedürlerinin, anestezi, laparoskopi ekipmanı ve deneyimli ekip gerektirmesi, oosit kalitesindeki bireysel varyasyon, hayvan refahı ve etik kaygılar, maliyet-etkinlik analizlerinin henüz sınırlı olması gibi nedenlerle, JIVET'in bugün için daha çok deneysel kullanım alanına sahip olduğu, ticari ölçekte yaygın kullanımının zaman alacağı bildirilmektedir (Falchi ve ark., 2022; Kaya ve ark., 2018).

Koyun ve keçilerde güncel embriyo transfer uygulamaları, çoğunlukla multiple ovulasyon ve in vivo embriyo üretimine (MOET) dayalı programlar şeklinde yürütülmektedir. Donör dişilerde FSH veya eCG temelli süperovulasyon protokolleri uygulanmakta, östrus senkronizasyonu sağlandıktan sonra doğal

aşım veya suni tohumlama ile fertilizasyon gerçekleştirilmektedir (Fonseca ve ark., 2016; Falchi ve ark., 2022). Fertilizasyonu takiben embriyolar genellikle 6–7. günde morula/blastosist evresinde toplanmakta ve farklı yöntemlerle alıcı dişilere transfer edilmektedir.

Embriyo toplama ve transferinde laparotomi, laparoskopi ve nonsurgical yöntemler olarak üç temel yaklaşımın kullanıldığı bildirilmektedir. Laparotomi, donörün ventral veya flank bölgesinden yapılan cerrahi girişim ile kornu uterilerin lokalize edilmesi, korpus luteum sayısının doğrudan gözlenmesi ve kornuların yıkanması nedeniyle uzun yıllar “altın standart” yöntem olarak benimsenmiştir. Ancak bu yöntemin, genel anestezi gereksinimi, karın boşluğunda ve genital organlarda adhezyon riskinin artması ve operasyonel maliyetler açısından belirgin sınırlılıklar taşıdığı bildirilmektedir (Fonseca ve ark., 2016). Adhezyonlar, hem tekrar embriyo toplama girişimlerinde başarı oranını düşürmekte, hem de sperm transportunu bozarak fertilizasyon oranlarını olumsuz etkileyebilmektedir. Bu nedenle donör başına 2–3’ten fazla yıkamanın önerilmediği vurgulanmaktadır (Fonseca ve ark., 2016).

Laparoskopik embriyo eldesi ve transferi daha küçük ensizyonlar ve daha az doku travması ile kornu uterilere ulaşılmasına olanak sağlaması nedeniyle önemli bir alternatif olarak geliştirilmiştir. Laparoskopi ile donörlerin 5–7 hatta daha fazla kez güvenli biçimde toplanabildiği, adhezyon insidansının daha düşük olduğu ve iyileşme süresinin kısaldığı bildirilmektedir (Teixeira ve ark., 2011; Falchi ve ark., 2022). Bununla birlikte, laparoskopi yüksek maliyetli ekipman, uzun öğrenme eğrisi ve nitelikli personel gereksinimi nedeniyle, birçok ülkede yaygın ticari uygulama düzeyine ulaşamamıştır (Fonseca ve ark., 2016).

Nonsurgical embriyo recovery (NSER) ve trans-servikal embriyo transfer teknikleri, özellikle keçilerde son yıllarda önemli ilerlemeler göstermektedir.

Koyunlarda serviks anatomisinin kompleks olması ve rektal manipölasyonun sınırlı oluşu nedeniyle trans-servikal yıkama ve transfer tekniklerinin uygulanmasının daha güç olduğu, ancak PGE₂ ve diğer ajanlar ile dilatasyonun artırılması sayesinde özellikle belirli ırklarda (örneğin Santa Inês, Dorper) ET oranlarının anlamlı düzeyde yükseltilebildiği rapor edilmiştir. Buna rağmen, dünya genelinde küçük ruminant embriyo transfer endüstrisinin hâlen büyük ölçüde cerrahi yöntemlerle yürütüldüğü değerlendirilmektedir (Fonseca ve ark., 2016).

Embriyoların transferinde, embriyo evresine bağlı olarak ovidukt ya da intra uterin yol hedeflenmektedir. Erken evre (2–8 hücre) embriyolar genellikle ovidukta, kompakt morula ve blastosistler ise ipsilateral kornu uteriye transfer edilmektedir. Alıcı dişinin siklus günü ile donör embriyosunun gelişim evresi arasında 12–24 saatlik bir eşleşme penceresinin korunmasına özen gösterilmektedir (Reproductive Technologies in Farm Animals, 2004; Fonseca ve ark., 2016).

Uluslararası düzeyde küçük ruminant embriyo üretimi ve transferi, toplam çiftlik hayvanı embriyo endüstrisi içinde görece sınırlı bir paya sahip bulunmaktadır. IETS bültenlerine dayanan değerlendirmelerde, koyun ve keçilerden elde edilen embriyoların tüm türler içinde sayısal olarak birkaç on bin düzeyinde seyrettiği, bunların büyük çoğunluğunun in vivo kökenli olduğu ve IVEP'in toplam küçük ruminant embriyoları içindeki oranının henüz birkaç yüzde birim düzeyini aşmadığı bildirilmektedir (Viana, 2022; Souza-Fabjan ve ark., 2023; Falchi ve ark., 2022). Koyunlarda MOET programlarının özellikle Güney Amerika, Okyanusya ve bazı Avrupa ülkelerinde yoğun olarak uygulandığı; keçilerde ise embriyo

transferinin sütçü ve etçi özel sürülerde, özel olarak piyasa ve genetik materyal ihracatı amaçlı yürütüldüğü değerlendirilmektedir (Fonseca ve ark., 2016; Falchi ve ark., 2022).

Ülkemizde reprodüktif biyoteknolojilerin uygulama düzeyine ilişkin kapsamlı değerlendirmeler, embriyo transferi ve IVEP'in büyükbaş hayvancılığa kıyasla küçük ruminantlarda daha sınırlı kaldığını göstermektedir (Kaya ve ark., 2018). Çalışmaların çoğunlukla üniversite ve araştırma enstitülerinde yürütülen deneysel çalışmalarla ve belirli sayıda elit sürüdeki pilot uygulamalarla sınırlı olduğu değerlendirilmektedir (Kaya ve ark., 2018; Birler ve ark., 2010).

Embriyo Transferinin Sınırlılıkları

Koyun ve keçilerde embriyo transferi ve ilişkili biyoteknolojilerin yaygınlaşmasını sınırlayan faktörler biyolojik, teknik ve sosyoekonomik düzeyde gruplanarak değerlendirilmektedir.

Biyolojik sınırlılıklar bağlamında süperovulasyon yanıtındaki bireysel varyasyon, oosit ve embriyo kalitesindeki heterojenlik, mevsimsel üreme özellikleri, embriyonik kayıplar ve embriyoların dondurma-çözdürme sonrası canlılık düzeyi öne çıkmaktadır (Falchi ve ark., 2022; Souza-Fabjan ve ark., 2023). Ayrıca, IVEP kaynaklı embriyolarda sitoplazmik olgunlaşma ve epigenetik yeniden programlama süreçlerinin optimal düzeyde olmaması nedeniyle hem blastosist oranlarının hem de gebelik ve canlı doğum oranlarının in vivo embriyolara kıyasla daha düşük kaldığı bildirilmektedir (Rizos ve ark., 2002; Falchi ve ark., 2022).

Teknik ve lojistik sınırlılıklar açısından laparotomi temelli protokollerin adhezyon riski ve tekrar kullanım açısından dezavantajları devam etmektedir. Embriyo seçiminin hâlen büyük ölçüde subjektif morfolojik kriterlere dayanması, non-invaziv

biyobelirteçlerin ve objektif ölçütlerin rutin kullanıma girmemiş olması, transfer edilecek embriyoların gerçek implantasyon potansiyelini tahmin etmeyi zorlaştırmaktadır (Reproductive Technologies in Farm Animals, 2004; Falchi ve ark., 2022). Özellikle IVEP embriyolarında metabolik profilleme, time-lapse görüntüleme verileri ve omik tabanlı parametrelerin entegre edildiği çoklu karar sistemlerinin henüz sınırlı sayıda merkezde kullanılabildiği bildirilmektedir (Falchi ve ark., 2022; Souza-Fabjan ve ark., 2023).

Sosyoekonomik ve altyapısal sınırlılıklar da embriyo transferinin yaygınlaşmasını önemli ölçüde etkilemektedir. Gelişmiş ET programları nitelikli personel, düzenli hekim kontrolü, altyapı, laboratuvar donanımı ve kayıt sistemleri gerektirmektedir. Bu durum küçük ölçekli aile işletmelerinin hâkim olduğu üretim sistemlerinde maliyet etkinliği azaltmaktadır. Birçok ülkede olduğu gibi Türkiye’de de sığır sektörüne kıyasla küçük ruminantlarda genetik ilerleme için ayrılan kaynakların sınırlı olması, koç/teke sperm bankalarının yetersizliği ve örgütlü ıslah programlarının henüz istenen olgunluğa ulaşmamış olması, embriyo transfer programlarına olan talebi düşürmektedir (Kaya ve ark., 2018).

Sonuç olarak koyun ve keçilerde embriyo transferi, genetik ilerlemenin hızlandırılması, değerli genotiplerin korunması ve ileri biyoteknolojik uygulamaların (transgenik hayvan üretimi, klonlama vb.) pratiğe aktarılması açısından stratejik bir araç olarak konumlanmakla birlikte, teknik, biyolojik ve ekonomik sınırlılıklar nedeniyle uygulama alanının görece dar kaldığı değerlendirilmektedir.

GELECEK PROJEKSİYONU

Küçük ruminantlarda reproduktif biyoteknolojilerin gelişimi son on yılda gerek moleküler genetikteki ilerlemeler gerekse in vitro

embriyo üretimi ve genom düzenleme teknolojilerindeki iyileşmeler doğrultusunda belirgin biçimde hızlanmıştır.

Genomik seleksiyonun, küçük ruminantlarda ıslah programlarını kökten dönüştüren temel araçlardan biri hâline geldiği bildirilmektedir. Yüksek yoğunluklu (Single Nucleotide Polymorphism) SNP panelleri ile tüm genomu kapsayan genotipleme ve buna paralel ayrıntılı fenotip kayıtlarının birleştirilmesi sayesinde, seleksiyon değerleri geleneksel soy-kütüğüne dayalı tahminlere kıyasla daha yüksek doğrulukla hesaplanmaktadır. Böylece özellikle süt verimi, büyüme, karkas özellikleri, yapağı kalitesi ve fertilitateye ilişkin karmaşık özellikler için genetik ilerlemenin hızlandığı vurgulanmaktadır (Zhang ve ark., 2024; Jinya ve ark., 2024).

Son yıllarda Avustralya, Yeni Zelanda, Fransa ve İrlanda gibi ülkelerde koyun ıslah programlarında genomik seleksiyonun rutin genetik değerlendirmelere dâhil edildiği, buna karşın keçi popülasyonlarında genomik veritabanlarının ve referans sürülerin henüz daha sınırlı olduğu, bu nedenle doğruluk düzeylerinin türler ve ülkelere göre değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir (Zhang ve ark., 2024; Seyedsharifi, 2024).

Bununla birlikte, Afrika ve Asya koşullarında yürütülen çalışmaların, yerel keçi ırklarında büyüme performansı, et kalitesi ve çevresel adaptasyonla ilişkili genetik varyasyonun genomik araçlarla başarılı biçimde karakterize edilebildiğini ve bu yaklaşımın küçük işletme ölçekli, düşük girdi düzeyine sahip sistemler için dahi uygulanabilir olduğunu gösterdiği bildirilmektedir (Ncube ve ark., 2025; Muthusamy ve ark., 2025).

Küçük ruminant sürülerinde genomik seleksiyonun pratik uygulamasında iki temel sınırlayıcı alan öne çıkarılmaktadır. Birincisi, çok sayıda bireyi ve uzun yıllara yayılan fenotip kayıtlarını içeren geniş referans popülasyonlarının oluşturulmasına yönelik

altyapı ve maliyet gereksinimleridir. İkincisi ise, özellikle fertilité, laktasyon, parazite direnç ve iklim adaptasyonu gibi kompleks özelliklerin genomik modellerde yeterince temsil edilmesi için uzun dönemli veri birikimine ihtiyaç duyulmasıdır (Zhang ve ark., 2024; Rodrigues ve ark., 2025).

Buna karşın, genomik seleksiyonun embriyo biyoteknolojileriyle birlikte kullanılması durumunda nesil aralığını belirgin biçimde kısaltabildiği, seçkin genotiplerin daha erken yaşlarda damızlık olarak değerlendirilmesine ve genetik kazanım hızının katlanarak artmasına olanak sağladığı bildirilmektedir (Pasquariello ve ark., 2024; Mikkola ve ark., 2024).

Genom düzenleme teknolojilerinin, özellikle CRISPR/Cas9 sisteminin, koyun ve keçi genom mühendisliğinde hem temel araştırmalar hem de ıslah odaklı uygulamalar için potansiyel araç hâline gelebileceği bildirilmektedir (Lin ve ark., 2022; Lu ve ark., 2024).

Bu teknoloji ile kas gelişimini düzenleyen miyostatin, yapığı kalitesi ve renklenme ile ilişkili genler, süt bileşimini etkileyen aday genler ve çeşitli monogenik hastalık genleri üzerinde hedefli mutasyonların başarıyla oluşturulduğu bildirilmektedir. Koyun ve keçilerin aynı zamanda insan hastalık modelleri için uygun büyük hayvan modelleri olarak kullanıldığı bilinmektedir. Özellikle solunum ve metabolik hastalık modellerinde, CRISPR/Cas9 ile oluşturulan genetik modifikasyonların insan patofizyolojisiyle yüksek oranda benzerlik gösterdiği vurgulanmaktadır (Lin ve ark., 2022).

Genom düzenlemenin yalnızca üretim özelliklerinin iyileştirilmesi için değil, aynı zamanda hayvan refahı ve çevresel sürdürülebilirlik amaçlı kullanımı da tartışılmaktadır. Hastalıklara dirençli genotiplerin geliştirilmesi, antimikrobiyal kullanımının azaltılması, metan emisyonlarını azaltma potansiyeli olan genetik

varyantların hedeflenmesi ve stres yanıtının iyileştirilmesi, üzerinde yoğunlaşılacak başlıca alanlar arasında yer almaktadır (Lu ve ark., 2024; Lin, 2024).

Bununla birlikte CRISPR/Cas9 uygulamalarının endüstriyel ölçekte yaygınlaştırılmasının etik tartışmaları beraberinde getirdiği, Avrupa Birliği ve bazı ülkelerde gıda amaçlı transgenik hayvanların ticarileşmesine yönelik çekincelerin sürdüğü değerlendirilmektedir.

Ülkemiz bağlamında yapılan değerlendirmelerde, genom düzenlemenin hayvansal üretimde genetik kazanç hızını artırma potansiyeli bilimsel çevrelerce kabul edilmekle birlikte, mevzuat, toplumsal algı ve izleme altyapısının henüz yeterince olgunlaşmadığı, bu nedenle kısa vadede daha çok hastalık modeli oluşturma, gen işlevlerinin aydınlatılması ve küçük ölçekli pilot ıslah uygulamalarında kullanılmasının gerçekçi bir senaryo olduğu bildirilmektedir (Okcuoğlu, 2025; Bilici, 2024).

Koyun ve keçilerde genom düzenlemenin klasik embriyo biyoteknolojileri (mikromanipülasyon, nükleer transfer, IVP) ile entegrasyonu sayesinde, laboratuvar ölçeğinden sürü ölçeğine geçiş için teknik bariyerlerin büyük ölçüde aşıldığı bundan sonraki sürecin esas olarak düzenleyici çerçeve, izlenebilirlik sistemleri ve tüketici kabulü tarafından belirleneceği değerlendirilmektedir.

Yapay zekâ, makine öğrenmesi ve bilgisayarla görme tabanlı teknolojilerin, küçük ruminantlarda reproduktif yönetimi yeniden tanımlayan temel bileşenler hâline gelmekte olduğu bildirilmektedir. Laparoskopik suni tohumlama uygulamalarına ilişkin güncel bir derlemede, gebelik oranlarını öngörmek için geliştirilen yapay zekâ tabanlı çok değişkenli modellerle kızgınlık tespiti, koç ve sürü kaynaklı değişkenlerin birlikte analiz edilmesiyle daha hassas zamanlama yapılabildiği vurgulanmaktadır (Kang ve ark., 2025).

Bilgisayarla görme temelli sistemlerin, davranış kalıplarını, hareket aktivitesini ve sürü içi etkileşimleri gerçek zamanlı analiz

ederek kızgınlık tespitinde yüzde 95'in üzerinde doğruluk seviyelerine ulaştığı ve bu durumun özellikle mera koşullarında insan gözleminin yerini alabilecek önemli bir araç olarak değerlendirildiği belirtilmektedir (Menezes ve ark., 2024; Balasubramaniam ve ark., 2025).

Yapay zekâ çözümlerinin yalnızca kızgınlık ve gebelik tespiti ile sınırlı kalmayıp, sperm kalite analizi, embriyo derecelendirme, ısı stresi izlemi, sürü düzeyinde fertilitite tahmini ve hastalıkların erken tespiti gibi çok sayıda alanda kullanılmakta olduğu bildirilmektedir (Hosseini-Zadeh, 2025; Dilaver, 2025; Younus ve ark., 2025).

Davranış sensörleri, aktivite ölçerler, rumen bolusları ve çevresel sensörlerin bütünleşik dijital çiftlik yönetim platformları altında birleştirilmesiyle, sürü yönetiminin desteklenmesi mümkündür. Böylece metabolik bozukluklar, ısı stresi ve besleme hatalarına bağlı infertilitenin erken dönemde öngörülebildiği ve müdahale edilebildiği bildirilmektedir (Dilaver, 2025).

Küçük ruminantlara özgü sistemlerde, özellikle meraya dayalı üretim modellerinde, konum tabanlı izleme ve sürü içi sosyal davranış analizlerinin damızlık seçiminde kullanılmaya başlandığı, maternal-yavru bağlanma davranışlarının ve sürü içi liderlik özelliklerinin genetik değerlendirmeye dâhil edilmesine yönelik çalışmaların artmakta olduğu değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, nitelikli veri eksikliği, yüksek ilk yatırım maliyetleri ve saha koşullarında sistem kalibrasyonunun zorluğu koyun keçi işletmelerinde yaygın uygulamanın önündeki başlıca engeller olarak karşımıza çıkmaktadır (Menezes ve ark., 2024; Hosseini-Zadeh, 2025).

Küçük ruminantlarda reproduktif biyoteknolojilerin genomik seleksiyon ve gerektiğinde genom düzenleme yaklaşımları ile birlikte kullanılması durumunda, hem genetik ilerleme hızının belirgin biçimde artabildiği hem de hayvan başına üretim

verimliliğinin yükseltilmesiyle çevresel ayak izinin azaltılabildiği bildirilmektedir (Pasquariello ve ark., 2024; Mikkola ve ark., 2024). Sürdürülebilirlik tartışmalarında, özellikle koyun ve keçi üretim sistemlerinin çoğunlukla mera ve doğal kaynaklara dayalı yapısı nedeniyle, biyoteknolojilerin yalnızca “maksimum verim” hedefiyle değil, aynı zamanda iklim değişikliğine uyum, kuraklığa dayanıklılık, parazit ve enfeksiyon baskısı altında performansın korunması ve yerel ırkların genetik çeşitliliğinin sürdürülmesi amacıyla kurgulanması gerektiği vurgulanmaktadır (Nardone, 2004; Muthusamy ve ark., 2025; Rodrigues ve ark., 2025). Bu bağlamda, yerel koyun ve keçi ırklarında genomik çeşitliliğin ve seleksiyon işaretlerinin tanımlanması, embriyo ve germ hücresi bankacılığı ile birleştirildiğinde, hem tehdit altındaki popülasyonların uzun dönemli korunması hem de adaptif özelliklerin ticari hatlara kontrollü transferi için stratejik bir araç olarak değerlendirilmektedir.

Avrupa Birliği düzeyinde yürütülen iSAGE ve Sm@RT gibi projelerde, küçük ruminant üretiminde sürdürülebilirlik hedeflerinin hassas üretim teknolojileri, reproduktif biyoteknolojiler ve dijital karar destek sistemlerinin entegrasyonu ile ele alındığı bildirilmektedir (Horizon 2020 iSAGE, 2020; Horizon 2020 Sm@RT, 2024).

Bu projelerde, kızgınlık ve gebelik izleme sensörleri, genomik seleksiyon indeksleri ve ekonomik optimizasyon algoritmalarının tek bir platform altında birleştirilmesiyle farklı iklim kuşaklarında, farklı mera tipleri ve işletme ölçeklerinde en uygun üreme stratejilerinin belirlenmesine çalışılmaktadır. Ülkemiz özelinde yapılan değerlendirmelerde ise, reproduktif biyoteknolojilerin ekonomik analizleri, üretici eğitimi, saha personelinin teknik yeterliliği ve kamuoyunun bilgilendirilmesi gibi boyutların, bu teknolojilerin sürdürülebilir ve kabul edilebilir bir şekilde yaygınlaştırılmasında kritik olduğu vurgulanmaktadır (Kaya, 2018).

Gelecek perspektifinde, embriyo biyoteknolojilerinin küçük ruminantlarda MOET'e kıyasla daha esnek, tekrarlanabilir ve genç yaşta damızlık kullanımına izin veren yapısı nedeniyle merkezî bir rol üstleneceği öngörülmektedir. Genomik seleksiyonun ise bu embriyo akışını yönlendiren stratejik bir filtre işlevi göreceği değerlendirilmektedir. Buna karşılık, genom düzenleme ve ileri düzey biyoteknolojik yaklaşımlarının, kısa vadede daha çok hastalık modellemesi ve deneysel ıslah stratejilerinin test edilmesi amaçlı kullanılacağı, sahaya doğrudan entegre edilmelerinin ise uzun bir zaman çizelgesine yayılacağı öngörülmektedir (Menchaca ve ark., 2018; Younus ve ark., 2025).

Küçük ruminantlarda reproduktif biyoteknolojilerin basit hormon protokollerinden, genomik seleksiyon, genom düzenleme, yapay zekâ ve dijital çiftlik yönetim sistemlerini içeren çok katmanlı bir inovasyon alanına dönüştüğü açıktır. Bu ortamda veteriner hekimlerin rolünün, yalnızca protokol uygulayan teknisyenler olmaktan çıkarak, bilimsel kanıta dayalı karar süreçlerini yöneten, sürü bazlı verileri okuyup yorumlayabilen, üreticiye hem biyolojik hem ekonomik düzeyde danışmanlık sunan uzmanlar şeklinde yeniden tanımlandığı değerlendirilmektedir (Kaya, 2018; Menchaca ve ark., 2018).

Bu nedenle veteriner hekimlerin, bir yandan klasik reproduktif muayene, sürü sağlığı ve diğer klinik becerilerini sürekli güncellerken, diğer yandan genomik veri okuryazarlığı, biyoinformatik çıktıları yorumlama, yapay zekâ tabanlı karar destek sistemleriyle çalışma ve biyogüvenlik-etik mevzuat konularında da yetkinliklerini artırmaları önerilmektedir. Koyun ve keçi işletmelerinde teknolojinin sürdürülebilir biçimde uygulanabilmesi için, her yeni biyoteknolojik aracın üretici ekonomisi, çevresel etki ve yerel ırkların korunması eksenlerinde birlikte değerlendirilmesi gerektiği, veteriner hekimin de bu eksenlerin kesişim noktasında

rehberlik rolü üstlenmesinin giderek daha kritik hâle geldiği kuşkusuzdur.

Kaynakça

Akalın, P. P., Bucak, M. N., Güngör, Ş., & ark. (2016). Influence of lycopene and cysteamine on sperm and oxidative stress parameters during liquid storage of ram semen at 5 °C. *Small Ruminant Research*, 137, 117–123.

Akhter, S., Ansari, M. S., Andrabi, S. M. H., & ark. (2023). Effects of vitamins C and E in Tris citric acid glucose extender on semen quality of Kail ram. *Theriogenology*, 205, 1–9.

Alexander, B., Mastromonaco, G., & King, W. A. (2010). Recent advances in reproductive biotechnologies in sheep and goat. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 1, 101.

Amiridis, G. S., & Cseh, S. (2012). Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130, 152–161.

Balasubramaniam, S., vd. (2025). Computer vision systems in livestock farming, poultry and aquaculture. In *Smart Sensing in Agriculture*.

Betteridge, K. J. (2003). A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Livestock Production Science*, 83, 3–14.

Bilici, E. (2024). Academicians' opinion on CRISPR-Cas in Türkiye. *ISPEC Journal of Agricultural Sciences*.

Birler, S., Pabuccuoğlu, F., Baran, A., & ark. (2010). Production of cloned lambs: Transfer of early cleavage stage embryos to final recipients. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 36, 1–8.

Bodu, M., Saeed, A. M., & Aboelhadid, S. M. (2025). Extender development for optimal cryopreservation of buck semen. *Frontiers in Veterinary Science*, 12, 1554771.

Brice, G., Leboeuf, B., Boué, P., & Sigwald, J. P. (1997). Artificial insemination in small ruminants. *Livestock Production Science*, 52, 89–98.

Bucak, M. N., & Tekin, N. (2007). Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, 73, 103–108.

Caprine and ovine genomic selection—Progress and application. (2024). *Animals*, 14, 2659.

Cognie, Y., Baril, G., Poulin, N., & Mermillod, P. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goats. *Theriogenology*, 59, 171–188.

Cosentino, I. O., Balaro, M. F. A., Menchaca, A., Perez-Clariget, R., Ungerfeld, R., & Brandão, F. Z. (2023). Recent advances in treatments for resynchronization of ovulation in small ruminants. *Animal Reproduction*, 20(1), e20220111.

da Silva Maia, M., Bicudo, S. D., Sicherle, C. C., Rodello, L., & Gallego, I. C. S. (2009). Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris–egg yolk extender supplemented with antioxidants. *Small Ruminant Research*, 85, 85–90.

Dilaver, H. (2025). Application of artificial intelligence technologies in livestock management. *Turkish Journal of Agricultural Engineering Research*, 6, 1–25.

Donovan, A., Hanrahan, J. P., Lally, T., Boland, M. P., Byrne, G. P., Duffy, P., & O'Neill, D. J. (2004). Fertility of the ewe following cervical insemination with fresh or frozen–thawed semen at natural or synchronised oestrus. *Animal Reproduction Science*, 84, 359–368.

Evans, R. W., Setchell, B. P., & Brooks, D. E. (1979). Lipid changes during epididymal maturation in ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57, 189–196.

Faigl, V., Vass, N., Kulcsár, M., Gábor, G., Rátky, J., & Huszenicza, G. (2012). Progress in artificial insemination of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130, 187–195.

Falchi, L., Ledda, S., & Zedda, M. T. (2022). Embryo biotechnologies in sheep: Achievements and new improvements. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(Suppl. 5), 22–33.

FAO. (1991). Sheep and goats in Turkey. In *Animal genetic resources of Turkey* (FAO Animal Production and Health Paper).

Fatet, A., Pellicer-Rubio, M. T., & Leboeuf, B. (2011). Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science*, 124, 211–219.

Fonseca, J. F., Souza-Fabjan, J. M. G., Batista, R. I. T. P., & Freitas, V. J. F. (2016). Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, 86, 144–151.

Fonseca, J. F., vd. (2018). Multiple ovulation and embryo transfer in small ruminants. *Small Ruminant Research*.

Foote, R. H. (1999). Artificial insemination from the origin to the present. *Animal Science*, 77, 1–12.

Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., & ark. (2010). In vitro fertility of goat semen cryopreserved with soybean lecithin-based extenders. *Theriogenology*, 73, 763–769.

Freitas, V. J. F. (2010). In vitro embryo production in small ruminants. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(Supl. especial), 409–413.

Gibbons, A. E., Fernandez, J. E., Bruno-Galarraga, M. M., Spinelli, M. V., & Cueto, M. I. (2019). Technical recommendations

for artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction*, 16(4), 803–809.

Gómez-Brunet, A., Santiago-Moreno, J., Arteaga, M., et al. (2012). Reproductive seasonality and its control in Spanish sheep and goats. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10, 848–863.

Goodman, R. L., Jansen, H. T., Billings, H. J., Coolen, L. M., & Lehman, M. N. (2018). Physiology of reproductive seasonality in sheep: An update. *Reproduction*, 156, R13–R27.

Gordon, I. (2004). *Reproductive Technologies in Farm Animals*. CABI Publishing.

Hill, J. R., Thompson, J. A., & Perkins, N. R. (1998). Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28,447 Merino ewes under commercial conditions. *Theriogenology*, 49, 697–709.

Horizon 2020 iSAGE. (2020). Innovation for sustainable sheep and goat production in Europe (iSAGE): Advancing reproductive management in small ruminants.

Horizon 2020 Sm@RT. (2024). Small Ruminant Technologies (Sm@RT): Enhancing precision reproductive monitoring and ART in small ruminants.

Hosseini-Zadeh, N. G. (2025). Artificial intelligence in veterinary and animal science: A comprehensive review. *Livestock Science*, 285, 105501.

Jainudeen, M. R., & Hafez, E. S. E. (2000). Sheep and goats. In E. S. E. Hafez & B. Hafez (Eds.), *Reproduction in Farm Animals* (7th ed., pp. 172–181). Lippincott Williams & Wilkins.

Jelani, G. (2023). Historical background and significance of embryo transfer in farm animals. In *Embryo Transfer in Farm Animals* (pp. 1–20). CABI.

Jinya, L., vd. (2024). Genomic selection in livestock breeding: Advances and perspectives. *Animal Molecular Breeding*.

Kang, H., Spanner, E. A., & Smith, C. L. (2024). Laparoscopic artificial insemination in sheep: Technological integration, economic evaluation and future perspectives. *Theriogenology*, 215, 1–12.

Kang, T. C., vd. (2025). Laparoscopic artificial insemination in small ruminants: Technological integration, economic evaluation, and future perspectives. *Frontiers in Veterinary Science*, 12, 1667887.

Kaya, A. (2018). Application of reproductive biotechnologies for sustainable production of livestock in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 42, 241–252.

Kaya, A., Güneş, E., & Memili, E. (2018). Application of reproductive biotechnologies for sustainable production of livestock in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 42, 143–151.

Kulaksız, R., & Daşkın, A. (2012). Reproductive performance of primiparous and multiparous Saanen goats after laparoscopic intrauterine insemination: A field study. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 36(2), 201–204.

Leboeuf, B., Delgadillo, J. A., Manfredi, E., Piacère, A., Clément, V., Martin, P., Pellicer, M., Boué, P., & De Cremoux, R. (2008). Management of goat reproduction and insemination for genetic improvement in France. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 379–385.

Leboeuf, B., Restall, B., & Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62, 113–141.

Leethongdee, S., & Ponglowhapan, S. (2014). Artificial insemination in goats: An update. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 44(1), 73–77.

Li, R., Liu, H., Zhang, Y., & ark. (2023). Soybean lecithin and cholesterol-loaded cyclodextrin in goat semen extender improves cryosurvival. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 231, 106–118.

Lin, Y., vd. (2022). CRISPR/Cas9 system in large animal models: Applications in sheep and goats. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 9152178.

López-Saéz, A., Gomes, S., Blesbois, E., & ark. (2000). Liquid storage (5 °C) of ram semen in different extenders. *Reproductive Fertility and Development*, 12, 715–722.

Lu, Z., vd. (2024). Progress and prospects: CRISPR gene-editing for sheep and goats. *Agriculture*, 14(3), 487.

Luo, J., Guo, L., & Shen, J. (2019). Research advances in reproduction for dairy goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(9), 1284–1295.

Ly, C., Wu, G., Hong, Q., & Quan, G. (2019). Spermatozoa cryopreservation: State of the art and future in small ruminants. *Biopreservation and Biobanking*, 17(2), 171–182.

Martemucci, G., & D'Alessandro, A. G. (2011). Induction/synchronization of oestrus and ovulation in dairy goats with different short-term treatments and fixed time intrauterine or exocervical insemination system. *Animal Reproduction Science*, 126, 187–194.

Martínez-Fresneda, L., da Silva Maia, M., Masot, J., & ark. (2019). Epididymal and ejaculated sperm differ on their response to

osmotic and cold shock stress in ram. *Animal Reproduction Science*, 202, 52–61.

Menchaca, A., Vilariño, M., Crispo, M., & ark. (2018). Storage of ram semen at 5 °C: Effects of preservation period and timed artificial insemination on fertility. *Animal Reproduction*, 15, 126–133.

Menezes, G. L., vd. (2024). Artificial intelligence for livestock: A narrative review of computer vision applications. *Animal Frontiers*, 14(6), 42–54.

Mikkola, M., vd. (2024). Recent advancements to increase success in assisted reproductive technologies in cattle. *Animal Reproduction*, 21(3), e20240031.

Molina, F. A. A., Galina, C. S., Pablos, J. L., & Maquivar, M. (2012). Factors influencing the success of an artificial insemination program in goats. *Small Ruminant Research*, 105, 119–123.

Muthusamy, M., vd. (2025). Comparative genomic insights into adaptation, selection and demography in small ruminants. *Frontiers in Genetics*, 16, 1621960.

Nardone, A. (2004). Sustainability of small ruminant organic systems. *Livestock Production Science*, 90(1–2), 27–39.

Ncube, K. T., vd. (2025). Genomic advancements in assessing growth performance and meat quality in goats. *Genes*, 16(2), 300.

O'Hara, L., Hanrahan, J. P., Richardson, L., & ark. (2010). Effect of storage duration, storage temperature and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, 73, 541–549.

Okcuoğlu, İ. (2025). Genome editing in animal husbandry: CRISPR applications and perspectives. *International Journal of Innovative Research in Science and Technology*, 5, 1–20.

Paramio, M. T., & Izquierdo, D. (2016). Recent advances in in vitro embryo production in small ruminants. *Theriogenology*, 86, 152–159.

Parkinson, T. (2024). A present vision for artificial insemination of certain farm animals. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 48, 1–15.

Pasquariello, R., & ark. (2024). Use of assisted reproductive technologies to shorten the generational interval in ruminants: Current status and perspectives. *Reproduction, Fertility and Development*, 36, 1–18.

Rizkallah, N., Arando, A., Vicente-Fiel, S., & ark. (2022). Factors affecting the survival of ram spermatozoa during freezing and thawing. *Animals*, 12, 594.

Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61, 234–248.

Rodrigues, J. L., vd. (2025). Genetic diversity and selection signatures in sheep breeds. *Journal of Applied Genetics*, 56, 1–15.

Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (1995). Frozen storage of ram semen II: Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, 38, 1–36.

Seyedsharifi, R. (2024). Investigating the effect of genotyping strategies on genomic selection in sheep. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 12, 1–10.

Silva, R. A. J., Nascimento, E. F., & Silva, S. V. (2019). Concentration of soybean lecithin affects short-term storage of goat semen at 5 °C. *Animal Reproduction*, 16, 210–218.

Souza-Fabjan, J. M. G., Leal, G. R., Monteiro, C. A. S., Batista, R. I. T. P., Barbosa, N. O., & Freitas, V. J. F. (2023). In vitro embryo production in small ruminants: What is still missing? *Animal Reproduction*, 20(3), e20230055.

Spanner, E. A., Kang, H., & Geenty, K. (2024). A multivariate model for the prediction of pregnancy in laparoscopic AI programmes in sheep. *Scientific Reports*, 14, 12345.

Tarig, A. A., Rosnina, Y., Wahid, H., & ark. (2017). Effect of different concentrations of soybean lecithin and virgin coconut oil in Tris-based extender on the quality of frozen–thawed buck semen. *Veterinary World*, 10, 712–71.

Teixeira, P. P., Padilha, L. C., Oliveira, M. E., Motheo, T. F., da Silva, A. S., Barros, F. F., Coutinho, L. N., Flôres, F. N., Lopes, M. C., Bandarra, M. B., & ark. (2011). Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. *Animal Reproduction Science*, 127, 169–175.

Tekin, K., Tirpan, M. B., & Daşkın, A. (2020). Cervical insemination with frozen–thawed semen in goats at different breeding ages. *Kocatepe Veterinary Journal*, 13, 1–9.

Tervit, H. R. (1996). Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Animal Reproduction Science*, 42, 227–238.

Tibary, A. (2005). Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. *Theriogenology*, 64, 618–638.

Torres-Rovira, L., Gonzalez-Bulnes, A., Succu, S., Spezzigu, A., Manca, M. E., Leoni, G. G., Sanna, M., Pirino, S., Gallus, M., Naitana, S., & Berlinguer, F. (2014). Predictive value of antral follicle count and anti-Müllerian hormone for follicle and oocyte developmental competence during the early prepubertal period in a sheep model. *Reproduction, Fertility and Development*, 26, 1094–1106.

Vajta, G., & Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65, 236–244.

Viana, J. H. M. (2022). Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals, 2021. *Embryo Technology Newsletter*, 40, 8–25.

Younus, A. M., vd. (2025). Advances, challenges, prospect, and future strategies in reproductive biotechnology. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 29, 1–18.

Zhang, L., Duan, Y., Zhao, S., Xu, N., & Zhao, Y. (2024). Caprine and ovine genomic selection—Progress and application. *Animals*, 14, 2659.

MANDALARDA REPRODÜKTİF BİYOTEKNOLOJİLER

**MURAT SELÇUK¹
MUSTAFA YİĞİT NİZAM²**

Giriş

Manda (*Bubalus bubalis*), başta Güney Asya, Avrupa'nın Akdeniz kuşağı ve Güney Amerika olmak üzere dünyanın pek çok bölgesinde hayvancılık açısından çok yönlü bir tür olarak değerlendirilmektedir. Et ve deri üretiminin yanı sıra, Asya kıtasında yıllık manda sütü üretimi 45 milyon tonu aşmakta; bu üretimin yaklaşık 30 milyon tonu Hindistan kaynaklıdır (Womack, 2005: 1). Özellikle yüksek verimli Murrah gibi ırklardan, 300 günlük bir laktasyon döneminde 4000 litreye kadar süt elde edilebilmektedir. Süt verimi yüksek bireylerin popülasyonunu artırmak amacıyla seçici ıslah uygulamaları ve etkili sürü yönetimi programlarının yürütülmesi, üretimde belirgin artışlar sağlayabilmektedir.

¹ Prof. Dr., Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı. Orcid: 0000-0003-1371-6297

² Dr., Dokuz Eylül Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Orcid: 0000-0003-0830-1644

Her ne kadar mandalar çevresel koşullara uyum kabiliyetleri ve yemden yararlanma düzeyleri bakımından dikkat çekici avantajlara sahip olsalar da birçok ülkede popülasyonlarının son yıllarda azaldığı bildirilmektedir. Bu gerilemenin temel nedenleri arasında mevsimsel etkiler, yetersiz beslenme ve çeşitli sağlık sorunlarına bağlı olarak ortaya çıkan düşük gebelik oranları yer almaktadır. Bu bağlamda, araştırmacılar farklı reproduktif biyoteknolojik yöntemleri kullanarak manda üreme performansını artırmaya yönelik modern ve yenilikçi stratejiler geliştirmeye çalışmaktadır (Nanda & Nakao, 2003).

Endokrin, hücresel ve moleküler düzeyde ovaryum ve uterus fonksiyonlarının düzenlenmesine dayanan koordine üreme yönetimi sistemleri bu amaçla geliştirilmiştir (Moore & Thatcher, 2006). Çeşitli endokrinolojik müdahaleler sonucunda, özellikle embriyo üretiminde artış sağlanmış ve embriyo transferiyle doğan buzağılar aracılığıyla manda reproduksiyonunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Ayrıca, mandalarda ovaryum folliküler dinamiği ve buna bağlı hormonal değişimleri inceleyen araştırmalar, senkronizasyon, embriyo üretimi ve transferi alanındaki uygulamaların geliştirilmesine önemli katkılar sunmuştur (Nandi ve ark., 2002; Madan & Prakash, 2007; Presicce, 2007).

Spermanın Alınması

Mandalarda verimliliğin yükseltilmesi ve genetik iyileştirmenin desteklenebilmesi için, yüksek üreme performansına sahip erkeklerden elde edilen spermanın kısa veya uzun süreli olarak muhafaza edilmesi gereklidir. Böylece, depolanan spermaların suni tohumlamada kullanılmasıyla her bir hayvandan daha yüksek düzeyde verim sağlanabilir. Bu sürecin temel aşaması ise kaliteli ve doğru şekilde sperma toplanmasıdır. Günümüzde boğa istasyonlarında mandalardan sperma elde etmede en sık tercih edilen yöntem suni vajen tekniğidir (Samsone ve ark., 2020).

Mandalardan sperma, 39–41°C’ye ayarlanmış suni vajen aracılığıyla alınmaktadır. Mandalar, evcil türler arasında suni vajen kullanımına en kolay uyum sağlayan hayvanlardan biri olarak kabul edilmektedir. Genellikle sperma alımı sabah erken saatlerde ve yemleme öncesinde gerçekleştirilmektedir (Sansone ve ark., 2000). Ancak manda boğalarının zaman içinde herhangi bir belirgin neden olmaksızın suni vajene karşı isteksizlik veya direnç geliştirdiği bildirilmiştir. Bu durum, mandalarda suni tohumlama uygulamalarının yaygınlaştırılmasını sınırlandıran faktörlerden biri olarak değerlendirilmektedir (Henry ve ark., 2018).

Elektroejakülatör kullanımı, mandalardan sperma elde etmede bir alternatif olarak tanımlansa da Zorzetto ve arkadaşları (2018) mandaların elektriksel uyarıya oldukça duyarlı olması nedeniyle bu yöntemin tercih edilmemesini önermektedir. Genç boğalarda elektroejakülatörle başarılı şekilde ejakulat alınabildiği bildirilse de, yetişkin hayvanlarda uygulamaya bağlı yaralanma ve kaza riskinin belirgin biçimde arttığı ifade edilmektedir (Ohashi ve ark., 2001; Zorzetto ve ark., 2018).

Mandalarda uygulanan bir diğer sperma toplama yöntemi, kauda epididimislerden in vitro koşullarda sperma elde edilmesidir (Lambrechts ve ark., 1999; Barati ve ark., 2009; Yulnawati ve ark., 2009; Yeni & Avdatek, 2017). Ancak epididimal kökenli manda spermasının fertilite kapasitesine ilişkin daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu bildirilmektedir (Zorzetto ve ark., 2018). Bu yöntemle elde edilen spermalar, kısa veya uzun süreli saklamaya uygun olup suni tohumlama, in vitro embriyo üretimi ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gibi ileri üreme biyoteknolojilerinde kullanılabilir (Yulnawati ve ark., 2009). Ayrıca bu teknik, post mortem sperma elde edilmesine olanak sağlayarak, özellikle nesli tehlike altında olan türlerin genetik materyalinin korunmasında önemli bir araç olarak değerlendirilmektedir (Herold ve ark., 2004).

Spermanın Saklanması

Reprodüktif biyoteknolojiler, yüksek verim potansiyeline sahip hatların oluşturulmasını ve hayvan ıslahının hızlandırılmasını sağlayarak birim hayvandan elde edilen verimin artırılmasına önemli katkı sunmaktadır (Birler ve ark., 2002). Bu kapsamda spermanın kısa ve uzun süreli olarak saklanması, üstün genetik özelliklerin daha geniş dişi popülasyonlara hızlı biçimde aktarılmasına imkân tanıyan temel biyoteknolojik uygulamalardan biridir. Spermanın depolanması sürecinde ise, uygun osmotik basınç ve pH koşullarının sağlanması; ayrıca enerji kaynakları, soğuktan koruyucu ajanlar, metabolik artık ürünlere karşı antioksidanlar ve mikrobiyal kontaminasyonu önleyici antibiyotiklerin kullanılması gerekmektedir (İnanç ve ark., 2021).

Kısa Süreli Saklama

Manda sperması, kısa süreli saklama açısından diğer türlerde uygulanan yöntemlere benzer şekilde korunabilmektedir. Literatürde, uygun bir sulandırıcı içinde muhafaza edilen manda spermasının motilitesinde belirgin bir kayıp oluşmaksızın 5°C’de 72 saate kadar saklanabildiği bildirilmektedir (Dhami & Sahni, 1994).

Sıklıkla tercih edilen diğer sulandırıcı formülasyonları arasında Tris (hydroxymethyl aminomethane), yumurta sarısı–sitrat ve yumurta sarısı–laktoz bazlı çözeltiler yer alır (Dhami & Sahni, 1994). Bu sulandırıcılar içinde, özellikle Tris esaslı formüllerin 72 saate kadar daha iyi motilite koruması sağladığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu medyumlara %0,1 oranında L-sistein, EDTA veya etilendiamintetraasetik asit eklenmesinin motiliteyi artırdığı rapor edilmiştir. Anadolu mandalarına ait epididimal spermaların kısa süreli saklandığı bir çalışmada, Yeni & Avdatek (2017), Tris–yumurta sarısı solüsyonunu; Tris 30,07 g, sitrik asit 16,4 g, fruktoz 12,6 g, %20 yumurta sarısı, 1000 IU penisilin ve 1000 µg/ml streptomisin içerecek şekilde 1 L distile su ile hazırlamıştır. Bu

formülasyona eklenen 12,5 ve 25 µg/ml karnosik asit, başlıca spermatolojik parametreler üzerinde olumlu etki göstermiştir.

Farklı gliserol oranlarını (%3, %6, %9) değerlendiren Kumar ve ark. (2019), 5°C’de 24 saatlik muhafaza için gliserol eklenmesinin gerekli olmadığını, ancak 72 saat ve daha uzun süreli depolamalarda %6 gliserolün motilitenin korunmasına katkı sağladığını bildirmiştir.

Uzun Süreli Saklama

Spermanın dondurulması, manda yetiştiriciliğinde genetik ilerlemenin ve modern üreme biyoteknolojilerinin temel bileşenlerinden biridir. Ancak, mandalarda spermanın kriyotoleransı sığırlara kıyasla daha düşüktür. Bu fark, spermatozoon plazma membranının yüksek doymamış yağ asidi içeriği, düşük kolesterol oranı ve farklı mitokondriyal enerji metabolizması ile ilişkilendirilmektedir (Mittal ve ark., 2019).

Güncel araştırmaların odak noktalarından biri, antioksidan destekli sulandırıcı sistemleridir. Vitamin B₁₂, melatonin, α-tokoferol ve L-penisilamin gibi bileşiklerin sperma sulandırıcısına eklenmesi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini baskılayarak lipid peroksidasyonunu azaltmakta ve çözdürme sonrası motiliteyi anlamlı ölçüde iyileştirmektedir (Chaudhary ve ark, 2020; Ahmed ve ark., 2021). Bununla birlikte, nanoteknoloji temelli yaklaşımlar da büyük ilgi görmektedir. Özellikle 2025 yılında bildirilen karvakrol yüklü fitozom sistemleri, oksidatif stres belirteçlerini azaltarak sperma motilitesini ve gebelik oranlarını artırmış, böylece nanofitozomal taşıyıcıların kriyoprezervasyonda umut vadeden bir araç olduğunu göstermiştir (Khalil ve ark., 2025).

Klasik kriyoprotektan formülasyonlarının ötesinde, biyopolimer kapsülleme teknikleri de spermanın dişi genital kanalında daha uzun süre canlı kalmasını ve kontrollü salınım

yoluyla fertilizasyon şansının artırılmasını sağlamaktadır (Perteghella ve ark., 2017). Ayrıca, laktaz ve gliserol kombinasyonları, optimal osmolarite ayarları ve etilen glikol tabanlı kriyoprotektanlar ile yapılan deneyler, çözündürme sonrası DNA bütünlüğü ve akrozom sağlamlığında anlamlı iyileşmeler göstermiştir (Eriani ve ark., 2017; Mughal ve ark., 2018).

Son dönemde yapılan proteomik ve genomik analizler, manda spermasının kriyoprezervasyon kapasitesini belirleyen biyokimyasal göstergeleri ortaya koymuştur. Özellikle seminal plazmadaki belirli protein bantlarının sperma motilitesiyle negatif korelasyon göstermesi, kriyotoleransın moleküler belirteçlerle tahmin edilebileceğini göstermektedir (Musa & Abdulkareem, 2023).

Sonuç olarak, geleneksel kriyoprotektanlara ek olarak geliştirilen antioksidan takviyeli, nanoteknolojik ve biyopolimer tabanlı sistemler, manda spermasının dondurulmasında önemli ilerlemeler sağlamıştır. Bu yenilikçi yaklaşımlar, yalnızca spermanın canlılığını değil, aynı zamanda genetik materyalin bütünlüğünü de koruyarak mandalarda yapay tohumlama ve embriyo üretiminde başarı oranlarını artırma potansiyeli taşımaktadır.

Mandalarda Suni Tohumlama

Suni tohumlama, çiftlik hayvanlarının yetiştirilmesi ve ıslahında, özellikle üstün genetik değere sahip damızlıkların üretimde en verimli şekilde kullanılmasını sağlayan, günümüzde yaygın biçimde uygulanan temel biyoteknolojik üreme yöntemlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Hayvan hareketlerinin azaltılmasına olanak tanınması, bulaşıcı hastalıkların kontrol ve eliminasyonunu desteklemesi ve genetik materyalin küresel ölçekte yaygın kullanımına imkân sağlaması, yöntemin başlıca avantajları arasında yer almaktadır (Singh ve ark., 2009).

Mandalarda suni tohumlama tekniği, serviksin daha uzun ve belirgin kıvrımlı yapısı nedeniyle sığırlara kıyasla daha fazla beceri gerektirmektedir. Rektovajinal yöntemde serviks rektal yolla sabitlenmekte ve kateter dorsal vajina boyunca 35–45° açıyla ilerletilmektedir. Servikal halkalar tek tek geçilerek kateterin ucu uterin gövdeye ulaştırılmakta ve sperma bu bölgeye yavaşça bırakılmaktadır. Uterus duvarının hassasiyeti nedeniyle kateterin aşırı ilerletilmemesi, subüretal divertiküluma girişin önlenmesi tekniğın temel noktalarını oluşturmaktadır. Teknik başarının önemli bir bileşeni de uygun zamanlamanın sağlanmasıdır. Mandalarda östrus belirtileri çoğu kez belirtili göstermeden seyretmektedir. Bu sebeple sadece davranış gözlemi değil; vulvar akıntı takibi, rektal palpasyon ve gerekirse idrarda LH düzeyine dayalı yardımcı yöntemler kullanılmaktadır. Ovulasyon genellikle kızgınlık başlangıcından 24–30 saat sonra gerçekleşmekte olduğundan, tohumlamanın ilk belirtilerden 12–18 saat sonra yapılması gebelik oranlarını artırmaktadır. Bu nedenle doğru kızgınlık tespiti, uygun semen hazırlığı ve serviksin dikkatli manipölasyonu mandalarda suni tohumlamanın başarısını belirleyen temel unsurlar arasında yer almaktadır (Praveen ve ark., 2024).

Sonuç olarak, mandalarda suni tohumlama uygulamaları hâlâ temel reproduktif teknolojilerin merkezinde yer almaktadır. Güncel çalışmalar, özellikle sperma kalitesi optimizasyonu, gelişmiş dondurma teknikleri ve hedefe yönelik semen yerleştirme yöntemlerinin suni tohumlama başarısını artırabileceğini göstermektedir. Bu ilerlemeler, manda üretiminde genetik ıslah ve verim artışı için sürdürülebilir bir temel sunmaktadır.

Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma

Spermatozoon cinsiyetinin belirlenmesi teknolojisi (sperm sexing), özellikle flow cytometry yöntemiyle, X ve Y kromozomu taşıyan sperm hücrelerinin ayrılmasında en verimli ve yaygın olarak

kullanılan yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu teknoloji, süt üretimi amacıyla dişi yavruların, et üretimi amacıyla ise erkek yavruların planlı şekilde elde edilmesine olanak tanır (Johnson, 1992). Bununla birlikte, söz konusu teknolojinin uygulamaya geçirilmesi ve yaygın kullanımı dünya genelinde sınırlı kalmıştır; cinsiyeti belirlenmiş spermanın büyükbaş üretiminde kullanımı henüz kısıtlı düzeydedir. Son yıllarda bu teknolojiye olan ilgi artmış olsa da uygulama koşulları ve teknik altyapı ülkeler arasında farklılık göstermektedir (Hufana-Duran ve ark., 2025).

Bazı araştırmalarda, albumin kolonu (albumin column method) gibi daha basit yöntemlerin de X ve Y spermatozoonlarını kütle ve yoğunluk farkına göre ayırabildiği bildirilmiştir. Bu yöntemle yapılan suni tohumlama uygulamalarında başarılı gebelikler ve cinsiyeti belirlenmiş manda buzağılarının doğumu rapor edilmiştir (Praharani ve ark., 2024).

Östrus Senkronizasyonu

Suni tohumlama, mandalarda genetik ilerlemede önemli rol oynamış ve bu türün iş gücü hayvanı olmaktan süt verimi yüksek bir üretim türüne dönüşümünü sağlamıştır. Ancak östrus tespitindeki güçlükler, östrus süresinin değişkenliği ve ovulasyon zamanlamasındaki belirsizlikler, suni tohumlama protokollerinin geliştirilmesine neden olmuştur. Bu protokoller, östrus döngüsünü prostaglandinler (PG), progesteron (P4) ve gonadotropinler (GnRH, hCG ve eCG) gibi hormonlar aracılığıyla kontrol altına almayı amaçlamaktadır. Özellikle GnRH ve PGF2 α uygulamaları, mandalarda zamanlı tohumlama için etkin şekilde kullanılmıştır. Bu stratejiler, düşük suni tohumlama verimliliği ve uzun buzağılama aralıkları gibi üretim kısıtlarını azaltarak reproduktif performansta belirgin iyileşmeler sağlamaktadır (Chaikhun ve ark., 2010; Atabay ve ark., 2019). Ovulasyon senkronizasyonu çalışmaları, mandalarda üreme yönetiminin daha etkin yürütülmesine olanak tanımıştır

(Chaikhun ve ark., 2010; Atabay ve ark., 2019). Bu amaçla PG, P4, GnRH ve hCG gibi hormonların kombinasyonları kullanılarak geliştirilen farklı senkronizasyon protokolleriyle başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Araştırmalarda, tohumlama anındaki baskın folikül çapının gebelik oranlarını etkilediği bildirilmiştir. Özellikle 12 mm çapa sahip baskın foliküllerde %45–50 düzeyinde gebelik oranları gözlenmiştir (Atabay ve ark., 2023).

Ayrıca yapılan çalışmalar, ön seçim kriterlerinin başarı oranlarını önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir. Vücut ağırlığının 300 kg'dan fazla olması, vücut kondisyon skorunun 2,5–3,5/5 aralığında bulunması, serviks çapının 2,5 cm'den ve ovaryum çapının 1,5 cm'den büyük olması gibi kriterleri sağlayan hayvanlarda %70'e varan gebelik oranları elde edilmiştir (Chaikhun-Marcou ve ark., 2017).

Modern üreme programlarında, suni tohumlama ve doğal aşım uygulamalarının birlikte kullanılmasıyla popülasyon artışı ve genetik ilerleme hedeflenmektedir. Uygun reproduktif yönetim koşullarında östrus senkronizasyonu ve GnRH–PGF2 α kombinasyonları ile yüksek östrus oranları ve tatmin edici gebelik oranları elde edilmiştir. Nitekim, PGF2 α (12,5 μ g) uygulamasını takiben GnRH (250 μ g) verilen mandalarda %100 östrus görülmesi ve Murrah spermasıyla yapılan suni tohumlama sonrası %66,67 gebelik oranı bildirilmiştir (Roza ve ark., 2019).

Superovulasyon ve Embriyo Transferi

Mandalarda superovulasyon ve embriyo transferi uygulamaları, reproduktif biyoteknolojilerin gelişimiyle birlikte yürütülmeye başlanmıştır (Afriani ve ark., 2020). İlk çalışmalar, cerrahi olmayan embriyo toplama yöntemleriyle düşük embriyo geri kazanım oranlarını ortaya koymuştur; ortalama olarak bataklık mandalarında 1–2, nehir mandalarında ise yaklaşık 2 embriyo elde edilmiştir (Parnpai ve ark., 1985; Cruz ve ark., 1991). Toplanan bu

embriyolar, östrusu senkronize edilmiş alıcılara transfer edilmiş ve bu uygulamalar sonucunda embriyo transferi ile doğan bataklık manda buzağuları ile nehir tipi embriyolardan doğan yavrular elde edilmiştir (Cruz ve ark., 1991; Chantaraprateep ve ark., 1989).

Mandada süperovulasyon ve embriyo transferi üzerine yapılan araştırmalar uzun yıllardır sürdürülmekte olup, bu çalışmalar kapsamında farklı gonadotropin protokollerinin etkinliği değerlendirilmiştir. Başlangıçta, sığırlarda kullanılan gonadotropin dozları ve protokollerinin mandalarda yeterli ovaryum yanıtı oluşturmadığı belirlenmiştir. Nitekim anöstrus dönemdeki mandalarda ortalama korpus luteum (CL) sayısı 0.66 ve ovulasyon göstermeyen follikül sayısı 0.0 iken, siklik hayvanlarda bu değerler sırasıyla 2.3 ve 1.0 olarak bildirilmiştir (Nguyen, 2006).

Equine koryonik gonadotropin (eCG) ve östradiol-17 β kombinasyonu uygulandığında, aynı gün içinde %90 oranında ovulasyon ve östrus senkronizasyonu sağlanmıştır. Estradiol ve hCG ile optimize edilen süperovulasyon protokolleri ise ovaryum yanıtını belirgin biçimde artırmıştır. Bu protokollerde donör başına ortalama 8.7 korpus luteum oluşmuş; non-cervical embriyo toplama yöntemiyle %46 embriyo geri kazanımı, postmortem flushing yöntemiyle ise %90'ın üzerinde geri kazanım elde edilmiştir. Elde edilen embriyoların yaklaşık %70'i iyi kalite olarak değerlendirilmiştir (Hufana-Duran ve ark., 2025)

In Vivo Embriyo Üretimi

Mandalarda süperovulasyonu sonrası suni tohumlama uygulanarak gerçekleştirilen in vivo embriyo üretimi, sığırlarda her donörden daha fazla sayıda embriyo elde edilmesini sağlayan bir tekniktir (Mapletoft ve ark., 2002). Bu teknikler, embriyo transferi ile genetik ıslah programlarında ilerlemenin hızlandırılmasında güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır (Bó et ve ark., 2002; Baruselli ve ark., 2011). Bununla birlikte, manda donörlerde embriyo geri

kazanım oranları genellikle sığırlara kıyasla daha düşüktür. Süperovulasyon uygulaması sonrasında mandalarda ortalama 15 adet (>8 mm) folikül gelişimi gözlenmiş, ancak yalnızca yaklaşık %60 ovulasyon oranı ve flushing sırasında yaklaşık 9 korpus luteum (CL) oluşumu elde edilmiştir. Buna bağlı olarak, embriyo geri kazanım oranı %34,8 civarında kalmıştır (Baruselli ve ark., 2000).

Genel olarak, süperovulasyon uygulanan mandalarda embriyo kazanım oranı %20–40 arasında değişirken, bu oran sığırlarda %63–80 düzeyindedir (Boland ve ark., 1991; Adams, 1994; Vos ve ark., 1994; Shaw ve ark., 1995). Bu farkın, oositin infundibulum tarafından yakalanmasında veya ovidukt boyunca taşınmasında yaşanan aksaklıklardan kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Baruselli ve ark., 2000).

Sonuç olarak, donör başına düşük embriyo üretim verimi, bu biyoteknolojinin manda yetiştiricileri tarafından geniş ölçekte kullanılmasını güçleştirmektedir.

In Vitro Embriyo Üretimi

Mandada in vitro embriyo üretim çalışmaları, ilk olarak kesimhaneden elde edilen oositlerin kullanılmasıyla başlamıştır. Ardından diğer bölgelerde yürütülen araştırmalar, manda üretimini artırmak amacıyla reproduktif biyoteknolojilerin geliştirilmesine odaklanmıştır. 1990'lı yıllarda embriyo transferi ve ilgili teknolojilerin uygulanmaya başlanmasıyla birlikte, yerli manda popülasyonlarının verimliliği ve genetik kalitesinin artırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmalar, üniversiteler, araştırma enstitüleri ve ulusal iş birliklerinin desteğiyle yürütülmüştür. Bu dönemde in vitro fertilizasyon (IVF) teknikleri, manda reproduksiyon araştırmalarında önemli bir dönüm noktası olmuştur. İlginç biçimde, mandalarda ineklere kıyasla %20 oranında daha az antral follikül bulunduğu; ancak embriyoların in vitro kültür sırasında

preimplantasyon evresine 18–24 saat daha erken ulaştığı bildirilmiştir (Nguyen, 2006; Hufana-Duran, 2008).

In vitro maturasyon (IVM), in vitro fertilizasyon (IVF) ve in vitro kültür (IVC) aşamalarının kombinasyonu sonucunda elde edilen ilk melez (bataklık × nehir tipi) manda buzağları 1996 yılında doğmuştur (Ocampo ve ark., 1997). Bunu, 2002 yılında vitrifiye edilmiş nehir tipi IVM–IVF–IVC embriyolarından doğan yavrular izlemiştir (Hufana-Duran ve ark., 2004). Bu başarılar, uluslararası iş birliklerine dayalı bir embriyo biyoteknolojisi laboratuvarı kurulmasına öncülük etmiştir. Bu kapsamda nehir tipi mandalardan in vitro üretilen embriyolar, dondurularak transfer edilmek üzere farklı alıcı sürülere nakledilmiş ve hem araştırma kurumlarında hem de üretici mandalarda sağlıklı yavruların doğumu gerçekleşmiştir. Bu gelişmeler, IVM–IVF–IVC-vitrifiye embriyoların uluslararası taşınabilirliğini ve başarılı embriyo transferiyle canlı doğum elde edilebileceğini göstermiştir (Hufana-Duran ve ark., 2004; Hufana-Duran ve ark., 2007; Hufana-Duran ve ark., 2008).

OPU (Ovum Pick-Up) uygulamaları, mandalarda in vitro embriyo üretimi için önemli bir biyoteknolojik araç haline gelmiştir. Gebeliğin üçüncü ayını geçmemiş tüm yaşlardaki dişilerden oosit toplanabilmekte, haftada iki kez yapılan toplamalarda daha yüksek kaliteli oositler elde edilmektedir. Ayrıca oosit aspirasyonu sırasında gerekli negatif basıncın kontrolü, embriyo gelişim başarısını doğrudan etkilemektedir (Promdireg ve ark., 2000). Tekrarlayan OPU işlemlerinin, bataklık mandalarda in vitro embriyo üretimi için sürdürülebilir bir oosit kaynağı oluşturduğu belirlenmiştir (Pavasuthipaisit ve ark., 1995). 2013 yılında, OPU–IVM–IVF–IVC yöntemleriyle üretilen nehir tipi embriyolardan doğan ilk buzağı rapor edilmiştir (Aquino ve ark., 2013). OPU işleminin teknik detayları Hufana-Duran ve Duran tarafından 2015 yılında ayrıntılı biçimde tanımlanmıştır (Hufana-Duran & Duran, 2015).

Kesimhane kaynaklı oositlerin gelişim yeteneği, depolama süresi ve sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir. Oositlerin 6 saat içinde kullanılacağı durumlarda 25–33 °C, 6 saati aşan depolamalarda ise 15 °C ideal bulunmuştur (Hufana-Duran, 2008). In vitro kültür (IVC) aşamasında asepsi, uygun sıcaklık (35–37 °C), pH (7,1–7,4) ve ozmolarite (280–300 mOsmol) değerlerinin korunması kritik öneme sahiptir. Sığır kaynaklı kültür ortamlarında bataklık mandalarda %30'un altında maturasyon oranları gözlemlendiğinden, manda oositlerine özgü kültür sistemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Nguyen, 2006; Yindee ve ark., 2011). Kumulus hücreleriyle birlikte ko-kültür uygulamaları ve optimize edilmiş besi ortamları, tam gelişim gösteren embriyoların elde edilmesini sağlamıştır (Hufana-Duran, 2008). Ayrıca, kumulus hücre tabakasının durumuna göre oosit seçimi ve ortama östradiol eklenmesi, fertilizasyon başarısını artırmaktadır (Nguyen, 2006).

IVF başarısı, spermatozoanın silika partikülleriyle santrifüj edilmesi yoluyla artırılmış ve bu yöntemle başarılı doğumlar elde edilmiştir (Hufana-Duran ve ark., 2004). Uygun sperma konsantrasyonu ve kapasitasyon medyumlarının kullanımı embriyo gelişimi açısından kritik önemdedir. Ayrıca intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemi, düşük motiliteye sahip boğalardan elde edilen spermada başarılı sonuçlar vermiştir (Liang ve ark., 2012).

Embriyoların Saklanması

Embriyoların kısa ve uzun süreli muhafazası, sığırlarda olduğu gibi mandalarda da embriyo transferi uygulamalarının ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Manda embriyoları, +4–5 °C sıcaklık aralığında 24–48 saat boyunca canlılıklarını koruyarak kısa süreli olarak saklanabilmektedir. Bu amaçla embriyolar, uygun medyumlar içinde ve steril koşullar sağlanarak tüplerde ya da payetler içerisinde depolanabilir. Öte yandan güncel biyoteknolojik yaklaşımlar, embriyoların yavaş dondurma, hızlı soğutma, kontrollü veya hızlı

çözdürme protokolleri ile vitrifikasyon teknikleri kullanılarak uzun süre saklanmasına imkân tanımaktadır (Avdatek & Yeni, 2021).

Embriyoların Kısa Süreli Saklanması

Embriyoların 24–48 saat saklanması gereken durumlarda Medium-199 (M-199), Ham's F-10 gibi kompleks kültür ortamları ya da PBS + %10 fetal calf serum (FCS) içeren çözeltiler tercih edilir ve embriyolar 4°C'de steril falkon tüplerinde muhafaza edilir. Depolama işlemi genellikle 0,25 ml'lik payetler kullanılarak yapılır. Uzun süreli saklamada kullanılan kriyoprotektanlar ile ani soğutma işleminin zona pellucida üzerinde hasara yol açabilmesi nedeniyle, embriyonun zarar görmemesi için çoğu zaman uzatılmış bir bekletme yapılmaksızın kısa süreli saklama uygulanır. Ayrıca embriyoların 12. saatten itibaren canlılık oranlarında belirgin bir düşüş başladığı belirtilmiştir (Mapletoft & Stookey, 1998).

Kısa süreli saklama döneminde ışığa maruziyet, embriyo canlılığını etkileyen önemli faktörlerden biridir; bu nedenle embriyolar mikroskop altında en fazla 30 dakika tutulmalıdır. Nakil sırasında oluşabilecek sarsıntı, mekanik titreşim ve sıcaklık değişimleri canlılığa zarar verebileceğinden özenle önlenmelidir. Embriyolar oda sıcaklığında veya 4°C'de 24 saat saklanıp transfer edildiğinde gebelik oranı yaklaşık %50 civarında kalırken, saklama süresinin iki güne uzaması bu oranı belirgin şekilde azaltır. Embriyolar toplandıktan sonra 25–38°C arasında yaklaşık 5 saat stabil kalabilir; bu aralıkta ilk iki saate kadar ciddi bir kayıp görülmez ancak 2. saatten sonra canlılıkta hafif bir azalma gözlelenebilir. Buna karşın, 25°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, özellikle 5. saate ulaşıldığında embriyo kayıpları belirgin şekilde artmaktadır (Kanagawa ve ark., 1995).

Embriyoların Kriyoprezervasyonu

Erken evrelerdeki manda embriyoları, ileri gelişim evrelerine kıyasla vitrifikasyona karşı daha hassastır. Yapılan çalışmalar, morula, erken blastosist, blastosist ve genişlemiş blastosist (expanded blastocyst) aşamalarında gerçekleştirilen vitrifikasyon uygulamaları arasında çatlama (hatching) oranları açısından anlamlı bir fark bulunmadığını ve bu oranın genellikle %75–90 aralığında olduğunu göstermektedir (Hufana-Duran ve ark., 2004).

Vitrifikasyonda kullanılan araçlar arasında payet, Cryotop, Open-Pull Straw (OPS) ve Katı Yüzey Vitrifikasyonu yöntemleri yer almaktadır (Parnpai ve ark., 2016). Özellikle payet yöntemi, yüksek blastosist çatlama oranı (%90) sağlamış ve bu yöntemle canlı manda buzağılarının doğumu başarıyla rapor edilmiştir (Hufana-Duran ve ark., 2004).

Kriyoprotektan ajanlar (CPA), hücre içine geçebilen ve hücre içine geçemeyen CPA'lar olmak üzere iki gruba ayrılır. Hücre içine geçebilen CPA'lar arasında propilen glikol, gliserol, etilen glikol ve dimetil sülfoksit (DMSO) bulunur. Bu ajanlar, buz kristali oluşumunu önleyerek hücre iskeletini korur. Hücre içine geçemeyen CPA'lar ise sükroz, galaktoz ve trehaloz gibi şekerlerdir; bunlar genellikle vitrifikasyon sırasında hücre içine geçebilen CPA'larla birlikte kullanılır (Parnpai ve ark., 2016).

Manda embriyolarının kriyoprezervasyonu, çeşitli araştırmalarda canlı doğumlarla sonuçlanmış ve yöntemin başarıyla uygulanabileceği doğrulanmıştır (Hufana-Duran ve ark., 2004; Hufana-Duran ve ark., 2007; Hufana-Duran ve ark., 2008). Ayrıca hızlı dondurma yöntemleri hem sığır hem de manda embriyolarında başarılı şekilde uyarlanmıştır. Özellikle klonlanmış sığır embriyolarının vitrifiye edilmesi sonrasında, çözdürme işlemini takiben %90'ın üzerinde yaşama oranı elde edilmiştir (Bui, 2006).

Somatik Hücre Nükleer Transferi

1996 yılında ilk klonlanmış koyun olan Dolly'nin doğumuyla birlikte (Wilmut ve ark., 1997), somatik hücre nükleer transferi (SCNT) yöntemi kullanılarak çok sayıda memeli türü başarıyla klonlanmıştır. SCNT'nin temel prensibi, çekirdeği çıkarılmış bir oosite (enükle edilmiş oosit), donör hücre çekirdeğinin aktarılması esasına dayanır. Bu işlemde, çekirdeği alınmış oositin sitoplazması, füzyon, aktivasyon ve embriyoların in vitro kültürü sonrasında donör hücre çekirdeğini totipotent bir duruma yeniden programlar. 1999 yılında, fetal fibroblast hücrelerinin donör olarak kullanılmasıyla ilk klonlanmış bataklık mada embriyoları başarıyla üretilmiştir (Parnpai ve ark., 1999).

Uzun yıllardır bilindiği üzere, klonlanmış embriyoların gelişiminde en büyük engel epigenetik yeniden programlama sürecidir. Bu sürecin eksik veya yetersiz gerçekleşmesi, mandalarda klonlama veriminin düşüklüğüne neden olmakta ve bu durum diğer türlerdeki gözlemlerle de tutarlılık göstermektedir. Klonlanmış embriyolarda, konseptuslarda ve yavrularda kromozomal anomaliler, mitokondri-nükleer genom uyumsuzluğu, büyük yavru sendromu ve plasental fonksiyon bozukluklarına bağlı anomaliler gibi çeşitli düzensizlikler bildirilmektedir. Bu sorunlar, klonlanmış yavruların canlılık ve yaşam sürelerini önemli ölçüde azaltmaktadır. Klonlanmış embriyoların ve doğan yavruların yaşama oranlarını artırmak amacıyla, epigenetik yeniden programlamayı iyileştirmeye yönelik çok sayıda strateji önerilmiştir (Srirattana ve ark., 2022). Ancak, devam eden araştırmalara rağmen, transfer edilen embriyo başına canlı doğum oranının düşük kalması hem bilimsel hem de ticari uygulamalar açısından hâlen en büyük kısıtlayıcı faktörlerden biridir (Hufana-Duran ve ark., 2025).

Genomik Seleksiyon

Genomik seleksiyonun, reproduktif biyoteknolojilerle entegrasyonu, manda yetiştiriciliği ve üretim programlarında devrim yaratma potansiyeline sahiptir. Bu yaklaşım, genetik açıdan üstün bireylerin daha erken yaşta ve daha yüksek doğrulukla seçilmesine olanak tanır. Manda ıslah çalışmalarında, genomik seleksiyon ve süt verimi, yağ oranı, protein oranı gibi verim özelliklerine yönelik genetik öngörü kullanılarak, suni tohumlama amacıyla genetik olarak üstün boğaların seçimi yapılmaktadır. Genetik değerlendirme çalışmalarında, GBLUP (Genomic Best Linear Unbiased Prediction) ve ssGBLUP (single-step GBLUP) yöntemlerinin, pedigree BLUP yöntemine göre daha yüksek doğruluk sağladığı bildirilmiştir (Herrera ve ark., 2021). Son dönemde, belirli genlerin belirlenmesine dayalı belirteç destekli seleksiyon uygulamaları, klasik seleksiyon yöntemleriyle birlikte yürütülmekte; böylece genetik açıdan üstün mandaların seçimi daha etkin hale getirilmektedir (Hufana-Duran ve ark., 2025).

Manda endüstrisinde üretim özellikleriyle ilişkili olarak kullanılan başlıca genler şunlardır; Soy kontrolü için belirteç genler, Beta-kazein ve Kappa-kazein genleri, yüksek süt verimiyle ilişkili olan PRLR (prolaktin reseptörü), yağ depolanması ve et kalitesi ile ilişkili FABP4, et yumuşaklığı ile ilişkili Calpain (CAPN1) ve Calpastatin (CAST), et verimi ile ilişkili Titin, süt verimi ve büyüme oranı ile ilişkili Myogenin. Ayrıca, hem bataklik hem de nehir tipi mandalarda, sperm-spesifik bir protein ve fertilite faktörü olan Fosfolipaz C zeta (PLC) için DNA belirteçleri geliştirilmiştir. Manda PLCZ1 mRNA ekspresyon düzeyleri ile in vitro fertilizasyon (IVF) başarısı arasında güçlü bir pozitif ilişki olduğu gösterilmiştir (Atabay ve ark., 2019).

Genomik seleksiyon, kısa buzağılama aralığı ve yüksek gebelik oranı gibi reproduktif özellikleri taşıyan bireylerin

seçilmesiyle, manda popölasyonlarının verimliliğini önemli ölçüde artırabilir. Bu yaklaşım, IVF, ET ve AI gibi ileri düzey üreme teknolojileriyle birlikte kullanıldığında, genetik ilerlemeyi hızlandıran, üretkenliği artıran ve manda yetiştiriciliğinin sürdürülebilirliğini sağlayan güçlü bir araç haline gelmektedir (Hufana-Duran ve ark., 2025).

Mandalarda Biyoteknolojik Yeniliklerin Geleceği

Manda ıslahında üreme biyoteknolojilerinin geleceği, yalnızca geleneksel verim ve büyüme özelliklerinin iyileştirilmesine değil; aynı zamanda küresel çevresel baskılarla uyumlu, sürdürülebilir bir üretim modelinin oluşturulmasına odaklanmaktadır. Bu bağlamda gelişmiş genomik seleksiyon yaklaşımları, klasik seleksiyon parametrelerinin ötesine geçerek metan emisyonu, yemden yararlanma etkinliği, hastalık direnci, ısı stresine tolerans ve genel çevresel dayanıklılık gibi yeni fenotiplerin hedeflenmesini mümkün kılmaktadır. Söz konusu genişleme, iklim değişikliğinin giderek artan etkilerine karşı daha uyarlanabilir ve verimli bir manda yetiştiriciliği altyapısı geliştirilmesini desteklemektedir.

Son yıllarda genomik belirteçlerin yüksek doğrulukla tanımlanmasını sağlayan teknolojik ilerlemeler, mandada seçilmiş özellik yelpazesini genişletmekte ve özellikle Güneydoğu Asya gibi nüfus artışının hızlı olduğu bölgelerde gıda güvenliğiyle ilişkili zorlukların yönetilmesine katkı sunmaktadır. Bu çerçevede gen düzenleme araçları (örn. CRISPR-Cas sistemleri), ısı toleransı, fertilité, büyüme performansı ve hastalık duyarlılığı gibi spesifik ıslah sorunlarının çözümünde stratejik bir potansiyel taşımaktadır. Genom düzenleme ile genomik seleksiyonun bütünleşmesi, gelecekte daha hassas, hızlı ve maliyet-etkin ıslah programlarının temelini oluşturacaktır.

Diğer yandan, geniş kapsamlı genom dizileme girişimleri de manda ıslahı için güçlü bir referans veri tabanı sağlamaktadır. 1000 Buffalo Genomes Project (1000BGP), türün bugüne kadar oluşturulmuş en kapsamlı genomik kaynaklarından biri olup, hedef özelliklerin moleküler temelini daha iyi anlaşılmasına ve yüksek doğruluklu genomik tahmin modellerinin geliştirilmesine olanak tanımaktadır (Pineda ve ark., 2024). Bu veri altyapısı aynı zamanda farklı manda popülasyonları arasında melezleme stratejilerinin optimize edilmesi ve bölgesel üretim hedeflerine uygun hatların geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

Tüm bu ileri teknolojilerin bütüncül olarak ıslah programlarına entegre edilmesi, manda yetiştiriciliğinde üretkenliğin artırılması, genetik verimliliğin yükseltilmesi ve sürdürülebilir-karlı bir üretim modelinin oluşturulması için benzersiz fırsatlar sunmaktadır. Üreme biyoteknolojilerindeki bu yenilikçi yönelimler, geleceğin manda sektöründe hem ekonomik hem de çevresel açıdan daha dayanıklı sistemlerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Kaynaklar

Adams, G. P. (1994). Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation.

Afriani, T., Rahim, F., Rachmat, A., Mundana, M., & Farhana, A. (2020). Follicle stimulating hormone and gonadotropin releasing hormone administration to the superovulation of buffalo (*Bubalus Bubalis*). American Journal of Animal and Veterinary Sciences, 15(2), 114-117.

Ahmed, H., Jahan, S., Riaz, M., Ijaz, M., & Wahab, A. (2021). Improving the quality and in vitro fertilization rate of frozen-thawed semen of buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls with the inclusion of vitamin B12 in the cryopreservation medium. Animal Reproduction Science, 229, 106761.

Aquino, F., Atabay, E., Atabay, E., Ocampo, M., Duran, P., Pedro, P., Duran, D., De Vera, R., & Cruz, L. (2013). In vitro embryo production and transfer of bubaline embryos using oocytes derived from Transvaginal Ultrasound-guide Follicular Aspiration (TUFA).

Atabay, E. P., Atabay, E. C., Dela Cruz, C. F., Apolinario, J. P., Maylem, E. R. S., & Flores, E. B. (2023). Influence of ovarian follicle sizes and estrous signs on pregnancy following progesterone-based fixed time artificial insemination in water buffaloes. Journal of Buffalo Science, 12, 143-150.

Atabay, E. P., Atabay, E. C., Maylem, E. R. S., Tilwani, R. C., Flores, E. B., & Sarabia, A. S. (2019). Improved Pregnancy in Water Buffaloes Through Synchronization of Ovulation and Fixed Time Artificial Insemination Technique. Philippine Journal of Veterinary Medicine, 56(2).

Atabay, E. P., Fajardo, Z. P., Tadeo, R. D., Atabay, E. C., Venturina, E. V., Mingala, C. N., & Fissore, R. A. (2019).

Phospholipase C zeta 1 mRNA as a marker of oocyte-activation and fertilization potential of water buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Livestock Science*, 225, 103-108.

Avdatek, F., & Yeni, D. (2021). Manda Embriyolarının Kısa ve Uzun Süreli Saklanması. *Türkiye Klinikleri Reproduction and Artificial Insemination-Special Topics*, 7(1), 48-53.

Badami, S., Roy, S. C., & Dhali, A. (2018). Effect of L-penicillamine, N-acetyl cysteine and α -tocopherol acetate on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm kinematics in vitro. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 6(6), 990–996.

Barati, F., Khaksari, M. M., & Mohammadi, G. A. (2009). Cryopreservation of in situ cool stored buffalo (*Bubalus bubalis*) epididymal sperm.

Baruselli, P. S., Ferreira, R. M., Sales, J. N. D. S., Gimenes, L. U., Sá Filho, M. F. D., Martins, C. M., ... & Bó, G. A. (2011). Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*, 76(9), 1583-1593.

Baruselli, P. S., Madureira, E. H., Visintin, J. A., Porto-Filho, R., Carvalho, N. A. T., Campanile, G., & Zicarelli, L. (2000). Failure of oocyte entry into oviduct in superovulated buffalo. *Theriogenology*, 53(1), 491.

Birler, S., Pabuccuoğlu, S., Atalla, H., Alkan, S., Özdaş, Ö. B., Bacinoğlu, S., Cirit, U., Zavar, İ., Sönmez, M. E. C., & İleri, İ. K. (2002). Transfer of in vitro produced sheep embryos. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 26(6), 1421-1426.

Bó, G. A., Baruselli, P. S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tribulo, R., ... & Mapletoft, R. J. (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57(1), 53-72.

Boland, M. P., Goulding, D., & Roche, J. F. (1991). Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, 35(1), 5-17.

Bui, X. N. (2006). Current status and trends of animal reproductive biotechnology in Vietnam. *Embryo Transfer Newsletter. Reprod. Fert. Develop*, 24(2), 5-10.

Chaikhun-Marcou, T., Maitreejet, W., Karnjanasirm, K., Rattanabtimtong, S., Kajaysri, J., & Raungprim, T. (2017). Increasing estrous synchronization rates in swamp buffalo through breeding soundness examination during Ovsynch-TAI. *Agri. Sci. J*, 48(2), 929-938.

Chaikhun, T., Tharasanit, T., Rattanatep, J., De Rensis, F., & Techakumphu, M. (2010). Fertility of swamp buffalo following the synchronization of ovulation by the sequential administration of GnRH and PGF2alpha combined with fixed-timed artificial insemination. *Theriogenology*, 74(8), 1371-1376.

Chantaraprateep, P., Kobayashi, G., Lohachit, C., Virakul, P., Kunavongkrit, A., Techakumphu, M., ... & Dusitsin, N. (1989). Success in embryo transfer in Thai swamp buffalo (*Bubalus bubalis*).

Chaudhary, S. C., Aeksiri, N., Wanangkarn, A., Liao, Y., & Inyawilert, W. (2020). Effects of melatonin on cryopreserved semen parameters and apoptosis of Thai swamp buffalo bull (*Bubalus bubalis*) in different thawing conditions. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 9(2), 238–245.

Cruz, L. C., Venturina, H., Jha, S. S., Adriano, F., Serra, P., Duran, P. G., Smith, O. F., Lorenzo, N. & Faylon, P. S. (1991). Successful transfer of Murrah buffalo embryo into Philippine swamp buffalo recipients.

Dhami, A. J., & Sahni, K. L. (1994). Effects of various cooling (from 30° C to 5° C), equilibration and diluent treatments on

freezability, post-thaw thermoresistance, enzyme leakage and fertility of bubaline spermatozoa.

Eriani, K., Sari, N., Rosnizar, R., Dasrul, D., Suhartono, S., & Rizal, M. (2017). Cryopreservation of Aceh swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) semen with combination of glycerol and lactose. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 9(3), 409–416.

Henry, M., Brito, M. F., Neves, B. P., Auler, P. A., Almeida, J., Andrade, G. O., Becerra, V. B., & Bergmann, L. (2018). Peculiarities of the buffalo species for andrological evaluation—results of four years of study and weekly semen collection schedule. *Animal Reproduction (AR)*, 14(Supplement 1), 1225-1233.

Herold, F. C., De Haas, K., Cooper, D., Colenbrander, B., Nothling, J. O., Theunissen, W., Spillings, B., & Gerber, D. (2004). Comparison of three different media for freezing of epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) and influence of equilibration time on the post-thaw sperm quality. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 71(3), 203-210.

Herrera, J. R. V., Flores, E. B., Duijvesteijn, N., Moghaddar, N., & van der Werf, J. H. (2021). Accuracy of genomic prediction for milk production traits in Philippine dairy buffaloes. *Frontiers in Genetics*, 12, 682576.

Hufana-Duran D. Studies for the improvement of in vitro culture systems of oocytes and embryos in water buffaloes. Tsukuba, Japan: University of; 2008. Ph.D.

Hufana-Duran, D., & Duran, P. G. (2015). Advanced reproductive technologies in water buffalo. *Bubaline Theriogenology*. Berlin: Peter Lang GmbHint'l Verlag Wissensch.

Hufana-Duran, D., Chaikhun-Marcou, T., Duran, P. G., Atabay, E. P., Nguyen, H. T., Atabay, E. C., ... & Parnpai, R. (2025). Future of reproductive biotechnologies in water buffalo in Southeast Asian countries. *Theriogenology*, 233, 123-130.

Hufana-Duran, D., Pedro, P. B., Salazar Jr, A. L., Venturina, H. V., Duran, P. G., Takahashi, Y., Kanai, Y. & Cruz, L. C. (2008). Twin calf production in water buffaloes following non-surgical transfer of in vitro-produced-vitrified embryos. *Philippine Journal of Science*, 137(2), 99-104.

Hufana-Duran, D., Pedro, P. B., Salazar, A. L., Venturina, H. V., Duran, P. G., & Cruz, L. C. (2007). River buffalo calves (2n= 50) delivered to term by swamp buffalo recipients (2n= 48) out of in vitro-derived vitrified embryos. *Livest. Sci*, 107, 213-219.

Hufana-Duran, D., Pedro, P. B., Venturina, H. V., Hufana, R. D., Salazar, A. L., Duran, P. G., & Cruz, L. C. (2004). Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of in vitro-derived vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Theriogenology*, 61(7-8), 1429-1439.

İnanç, M. E., Güngör, Ş., & Ata, A. (2021). Manda Spermasının Alınması, Değerlendirilmesi ve Saklanması. *Türkiye Klinikleri Reproduction and Artificial Insemination-Special Topics*, 7(1), 8-15.

Johnson, L. A. (1992). Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. *Journal of Animal Science*, 70, 8-18.

Kanagawa, H., Shimohira, I., & Saitoh, N. (1995). Manual of bovine embryo transfer. National Livestock Breeding Center MAFF, JICA-Japan, 1-34.

Khalil, A., & Elkhamy, M. (2025). Beneficial effects of carvacrol-loaded phytosomes on enhancing cryotolerance of buffalo

semen following cryopreservation. Scientific Reports, 15, Article 10030.

Kumar, S., Sahni, K. L., & Mohan, G. (1992). Effect of different sugars as a sole cryoprotectant in freezing of buffalo semen.

Lambrechts, H., Van Niekerk, F. E., Coetzer, W. A., Cloete, S. W. P., & Van Der Horst, G. (1999). The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa. Theriogenology, 52(7), 1241-1249.

Liang, Y. Y., Srirattana, K., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T., & Parnpai, R. (2012). Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Cryobiology, 65(2), 151-156.

Madan M, Prakash B. Reproductive en-docrinology and bitechnology applications among buffaloes. Society of Reproduction and Fertility supplement. 2007;64:261-81

Mapletoft, R. J., & Stookey, J. M. (1998). General sanitary procedures and welfare considerations associated with in-vivo production of embryos. Manual of the International Embryo Transfer Society, 3, 55-66.

Mapletoft, R. J., Steward, K. B., & Adams, G. P. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. Reproduction Nutrition Development, 42(6), 601-611.

Mittal, P. K., Madan, A. K., Sharma, V., Gottam, G. S., & Gupta, B. (2019). Cryopreservation of buffalo bull semen-restriction and expectation: A review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 8(1), 1351-1368.

Moore K, Thatcher W. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 2006;89(4): 1254-66.

Mughal, D. H., Ijaz, A., Yousaf, M., Wadood, F., Farooq, U., Mahmood, S. A., & Riaz, A. (2018). Effect of osmotic pressure on spermatozoa characteristics of cryopreserved buffalo bull (*Bubalus bubalis*) semen. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 274–277.

Musa, K. S., & Abdulkareem, T. A. (2023). Protein profiles in seminal plasma of Iraqi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) associated with fresh and cryopreserved semen quality. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1262(7), 072095.

Nanda AS, Nakao T. Role of buffalo in the socio-economic development of rural Asia: Current status and future prospectus. *Animal Science Journal*. 2003;74(6):443-55.

Nandi S, Raghu H, Ravindranatha B, Chauhan M. Production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in vitro: premises and promises. *Reproduction in Domestic Animals*. 2002;37(2):65-74. 5.

Nguyen, B. X. (2006). Current status and trends of animal reproductive biotechnology in Vietnam. *Embryo Transfer Newsletter*, 24(2), 5-10.

Ocampo, M. B., Ocampo, L. C., Lorenzo, N. D., De Vera, R. V., Aquino, F. P., & Cruz, L. C. (1997). Pregnancies resulting from swamp buffalo oocytes matured and fertilized in vitro.

Ohashi, O. M., Oba, E., Nogueira, J. C., Sousa, J. D., & Silva, A. D. (2001). Characteristic of the reproductive development of male buffalo: testicular development, puberty and sexual maturity.

Parnpai, R., Liang, Y., Ketudat-Cairns, M., Somfai, T., & Nagai, T. (2016). Vitrification of buffalo oocytes and embryos. *Theriogenology*, 86(1), 214-220.

Parnpai, R., Tasripoo, K., & Kamonpatana, M. (1999). Development of cloned swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblasts: comparison in vitro cultured with or without buffalo and cattle oviductal epithelial cells.

Parnpai, R., Timsard, V., Kamonpatana, M., Pansin, C., Sophon, S., Jetana, T., ... & Austin, C. R. (1985). Recovery of swamp buffalo embryos using non surgical technique. *Buffalo J*, 1(1), 77-82.

Pavasuthipaisit, K., Holyoak, R. G., Tocharus, C., & Kitiyanant, Y. (1995). Repeated transvaginal follicular aspiration in swamp buffalo. *Theriogenology*, 43(1), 295.

Perteghella, S., Gaviraghi, A., Cenadelli, S., Bornaghi, V., Galli, A., Crivelli, B., Vigani, B., Vigo, D., Chlapanidas, T., Faustini, M., & Torre, M. L. (2017). Alginate encapsulation preserves the quality and fertilizing ability of Mediterranean Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*) and Holstein Friesian (*Bos taurus*) spermatozoa after cryopreservation. *Journal of Veterinary Science*, 18(1), 81–88.

Pineda, P. S., Flores, E. B., Villamor, L. P., Parac, C. J. M., Khatkar, M. S., Thu, H. T., Smith, T. P. L., Rosen, B. D., Ajmone-Marsan, P., Colli, L., Williams, J. L., Low, W. Y. (2024). Disentangling river and swamp buffalo genetic diversity: initial insights from the 1000 Buffalo Genomes Project. *GigaScience*, 13, giae053.

Praharani, L., Kusumaningrum, D. A., Muttaqin, Z., Sianturi, R. G., Rusdiana, S., Talib, C., Arrazy, A.F., & Sopian, E. (2024, July). Pregnancy and calving rate of artificial insemination with sexed semen in swamp buffaloes under field conditions. In IOP

Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 1377, No. 1, p. 012077). IOP Publishing.

Praveen, K. S., Radhika, V., Chandrika, T., Srihari, J., Manoranjan, I., Srikanth, N. R., & Mutha Rao, M. (2024). Artificial insemination in cattle and buffalo: An update. *Int. J. Vet. Sci. Anim. Husb*, 9, 221-225.

Presicce G. Reproduction in the water buffalo. *Reproduction in Domestic Animals*. 2007;42 24-32.

Promdireg, A., Techakumphu, M., Phutikanit, N., & Na-Chiangmai, A. (2000). A Preliminary Study on Oocyte Collection Using Transvaginal Ultrasound in Swamp Buffalo Heifers (*Bubalus Bubalis*). *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 30(1), 43-50.

Purohit, G., Duggal, G., Dadarwal, D., Kumar, D., Yadav, R., & Vyas, S. (2003). Reproductive biotechnologies for improvement of buffalo: The current status. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16(7), 1071–1086.

Roza, E., Aritonang, S. N., Susanti, H. I. L. D. A., & Sandra, A. F. R. I. A. N. I. (2019). Synchronization of GnRH and PGF2 α on estrus response, pregnancy, progesterone hormones in crossing of Swamp Buffalo and Water Buffalo in West Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas*, 20(10), 2910-2914.

Sansone, G. M. J. F., Nastri, M. J. F., & Fabbrocini, A. (2000). Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal reproduction science*, 62(1-3), 55-76.

Shaw, D. W., Farin, P. W., Washburn, S. P., & Britt, J. H. (1995). Effect of retinol palmitate on ovulation rate and embryo quality in superovulated cattle. *Theriogenology*, 44(1), 51-58.

Silva, L. K. X., Lourenço, J. B., Almeida da Silva, A. O., Sousa, J. S., Silva, A. G. M., Dos Reis, A. N., Miranda, M., Santos,

S. D., Ohashi, O. M., Martorano, L., Rocha, G. N., Faturi, C., Morais, É., Mares, É., & Garcia, A. R. (2020). Increased quality of in natura and cryopreserved semen of water buffaloes supplemented with saturated and unsaturated fatty acids from the palm oil industry. *Animal Reproduction*, 17, Article e20200522.

Singh, B., Chauhan, M. S., Singla, S. K., Gautam, S. K., Verma, V., Manik, R. S., ... & Mukesh, M. (2009). Reproductive biotechniques in buffaloes (*Bubalus bubalis*): status, prospects and challenges. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(4), 499-510.

Srirattana, K., Kaneda, M., & Parnpai, R. (2022). Strategies to improve the efficiency of somatic cell nuclear transfer. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 1969.

Tasripoo, K., Suthikrai, W., Sophon, S., Jintana, R., Nualchuen, W., Usawang, S., ... & Srisakwattana, K. (2014). First cloned swamp buffalo produced from adult ear fibroblast cell. *animal*, 8(7), 1139-1145.

Tom, C. K., & Valdez, C. A. (2015). Effects of equilibration time, thawing temperature and time on pre-freezing and post-thaw morphology of water buffalo (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758) spermatozoa cryopreserved in ethylene glycol. *The Philippine Journal of Veterinary Medicine*, 52(1), 1–1.

Vos, P. L. A. M., Van der Schans, A., De Wit, A. A. C., Bevers, M. M., Willemse, A. H., & Dieleman, S. J. (1994). Effects of neutralization of pregnant mares' serum gonadotrophin (PMSG) shortly before or at the preovulatory LH surge in PMSG-superovulated heifers on follicular function and development. *Reproduction*, 100(2), 387-393.

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), 810-813.

Womack JE. Advances in livestock genomics: opening the barn door. *Genome Research*. 2005;15(12):1699-705.

Yeni, D., & Avdatek, F. (2017). Kısa süreli saklanan epididimal Anadolu mandası spermasına ilave edilen karnosik asitin etkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 10(3), 187–195.

Yindee, M., Techakumphu, M., Lohachit, C., Sirivaidyapong, S., Na-Chiangmai, A., Roelen, B. A. J., & Colenbrander, B. (2011). Maturation Competence of Swamp Buffalo Oocytes Obtained by Ovum Pick-Up and from Slaughterhouse Ovaries. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(5), 824-831.

Yuan, W. L., Liu BingTsan, L. B., Jea YuShine, J. Y., & Lin ChengYong, L. C. (2008). Improving the fertility of buffalo cows (*Bubalus bubalis*) in Taiwan with PGF2 α treatment.

Yulnawati, Y., Maheshwari, H., & Rizal, M. (2009). Viability and plasma membrane integrity of the spotted buffalo epididymal spermatozoa after thawing with the addition of dextrose into the extender. *Biotropia*, 16(1).

Zorzetto, M. F., Sancler-Silva, Y. F. R., Codognoto, V. M., & Boakari, Y. L. (2018). Reproductive Biotechnologies of Buffaloes. *Reproduction Biotechnology in Farm Animals*, 261.

KÖPEKLERDE REPRODÜKTİF BİYOTEKNOLOJİLER

BURCU ESİN¹
CUMALİ KAYA²
MESUT ÇEVİK³

Giriş

Köpeklerde reprodüktif biyoteknoloji hem klinik üreme yönetimi hem de translasyonel biyomedikal araştırmalar açısından önemli bir alandır. Dişi köpeklerin uzun anöstrus dönemi, oositlerin metafaz I evresinde ovüle olması, oosit maturasyonunun ovulasyondan sonraki 2–3 gün içinde tamamlanması gibi özgün fizyolojik farklılıklar, bu türde yardımcı üreme tekniklerinin uygulanmasını zorlaştırmaktadır (Nagashima & Songsasen, 2021). Bununla birlikte, son yirmi yılda hem sperma kriyoprezervasyonu hem de in vitro fertilizasyon (IVF) alanında sağlanan gelişmeler,

¹ Dr. Araş. Gör., Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Orcid: 0000-0002-5728-1478

² Dr. Araş. Gör., Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Orcid: 0000-0002-0666-5359

³ Prof. Dr., Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Orcid: 0000-0002-0754-6116

köpeklerde doğrudan klinik uygulama ve ırk koruma projeleri için umut vericidir (Nagashima et al., 2015).

Köpeklerde reproduktif biyoteknoloji, ilk kez 1930’larda Rus bilim insanı Ivanov tarafından tanımlanan suni tohumlama (ST) denemeleriyle başlamıştır. 1960’lı yıllarda Tris-bazlı sulandırıcıların geliştirilmesi ve sperma kriyoprezervasyonunun başarıyla uygulanması (Hermansson et al., 2021), köpeklerde genetik materyalin uzun süreli saklanması sağlamıştır. 1980’lerden itibaren cerrahi inseminasyonun yerini endoskopik transservikal inseminasyon (TCI) almış; 2000’lerin ortalarından itibaren embriyo transferi, oosit olgunlaştırma (IVM) ve somatik hücre çekirdek transferi (SCNT) teknikleri veteriner biyoteknoloji araştırma alanı olarak yerini almıştır (Songsasen, 2021).

Günümüzde köpeklerde reproduktif biyoteknoloji, yalnızca üreme verimliliğini artırmayı değil, aynı zamanda ırkların genetik çeşitliliğini korumayı, genetik hastalıkların moleküler modellerini geliştirmeyi ve translasyonel araştırmalarda köpeği insan hastalıkları için bir model haline getirmeyi amaçlamaktadır (Zou et al., 2015).

Erkek Üreme Fizyolojisi ve Uygulamalı Reprodüktif Biyoteknolojiler

Köpeklerde erkek reproduktif biyoteknolojisi, spermatogenezin fizyolojisinden başlayarak spermanın toplanması, değerlendirilmesi, kriyoprezervasyonu ve reproduktif biyoteknolojilerinde kullanımıyla devam eden çok yönlü bir süreçtir. Bu alanın temel amacı yalnızca fertilité yeteneğine sahip gametlerin elde edilmesi değil; aynı zamanda bu gametlerin uzun süreli saklanması, genetik materyalin korunması ve kontrollü üreme programlarında etkin biçimde kullanılabilirliğinin artırılmasıdır. Günümüzde bu çalışmalar, köpek ırklarının genetik çeşitliliğinin sürdürülebilirliği, nadir türlerin korunması ve translasyonel

araştırmalarda model geliştirilmesi açısından bk öneme sahiptir (McDonald, 1969; Songsasen, 2021).

Köpeklerde spermatogenez ortalama 60 gün süren karmaşık bir hücresel süreçtir. Germ hücreleri, spermatogonyumdan olgun spermatozoona kadar farklılaşırken Sertoli ve Leydig hücreleriyle sıkı bir etkileşim içindedir. Sertoli hücreleri hem besleyici hem de koruyucu bir mikroçevre oluşturarak kan-testis bariyerini meydana getirir ve germ hücrelerinin immün sistem tarafından tanınmasını önler. Leydig hücreleri ise luteinizan hormon (LH) etkisiyle testosteron üretimini sağlar. Bu endokrin etkileşim, hipotalamus–hipofiz–gonad eksenini tarafından kontrol edilir. Gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) hipotalamustan pulsatif salınımı, n hipofizde LH ve folikül stimüle edici hormon (FSH) sekresyonunu uyarır. Luteinizan hormon, leydig hücrelerinde steroidogenez sürecini başlatırken; FSH, sertoli hücrelerinde androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezini uyararak intratestiküler testosteron düzeyinin stabil kalmasını sağlar (McDonald, 1969). Bu koordineli hormonal mekanizma, spermatogenezin srekliiliği ve kalitesi için gereklidir.

Spermatogenezin testis lobülleri arasında tam senkronize olmaması, ejakülat kalitesinde dönemsel farklılıklara neden olabilir. Bunun yanı sıra çevresel sıcaklık, fotoperiyot, beslenme ve toksik ajanlara maruz kalma gibi dış faktörler spermatogenezin başarısını doğrudan etkileyen parametrelerdir. Köpeklerde sperma toplama işlemi çoğunlukla elle masaj yöntemiyle yapılır ve üç ejakülat fraksiyonundan oluşur: Üretral yıkama sıvısı, spermatozoon açısından zengin fraksiyon ve prostatik sıvı. Laboratuvar değerlendirmelerinde genellikle ikinci fraksiyon kullanılır. İkinci fraksiyon fertilizasyon kapasitesine sahip spermatozoonların bk bir kısmını içerir. rnek alımından önce erkek köpeğe 3–5 günlük cinsel istirahat önerilir. Daha uzun dinlenme süresi ise fertilite yeteneği düşük spermatozoonların artmasına ve morfolojik

bozukluklara neden olabilir. Elle masaj yöntemi ile toplama yapılamayan, nörolojik hasarlı veya davranışsal olarak uygun olmayan erkeklerde ise anestezi altında elektro-ejekülatör cihazları kullanılmaktadır (Belala et al., 2024).

Toplanan ejakülatın değerlendirilmesi hem makroskopik hem de mikroskopik parametreleri içeren çok yönlü bir analiz sürecidir. Spermatolojik analiz, ejakülatın fertilite potansiyelini belirlemede kritik öneme sahiptir. Makroskopik incelemede öncelikle ejakülatın hacmi, renk, koku, koagülasyon (kaynama) hareketi ve viskozite gibi fiziksel özellikleri belirlenir. Ortalama ejakülat hacmi türler arasında değişmekle birlikte genellikle 1–30 mL arasında olup, bu parametre eklenti bezlerinin fonksiyonel durumunu yansıtır. Normalde ejakülatın rengi süt beyazı ya da opak beyaz olmalıdır; sarımsı tonlar genellikle idrar kontaminasyonu veya enfeksiyonu, kırmızı renk ise hematospermi (spermadaki kan varlığı) olasılığını gösterir. Koku, tür spesifik olmakla birlikte keskin ya da amonyak benzeri koku, genellikle bakteriyel kontaminasyon belirtisidir. Kaynama hareketi, mikroskopik inceleme sırasında spermatozoonların yoğun ve senkronize hareketleri sonucunda, sıvı yüzeyinde kaynama benzeri dalgalanmalar şeklinde gözlenen toplu motilite olgusudur. Bu görünüm, yüksek spermatozoa yoğunluğu ve canlılığının bir göstergesidir. Viskozite, spermanın akışkanlık derecesini gösterir. Yüksek viskozite, spermatozoon hareketini olumsuz etkileyerek fertilizasyon şansını azaltabilir. Mikroskopik incelemede ise ejakülatın kitle hareketi, motilitesi, spermatozoon yoğunluğu (konsantrasyonu), morfolojik özellikleri ve ölü-canlı oranı değerlendirilir. Kitle hareketi, spermatozoonların toplu olarak sergilediği dalgalanma benzeri hareketin mikroskop altında gözlenmesiyle belirlenir ve 0'dan 5'e kadar puanlanır. Yüksek skor, iyi sperma kalitesini ifade eder. Motilite, belirli bir alandaki spermatozoonların ileri doğru hareket etme oranını gösterir ve genellikle % motilite olarak kaydedilir. Bu oran fertilite

potansiyelinin en belirleyici göstergelerindendir. Yoğunluk (konsantrasyon), mililitre başına düşen spermatozoon sayısını ifade eder. Morfolojik muayene, spermatozoonun baş, orta parça ve kuyruk yapılarının değerlendirilmesiyle gerçekleştirilir. Morfolojik anomalilerin artışı spermatozoonun fertilizasyon yeteneğini olumsuz etkiler. Ölü-canlı oranı, genellikle çeşitli boyama yöntemleriyle belirlenir. Eosin-nigrosin ile boyanan bir örnekte boyayı almayan spermatozoonlar canlı, boyayı alanlar ise ölü olarak kabul edilir. Ayrıca spermanın pH değeri de önemli bir kalite göstergesidir. Normalde 6.2–7.0 aralığında olup, daha düşük pH asidik koşulları ve olası kontaminasyonu, yüksek pH ise prostatik disfonksiyon veya inflamasyonu düşündürülebilir (Belala et al., 2024). Bu parametrelerin birlikte değerlendirilmesi, ejakülatın genel fertilite kapasitesini ortaya koyar ve ileri aşamalarda uygulanacak kriyoprezervasyon veya suni tohumlama işlemleri için uygunluğun belirlenmesine olanak sağlar.

Köpek spermasının kriyoprezervasyonu, reproduktif biyoteknolojinin en kritik uygulama alanlarından biridir. Bu işlemde amaç, hücre bütünlüğünü ve fertilizasyon kapasitesini koruyarak genetik materyalin uzun vadeli saklanabilmesidir. Kriyoprezervasyon öncesi kullanılan sulandırıcılar, spermatozoonları ozmotik stres ve buz kristali oluşumuna karşı korur. Köpeklerde yaygın olarak Tris-sitrat-glikoz tamponu, %20 yumurta sarısı ve %4–6 gliserolden oluşan sulandırıcılar kullanılmaktadır. Gliserol hücre içi kriyoprotektan olarak hücre dışına su çıkışını düzenlerken; yumurta sarısı fosfolipid ve lipoprotein içeriğiyle membran stabilitesini destekler. Yumurta sarısına alternatif olarak mikrobiyal kontaminasyon riskini ortadan kaldıran soya bazlı lesitin sulandırıcılar da kullanılabilmektedir (Hermansson et al., 2021). Ayrıca şeker bazlı kriyoprotektanlar (ör. trehaloz) ve antioksidan katkıları (vitamin E, C, melatonin,

resveratrol, selenyum) dondurulmuş spermanın motilite ve DNA bütünlüğünü anlamlı biçimde iyileştirmektedir (Esin et al., 2024).

Kriyoprezervasyon işlemi genellikle 37°C'den 5°C'ye yavaş soğutma (yaklaşık 0,3°C/dakika) ile başlar. Hızlı soğutma, spermatozoa plazma membranında “soğuk şok” hasarına neden olur. Kriyoprezervasyon, sıvı azot buharında ön soğutma sonrası -196°C'de uzun süreli depolama şeklinde gerçekleştirilir. Çözme işlemi 37°C'de 30 saniye sürede yapılır ve çözüm sonrası motilite genellikle %40–60 arasında seyretmektedir. Kriyoprezervasyon sonrası kalite değerlendirmesinde motilite, morfoloji ve canlılık testlerinin yanında Hipoosmotik Şişme Testi (HOST) ile membran bütünlüğü, akrozom reaksiyon testiyle kapasitasyon yeteneği, mitokondri aktivitesiyle enerji üretimi ve DNA fragmentasyon indeksi (DFI) analizleri de yapılmaktadır (Esin et al., 2022). DNA fragmentasyon indeksi fertilizasyon potansiyelinin en güvenilir göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir (Songsasen, 2021).

Köpeklerde spermanın klinik kullanımı çoğunlukla suni tohumlama ve IVF tekniklerine dayanır. Taze spermanın vajinal inseminasyonla gebelik oranı %80–90 iken, 4–8°C'de 72 saate kadar saklanabilen soğutulmuş spermada bu oran %70 civarındadır. Dondurulmuş spermada ise doğrudan vajinal uygulamada başarı oranı %40 civarındayken, transcervical inseminasyon (TCI) yöntemiyle %65–70 seviyesine ulaşabilmektedir (Songsasen, 2021). Ortalama sperma dozu 150–200 milyon motil spermatozoondur ve uygulama zamanı, dişinin progesteron düzeyinin 4–6 ng/mL aralığında olduğu periyotla uygun olmalıdır.

Son yıllarda erkek reproduktif biyoteknolojisinde nanoteknoloji tabanlı yenilikler dikkat çekmektedir. Gümüş, altın ve selenyum nanopartiküllerinin düşük dozlarda ekstenderlere eklenmesi, membran bütünlüğünün korunmasını ve oksidatif hasarın azaltılmasını sağlamaktadır (Esin et al., 2024). Ayrıca biyopolimer

bazlı mikroenkapsülasyon teknikleriyle spermanın uterusunda salınım süresinin uzatılması, gebelik oranlarını artıran umut verici bir strateji olarak değerlendirilmektedir. Genetik düzeyde ise spermatozoon RNA profilinin (özellikle miRNA ve piRNA dizilerinin) embriyo gelişimi ve gen regülasyonu üzerindeki etkileri giderek daha fazla araştırılmaktadır.

Sonuç olarak, köpeklerde erkek reproduktif biyoteknolojisi artık yalnızca sperma toplanması ve değerlendirilmesiyle sınırlı değildir. Moleküler biyoloji, nanoteknoloji ve biyofiziksel yaklaşımların entegre edildiği çok disiplinli bir alana dönüşmüştür. Gelişen bilgisayar destekli sperma analizi (CASA), antioksidan bazlı kriyoprezervasyon protokolleri ve endoskopik inseminasyon teknikleri sayesinde genetik materyalin korunması, dondurulmuş spermanın etkin kullanımı ve kontrollü damızlık yönetimi günümüzde bilimsel ve klinik açıdan mümkün hale gelmiştir. Bu ilerlemeler hem evcil köpek ırklarının korunması hem de translasyonel biyomedikal araştırmalarda türün model organizma olarak kullanımını daha da güçlendirmektedir.

Dişi Üreme Fizyolojisi ve Uygulamalı Reprodüktif Biyoteknolojiler

Köpeklerde dişi üreme fizyolojisi, reproduktif biyoteknolojilerinin başarı oranını belirleyen temel faktörlerden biridir. Türün özgün ovulasyon dinamikleri ve endokrin yapısı hem fertilizasyon süreçlerini hem de in vitro üretim yaklaşımlarını diğer memelilerden ayırmaktadır. Diğer evcil türlerle karşılaştırıldığında, dişi köpeklerde uzun anöstrus dönemi, oositlerin metafaz I evresinde ovüle olması, oosit olgunlaşmasının postovulatuvar dönemde ovidukta gerçekleşmesi ve gebeliğin tamamen luteal faza bağımlı olması, türün üreme biyolojisine özgü bir nitelik kazandırmaktadır (Nagashima & Songsasen, 2021). Bu fizyolojik özellikler, köpeklerde IVM, IVF ve embriyo kültürü çalışmalarının tarihsel

olarak sınırlı başarı göstermesine sebep olmaktadır. Ancak son on yılda hücre kültürü teknolojilerinde, moleküler reproduktif biyolojide ve mikroakışkan sistemlerde elde edilen ilerlemeler bu kısıtlamaların büyük ölçüde aşılmasını sağlamıştır (Liu et al., 2025).

Köpeklerde östrus döngüsü, yaklaşık 6–9 ay süren dört ardışık fazdan oluşur. Bunlar: proöstrus, östrus, diöstrus (metöstrus) ve anöstrustur. Proöstrus döneminde vulvada şişlik ve kanlı akıntı gözlenirken östrojen düzeyi hızla artar. Ancak LH henüz pik yapmamıştır. LH piki genellikle östrusun ortasında meydana gelir ve bunu izleyen 48–60 saat içinde ovulasyon gerçekleşir. Bu sırada progesteron düzeyi 2–6 ng/mL'ye yükselir ve oositler metafaz I evresinde ovüle olur (McDonald, 1969). Oositler metafaz II'ye geçişlerini ovulasyondan sonraki 2–3 gün içinde ovidukta tamamlar. Diöstrus dönemi yaklaşık 60 gün sürer ve yüksek progesteron sekresyonu ile karakterizedir. Anöstrus ise 3 ila 9 ay sürebilen üremenin inaktif olduğu dönemidir. Bu döngü uzunluğu ve oosit olgunlaşmasının postovulatuvar doğası, köpeklerde in vitro gamet manipülasyonlarını sınırlayan ana fizyolojik etkenlerdir. Endokrin düzeyde östrojen, progesteron, LH, FSH ve prolaktin arasındaki dinamik etkileşim, folikülogenez ve ovulasyonun zamanlamasını düzenlerken; prolaktin luteal fazın sürdürülmesinde ve yalancı gebelik (psödogestasyon) olgularında kritik rol oynamaktadır (Nagashima & Songsasen, 2021).

İn vitro maturasyon çalışmaları köpeklerde uzun süre sınırlı başarı oranlarıyla (%20–30) sonuçlanmıştır. Başarının düşük kalmasının başlıca nedeni, oviduktal mikroçevrenin laboratuvar ortamında tam olarak taklit edilememesidir. Kullanılan kültür ortamlarının bileşimi ve gaz koşulları maturasyon verimliliğini doğrudan etkiler. Köpek oositleri için TCM-199, DMEM veya Waymouth MB 752/1 gibi bazal ortamlar sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlara FSH, LH, estradiol-17 β , EGF ve fetal serum gibi katkılar eklenmektedir. Fizyolojik hipoksi koşullarında (%5 O₂) maturasyon

oranlarının anlamlı şekilde arttığı bildirilmiştir. Ayrıca, kumulus-ooforus komplekslerinin korunması, hiyaluronik asit üretimi ve antioksidan destek (ör. askorbik asit, melatonin, koenzim Q10) mitokondri fonksiyonunu koruyarak maturasyon oranlarını artırmaktadır (Songsasen & Wildt, 2007; Rodrigues et al., 2013; Rodrigues & Rodrigues 2018).

İlk IVF denemeleri 1990’larda yapılmış, ancak oosit olgunlaşmasının doğru zamanlanamaması nedeniyle başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Nagashima ve arkadaşlarının (2015) çalışması, köpeklerde ilk başarılı IVF doğumlarını raporlamıştır. Araştırmacılar, ovulasyondan 72 saat sonra toplanan oositleri spermayla 4 saat inkübe etmiş, oviduktal epitel hücreleriyle ko-kültür ederek pronükleus oluşumu ve embriyo gelişimini sağlamışlardır (Nagashima et al., 2015).

IVF sonrası embriyo kültürü genellikle *Synthetic Oviductal Fluid (SOF)* veya *Modified Tyrode’s Medium (mTALP)* ortamlarında, oviduktal epitel hücreleriyle ko-kültür edilerek yürütülür. 38,5°C sıcaklıkta, %5 O₂ ve %5 CO₂ içeren, yüksek nemli bir ortamda yapılan kültürlerde embriyolar genellikle 6–7 gün içinde blastosist aşamasına ulaşır. Embriyo gelişimi sırasında mitokondri aktivitesi, GDF9 ve BMP15 gen ekspresyonları embriyonik kalite göstergeleri olarak değerlendirilmektedir. Son yıllarda geliştirilen mikroakışkan sistemler, oviduktal sıvı akışını taklit ederek embriyo gelişim oranlarını anlamlı biçimde artırmıştır (Songsasen et al., 2023).

Köpek oositlerinin yüksek lipid içeriği, kriyotoleransı düşürmekte ve klasik yavaş dondurma yöntemleriyle yüksek canlılık oranı elde edilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle vitrifikasyon, yani ani camlaşma temelli dondurma yöntemi tercih edilmektedir. Etilen glikol (%15), DMSO (%15) ve trehaloz (0.5 M) içeren çözeltiler, “cryotop” yöntemiyle hızlı soğutulularak sıvı azotta depolanmaktadır. Çözüm sonrası oosit canlılığı genellikle %70

civarındadır ve zona pellucida bütünlüğü ile kromatin stabilitesi korunmuşsa, bu oositler fertilizasyon için kullanılabilir kabul edilmektedir (Liu et al., 2025). Oosit kalitesi, sitoplazmik homojenlik, kumulus hücre tabaka yapısı, mitokondri aktivitesi ve oksidatif stres düzeyi gibi morfolojik ve biyokimyasal parametrelerle değerlendirilir. Yüksek kaliteli oositlerde GDF9, BMP15 ve PRDX5 genlerinin ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (Songsasen et al., 2023). Bu parametreler, IVF öncesinde oosit seçimi ve embriyo gelişim tahmininde güvenilir biyogöstergeler olarak değerlendirilmektedir.

Köpeklerde dişi gamet biyoteknolojisi günümüzde iki temel uygulama alanına sahiptir. Birincisi, genetik açıdan değerli dişi bireylerden oosit toplanarak genetik materyalin kriyoprezervasyonu ve ırk koruma programlarında kullanılmasıdır. İkincisi ise hormonal dengesizlik veya oviduktal obstrüksiyon gibi nedenlerle infertil olan dişilerde fertilizasyon desteği sağlanmasıdır. Ayrıca köpek oositleri, insan reproduktif fizyolojisine yakın özellikleri nedeniyle translasyonel model olarak da kullanılmaktadır. Özellikle oosit yaşlanması, mitokondriyal DNA mutasyonları ve enerji metabolizması üzerine yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda köpek modeli giderek daha fazla önem kazanmaktadır (Suzuki et al., 2022; Liu et al., 2025).

Gelecekte köpeklerde dişi gamet biyoteknolojisinin mikroakışkan in vitro maturasyon sistemleri, hücre dışı veziküllerin (eksozomların) oosit-çevre etkileşimi üzerindeki etkileri, vitrifikasyon sonrası epigenetik stabilitenin korunması ve üç boyutlu biyomateryal tabanlı yapay over sistemlerinin geliştirilmesi yönünde ilerlemesi beklenmektedir. Bu yenilikler, önümüzdeki on yıl içinde köpeklerde oosit ve embriyo biyoteknolojisini insan reproduktif biyoteknolojilerinin düzeyine yaklaştıracabilecek potansiyele sahiptir.

Suni Tohumlama Teknikleri

Köpeklerde suni tohumlama teknikleri, reproduktif biyoteknolojinin en yaygın klinik uygulamaları arasında yer almaktadır. Hem doğal çiftleşmenin mümkün olmadığı durumlarda fertilizasyonu sağlamak hem de genetik materyalin güvenli taşınmasına olanak tanımak amacıyla kullanılmaktadır. Bu tekniklerin başarısı, spermanın fiziksel durumu (taze, soğutulmuş veya dondurulmuş), ST uygulama zamanı, ST yeri ve kullanılan yöntemin invazivlik düzeyi ile yakından ilişkilidir (McDonald, 1969). Köpeklerde ST, temel olarak vajinal, cerrahi ve endoskopik transservikal (TCI) yöntemler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Her yöntemin avantajları, sınırlılıkları ve etik değerlendirmeleri farklıdır.

Vajinal ST, en basit ve en az invaziv olan yöntemdir. Özellikle taze veya kısa süreli soğutulmuş sperma kullanıldığında oldukça yüksek gebelik oranları elde edilebilir. Prosedür, steril bir kateter yardımıyla spermanın vajinaya, genellikle servikal kanala yakın bölgeye bırakılması esasına dayanır. Uygulama sırasında dışının östrus döngüsünün doğru şekilde belirlenmesi, başarı için kritik öneme sahiptir. Ovulasyon zamanı genellikle serum progesteron düzeyleriyle izlenir. Progesteronun 4–6 ng/mL aralığı optimal fertilizasyon penceresini gösterir (McDonald, 1969). Bununla birlikte, vajinal sitoloji de östrus döneminin belirlenmesinde tamamlayıcı bir tanısal araç olarak kullanılmaktadır. Vajinal epitel hücrelerinin morfolojik değişimleri, hormonal döngüyle yakından ilişkilidir. Proöstrus döneminde, smearde parabazal ve küçük intermediol hücrelerin yanı sıra artan miktarda eritrositler görülür. Östrus döneminde, hücrelerin büyük bölümü yüzeysel ve keratinize (anükleer veya piknotik çekirdekli) hücrelerden oluşur. Bu, yüksek östrojen düzeylerinin etkisini yansıtır. Metöstrus veya diöstrus başlangıcında, yeniden parabazal ve lökosit içeren hücrelerin baskın hale gelmesi luteal fazın başladığını gösterir. Bu nedenle, vajinal sitoloji sonuçlarının

progesteron ölçümüyle birlikte değerlendirilmesi, optimal tohumlama zamanının belirlenmesinde yüksek doğruluk sağlar (Whitler, 2023). Vajinal suni tohumlamada gebelik oranları taze sperma kullanıldığında %80–90 civarındayken, dondurulmuş sperma kullanıldığında ise bu oran düşmektedir. Serviksin anatomik yapısı ve spermanın motilitesi, uterin geçişin etkinliğini doğrudan etkilemektedir.

Cerrahi suni tohumlama ise tarihsel olarak özellikle dondurulmuş sperma kullanımı için tercih edilmiştir. Bu yöntemde sperma, laparotomi yoluyla doğrudan kornu uteriye enjekte edilir. Ancak cerrahi işlem, genel anestezi gereksinimi, postoperatif ağrı, iyileşme süreci ve potansiyel komplikasyonlar nedeniyle günümüzde etik açıdan tartışmalı hale gelmiştir. Avrupa ve Türkiye'deki veteriner etik kurulları, hayvan refahı ilkeleri doğrultusunda bu yöntemin rutin kullanımını sınırlamış, yalnızca araştırma veya özel klinik endikasyonlar dışında uygulanmamasını önermiştir (Comizzoli & Wildt, 2012). Ayrıca cerrahi yaklaşımlar, yüksek gebelik oranlarına rağmen invazivliği nedeniyle günümüz minimal invaziv reproduktif biyoteknoloji anlayışıyla uyumsuz kabul edilmektedir.

Bu gelişmeler doğrultusunda, endoskopik TCI günümüzde köpeklerde en çok tercih edilen yöntem haline gelmiştir. TCI, rijit veya fleksibl endoskop yardımıyla servikal kanalın geçilmesi ve spermanın doğrudan uterin lümene bırakılması esasına dayanır. Bu yöntemde cerrahi kesi gerekmemekte, yalnızca hafif sedasyon altında işlem yapılabilir. TCI'nin en büyük avantajı, uterin depozisyonun doğrudan sağlanması sayesinde sperma kaybının en aza indirilmesi ve dondurulmuş sperma kullanıldığında bile yüksek gebelik oranlarının (%70–80) elde edilebilmesidir (Whitler, 2023). Ayrıca işlem sonrası hızlı iyileşme, minimal stres ve tekrarlanabilirlik, bu yöntemi hem klinik hem de araştırma uygulamaları için ideal hale getirmiştir.

Son yıllarda TCI teknolojisinde kullanılan görüntüleme sistemleri ve kateter tasarımlarındaki ilerlemeler, işlemin hem doğruluğunu hem de güvenliğini artırmıştır. Özellikle yüksek çözünürlüklü video-endoskoplar ve servikal kanalı tanımlayan dijital marker sistemleri, uterin lümen girişin objektif şekilde doğrulanmasına olanak sağlamaktadır (Whitler, 2023). Bununla birlikte, endoskopik suni tohumlamanın etkinliği büyük ölçüde uygulayıcının deneyimine, sperma kalitesine ve hormonal senkronizasyona bağlıdır.

Genel olarak değerlendirildiğinde, köpeklerde suni tohumlama teknikleri son yirmi yılda önemli gelişmeler göstermiştir. Cerrahi yaklaşımlardan uzaklaşarak, minimal invaziv ve etik açıdan kabul edilebilir yöntemlerin ön plana çıkması hem hayvan refahını artırmış hem de uluslararası standartlara uygun bir üreme yönetimi sağlamıştır. Bu bağlamda, TCI'nin rutin klinik uygulamalarda "altın standart" haline geldiği, vajinal suni tohumlamanın ise maliyet etkinliği ve basitliği nedeniyle özellikle taze sperma kullanımında halen değerli bir seçenek olarak yerini koruduğu söylenebilir.

Köpek Spermatozoasının Kriyobiyojisi

Suni tohumlama teknolojisinin ilk olarak uygulandığı tür köpek olmasına rağmen, erkek köpeklerin genetik potansiyelinden yararlanmak amacıyla spermanın korunması, saklanması ve dondurulması konusunda diğer evcil türlere kıyasla daha az ilerleme kaydedilmiştir. Ancak, köpek spermasının dondurularak saklanabilmesiyle farklı ırklara ait genetik materyalin ulusal ve uluslararası düzeyde taşınabilmesi, bu alana olan ilgiyi giderek artırmıştır (Srivastava et al., 2011). Kriyoprezervasyon uygulamaları sayesinde özellikle damızlık değeri yüksek bireylerden alınan spermanın uzun süreli saklanması ve farklı ülkelerdeki dişi köpeklerin tohumlanması mümkün hâle gelmiş; bu doğrultuda birçok ülkede köpek sperma bankaları oluşturulmuştur (Farstad, 1996).

Köpeklerde sperma kriyoprezervasyonuna yönelik çalışmaların kökeni 18. yüzyıla kadar uzanmaktadır. Abbe Lazaro Spallanzani (1776), sıcaklık düşüşünün spermatozoon metabolik aktivitesini geri dönüşümlü olarak azalttığını ilk gözlemleyen araştırmacı olmuştur. Aynı bilim insanı 1780 yılında köpeklerde ilk suni tohumlamayı gerçekleştirmiştir. Polge (1949), tarafından gliserolün kriyoprotektif etkisinin keşfi, kriyobiyoloji alanında devrim yaratmıştır. Seager (1969), köpeklerde dondurulmuş-çözdürülmüş sperma ile ilk gebeliği elde etmiş ve 1981'de American Kennel Club, dondurulmuş spermanın suni tohumlamada kullanımını resmî olarak onaylamıştır. Bu gelişmelerin ardından, kriyoprezervasyonun optimizasyonu ve spermatozoon canlılığının korunması üzerine yoğun çalışmalar yapılmıştır.

Spermanın dondurularak saklanması temelde dört aşamada gerçekleşmektedir: soğutma (sıcaklık düşürme), hücresel dehidrasyon, dondurma ve çözündürme (Medeiros et al., 2002). Bu aşamalar sırasında spermatozoonlar soğuk şoku, ozmotik stres, oksidatif stres ve kristalizasyon gibi birçok olumsuz faktöre maruz kalır (Yoon et al., 2015). Özellikle spermatozoonun plazma ve akrozomal membranları donma sürecinde hasar görerek yapısal bütünlüğünü kaybeder. Bu nedenle, spermanın korunmasında kriyoprotektanlar büyük önem taşır. Kriyoprotektanlar, spermayı donma sırasında oluşabilecek buz kristallerine ve ozmotik değişimlere karşı koruyarak hücre zarının bütünlüğünü sürdürmeyi amaçlar. Köpek spermasının dondurulmasında kullanılan sulandırıcılar, seminal plazmaya benzer ozmolarite ve pH değerine sahip olacak şekilde formüle edilir.

Köpek spermatozoasında kriyoprezervasyon sırasında en fazla etkilenen kısım çekirdek ve akrozom bölgesidir. Çekirdek, DNA bütünlüğünü koruyan protaminlerle stabilize edilir; köpek spermleri yalnızca Protamin 1 içerdiğinden, bazı çalışmalar bunun soğuk şokuna dayanıklılığı artırdığını, bazıları ise DNA fragmantasyonunu yükselttiğini bildirmiştir (Urbano et al., 2013).

Akrozomun yapısal bozulması ise oosit penetrasyon yeteneğini düşürür (Chlopik & Wysokinska, 2020). Ayrıca, flagellum bölgesindeki mitokondrilerin zarar görmesi ATP üretimini azaltarak motiliteyi düşürür (Lindemann & Lesich, 2016).

Günümüzde köpeklerde standart bir dondurma-çözündürme protokolü tam olarak geliştirilememiştir. Farklı bireylerden elde edilen ejakülatlarda görülen ozmotik duyarlılık farklılıkları, kriyoprezervasyon sonrası sperma canlılığını öngörülemez kılmaktadır (Eilts, 2005). Bu nedenle son yıllarda kriyoprezervasyon mediumlarına antioksidanlar, antifriz proteinleri, seminal plazma proteinleri, nanopartiküller, lipozomlar ve eksozomlar gibi yeni nesil koruyucular eklenerek spermatozoon bütünlüğünün korunması hedeflenmektedir (Saadeldin et al., 2020).

Sonuç olarak, köpek spermatozoasının kriyobiyolojisi, hem dondurma sürecinde oluşan hücresel değişikliklerin hem de bu değişiklikleri minimize eden biyokimyasal mekanizmaların anlaşılmasını kapsamaktadır. Bu alanda geliştirilecek etkin protokoller, yalnızca köpek üreme biyoteknolojisi açısından değil, aynı zamanda genetik çeşitliliğin korunması ve nesli tehlike altındaki türlerin sürdürülebilirliği açısından da büyük önem taşımaktadır.

Embriyo Teknolojileri ve Kriyobiyoloji

Köpeklerde embriyo biyoteknolojisi, in vivo embriyo elde edilmesinden başlayarak in vitro embriyo üretimi (IVP), embriyoların kültür ve kalite değerlendirmesi, kriyoprezervasyon stratejileri ile çözme/ısı geri kazanım ve son olarak embriyo transferi (ET) uygulamalarına kadar uzanan kompleks bir süreçtir.

İn vivo embriyo üretimi aşamasında, süperovulasyon ile uyarılmış dişilerde doğal çiftleştirme ya da suni tohumlama sonrası uterustan embriyoların toplanması amaçlanır. Ancak bu yöntemde, köpekte yanıt değişkenliği yüksek olmakta, ovulasyon sonrası 2-6

gün arasında yapılan flush işlemlerinden 2–8 hücre, morula ya da erken blastosist evreleri elde edilebilmektedir. Öte yandan in vitro üretim stratejileri, ovariektomi veya OPU (ovum pick-up) ile elde edilen oositlerin önce IVM'ye tabi tutulmasını gerektirir. Köpek oositleri çoğunlukla metafaz I evresinde ovüle olduğundan ve in vivo maturasyon süreci uzun olduğundan, IVM ortamlarının optimize edilmesi önemlidir. Bu bağlamda, düşük oksijen koşulları (%5 O₂), EGF, FSH/LH ve estradiol katkılı kültür ortamları kullanılmıştır. Nagashima ve arkadaşları, uygun spermatozoon kapasitasyon ortamı ve olgun oositlerin kullanımıyla %78,8 oranında embriyo gelişimi elde etmiş ve daha sonra bu embriyoların kriyoprezervasyonu sonrası nakliyle yedi sağlıklı yavru doğurtmuşlardır. Özellikle köpek embriyolarında oksijenin yüksek düzeyde olması reaktif oksijen türleri üretimini artırmakta, bu da gelişimsel başarıyı olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle; %5 O₂–%5 CO₂–%90 N₂ koşulları tercih edilmektedir. Ko-kültür sistemleri (örneğin oviduktal epitel hücreleri) erken bölünme ve genom aktivasyonunu destekleyen mikroçevre olarak büyük önem taşımaktadır (No et al., 2018).

Köpek embriyoları, yüksek sitoplazmik lipid içeriği nedeniyle kriyotoleransı düşük biyolojik materyaller arasında yer alır. Bu durum, özellikle buz kristali oluşumunun ve membran hasarının artmasına neden olur. Abe ve arkadaşları, köpek embriyolarında kriyoprezervasyonun zorluklarını, özellikle lipid içerikli yapının etkisini vurgulamışlardır (Meneghel et al., 2017). Bu nedenle günümüzde köpek embriyolarında vitrifikasyon yöntemi, klasik kontrollü-hız dondurmaya kıyasla daha çok tercih edilmektedir.

Vitrifikasyon protokollerinde, yüksek konsantrasyonlu geçirgen kriyoprotektan (örn. etilen glikol, DMSO) ve geçirgen olmayan şekerlerin (ör. Trehaloz, sukroz) kombinasyonları ile minimal hacim taşıyıcılarının (cryotop, cryoloop) kullanılması

önerilmektedir. Bu sayede buz kristali oluşumu pratiğe indirgenmekte, dondurma/çözme işlemleri sırasında hücre içi hasar azaltılmaktadır. Çözme aşamasında ise hızlı ısınma, adım-adım kriyoprotektanların uzaklaştırılması ve ardından kısa süreli toplama öncesi kültür uygulamaları önerilmektedir.

Transfer aşamasında, donör ve alıcı dişi arasında **lüteal yaş** uyumu oldukça kritik bir faktördür. Alıcının korpus luteum yaşı, donor embriyo evresinden 0–2 gün ileride olmamalıdır. Köpeklerde minimal invaziv endoskopik transservikal embriyo transferi teknikleri artan popülerliğe sahiptir ve refah yönünden cerrahi yöntemlere kıyasla avantaj sunmaktadır. Klinik uygulamada embriyo evresi, kalitesi ve alıcının uterin ortamı başarı oranlarını doğrudan etkilemektedir.

Özetle, köpeklerde embriyo teknolojileri ve kriyobiyolojisi alanında son yıllarda kayda değer ilerlemeler yaşanmış olmakla birlikte, tür-spesifik fizyolojik özellikler ve laboratuvar kaynaklı sınırlamalar nedeniyle optimize edilme gereksinimleri mevcuttur. Embriyo üretimi, kültür, dondurma ve transfer zincirinin her halkasında kalite kontrol stratejileri ve biyogüvenlik protokollerinin uygulanması ileriye dönük uygulamaların başarısı için kritik öneme sahiptir.

Gonadal Doku Kriyoprezervasyonu ve Folikül Kültürü

Gonadal doku kriyoprezervasyonu, köpeklerde reproduktif biyoteknolojinin en hızlı gelişen ve translasyonel değeri en yüksek alanlarından biridir. Bu yaklaşım, özellikle **prepubertal bireylerde, genetik olarak değerli dişilerde, kemoterapi veya gonadotoksik tedavi öncesi fertilitenin korunması gereken olgularda ve nesli tehdit altındaki köpekgillerde (Canidae spp.)** üreme kapasitesinin uzun vadede korunmasını amaçlamaktadır. Ovaryum ve testis dokularının dondurulup çözülme sonrasında fonksiyonel gamet

retme kapasitesinin korunması hem klinik hem de koruma biyolojisi açısından büyük önem taşıtmaktadır (Lodde et al., 2025).

Köpeklerde gonadal doku kriyoprezervasyonu, üç ana strateji üzerine kuruludur: (i) yavaş dondurma (slow freezing), (ii) vitrifikasyon, ve (iii) doku mikrokapslasyonu ile üç boyutlu kültür sistemleri. Yavaş dondurma, geçirgen kriyoprotektanların (r. etilen glikol, DMSO, propilen glikol) düşük konsantrasyonlarda ve kontrollü soğutma hıızıyla uygulanmasını içerirken, vitrifikasyon yüksek konsantrasyonlu çözeltelerde ultra hızlı soğutma yoluyla buz kristali oluşumunu önlemeyi hedefler (Comizzoli & Wildt, 2012). Köpek ovaryum dokusu, yüksek lipid içeriği ve kompleks damar yapısı nedeniyle dondurma sonrası hücre hasarına yatkındır. Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalar, uygun kriyoprotektan kombinasyonları ve dondurma hızlarının optimize edilmesiyle bu sorunun kısmen aşılabildiğini göstermektedir (Songsasen et al., 2023).

Songsasen ve arkadaşları (2023), yavaş dondurma yöntemiyle dondurulan köpek ovaryum korteks dokularında ortalama %85 oranında hücre sel canlılık saptamıştır. Ayrıca, primordial foliküllerin morfolojik bütünlüğünün büyük oranda korunduğunu bildirmiştir. Bu bulgular, köpeklerde ovaryum dokusu dondurmanın biyolojik olarak uygulanabilir olduğunu kanıtlamaktadır. Benzer şekilde, Comizzoli ve Wildt (2012) tarafından yapılan çalışmalar, köpek ve tilki türlerinde folikül yapısının kriyoprezervasyon sonrası canlılığını korunduğunu, ancak folliküler büyümenin in vitro koşullarda kısıtlı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle güncel araştırmalar, **folikül kültürü ve büyüme ortamlarının optimizasyonuna** odaklanmıştır.

Folikül kültür sistemleri, dondurulmuş dokudan izole edilen **preantral foliküllerin** laboratuvar ortamında olgunlaşmasını sağlamayı hedefler. Bu amaçla kullanılan kültür ortamları (r. α -

MEM, TCM-199) genellikle FSH, insülin-transferrin-selenium (ITS) kompleksi ve serum katkılarıyla zenginleştirilir (Lodde et al., 2025). Köpeklerde folikül çapının yavaş büyümesi ve bazal membranın kalın olması, in vitro ortamda difüzyon kısıtlamasına neden olur. Bu nedenle **üç boyutlu mikroenkapsülasyon sistemleri**, foliküllerin daha fizyolojik bir mikroçevrede büyümesini sağlamak amacıyla geliştirilmiştir (Desai, 2010).

In vitro folikül büyümesi sürecinde, granüloza hücrelerinden salgılanan östrojen ve inhibin düzeyleri, kültürün fizyolojik yeterliliğini değerlendirmek için önemli biyokimyasal göstergelerdir. Köpeklerde yapılan çalışmalar, 12–14 günlük kültür periyodunda antral boşluk oluşumu ve oositin çekirdek maturasyonunun sınırlı da olsa mümkün olduğunu göstermiştir (Lodde et al., 2025). Bununla birlikte, oositin metafaz II evresine ulaşması için genellikle ilave hormonal uyarı (FSH + LH) veya oosit-çevre etkileşimini artıran **3D-biyomateryal destekli yapay over modelleri** gerekmektedir (Brito et al., 2014).

Gonadal doku kriyoprezervasyonunun translasyonel önemi, yalnızca evcil köpeklerle sınırlı değildir. Nesli tehlike altındaki vahşi köpekgillerde (örneğin Afrika yaban köpeği *Lycaon pictus* ve gri kurt *Canis lupus*) ovaryum ve testis dokularının biyobankalarda saklanması, **ex situ genetik koruma** stratejilerinin temelini oluşturmaktadır. Hartzler ve arkadaşları (2023), Afrika yaban köpeği over dokularının vitrifikasyon sonrası morfolojik olarak yüksek oranda korunabildiğini ve potansiyel olarak IVM-IVF çalışmalarında kullanılabileceğini göstermiştir. Bu bulgular, gonadal doku kriyobiyolojisinin yalnızca bireysel fertilitateyi değil, aynı zamanda türlerin genetik çeşitliliğini koruma açısından da stratejik bir araç olduğunu göstermektedir.

Günümüzde yapılan moleküler düzeydeki analizler, kriyoprezervasyonun folikül hücrelerinde **apoptozis, oksidatif stres**

ve mitokondriyal disfonksiyon gibi mekanizmalar yoluyla kaliteyi etkilediğini ortaya koymuştur. Özellikle BAX/BCL-2 oranındaki değişim, TUNEL pozitifliği ve ROS seviyelerindeki artış, çözülme sonrası dokunun canlılık skorlarını belirlemektedir (Comizzoli & Wildt, 2012). Bu nedenle sulandırıcılara antioksidan ajanların (ör. melatonin, N-asetilsistein, resveratrol) eklenmesiyle bu hasarın azaltılması yönünde çalışmalar artmaktadır (Brito et al., 2014).

Sonuç olarak, köpeklerde gonadal doku kriyoprezervasyonu ve folikül kültürü, fertilite koruma ve genetik çeşitliliğin sürdürülmesi açısından geleceğe yönelik umut verici yaklaşımlardan biridir. Henüz klinik rutine girmemiş olsa da doku canlılığının korunması, folikül gelişiminin desteklenmesi ve oosit olgunlaşmasının laboratuvar koşullarında sağlanabilmesi yönünde kaydedilen ilerlemeler, hem veteriner reproduktif biyoteknoloji hem de translasyonel biyoteknoloji açısından önemlidir. Bu tekniklerin köpek modelinde optimize edilmesi, benzer stratejilerin insan ve diğer yaban türlerinde de güvenle uygulanabilmesinin önünü açacaktır.

Klonlama ve Genom Düzenleme

Köpeklerde klonlama ve genom düzenleme, modern veteriner biyoteknolojisinin en ileri aşamalarını temsil eden iki temel yaklaşımdır. Bu teknolojiler yalnızca üreme biyolojisinin sınırlarını genişletmekle kalmamış, aynı zamanda genetik hastalıkların modellenmesi, biyomedikal araştırmalar ve nadir ırkların korunması açısından da önemli uygulama alanları yaratmıştır. Somatik hücre çekirdek transferi (SCNT) yöntemiyle gerçekleştirilen ilk başarılı köpek klonlaması hem bilimsel hem de etik açıdan yeni bir dönemin başlangıcı olarak kabul edilir (Lee et al., 2005).

Köpeklerde klonlama çalışmaları, diğer evcil türlere kıyasla geç başarıya ulaşmıştır. Bunun en önemli nedeni, köpek oositlerinin metafaz II evresine geçişinin ovulasyondan 48–72 saat sonra

tamamlanması ve uygun alıcı oositlerin elde edilmesinin güçlüğüdür (Jang et al., 2008). Ayrıca, köpek oositlerinin yüksek lipid içeriği mikromanipülasyon sırasında stabiliteyi azaltmakta ve kriyoprezervasyon sonrası yapısal bozulmalara yol açmaktadır (Meneghel et al., 2017). Tüm bu zorluklara rağmen, 2005 yılında Seoul National University araştırma ekibi tarafından gerçekleştirilen deneysel çalışma, köpek klonlama alanında bir dönüm noktası olmuştur. Lee ve arkadaşları (2005), bir Afgan tazısından alınan somatik hücre çekirdeğini enükle edilmiş metafaz II oositine transfer ederek, ilk klon köpek olan “**Snuppy**”’nin doğumunu sağlamışlardır. Snuppy’nin genetik profili donör bireyle %99,9 oranında benzer bulunmuş, bu bulgu SCNT’nin köpekte teknik olarak uygulanabilir olduğunu kesin biçimde ortaya koymuştur.

Köpeklerde SCNT süreci, donör fibroblast hücresinin çekirdeğinin metafaz II evresindeki oosite aktarılması, çekirdek–sitoplazma füzyonu ve elektriksel ya da kimyasal aktivasyon yoluyla embriyonik gelişimin başlatılması aşamalarını içerir. Bununla birlikte, SCNT sonrası embriyonik gelişim oranlarının düşük kalmasının temel nedeni, **epigenetik yeniden programlamanın yetersizliğidir** (Wang et al., 2020). Somatik çekirdeklerin totipotent embriyonik profile dönüşebilmesi için DNA metilasyonunun ve histon modifikasyonlarının yeniden düzenlenmesi gerekir. Ancak köpek embriyolarında hipermetillenmiş promotör bölgeleri, gen ekspresyonunun yeniden düzenlenmesini sınırlar. Bu problemi aşmak amacıyla, histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi) ve DNA metiltransferaz inhibitörleri (DNMTi) kullanımı önem kazanmıştır. Trichostatin A (TSA) ve sodyum butirat gibi ajanlar, kromatin gevşemesini artırarak yeniden programlamayı kolaylaştırmakta ve blastosist gelişim oranlarını yükseltmektedir. Jeong ve arkadaşları (2021), TSA ile muamele edilen SCNT embriyolarında blastosist oranının %14’ten %34’e çıktığını bildirmiştir. Ancak, epigenetik

modifikasyonun dozu ve süresi kritik parametrelerdir; aşırı uyarım DNA bütünlüğünü ve genetik stabiliteyi bozabilir.

Klonlama teknolojisinin uygulama alanı yalnızca bilimsel modelleme ile sınırlı değildir. Günümüzde SCNT yöntemi, üstün genetik özelliklere sahip köpeklerin çoğaltılmasında, nesli tükenmekte olan türlerin korunmasında ve biyomedikal araştırmalarda genetik olarak modifiye edilmiş hayvan modellerinin üretilmesinde de kullanılmaktadır (Kim et al., 2022). Örneğin, Duchenne kas distrofi (DMD) veya diyabet gibi hastalıkların köpek modelleri, insan hastalıklarının fizyopatolojisini anlamak ve yeni tedavi stratejileri geliştirmek için büyük transkripsiyonel değeri taşımaktadır (Nghiem et al., 2019).

Klonlamayla paralel olarak gelişen genom düzenleme teknolojileri, köpek biyoteknolojisinde yeni bir dönemi başlatmıştır. İlk olarak ZFN ve TALEN sistemleriyle denenilen gen düzenleme, CRISPR/Cas9 teknolojisine kullanıma girmesiyle önemli ölçüde kolaylaşmıştır (Zhao et al., 2019). CRISPR/Cas9, rehber RNA'nın Cas9 endonükleazını hedef DNA bölgesine yönlendirmesi ve burada çift zincir kırığı oluşturmaya dayanır. Bu kesilmenin ardından hücre, kendi DNA tamir mekanizmalarını (NHEJ veya HDR) kullanarak gen bölgesini yeniden düzenler. Köpeklerde bu sistem, hem gen knockout (devre dışı bırakma) hem de gen ekleme çalışmalarında başarıyla uygulanmıştır. Zou ve arkadaşları (2015), **MSTN (myostatin)** genini CRISPR/Cas9 ile devre dışı bırakarak kas gelişimini artıran genetik olarak modifiye edilmiş köpekler üretmişlerdir. Bu bulgu, köpeklerde fonksiyonel gen düzenlemesinin mümkün olduğunu ilk kez göstermiştir. Daha sonra **DMD** geninin devre dışı bırakıldığı köpek modelleri oluşturulmuş ve bunlar, insan DMD patofizyolojisinin incelenmesinde benzersiz transkripsiyonel araçlar olarak kabul edilmiştir (Nghiem et al., 2019).

Bu teknolojik gelişmeler beraberinde önemli etik ve biyogüvenlik tartışmalarını da getirmiştir. Klonlama uygulamalarında düşük gebelik oranları, yüksek embriyo kayıpları, neonatal mortalite ve potansiyel epigenetik anomaliler, 3R (Replacement, Reduction, Refinement) ilkeleri doğrultusunda dikkatli değerlendirme gerektirmektedir (Comizzoli & Wildt, 2012). Aynı şekilde, genom düzenleme çalışmalarında da etik kurulların onayı ve biyogüvenlik sertifikasyonlarının sağlanması zorunludur. Avrupa Birliği ve Türkiye’deki mevcut düzenlemeler, genetik olarak modifiye edilmiş köpeklerin yalnızca bilimsel veya tıbbi amaçlarla üretilebileceğini açıkça belirtmektedir (Beattie, 2021).

Geleceğe bakıldığında, köpeklerde klonlama ve genom düzenleme teknolojilerinin entegrasyonu hem klinik reproduktif biyoteknoloji hem de translasyonel genetik araştırmalar açısından yeni fırsatlar sunacaktır. Özellikle **base editing** ve **prime editing** gibi gelişmiş CRISPR sistemlerinin kullanımı, hedef dışı mutasyon riskini azaltarak daha güvenli ve hassas gen düzenleme olanağı sağlamaktadır (Aliciaslan et al., 2025). Bu gelişmeler, köpeklerde kalıtsal hastalıklara dirençli hatların geliştirilmesini, genetik hastalıkların embriyonik düzeyde tedavisini ve genetik çeşitliliğin koruma altına alınmasını mümkün kılabilir. Bununla birlikte, etik çerçevenin titizlikle korunması, uzun dönemli etkilerin izlenmesi ve biyogüvenlik denetimlerinin sıkı biçimde yürütülmesi, bu teknolojilerin sorumlu ve sürdürülebilir şekilde uygulanabilmesi için önemli koşullardır.

Kaynakça

Aliciaslan, M., Erbasan, E., Erendor, F., & Sanlioglu, S. (2025). Prime editing: the next frontier in precision gene therapy. *The Journal of Gene Medicine*, 27(10), e70040.

Beattie, S., Hubert, A., Morrell, J., Awigena Cook, J., Werner, M., Ginty, P., ... & Tellner, P. (2021). Alliance for Regenerative Medicine (ARM), European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA), and European Association for Bioindustries (EuropaBio). Call for more effective regulation of clinical trials with advanced therapy medicinal products consisting of or containing genetically modified organisms in the European Union. *Hum Gene Ther*, 32, 997-1003.

Belala, R., Bourahmoune, D., & Mimoune, N. (2024). The use of computer assisted sperm analysis (CASA) in domestic animal reproduction: A review. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 30(6), 741-751.

Brito, I. R., Lima, I. M., Xu, M., Shea, L. D., Woodruff, T. K., & Figueiredo, J. R. (2014). Three-dimensional systems for in vitro follicular culture: overview of alginate-based matrices. *Reproduction, fertility and development*, 26(7), 915-930.

Comizzoli, P., & Wildt, D. E. (2012). On the horizon for fertility preservation in domestic and wild carnivores. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 261-265.

Desai, N., Alex, A., AbdelHafez, F., Calabro, A., Goldfarb, J., Fleischman, A., & Falcone, T. (2010). Three-dimensional in vitro follicle growth: overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 119.

Eilts, B. E. (2005). Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology*, 64(3), 692–697.

Esin, B., Akar, M., Tanrikulu, M., Kaya, C., & Çevik, M. (2022). The Effects of Fast and Slow Thawing on Spermatological Parameters and Detect of Chromatin Condensation by Toluidine Blue Staining in Frozen-Thawed Bull Sperm. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 28(3).

Esin, B., Kaya, C., Akar, M., & Çevik, M. (2024). Investigation of the protective effects of different forms of selenium in freezing dog semen: Comparison of nanoparticle selenium and sodium selenite. *Reproduction in Domestic Animals*, 59(6), e14652.

Farstad, W. (1996). Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*. 42(1-4), 251-260.

Hartzler, K. E., McCartney, C., Songsasen, N., & Nagashima, J. B. (2023). Cryopreservation of African painted dog (*Lycaon pictus*) ovarian tissue. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1134726.

Hermansson, U., Johannisson, A., & Axné, E. (2021). Cryopreservation of dog semen in a Tris extender with two different 1% soybean preparations compared with a Tris egg yolk extender. *Veterinary medicine and science*, 7(3), 812-819.

Jang, G., Oh, H. J., Kim, M. K., Fibrianto, Y. H., Hossein, M. S., Kim, H. J., ... & Lee, B. C. (2008). Improvement of canine somatic cell nuclear transfer procedure. *Theriogenology*, 69(2), 146-154.

Jeong, P. S., Yang, H. J., Park, S. H., Gwon, M. A., Joo, Y. E., Kim, M. J., ... & Sim, B. W. (2021). Combined chaetocin/trichostatin A treatment improves the epigenetic modification and developmental competence of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 709574.

Kim, D. E., Lee, J. H., Ji, K. B., Park, K. S., Kil, T. Y., Koo, O., & Kim, M. K. (2022). Generation of genome-edited dogs by somatic cell nuclear transfer. *BMC biotechnology*, 22(1), 19.

Lee, B. C., Kim, M. K., Jang, G., Oh, H. J., Yuda, F., Kim, H. J., ... & Hwang, W. S. (2005). Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 436(7051), 641-641.

Lindemann, C. B., & Lesich, K. A. (2016). Functional anatomy of the mammalian sperm flagellum. *Cytoskeleton*, 73(11), 652-669.

Liu, M., Cui, J., Chang, H. M., Liu, J., & Leung, P. C. (2025). Advances in human oocyte in vitro maturation: current status and future perspectives: a narrative review. *Reproduction and Fertility*, 6(4).

Lodde, V., Monferini, N., Plevridi, M., Dey, P., Donadini, L., Franchi, F. F., ... & Luciano, A. M. (2025). Approaches to in vitro oocyte growth in domestic farm mammals: how and why?. *Animal Reproduction*, 22(3), e20250090.

McDonald, L. E. (1969). Veterinary endocrinology and reproduction.

Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., & Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*. 57(1), 327-344.

Meneghel, M., Dall'Acqua, P. C., Ambroggi, M., Leão, B., Rocha-Frigoni, N. A., & Mingoti, G. Z. (2017). Lipid content and cryotolerance of in vitro-produced bovine embryos treated with forskolin before vitrification. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37, 395-400.

Nagashima, J. B., & Songsasen, N. (2021). Canid reproductive biology: norm and unique aspects in strategies and mechanisms. *Animals*, 11(3), 653.

Nagashima, J. B., Sylvester, S. R., Nelson, J. L., Cheong, S. H., Mukai, C., Lambo, C., ... & Travis, A. J. (2015). Live births from

domestic dog (*Canis familiaris*) embryos produced by in vitro fertilization. *PLoS One*, 10(12), e0143930.

Nghiem, P. P., & Kornegay, J. N. (2019). Gene therapies in canine models for Duchenne muscular dystrophy. *Human Genetics*, 138(5), 483-489.

No, J., Zhao, M., Lee, S., Ock, S. A., Nam, Y., & Hur, T. Y. (2018). Enhanced in vitro maturation of canine oocytes by oviduct epithelial cell co-culture. *Theriogenology*, 105, 66-74.

Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172), 666-666.

Rodrigues, B. A., & Rodrigues, J. L. (2018). In vitro maturation of canine oocytes: a unique conundrum. *Animal Reproduction (AR)*, 7(1), 3-15.

Rodrigues, B. A., Rodrigues, C. A., Salviano, M. B., Willhelm, B. R., Collares, F. J. F., & Rodrigues, J. L. (2013). Similar patterns of embryo development in canine oocytes cultured in vitro at oxygen tensions of 5 and 20%. *Theriogenology*, 79(8), 1224-1228.

Saadeldin, I. M., Khalil, W. A., Alharbi, M. G., & Lee, S. H. (2020). The Current Trends in Using Nanoparticles, Liposomes, and Exosomes for Semen Cryopreservation. *Animals*, 10(12), 2281.

Seager, S. W. J. (1969). Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest*, 17,6-10.

Songsasen, N. (2021). Current and future perspectives of reproductive technologies in domestic and wild canids. *Clinical Theriogenology*, 13(3), 138-145.

Songsasen, N., & Wildt, D. E. (2007). Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Animal reproduction science*, 98(1-2), 2-22.

Songsasen, N., Ferraz, M., & Nagashima, J. (2023). Applications of Dynamic Microfluidic Platforms in Reproductive Studies and Fertility Preservation. *Emerging Technologies In Biophysical Sciences: A World Scientific Reference: Volume 2: Emerging Technologies for Fertility*, 17-39.

Srivastava, A. K., Kumar, S., & Mathur, A. K. (2011). Cryo-damage of canine semen and its minimization: present scenario. *Indian Journal of Canine Practice Volume*, 3(2), 90-98.

Suzuki, H., Watanabe, H., & Abe, Y. (2022). Assisted reproductive techniques for canines: preservation of genetic material in domestic dogs. *Journal of Reproduction and Development*, 68(1), 1-11.

Urbano, M., Dorado, J., Ortiz, I., Morrell, J. M., Demyda-Peyras, S., Galvez, M. J., ... & Hidalgo, M. (2013). Effect of cryopreservation and single layer centrifugation on canine sperm DNA fragmentation assessed by the sperm chromatin dispersion test. *Animal reproduction science*. 143(1-4), 118-125.

Wang, X., Qu, J., Li, J., He, H., Liu, Z., & Huan, Y. (2020). Epigenetic reprogramming during somatic cell nuclear transfer: recent progress and future directions. *Frontiers in Genetics*, 11, 205.

Whitler, W. (2023). Canine transcervical insemination: history and technique. *Clinical Theriogenology*, 15.

Yoon, S. J., Kwon, W. S., Rahman, M. S., Lee, J. S., & Pang, M. G. (2015). A novel approach to identifying physical markers of cryo-damage in bull spermatozoa. *PLoS One*. 10(5), 1-12.

Zhao, J., Lai, L., Ji, W., & Zhou, Q. (2019). Genome editing in large animals: current status and future prospects. *National Science Review*, 6(3), 402-420.

Zou, Q., Wang, X., Liu, Y., Ouyang, Z., Long, H., Wei, S., ... & Gao, X. (2015). Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system. *Journal of molecular cell biology*, 7(6), 580-583.

BALIKLARDA REPRODÜKTİF BİYOTEKNOLOJİLER

MERVE DENİZ TANRIKULU¹

Giriş

Reprodüktif biyoteknolojiler, balıkların üreme süreçlerini kontrol ederek üretim verimliliğini ve genetik potansiyelini artırmayı hedefleyen yöntemler bütünüdür. Günümüzde balıkçılık ve akuakültür sektörü, dünya gıda arzında giderek artan bir öneme sahiptir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 2024 yılı verilerine göre, dünya su ürünleri üretimi ilk kez avcılık üretimini aşarak toplam 223,2 milyon tona ulaşmıştır; bunun 185,4 milyon tonunu sucul hayvanlar, 37,8 milyon tonunu ise algler oluşturmaktadır. Dünya su ürünleri üretiminde en çok yetiştirilen türler arasında sazan (*Cyprinus carpio*), tilapia (*Oreochromis niloticus*), somon (*Salmo salar*) ve karides (*Penaeus* türleri) yer alırken, istiridye (*Crassostrea* türleri) ve midye (*Mytilus* türleri) de önemli bir paya sahiptir. Küresel üretimin yaklaşık %75'i Asya ülkeleri tarafından gerçekleştirilmektedir (FAO, 2024).

¹Dr., Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Orcid:0000-0002-7822-2100

Balıklarda reprodüktif biyoteknoloji uygulamalarının temelleri 20. yüzyılın ortalarında atılmış, özellikle 1970'lerden itibaren hormon uygulamaları ve yapay dölleme tekniklerindeki gelişmelerle önemli ivme kazanmıştır. Başlangıçta ekonomik açıdan değer taşıyan türlere (örneğin *Salmo salar*, *Cyprinus carpio*) odaklanan bu uygulamalar, günümüzde çok daha geniş bir tür yelpazesinde embriyo manipülasyonu, kromozom seti müdahaleleri, germ hücre nakli, kriyoprezervasyon ve cinsiyet kontrolü gibi ileri teknolojileri kapsamaktadır (Zohar, 2020).

Reprodüktif biyoteknolojiler, balıkların hastalıklara direnç, büyüme performansı ve besin içeriği gibi özelliklerinin genetik olarak iyileştirilmesine olanak sağlamış; dişi ve erkek bireyler arasındaki büyüme hızı ve vücut ölçülerindeki farklar (seksüel dimorfizm) ekonomik açıdan yönlendirilebilir hâle gelmiştir. Hormon uygulamaları, kromozom manipülasyonları ve genetik seçim gibi biyoteknolojik yöntemler, üretim verimliliğini artırırken genetik çeşitliliğin korunmasını ve sürdürülebilir yetiştiriciliği desteklemektedir (Lakra & ark., 2022; Ganesan & Maulali, 2025).

Bu bölümde, balıklarda reprodüktif biyoteknolojinin temel bileşenleri geniş bir çerçevede ele alınacaktır. Öncelikle erkek balıklarda reprodüktif biyoloji ve fertilitiyi belirleyen faktörler açıklanacak; ardından sperma toplama yöntemleri, sperm motilitesinin aktivasyonu, in vitro fertilizasyon, sperm ve germ hücresi kriyoprezervasyonu, embriyo ve oosit/blastomer kriyoprezervasyonu gibi modern biyoteknolojik yaklaşımlar detaylandırılacaktır. Ayrıca germ hücre nakli, cinsiyet belirleme, cinsiyet farklılaşması, cinsiyet dönüştürme uygulamaları ve balık yetiştiriciliğinde hormon kullanımı gibi üretim odaklı teknolojiler de kapsamlı şekilde değerlendirilecektir. Bu uygulamalar, yalnızca üretim verimliliğinin artırılmasına değil; aynı zamanda genetik çeşitliliğin sürdürülebilir biçimde korunmasına ve yüksek kalite standartlarının sağlanmasına katkı sunmaktadır.

Erkek Balıklarda Reprodüktif Biyoloji

Balıklarda erkek üreme sistemi genel hatlarıyla çift testis, testiküler kanal ve sperm kanalından oluşur; ancak bu yapı türler arasında belirgin morfolojik farklılıklar gösterir (Dzyuba & ark., 2019). Testisler, spermatogonyumların seminifer bölgede dağılım şekline göre tübüler ve lobüler olmak üzere iki temel tipe ayrılır. Tübüler tipte spermatogonyumlar mitoz ve mayoz bölünmelerle kistler oluşturur ve olgunlaştıkça testis merkezine göç eder. Lobüler tipte ise olgunlaşan spermatozoa doğrudan lobül lümenine geçer (Parenti & Grier, 2004). Bazı denizel teleostlarda görülen filiform testisler, testisin vücut boşluğu boyunca uzanmasına olanak tanıyarak sperm toplanmasını kolaylaştırır (Uribe & ark., 2014; Beirão & ark., 2019). Ayrıca bazı türlerde bu iki tip arasında “ara tip” testis yapıları da tanımlanmıştır (Schulz & ark., 2010).

Testiküler doku yalnızca germ hücrelerini değil, Sertoli ve Leydig hücrelerini, bağ dokusunu, damar ve sinir yapılarını da içerir. Testislerden çıkan testiküler kanallar sperm kanallarıyla devamlılık gösterir ve spermatozoanın beslenmesi, depolanması ile seminal plazma bileşiminin oluşumunda rol oynar (Uribe & ark., 2014). Balıklarda spermatozoa tam anlamıyla fertilizasyon yeteneği kazanmaz; motilite ve dölleme kapasitesi, sperm kanalında gerçekleşen maturasyon süreci sonucunda elde edilir (Miura & ark., 1992).

Balıklarda spermatogenez, germ hücrelerinin farklılaşarak olgun spermatozoaya dönüşmesini sağlayan; hormonlar, büyüme faktörleri ve genlerin koordineli etkileşimiyle düzenlenen karmaşık bir süreçtir (Bhat & ark., 2021). Bu süreç memelilere kıyasla daha kısa sürede tamamlanır ve çevresel faktörlerden doğrudan etkilenir (Nóbrega & ark., 2009). Spermatogenez, seminifer tübüllerdeki spermatokistlerde gerçekleşir ve her bir spermatokist, eş zamanlı olarak gelişen germ hücrelerini içerir. Sertoli hücreleri genellikle tek

bir germ hücre klonuyla temas halindedir, bu da gelişim sürecinin senkronize ilerlemesini sağlar. Teleost balıklarında spermatozoalar genellikle akrozom içermez ve yumurtaya mikropil adı verilen açıklıktan girer (Schulz & ark., 2010; Pecio, 2019).

Spermatogenez süreci hipotalamus-hipofiz-gonad (HPG) eksenini tarafından kontrol edilir. Hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipofizden FSH ve LH salınımını uyarır. FSH spermatogonial proliferasyonun erken evrelerinde, LH ise spermiogenez ve sperm olgunlaşmasının son aşamalarında etkilidir. Testiste üretilen 11-ketotestosteron (11-KT) ve progestin türevi $17\alpha,20\beta$ -dihidroksi-4-pregnen-3-on (DHP), sperm maturasyonu ve motilitenin kazanılmasında anahtar rol oynar (Schulz & Miura, 2002; Schulz & ark., 2010).

Spermatogonial kök hücrelerin (SSC) yenilenmesi, östrojen (estradiol- 17β ; E2) tarafından kontrol edilir. E2, Sertoli hücrelerinden salgılanan parakrin faktörler aracılığıyla SSC'lerin yenilenme bölünmelerini uyarır (Miura & Miura, 2003). Buna karşılık, 11-KT mitotik aktiviteyi artırarak spermatogonial hücreleri mayotik farklılaşmaya yönlendirir. Sertoli hücrelerinden salgılanan activin B, germ hücre proliferasyonunu desteklerken, bazı inhibitör faktörler aşırı çoğalmayı önler. Spermatogenez ilerledikçe, tip B spermatogonyumlar mayotik profaza girer; bu aşamada DHP'nin etkisiyle DNA replikasyonu ve mayoz belirteçleri (Spo11, Dmcl) aktive olur. Germ hücreler böylece spermatosit evresine geçerek spermatidlerin oluşumuna zemin hazırlar (Schulz & ark., 2010). Spermiogenez süreci, çekirdek yoğunlaşması, flagellum oluşumu ve motilite kazanımı gibi morfolojik ve fizyolojik değişikliklerle karakterizedir. Teleostlarda spermatozoalar testiste hareketsizdir; sperm kanallarından geçerken DHP ve 11-KT etkisiyle olgunlaşarak motil hale gelirler (Ozaki & ark., 2006). Bu süreçte seminal plazma pH'nın yükselmesi ve hücre içi cAMP düzeyinin artışı belirleyici rol oynar. Bazı türlerde membrana bağlı progestin reseptörleri

(mPR α), sperm hiper-motilitesini doğrudan uyarabilir (Miura & Miura, 2003). Anti-Müllerian hormon (AMH) ise spermatogenez başlamadan önce baskılayıcı etkiye sahiptir; bu nedenle spermatogenezin aktif hale geçebilmesi için AMH düzeylerinin düşmesi gerekir (Schulz & ark., 2010). Ayrıca germ hücre gelişiminde vasa, dnd, dmrt1, ar ve er gibi genlerin koordineli ekspresyonu kritik öneme sahiptir (Bhat & ark., 2021).

Spermatogenez süreçleri, su sıcaklığı, fotoperiyot, oksijen seviyesi ve beslenme gibi çevresel faktörlerden büyük ölçüde etkilenir. Bu faktörler hormon salınımını, gonad gelişimini ve gamet kalitesini belirler. Örneğin, su sıcaklığı ve fotoperiyot, üreme döngüsünün başlangıcını tetiklerken; beslenme kalitesi germ hücre proliferasyonu ve sperm motilitesi üzerinde doğrudan etkilidir. Çevresel stres faktörleri, yüksek amonyak veya düşük oksijen gibi durumlar sperm ve yumurta kalitesini olumsuz etkiler (Alavi & ark., 2021). Bu fizyolojik süreçlerin anlaşılması, sperma sağımı, depolama ve yapay dölleme uygulamalarının başarı oranını doğrudan etkileyen temel bir altyapı sağlar.

Erkek Balıklarda Fertiliteyi Etkileyen Faktörler

Erkek balıklarda fertilite, spermanın biyolojik kalitesi ve üreme performansını belirleyen çeşitli parametrelerle doğrudan ilişkilidir. Bunlar arasında sperm üretim kapasitesi, morfolojik bütünlük, genom bütünlüğü ve motilite kinetiği öne çıkar ve her biri dölleme başarısı üzerinde belirleyici etkiye sahiptir. Sperm üretimi, testis fonksiyonları, hormonal profil ve çevresel koşullar tarafından şekillenir. Semen hacmi, sperm yoğunluğu ve sperma/ovosit oranı fertilizasyon verimliliği ile pozitif korelasyon gösterir; bu nedenle sperm üretim kapasitesi, erkek fertilitésinin temel göstergelerinden biridir (Koumpiadis & ark., 2021; Dougherty & ark., 2022).

Sperm morfolojisi, özellikle baş boyutu ve kuyruk uzunluğu, oosit mikropil yapısı ile tür-spesifik bir uyum sergiler. Küçük baş

genellikle daha yüksek hareketlilikle ilişkilidir; kuyruk uzunluğu ise spermatozoa hızını ve hareket paternini etkileyerek fertilizasyon potansiyelini belirler. Morfolojik anormallikler, penetrasyon kabiliyetini ve sperm verimliliğini azaltabilir (Kvarnemo & ark., 2023).

Genetik bütünlük, sağlıklı embriyo oluşumu ve gelişimi açısından kritik öneme sahiptir. DNA hasarı, kromozom eksikliği veya poliploidi fertilitiyi olumsuz etkiler. Bu nedenle sperm DNA'sının bütünlüğü TUNEL, Comet veya kromatin yapı testleri ile değerlendirilir; balık spermindeki parçalanmış kromatin yüzdesini ölçmek için Comet testi en yaygın yöntemdir (Shaliutina & ark., 2013; Cabrita & ark., 2014).

Sperm motilitesi fertilitenin en güvenilir göstergelerindendir. Hem motil sperm yüzdesi hem de hareket süresi, spermatozoaların oosite ulaşma kapasitesini belirler. Motilite performansı, hücresel ATP içeriği ve iyonik sinyal mekanizmalarıyla ilişkilidir ve çevresel faktörlerden, özellikle su sıcaklığından güçlü biçimde etkilenir (Alavi & ark., 2008). Sıcaklık artışı, özellikle soğuk su türlerinde motilite ve doğrusal ilerlemeyi olumsuz etkilerken; ılıman ve tropikal türlerde sperm geniş bir sıcaklık aralığında motil kalabilir. Motilite kinetiği, ATP üretimi ve enerji metabolizmasını düzenleyen adenilat kinaz, pirüvat kinaz ve malat dehidrogenaz gibi enzimlerle doğrudan ilişkilidir; sıcaklık değişimleri bu enzimlerin işlevini etkileyerek spermatozoa enerji kaynaklarını sınırlayabilir.

Spermatozoa hız parametreleri (VCL, VSL, VAP) ve doğrusal hareket oranı, spermanın oosite etkin ulaşımı açısından önemlidir; çevresel değişiklikler bu parametreleri tür-spesifik olarak etkileyebilir. Ayrıca yüksek metabolik aktivite sırasında oluşan reaktif oksijen türleri (ROS), spermatozoaya zarar verebilir; SOD, CAT ve POX gibi antioksidan enzimler bu stresi azaltarak motilite

ve DNA bütünlüğünü korur (Gallego & Asturiano, 2019; Cheng & ark., 2024).

Sonuç olarak sperm üretimi, morfolojisi, genom bütünlüğü ve motilite kinetiği, erkek balıklarda fertilitenin temel belirleyicileridir. Bu parametrelerin ayrıntılı analizi, doğal üreme başarısının anlaşılmasına ve yapay dölleme ile kriyoprezervasyon gibi reprodüktif biyoteknolojik uygulamaların etkinliğinin artırılmasına kritik katkı sağlar.

Balıklarda Sperma Toplama Yöntemleri

Balıklarda sperma toplama, yapay dölleme ile genetik ve üreme biyoteknolojileri çalışmalarında kritik bir adımdır. Bu nedenle spermanın güvenli, tekrarlanabilir ve yüksek kalite ile elde edilmesi için uygun yöntemlerin bilinmesi gerekir. Sperma toplama yöntemi, balığın türüne, testis morfolojisine, yaşına, olgunluk durumuna, üreme stratejisine ve çalışma amacına bağlı olarak değişir. Örneğin alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) ve sazan (*Cyprinus carpio*) gibi tatlı su türlerinde stripping yayginken, levrek ve çipura gibi deniz balıklarında hormon uyarımı ve kateterizasyon daha sık uygulanmaktadır (Beirão & ark., 2019).

En yaygın yöntemlerden biri, olgun erkek balığın karın bölgesine uygulanan kontrollü baskı ile sperm ve seminal plazmanın dışarı alınmasını sağlayan stripping yöntemidir (Beirão & ark., 2019). Filiform testis yapısına sahip türlerde semen genellikle ürogenital açıklığın hemen dışına yerleştirilen bir enjektörle doğrudan toplanabilir. Bu yöntem gilthead seabream (*Sparus aurata*) ve tambaqui (*Colossoma macropomum*) gibi türlerde başarıyla uygulanmıştır (Zilli & ark., 2011). Kateter veya kanül kullanımı, idrar, dışkı veya su ile kontaminasyon riskini azaltarak sperm kalitesini artırabilir. Kateter ürogenital açıklıktan yerleştirilir ve bağlı olduğu tüp ya da enjektörle sperm doğrudan sperm kanalı veya testisten alınır (Sarosiek & ark., 2016). Ürogenital açıklığın yapısı

bu işlemi zorlaştırdığında veya sperm kanalında tıkanma riski varsa modifiye teknikler kullanılabilir. Örneğin benekli kurt balığı (*Anarhichas minor*) türünde, abdominal masaj sonrası erkek papillaya bağlanan bir Pasteur pipeti ile sperm toplanmıştır (Beirão & Ottosen, 2018). Çok küçük miktarda sperm veren türlerde, örneğin zebra balığı (*Danio rerio*), cam mikropipiller, enjektör veya mikropipet uçları kullanılabilir; bu durumda idrar kontaminasyonu riski yüksek olduğundan örneklerin dikkatle kontrol edilmesi gerekir (Diogo & ark., 2018).

Bazı türlerde, örneğin Avrupa yılan balığı (*Anguilla anguilla*), idrar kontaminasyonunu önlemek zordur. Bu gibi durumlarda spermanın doğrudan immobilizasyon solüsyonu içerisine aspire edilmesini sağlayan özel toplama sistemleri geliştirilmiştir (Asturiano, 2008). Avrupa levreği (*Dicentrarchus labrax*) türünde sperma toplandıktan hemen sonra non-aktivasyon ortamı (NAM) kullanılarak kontaminasyon riski azaltılmakta ve hücre canlılığı daha uzun süre korunabilmektedir (Fauvel & ark., 2012). Toplama sırasında spermatozoaların su ile temas etmemesi gerekir, çünkü su ile temas eden sperm hızla aktive olarak fertilizasyon kapasitesini kaybeder. Stripping yöntemi, balığın canlılığını koruyarak tekrarlı sperm toplama imkânı sağlar ve özellikle küçük ve orta boy tatlı su türlerinde yüksek başarı sunar.

Araştırma amaçlı olarak, karın masajının uygun olmadığı veya küçük boyutlu türlerde, özellikle zebra balığı (*Danio rerio*), testis diseksiyonu sıklıkla uygulanır. Bu yöntemde balık ötanazi edildikten sonra testisler çıkarılır ve steril ortamda sperm elde edilir. Testis diseksiyonu, yüksek sperm yoğunluğu ve düşük kontaminasyon sağlar; ancak balığın tekrar kullanılamaması ve etik sınırlamalar nedeniyle uygulama alanı sınırlıdır (Viveiros & Komen, 2008; Sun & ark., 2010; Diogo & ark., 2019).

Büyük ve değerli türlerde kateterizasyon yöntemi tercih edilir. Anestezi altında ürogenital açıklığa ince bir kanül yerleştirilerek sperm elde edilir. Bu yöntem düşük kontaminasyon ve tekrarlanabilirlik açısından avantajlıdır, ancak deneyim ve teknik bilgi gerektirir. Kateterizasyon özellikle levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) gibi deniz balıklarında yaygındır (Malinovskiy & ark., 2021).

Bazı durumlarda hormon uyarımı ile spermatogenez ve sperm salınımı hızlandırılabilir. Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) analogları veya insan koryonik gonadotropini (hCG) enjeksiyonları, düşük sperm üretimi gösteren türlerde veya belirli zamanlarda sperm elde edilmesi gereken durumlarda kullanılır. Hormon uyarımı, stripping veya kateterizasyon ile kombinasyon halinde uygulandığında sperm kalitesini artırabilir (Mylonas & ark., 2010; Beirão & ark., 2019).

Sperma toplandıktan sonra yapay dölleme ve genetik materyal depolama çalışmalarında muhafaza önem kazanır. Kısa süreli kullanım için soğuk zincir yeterliyken, uzun süreli depolama için kriyoprezervasyon en etkili yöntemdir. Uygun koruyucu çözeltiler ve kontrollü dondurma protokolleri kullanıldığında spermatozoa canlılığı, motilitesi ve fertilizasyon kapasitesi korunabilir. Doğru toplama ve muhafaza protokolleri, yüksek kaliteli sperm elde edilmesini sağlayarak yapay dölleme, kriyoprezervasyon ve genetik çalışmaların başarısını artırır.

Sperm Motilitesinin Aktivasyonu ve Osmoregülasyon

Hem tatlı su hem de deniz balıklarının spermatozoası, testis içinde, seminal sıvıda ve seminal sıvıya benzer ozmolaliteye sahip çözeltilerde genellikle hareketsiz (quiescent) durumdadır (Dadras & ark., 2017). Spermatozoalar, sperm kanallarından geçerken maturasyon sürecinden geçer ve bu süreç sonunda dış ortamla temasa geçtiğinde motilite kazanabilecek fizyolojik kapasiteye ulaşır

(Miura & ark., 1992). Hareketliliğin başlaması, ortamın ozmolalitesi, iyonik bileşimi ve pH gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlıdır ve bu özellikler türlerin doğal yaşam ortamına uyumuna göre belirlenmiştir (Alix & ark., 2020).

Motiliteyi başlatan mekanizmalar türler arasında farklılık gösterir. Tatlı su balıklarının spermatozoası genellikle hipotonik ortamda aktive olurken, deniz balıklarında hipertonic koşullar motiliteyi başlatır (Morisawa & Suzuki, 1980; Oda & Morisawa, 1993). Tatlı su türlerinde dış ortamın düşük ozmolalitesi, hücre içine su girişi ve potasyum (K^+) iyon derişimindeki değışikliklerle membran potansiyelinin bozulmasına yol açarak motilitenin başlamasını sağlar (Cosson, 2004). Deniz balıklarında ise yüksek ozmolalite nedeniyle hücre dışına su çıkışı ve sodyum (Na^+) ile kalsiyum (Ca^{2+}) iyonlarının hücre içine geçişi flagellar hareketin başlatılmasında kritik rol oynar (Alavi & Cosson, 2006).

Euryhalin türlerde, örneğin tilapia, spermatozoalar hem izotonik hem de hipertonic koşullarda aktive olabilir; ancak tuz konsantrasyonu ve Ca^{2+} varlığı aktivasyonu etkiler. Bu türlerde spermatozoalar çevresel ozmotik değışikliklere yüksek adaptasyon gösterir; membran iyon kanalları ve osmoregülatuar proteinlerin esnek kontrolü sayesinde optimal motilite sağlanır. Özellikle Na^+/K^+ -ATPaz ve aquaporinlerin ekspresyon farklılıkları, tatlı ve tuzlu ortamlarda motilite yanıtının sürdürülmesine katkı sağlar (Morita & ark., 2003; Herrera & ark., 2021).

Aktivasyon ortamının pH değeri motiliteyi doğrudan etkiler; alkalileşme flagellar aktiviteyi artırırken, düşük pH sperm hareketini baskılar (Alavi & Cosson, 2006). Bazı türlerde ovaryen sıvı, sperm motilitesinin süresini ve yönelimini düzenleyen doğal bir aktivasyon faktörü olarak görev yapar. Dış döllenme gösteren türlerde, ovaryen sıvının iyonik bileşimi ve viskozitesi spermatozoanın yumurtaya yönelmesini kolaylaştırır (Rosengrave & ark., 2008).

Sperm motilitesi genellikle birkaç saniye ila birkaç dakika arasında sürer ve bu süre boyunca hücresel enerji rezervi olan ATP hızla tüketilir (Alavi & Cosson, 2006). Bu nedenle sperm aktivasyonundan önce, laboratuvar veya saha koşullarında motiliteyi erken başlatacak ortamdan kaçınılmalıdır. Sperm kalitesinin korunması için, sperma toplandıktan sonra seminal plazmaya benzer ozmolalite ve pH değerine sahip inaktif çözeltiler (örneğin non-activating medium, NAM) içinde saklanmalıdır (Beirão & ark., 2019).

Sonuç olarak, balık spermatozoalarının motilite aktivasyonu, ozmolalite, iyon kompozisyonu, pH ve ovaryen sıvı gibi çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimiyle düzenlenir. Türler arası farklılıklar gösterse de bu mekanizma, spermanın doğal döllenme ortamına biyokimyasal adaptasyonunu yansıtır. Bu bilgilerin anlaşılması, sperm saklama ve kriyoprezervasyon protokollerinin geliştirilmesinde kritik önem taşır; çünkü aktivasyon koşullarının yanlış ayarlanması sperm fonksiyonlarının geri dönüşsüz bozulmasına neden olabilir.

Balıklarda İn Vitro Fertilizasyon (IVF)

İn vitro fertilizasyon (IVF), balıklarda yapay üreme sürecinin temel aşamalarından birini oluşturur ve sperm ile oositlerin kontrollü şekilde birleştirilmesini içerir. Bu yöntem, gametlerin karşılaşmasını kolaylaştırarak döllenme verimini artırmayı amaçlar. Balık türlerinde uygulanan üç temel IVF yöntemi bulunmaktadır: kuru, yarı-kuru ve ıslak yöntem. Kuru yöntemde sperm doğrudan oositlere eklenir ve ardından aktivasyon çözeltisi ilave edilir. Yarı-kuru yöntemde sperm, önceden seyreltilmiş aktivasyon ortamı ile karıştırılır (50–200 kat) ve hemen oositlere uygulanır. Islak yöntemde ise önce oositler aktivasyon çözeltisi ile karıştırılır, ardından sperm eklenir; Cyprinidae familyasına ait bazı türlerde (ör.

Cyprinus carpio) bu yöntem sonuçların tutarsız olması nedeniyle nadiren tercih edilir (Beirão & ark., 2019).

IVF başarısını belirleyen en kritik faktörlerden biri spermatozoa:oosit oranıdır. Bu oran, türün üreme fizyolojisi, çiftleşme stratejileri ve gamet özelliklerine bağlı olarak değişir. Örneğin, turna balığı (Silurus glanis) ve Afrika yayın balığı (Clarias gariepinus) gibi türlerde başarılı dölleme ($> \%80$) için 10^2 – 10^3 spermatozoa/oosit oranı yeterliyken, ringa balığı (Clupea harengus) gibi türlerde $\geq 10^4$ spermatozoa/oosit gereklidir (Rurangwa & ark., 1998; Linhart & ark., 2004; Rosenthal & ark., 1998). Gametler arasındaki temas süresi de sperm ömrü ve oositin döllemeye uygunluğu açısından önemlidir; türler arasında farklılık gösterir. Örneğin Atlantik morina balığında (Gadus morhua) yüksek sperm:oosit oranında ($\sim 10^5$), 5 dakika yeterliyken düşük oranlarda 30 dakika gerekebilir (Butts & ark., 2009).

IVF başarısında kullanılan ortam ve aktivasyon çözeltilerinin kimyasal özellikleri de önemlidir. Tatlı su ve deniz balıklarında pH, ozmolalite ve iyon kompozisyonu sperm motilitesini ve dölleme kapasitesini doğrudan etkiler (Alavi & Cosson, 2006; Beirão & ark., 2019). Spermatozoa, laboratuvar koşullarında veya sperm toplandıktan sonra non-activating medium (NAM) gibi inaktif çözeltilerde saklanarak motilitenin önceden başlaması engellenir ve kalitesi korunur. Oositlerin olgunluk derecesi de dölleme başarısı için kritik olup, olgunlaşmamış oositlerin kullanımı fertilizasyon oranlarını düşürür (Montague & ark., 2023).

Son olarak, IVF sonrası embriyoların uygun ortamda kültürlenmesi veya transfer edilmesi, dölleme verimliliğini etkileyen bir diğer faktördür. Embriyoların erken dönem gelişimi sırasında çevresel koşulların optimize edilmesi, yüksek fertilizasyon oranı ve sağlıklı larvaların elde edilmesini destekler.

Balıklarda Sperma Kriyoprezervasyonu

Balık spermasının kriyoprezervasyonuna yönelik ilk girişimler, büyük ölçüde hayvancılıkta kullanılan dondurma tekniklerinden uyarlanarak geliştirilmiştir. Bu alandaki ilk başarı, 1953 yılında Blaxter'ın *Clupea harengus* (ringa balığı) yumurtalarını dondurulmuş-çözülmüş sperma ile döllendirmesiyle elde edilmiştir (Blaxter, 1953). Günümüzde, yetiştiriciliği yapılan hemen tüm balık türlerinin spermasının kriyoprezervasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Bu teknoloji, erkek bireylerin dişilerden daha erken olgunlaşmasıyla ortaya çıkan zamanlama problemlerini ortadan kaldırmakta, seçici ıslah programlarının yürütülmesine olanak tanımakta ve genetik kaynakların uzun süreli korunmasını sağlamaktadır (Lakra & Ayyappan, 2003). Balıklarda germplazmanın korunmasına yönelik kriyoprezervasyon çalışmaları, ilk uygulamalardan bu yana hem tatlı su hem de deniz türlerinde ilgi görmüş ve farklı türlere özgü dondurma protokolleri geliştirilmiştir; çalışmaların önemli bir kısmı mevsimsel üreme gösteren ve ekonomik değeri yüksek türlere, özellikle salmonidler ve siprinidler üzerine yoğunlaşmıştır. Germplazma bankacılığı kapsamında yalnızca sperm değil, somatik hücreler, spermatogonia, primordial germ hücreleri, oosit ve embriyolar da araştırılmıştır (Martínez-Páramo & ark., 2017).

Balık spermasının korunması genel olarak kısa süreli saklama ve uzun süreli kriyoprezervasyon olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Beirão & ark., 2019; Herranz-Jusdado & ark., 2019). Kısa süreli saklama yöntemlerinde sperm, genellikle oda sıcaklığında veya 0 °C'ye yakın düşük sıcaklıklarda muhafaza edilir ve hareketliliği birkaç gün ile birkaç hafta arasında korunabilir; bu yöntem, kısa süreli yapay dölleme uygulamaları için uygundur (Herranz-Jusdado & ark., 2019). Uzun süreli canlılık için ise -80 °C veya sıvı azot sıcaklıkları (-196 °C) gibi ultra düşük sıcaklıklarda dondurma gereklidir (Cabrita & ark., 2010).

Balıklarda yapay dölleme, dişilerden elde edilen olgun oositlerin erkek gametleriyle vücut dışında kontrollü bir şekilde döllemesine dayanır ve başarı büyük ölçüde gamet kalitesi, aktivasyon koşulları ve spermanın fizyolojik bütünlüğüne bağlıdır. Oositler genellikle stripping yöntemiyle hasarsız şekilde toplanırken, sperm kuru yöntemle alınır ve aktivasyon solüsyonu ile temas edene kadar inaktif olarak korunur. Taze sperm ile yapılan döllemede, aktivasyon çözeltisi eklenmesiyle motilite başlatılır ve uygun sperm:oosit oranı sağlanarak nazik karıştırma ile fertilizasyon gerçekleştirilir (Shaza & ark., 2024).

Dondurulmuş spermanın çözündürülmesi, başarılı bir fertilizasyon için kritik bir aşamadır ve işlem genellikle hızlı çözme prensibine dayanır. Kriyotüpler sıvı azottan çıkarıldıktan sonra 40–50 °C su banyosuna alınarak birkaç saniye içinde çözündürülür; bu yaklaşım, yeniden kristallenme kaynaklı hücresel hasarı en aza indirir. Çözdürme sonrasında sperm örneği, türün fizyolojisine uygun hedef sıcaklığa—örneğin soğuk su balıklarında yaklaşık 10 °C—aşırı ısınmadan hızla getirilir. Ardından uygun çözdürme veya seyreltme solüsyonu ile osmotik dengeleme sağlanır. Aktivasyon solüsyonuyla temas eden çözdürülmüş sperm motilite kazanır ve taze oositlere uygulanarak dölleme tamamlanır (Tiersch, 2006; Streit & ark., 2024).

Güncel araştırmalar, aktivasyon solüsyonunun bileşimi, sperm yoğunluğu, gametlerin kısa süreli depolanması ve kriyoprezervasyonun motilite ile membran ve DNA bütünlüğü üzerindeki tür-özümlü etkilerinin dölleme oranlarını belirlediğini göstermektedir (Merino & ark., 2023; Krasilnikova & ark., 2025). Bu bulgular, yapay dölleme protokollerinin yıl boyunca kaliteli gamet kullanımını mümkün kılacak şekilde optimize edildiğini ve akuakültürde sürdürülebilir yavru üretiminin temel bir bileşeni hâline geldiğini ortaya koymaktadır.

Balıklarda Sperma Kriyoprezervasyonunda Kullanılan Seyreltici ve Kriyoprotektanlar

Balık spermasının kriyoprezervasyonu, spermanın uygun bir seyreltici içerisinde sulandırılarak hücreleri donma kaynaklı hasarlardan koruyacak bir kriyoprotektan ile birlikte uygulanmasını gerektirir. Bu kombinasyon, dondurma ve çözme aşamalarında ozmotik stres, buz kristali oluşumu ve zar bütünlüğünün bozulması gibi olumsuzlukları en aza indirir ve spermatozoaların ultra düşük sıcaklıklarda uzun süre stabil şekilde korunmasına olanak tanır (Cabrita & ark., 2010; Herranz-Jusdado & ark., 2019).

Tatlı su balıklarında sperm, hipotonik ortama temas ettiğinde hızla aktive olduğundan, kullanılacak seyrelticinin izotonik özellikte, iyi tamponlanmış, toksik etkisi düşük ve mümkün olduğunca basit bir bileşime sahip olması önemlidir (Beirão & ark., 2019). Balıklarda ejakülat hacminin sınırlı olması ve spermanın yüksek viskozitesinin korunması gerektiği göz önünde bulundurulduğunda, seyrelticiler yalnızca dondurma işlemi için değil, aynı zamanda dondurma öncesi hareketliliğin ve dölleme gücünün korunması açısından da kritik rol oynar. Uygun seyrelticilerle spermatozoaların canlılığı birkaç günden birkaç yıla kadar sürdürülebilir (Muchlisin, 2005).

Klasik Ringer tipi çözeltiler, içerdiği Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ve HCO_3^- iyonları sayesinde spermanın fizyolojik dengesini korur ve erken aktivasyonunu önler; hâlen farklı balık türlerinde en yaygın kullanılan seyrelticidir (Muchlisin, 2005; Muchlisin & ark., 2024). Seyreltici bileşiminin iyon konsantrasyonu, ozmolarite ve tampon kapasitesi sperm fonksiyonları üzerinde belirleyici etkiler yaratır. Örneğin sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermasıyla yapılan bir çalışmada, 46–62 mOsm/kg ozmolarite aralığındaki çözeltiler kısa süreli depolamada en yüksek hareketlilik oranlarını sağlamıştır (Shazada & ark., 2025). Ringer çözeltisine alternatif olarak HBSS

veya Tris-tamponlu çözeltiler, bazı türlerde kriyoprezervasyon sonrası sperm fonksiyonlarını daha iyi koruyabilmektedir (Zhu & ark., 2025). Ayrıca melatonin gibi antioksidan katkılar, dondurma ve çözme sonrası mitokondriyal zar bütünlüğünün korunmasına katkı sağlayarak hareketlilik ve döllenme kapasitesini artırmaktadır (Ruan & ark., 2024). Türler arasında farklılıklar bulunduğundan, seyreltici formülasyonlarının türlere özgü optimize edilmesi gereklidir (Muchlisin & ark., 2024).

Seyrelticiler spermanın fizyolojik stabilitesini korusa da, kriyoprezervasyonun başarısı için tek başına yeterli değildir. Dondurma sırasında hücre içi ve dışı ortamlarda meydana gelebilecek buz kristali oluşumu, ozmotik dengesizlikler ve membran hasarı, sperm motilitesi ve döllenme kapasitesini ciddi şekilde düşürür. Bu nedenle seyrelticilere kriyoprotektan adı verilen koruyucu maddeler eklenir. Balık spermasının kriyoprezervasyonunda hem penetran (hücre zarından geçebilen) hem de non-penetran (zar dışı etkili) kriyoprotektanlar kullanılmaktadır (Aramli & ark., 2024).

Penetran kriyoprotektanlardan dimetil sülfoksit (DMSO), tatlı su balıklarında yüksek membran geçirgenliği sayesinde sperm zarına hızla nüfuz ederek buz kristali oluşumunu engeller. %5–10 DMSO konsantrasyonları, sazan (*Cyprinus carpio*) ve kırmızı barb (*Barbodes gonionotus*) spermasının dondurma sonrası yüksek motilite göstermesini sağlamıştır (Irawan & ark., 2010; Vuthiphandchai & ark., 2015). Bazı salmonid ve yayın balığı türlerinde dimetil asetamid (DMA) DMSO'ya kıyasla daha etkili bulunmuştur (Aramli & ark., 2024). Metanol ise DMSO ve gliserolden daha yüksek difüzyon kapasitesine sahip olması ve düşük toksisitesi nedeniyle mersin balıklarında (*Acipenser baerii*) daha yüksek döllenme oranları sağlamaktadır (Kodzik & ark., 2024). Ayrıca etilen glikol gibi bazı penetran ajanlar, mersin balıklarında

ortalama motilite ve hız değerlerini artırmaktadır (Shaliutina-Loginova & Loginov, 2023).

Non-penetrant kriyoprotektanlar, hücre dışı ortamda zar lipidlerini stabilize ederek kriyohasarı azaltır. Yumurta sarısı ve soya lesitini içeren çözeltiler uzun süredir kullanılan etkili ajanlardır ve spermanın dondurma-çözme sonrası bütünlüğünü korumada başarılıdır (Muchlisin & ark., 2015; Fatriani & ark., 2020). Hayvansal içerik taşımayan %10 soya lesitini bazlı seyrelticiler de yumurta sarısı içeren çözeltilerle benzer düzeyde koruyuculuk sağlamaktadır (Yildiz & ark., 2013). Bovine serum albümin (BSA) ilavesi özellikle Sibirya mersini (*Acipenser baerii*), Beluga mersini (*Huso huso*) ve sazan (*Cyprinus carpio*) türlerinde membran bütünlüğünü ve motiliteyi artırmaktadır (Sadeghi & Imanpoor, 2013). Amino asitlerin ozmoregülatör ve antioksidan özellikleri, kriyohasarı azaltırken, antifriz proteinleri (özellikle tip III izoformları) buz kristali oluşumunu engelleyerek zar lipid bütünlüğünü korur (Abualreesh & ark., 2021). Şekerler (glukoz, trehaloz, maltose) ve siklodekstrinler de non-penetrant katkıları olarak zar stabilitesini artırır ve kriyoprotektan etkinliğini destekler (Golshahi & ark., 2018; Yıldiz & ark., 2015).

Sonuç olarak, balık spermasının kriyoprezervasyonunda tek bir evrensel formülasyon bulunmamaktadır. Türler arasındaki fizyolojik ve biyokimyasal farklılıklar nedeniyle seyreltici ve kriyoprotektan bileşimleri her tür için ayrı ayrı optimize edilmelidir. Güncel eğilimler, penetrant ve non-penetrant maddelerin uygun kombinasyonları ile antioksidan takviyelerin birlikte değerlendirildiği tür spesifik yaklaşımların kriyoprezervasyon başarısını artırmada daha etkili olduğunu göstermektedir.

Balıklarda Germ Hücre Kriyoprezervasyonu

Balıklarda uzun yıllardır yalnızca sperm kriyoprezervasyonu yaygın biçimde uygulanmakta ve her türe özgü protokoller

geliştirilmiştir (Cabrita & ark., 2010). Ancak spermatogonyum ve oogonyum gibi farklılaşmamış germ hücrelerinin kriyoprezervasyonu, sperm kriyoprezervasyonunun tek başına neslin devamını garanti edememesi nedeniyle heyecan verici bir alternatif sunmaktadır (Yoshizaki & Lee, 2018). Özellikle gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üzerinde yapılan çalışmalar, olgunlaşmamış testis ve yumurtalık dokularının kriyoprezervasyonunda başarı sağlandığını ve farklılaşmamış germ hücrelerinin yarı kalıcı olarak saklanabileceğini göstermiştir (Lee & ark., 2016).

Germ hücresi kriyoprezervasyonunun temel amacı, bu hücrelerin transplantasyon ile kullanılmasına olanak sağlamaktır. Bu amaçla germ hücreleri yavaş dondurma veya vitrifikasyon yöntemleri ile saklanmaktadır. Her iki yöntemle dondurulan germ hücrelerinin larvalara transplantasyonundan sonra genital çıkıntıya göç oranı ve üreme yetenekleri bakımından kontrol grupları ile anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Octavera & ark., 2020). Germ hücreleri, diseksiyonla elde edilen olgunlaşmamış gonadlardan izole edilebildiği gibi tüm testis dokusunun kriyoprezervasyonunu takiben de elde edilebilmektedir (Lee & ark., 2021).

Kriyoprezervasyon sonrası testis dokusundan izole edilen spermatogonyumların dişi alıcı balıklara transferi, bu hücrelerin ovaryum dokusuna farklılaşmasını sağlayarak türün devamlılığında önemli bir avantaj sunmaktadır. Oogonyum kriyoprezervasyonunda ise DMSO (dimetil sülfoksit), metanol, gliserol, etilen glikol ve yumurta sarısı gibi çeşitli kriyokoruyucular kullanılmaktadır. Bu kriyokoruyucular arasında hücre içine penetrasyon yeteneği olan DMSO, hem sperm motilitesi hem de döllenme oranları açısından en yüksek başarıyı sağlamaktadır. Yumurta sarısı penetran özellik göstermese de laktoz ile birlikte kullanıldığında etkili sonuçlar elde edilmiştir (Abualreesh & ark., 2021).

DMSO, gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) spermatogonyal kök hücreleri, İliş balığı (*Ilisha furcatus*) tip A spermatogonyumları, sazan (*Cyprinus carpio*) ovaryumu ve çeşitli oogonya tiplerinin kriyoprezervasyonunda en başarılı kriyokoruyucu olarak rapor edilmiştir (Franek & ark., 2019; Abualreesh & ark., 2020; Abualreesh & ark., 2021). Bu durum, özellikle ulaşılamayan veya nesli tehlike altında olan türler için önemlidir; çünkü yalnızca erkek veya dişi donör birey mevcut olsa bile, germ hücreleri her iki cinsiyetten alıcılara transfer edilebilir ve böylece hem oosit hem de spermatozoa üretimi sağlanabilir (Lee & ark., 2016).

Bununla birlikte, bu teknolojilerin uygulanması bazı zorlukları da beraberinde getirmektedir. Nesli tehlike altında olan türlerde, donör germ hücresi sağlayacak birey sayısı sınırlı olabilir veya tür küçük boyutlu olabilir; bu durum yeterli sayıda germ hücresi toplamanın önünde engel oluşturur. Bu sorunu aşmak için, farklılaşmamış germ hücrelerinin in vitro çoğaltılması güçlü bir strateji olarak önerilmektedir (Iwasaki-Takahashi & ark., 2020). Ayrıca, parental balıklardan gamet üretimi yetiştirme koşullarının kontrolü veya hormon uygulamaları ile mümkün olsa da, donör balık gonadlarındaki farklılaşmamış germ hücrelerinin in vivo çoğalması hâlen sınırlı düzeyde kalmıştır (Mylonas & ark., 2010).

Sonuç olarak, germ hücresi kriyoprezervasyonunda süreçlerin basitleştirilmesi, kimyasal kullanımının en aza indirilmesi, bazı aşamaların doğrudan yetiştiricilik tesislerinde uygulanabilmesi ve örneklerin kolay transfer edilebilir hâle getirilmesi, küresel ölçekte aciliyet taşıyan tür koruma çalışmalarının hızlandırılmasına önemli katkı sağlayacaktır.

Balıklarda Oosit ve Blastomer Kriyoprezervasyonu

Oositlerin embriyolara kıyasla daha küçük boyutları, düşük su içeriği ve tam gelişmiş koryon zarının bulunmaması, su ve

çözünmüş maddelerin oositlerden geçişini kolaylaştırmakta ve bu durum kriyoprezervasyon açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır (Tsai & Lin, 2012). Tıpkı embriyolarda olduğu gibi, oositlerin soğutmaya karşı duyarlılığı gelişim evresine bağlı olarak değişmektedir. Örneğin, evre V oositler, evre III oositlere kıyasla soğutmaya karşı daha az dirençlidir (Isayeva & ark., 2004). Ayrıca, farklı evrelerdeki oositlerin su ve kriyoprotektan (CPA) geçirgenlik özellikleri de farklılık göstermektedir.

Zebra balığı (*Danio rerio*), en çok çalışılan türlerden biri olarak öne çıkmaktadır. 25°C’de olgunlaşmamış oositlerin su ve CPA geçirgenliği, olgun oositlerden daha yüksek bulunmuştur (Seki & ark., 2007). Benzer şekilde, Japon pirinç balığı (*Oryzias latipes*) oositlerinde de olgunlaşmamış oositlerin kriyoprezervasyona daha uygun olabileceği gözlemlenmiştir (Valdez & ark., 2005). Öte yandan, zebra balığı III. evre oosit membran geçirgenliğinin sıcaklık arttıkça azaldığı rapor edilmiş; ancak bu mekanizmanın tam olarak anlaşılmadığı belirtilmiştir (Zhang & ark., 2005).

Embriyoların kriyoprezervasyonu teknik açıdan zorluklar içerdiğinden, bazı araştırmacılar tam embriyo yerine izole blastomerleri korumayı tercih etmiştir (Tsai & Lin, 2012). Erken embriyonik hücreler olarak da bilinen blastomerler, balık genomlarının korunmasında etkili bir alternatif sunmaktadır. Blastomerler, tam embriyolara göre daha küçük boyutlu olup, laboratuvar ortamında işlenmeleri daha kolaydır (Strüssmann & ark., 1999).

Günümüzde blastomer kriyoprezervasyonu, gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Japon beyaz balığı (*Carassius cuvieri*), chum somonu (*Oncorhynchus keta*) ve sazan (*Cyprinus carpio*) gibi birçok balık türünde başarıyla uygulanmıştır (Nilsson & Cloud, 1993; Strüssmann & ark., 1999; Kusuda & ark., 2004). Bu yöntem, özellikle embriyoların zorlu koşullarda hayatta kalma

şansının düşük olduğu durumlarda, genomun uzun süreli korunmasına önemli katkı sağlamaktadır.

Balıklarda Embriyo Kriyoprezervasyonu

Balık embriyolarının kriyoprezervasyonu hâlen standart bir protokol olarak gerçekleştirilememektedir. Başarıyı sınırlayan temel faktörler arasında düşük yüzey/hacim oranı, geniş vitellus hacmi, düşük membran geçirgenliği ve soğuklara yüksek duyarlılık yer almakta; bu durum dondurma ve çözündürme sırasında kristalleşme ve biyolojik hasar riskini artırmaktadır (Cabrita & ark., 2010; Diwan & ark., 2020). Bugüne kadar 20’den fazla teleost türünde embriyo kriyoprezervasyonu denemeleri yapılmış ve ilk başarılı uygulama 1989 yılında sazan (*Cyprinus carpio*) embriyolarında yavaş dondurma yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Zhang & ark., 1989).

Embriyo kriyoprezervasyonunda dikkate alınması gereken faktörler, kriyokoruyucunun toksisitesi, embriyonun gelişim evresi ve kriyoprezervasyon sırasında uygulanan koşullardır (de Carvalho & ark., 2014). Çeşitli balık türlerinde yapılan çalışmalar hâlen zorluklarla karşılaşsa da bazı umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, türbot (*Scophthalmus maximus*) embriyolarında farklı kriyoprotektan ve vitrifikasyon çözeltilerinin denenmesi sonucunda sınırlı da olsa çıkış başarıları bildirilmiştir (Cabrita & ark., 2003). Benzer şekilde, Japon dil balığı (*Paralichthys olivaceus*) embriyolarında metanol, propilen glikol ve DMSO gibi kriyoprotektanların kullanıldığı vitrifikasyon çalışmalarında kısmi canlılık korunabilmiş; ancak toksisite ve geçirgenlik sorunları başarıyı önemli ölçüde sınırlamıştır (Chen & Tian, 2005; Edashige & ark., 2006).

Başarı oranlarını artırmak amacıyla çeşitli kriyoprotektan kombinasyonları da test edilmiştir. İran mersini (*Acipenser persicus*) embriyolarında DMSO-bazlı vitrifikasyon çözeltileri ile yaklaşık %45 civarında çıkış oranı elde edilebilmiştir (Keivanloo & ark.,

2016). Zebra balığı (*Danio rerio*) çalışmaları ise permeabilityi artırmak için propilen glikol ve benzeri kriyoprotektanların hızlı soğutma protokolleriyle uygulanmasına rağmen embriyoların büyük bölümünün gelişimi durmakta veya erken dönemlerde kayıplar meydana gelmektedir (Higaki ve ark., 2010).

Embriyonun gelişim evresi, kriyoprezervasyon başarısı için kritik öneme sahiptir. Erken evre embriyolar soğuk hasara karşı daha hassas iken, gastrulasyon sonrası evrelerde bu duyarlılık azalır (Ahammad & ark., 2003; Silakes & Bart, 2010). Geç evrelerde embriyonun hücrel ve doku yapısı, tamir mekanizmaları ve enzimatik aktiviteleri gelişmiş olduğundan soğuk stresine karşı daha dirençli hâle gelir. Ancak geç evrelerde zar geçirgenliği azalır ve kriyoprotektanların vitellus içine penetrasyonu sınırlanır. Bu nedenle embriyo kriyoprezervasyonu için genellikle somite evresi ve kuyruk tomurcuğu evresi tercih edilmektedir. Ayrıca embriyonun su dağılımı ve su geçirgenliği, kriyoprotektanların etkinliği açısından dikkatle değerlendirilmelidir (Qin & ark., 2025).

Bu zorlukların üstesinden gelmek amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar arasında kriyoprotektanların doğrudan sitoplazmaya mikroenjeksiyonu, yumurta veya embriyolara uygulanan negatif basınçla geçirgenliğin artırılması, antifriz proteinlerinin mikroenjeksiyonu ve hidrostatik basınç uygulanması yer almaktadır. Yumurtaların ve embriyoların geçirgenliği hakkında kesin bilgi, başarılı bir kriyoprezervasyon için kritik öneme sahiptir (Siva, 2021). Mevcut çalışmalar, çoğunlukla somite ve kuyruk tomurcuğu evresindeki embriyoların daha uygun olduğunu göstermektedir; ancak türler arası farklılıklar olabileceği için daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Buna karşın, sperm ve germ hücrelerinin kriyoprezervasyonu üzerine yapılan güncel çalışmalar hem dişi hem de erkek genomunu saklama açısından umut verici sonuçlar sunmaktadır.

Balıklarda Germ Hücre Nakli

Balıklarda reprodüktif biyoteknoloji kapsamında, germ hücre nakli (Germ Cell Transplantation, GCT) günümüzde önemli bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. GCT, genetik materyalin nesiller boyunca korunmasını ve yeniden üretilmesini sağlayan ileri düzey bir yaklaşım sunar. Bu yöntemde, alıcı embriyolara veya larvalara spermatogonyum veya oogonyum gibi germ hücreleri transfer edilir. Nakledilen hücreler alıcı gonadlarda kolonize olarak olgun gamet üretme kapasitesine ulaşır ve doğal fertilizasyon veya yapay dölleme yoluyla yavru üretimini mümkün kılar. Bu yaklaşım, üreme süresi uzun türlerde genetik kaynakların korunması, üstün genotiplerin yaygınlaştırılması ve soy hatlarının sürdürülebilirliğinin sağlanması açısından büyük potansiyel taşımaktadır (Yoshizaki & Yazawa, 2019). Ancak ticari ölçekte yaygın uygulanabilirlik hâlâ bazı teknik ve ekonomik engeller nedeniyle sınırlıdır; bu nedenle protokollerin optimizasyonu, alıcı-hücre uyumu, verimlilik ve tür-özgü adaptasyon araştırmaları güncel odak noktalarıdır (Ryu & ark., 2022).

Olgunlaşmamış gonadlardan izole edilen germline kök hücreleri, immünojenik olarak olgunlaşmamış yeni çıkmış larvaların intraperitoneal bölgesine nakledilebilir (Yoshizaki & ark., 2010). Larvaların yanı sıra, germ hücrelerinin damızlık balıklara transferi de mümkündür (Lacerda & ark., 2013). Larvalara aktarılan germline kök hücreleri, genital çıkıntıya göç ederek çoğalır ve spermatogenez veya oogeneze süreçlerini başlatır. Donör germ hücreleri, alıcının cinsiyetine bağlı olarak farklılaşır; dişi alıcıda oosit, erkek alıcıda spermatozoa üretir (Yoshizaki & ark., 2010). Bu özellik, özellikle nesli tehdit altında olan türlerde önem taşır; yalnızca bir cinsiyetten donör birey mevcut olsa bile, bu hücreler hem erkek hem de dişi alıcılara aktarılabilir ve hem oosit hem de spermatozoa üretimi sağlanabilir (Lee & ark., 2016).

GCT, özellikle steril veya gonadları baskılanmış alıcılar kullanıldığında, genetik materyalin doğrudan aktarılmasına olanak tanır. Örneğin, diploid veya triploid alıcılara nakledilen spermatogonyumlar, alıcının gonadında kolonize olarak olgun spermatozoa üretir ve genetik olarak donör bireylerin sperması ile fertilizasyon gerçekleştirilebilir. Benzer şekilde, oogonyum nakli alıcı gonadlarda olgun oosit gelişimini sağlar (Ryu & ark., 2022).

Sonuç olarak, balık üretim programlarında GCT hem sürdürülebilir üretim hem de genetik kalite açısından kritik bir strateji sunmaktadır. Bu yöntem, nadir türlerin korunması, damızlıkların optimizasyonu ve genetik ıslah programlarının etkin yürütülmesi için önemli bir araçtır.

Balıklarda Cinsiyet Belirleme ve Cinsiyet Farklılaşması

Balıklar, omurgalılar içinde en geniş cinsiyet çeşitliliğine sahip gruplardan biri olup, cinsiyet belirleme (sex determination) ve cinsiyet farklılaşması (sex differentiation) süreçlerinde oldukça çeşitli biyolojik mekanizmalar gösterir (Nagahama & ark., 2021). Türlerin çoğu yaşamları boyunca yalnızca bir cinsiyete sahip olan gonokorist bir üreme sistemi sergilerken, bazı türlerde bireyler hem erkek hem de dişi gamet üretebilen hermafrodit özellik taşır. Ayrıca, bazı türlerde yaşam döngüsü sırasında cinsiyet değişimi gözlenir ve bu durum sekansiyel hermafroditizm olarak adlandırılır. Daha nadir görülen uniseksüel üreme biçimlerinde ise yavrular yalnızca maternal veya paternal genetik materyal üzerinden gelişir (Wang & Shen, 2019).

Balıklarda cinsiyeti belirleyen temel süreçler genetik faktörlere (GSD), çevresel sinyallere (ESD) veya her ikisinin etkileşimine (GSD+TE) bağlı olabilir. Sıcaklık temelli sistemler (Thermal Sex Determination, TSD) özellikle erken gelişim döneminde etkili olup, sıcaklık cinsiyet oranlarını önemli ölçüde değiştirebilir. Poligenik cinsiyet belirleme (PSD) sistemlerinde ise

birden fazla genin birleşik etkisi cinsiyeti şekillendirir. Cinsiyet belirlemeyi takip eden cinsiyet farklılaşması sürecinde gonadlar fenotipik olarak testis veya ovaryuma dönüşür (Wang & Shen, 2019; Bhattacharya & Modi, 2021). Bu çeşitlilik, balıkları cinsiyet belirleme mekanizmalarının evrimsel dinamiklerini incelemek için değerli model organizmalar hâline getirmiştir.

Genetik cinsiyet belirleme genellikle tek bir “master-key regulator” (MKR) gen tarafından başlatılır. Bu genler, cinsiyet farklılaşma sürecinin yönünü belirleyerek bireyin dişi veya erkek olarak gelişmesini sağlar. Farklı türlerde MKR genlerin değişiklik göstermesi, mekanizmanın evrimsel olarak esnek olduğunu ortaya koymaktadır (Matsuda & ark., 2016; Curzon & ark., 2021). Bugüne kadar birçok türde *amh*, *dmrt1*, *hsd17b* ve *banf2* genlerinin MKR olarak görev yaptığı belirlenmiştir. Özellikle *amh* geninin XY/XX sisteminde, *dmrt1* geninin ise hem WZ/ZZ hem de XY/XX sistemlerinde rol aldığı rapor edilmiştir (Marshall & ark., 2013; Capel, 2017; Wang & Shen, 2019).

Çevresel ve sosyal koşullar da cinsiyetin belirlenmesinde etkili olabilir. Erken gelişim döneminde sıcaklık değişimleri, genetik olarak belirlenmiş cinsiyet oranlarını önemli ölçüde değiştirebilir. Örneğin, Nil tilapiyası (*Oreochromis niloticus*) ve Mavi tilapiya (*O. aureus*) türlerinde 34–37 °C sıcaklıklarda dişiden erkeğe cinsiyet dönüşümü gözlenmiştir; bu etki popülasyonlar ve aileler arasında değişkenlik gösterebilir (Baroiller & ark., 2009; Taslima & ark., 2021). Son yıllarda iklim değişikliği ve epigenetik yeniden programlama süreçleri, balıklarda cinsiyet belirleme araştırmalarında ön plana çıkmıştır. Özellikle TSD sistemine sahip türlerde artan su sıcaklıklarının erkek birey oranını artırdığı; levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve Japon pirinç balığı (*Oryzias latipes*) gibi türlerde yüksek sıcaklık koşullarının gonadal farklılaşmayı erkeksileşme yönünde kaydırıldığı bildirilmiştir (Hayashi & ark., 2010; Geffroy & ark., 2021). Bu durum, doğal popülasyonlarda dişi

birey sayısının azalmasına ve uzun vadede üreme başarısının düşmesine yol açarak popülasyonların sürdürülebilirliğini tehdit etmektedir.

Epigenetik yeniden programlama da gonadal kaderin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. DNA metilasyonu, non-kodlayıcı RNA'lar ve histon modifikasyonları, cyp19a1a, dmrt1 gibi anahtar genlerin ekspresyonunu kalıcı biçimde etkileyerek cinsiyet farklılaşmasını yönlendirir (Valdivieso & ark., 2022). Bu süreçler, çevresel faktörlerin genetik yapıyla etkileşimi sonucu kalıcı epigenetik izler bırakır ve bireyin cinsiyet yönelimini şekillendirir.

Reprodüktif biyoteknoloji açısından, bu bulgular tek cinsiyetli üretim stratejilerinin geliştirilmesi, gen düzenleme teknolojileriyle (ör. CRISPR/Cas9) cinsiyet belirleyici genlerin hedeflenmesi ve hormon uygulamalarıyla yönlendirilmiş cinsiyet dönüşümlerinin optimize edilmesi açısından büyük potansiyel taşımaktadır (Zhu & ark., 2024). Ayrıca, iklim değişikliğine bağlı cinsiyet oranı dengesizliklerini azaltmak için genetik materyalin kriyoprezervasyonu, kontrollü sıcaklık kuluçkaları ve genetik bankalama gibi yaklaşımlar koruma biyoteknolojisi kapsamında önem kazanmaktadır (Geffroy & Wedekind, 2020). Ekonomik değeri yüksek türlerde tek cinsiyetli popülasyonların elde edilmesi, büyüme performansını ve üretim verimliliğini artırır; örneğin tilapia üretiminde erkek bireylerin tercih edilmesi daha hızlı büyüme ve yemden daha iyi yararlanma avantajı sağlar (Adolfi & ark., 2019; Baroiller & ark., 2009; Curzon & ark., 2020).

Balıklarda Cinsiyet Dönüşümü

Balıklarda cinsiyet dönüşümü (sex reversal), bireyin yaşam döngüsü boyunca fonksiyonel bir cinsiyetten diğerine dönüşüm göstermesidir. Bu süreç genellikle çevresel, fizyolojik veya sosyal faktörlerle tetiklenir ve özellikle hermafrodit türlerde görülür (Gemmell & ark., 2019). Bireyin üreme başarısını maksimize

etmeye yönelik bir adaptasyon olup, çoğunlukla popülasyonun sosyal yapısı ve üreme stratejisiyle ilişkilidir (Thomas & ark., 2018). Bu durum, ardışık hermafroditlik olgusu olarak tanımlanan fenotipik plastisitenin dikkat çekici bir örneğini oluşturur. Ardışık hermafrodit türlerde bireyler yaşamlarına bir cinsiyetle başlar ve çevresel veya sosyal uyarılar sonucunda karşı cinse dönüşür. Bu değişim dışiden erkeğe (protogini), erkekten dişiye (protandri) veya çift yönlü (bidirectional) olarak gerçekleşebilir (Avise & Mank, 2009; Godwin, 2009).

Cinsiyet dönüşümü genellikle büyüklük avantajı modeli (Size-Advantage Model, SAM) ile açıklanır. Bu modele göre birey, yaşam boyu üreme başarısını en üst düzeye çıkarmak amacıyla, karşı cinsin daha yüksek üreme başarısı göstereceği bir vücut büyüklüğüne ulaştığında cinsiyet dönüşümü gerçekleşir (Erisman & ark., 2009; Thomas & ark., 2018). Yani birey büyüdükçe, üreme verimliliği daha yüksek olan cinsiyete geçiş doğal seçim açısından avantaj sağlar.

Cinsiyet dönüşümü üç aşamada ilerler: davranışsal, gonadal ve morfolojik. Davranışsal değişim, baskın bireyin ortadan kalkmasından birkaç saat sonra başlar; dışiden erkeğe geçişte saldırganlık ve kur davranışı gibi erkeğe özgü davranışlar gözlenir. Gonadal değişimde, ovaryum dokusu gerilerken testiküler yapı oluşur; protandrik türlerde testis dokusu geriler ve ovaryum gelişir. Bu süreç genellikle 7–10 gün sürer. Morfolojik değişim, renk ve vücut şekli değişimleriyle tamamlanır ve türe bağlı olarak birkaç hafta sürebilir (Thomas & ark., 2018).

Cinsiyet dönüşümü hormonal düzenlemelerle yakından ilişkilidir. Özellikle ardışık hermafrodit türlerde östrojen/androjen oranındaki değişimler gonadal yeniden yapılanmayı tetikleyerek bireyin fonksiyonel cinsiyetini değiştirir. Hipotalamus-hipofiz-gonad (HPG) eksenini, yalnızca üreme döngüsünü değil, cinsiyet

belirleme ve değiştirme mekanizmalarını da düzenler (Lamn & ark., 2015; Thomas & ark., 2018). Ayrıca hipotalamus-hipofiz-interrenal (HPI) aksı yoluyla kortizol, aromataz enzimini baskılayarak östrojen üretimini azaltır ve testosteronun 11-ketotestosterona dönüşümünü hızlandırır; dolayısıyla stres hormonları da gonadal yönelimi etkileyebilir (Casas & Rey, 2021).

Cinsiyet dönüşümü genetik ve epigenetik mekanizmalarla da kontrol edilir. İki karşıt gen ağı cinsiyet farklılaşmasını düzenler: dişileştirici genler (foxl2, cyp19a1a, wnt4) ve erkeksileştirici genler (dmrt1, amh, sox9). Bu gen ağları birbirini baskılayarak gonadal kaderi belirler. Özellikle cyp19a1a geni, testosteronu östrojene dönüştüren aromataz enzimi kodlar; protogyn türlerde erken evrede baskılanması cinsiyet değişimini tetikler (Fang & ark., 2025). Epigenetik mekanizmalar, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları yoluyla bu genlerin ekspresyonunu değiştirir (Best & ark., 2018). Örneğin, cyp19a1a promotör bölgesinde metilasyon artışı genin baskılanmasına ve erkek yönelimine yol açar (Casas & Rey, 2021). Bu mekanizma hem sıcaklığa bağlı hem de sosyal uyarıya bağlı cinsiyet değişiminde görev alır.

Tüm bu bulgular, balıklarda cinsiyet dönüşümünün tek bir modelle açıklanamayacak kadar esnek ve çok faktörlü bir mekanizma olduğunu göstermektedir. Güncel çalışmalar, sperm rekabeti, sosyal etkileşim ve çevresel değişkenlerin SAM modeline entegre edilmesi gerektiğini öne sürmektedir. Cinsiyet dönüşümü yalnızca bireysel üreme başarısını artırmakla kalmaz, aynı zamanda popölasyon dinamiklerinin düzenlenmesi ve türlerin çevresel değişimlere adaptasyonu açısından da kritik öneme sahiptir.

Balık Yetiştiriciliğinde Hormon Kullanımı

Hormonlar, farklı hücre tipleri arasında iletişimi sağlayan kimyasal haberci moleküllerdir ve etkilerini özgöl yapısal özelliklere sahip reseptörler üzerinden gerçekleştirirler. Hormon–reseptör

etkileşimi sonrasında hücre içinde bir dizi biyokimyasal reaksiyon zinciri başlar ve bu süreç ilgili dokularda belirli biyolojik yanıtların oluşmasına yol açar (Guyton & Hall, 2011). Kolesteroleden türetilen steroid hormonlar; östrojenler, androjenler, progesteronlar, glukokortikoidler ve mineralokortikoidler olmak üzere beş temel grupta sınıflandırılır. Bu gruplardan östrojenler, androjenler ve progesteronlar üreme fizyolojisinin düzenlenmesinde kritik rol oynayan cinsiyet steroidlerini oluşturur. Su ürünleri yetiştiriciliğinde ise özellikle östrojen ve androjen türevi hormonlar hem doğal hem sentetik formlarıyla yaygın şekilde kullanılmaktadır (Guedes-Alonso & ark., 2014).

Akuakültürde hormon uygulamalarının başlıca kullanım alanları yapay üreme ve cinsiyet dönüşümüdür. Yapay üreme teknikleri düzenli ve öngörülebilir yavru üretimine olanak tanıyarak üretim zincirinin sürdürülebilirliğinde stratejik önem taşıırken, cinsiyet dönüşümü ise erkek ve dişi bireyler arasında büyüme performansı farkının belirgin olduğu türlerde ekonomik verimliliği artırmak amacıyla uygulanmaktadır (Tarenger & ark., 2010). Teleostlarda puberte döneminde ortaya çıkan bu farklılıklar, hormonal müdahalelerle yönetilebilmektedir.

Balıklarda cinsiyet, genetik (gonad gelişiminin moleküler kontrolü) ve fenotipik (testis veya ovaryum oluşumu) düzeyde belirlenir (Sekido & Lovell-Badge, 2012). Gonadal farklılaşmanın yönlendirilmesi androjen veya östrojen içeren hormonların kontrollü uygulanmasıyla mümkündür. Bu amaçla tamoksifen (östrojen reseptör blokörü), fadrozol ve letrozol (aromataz inhibitörleri), 17 α -methyl testosterone, 17 α -ethynyl testosterone, 17 α -ethynyl estradiol ve 17 β -estradiol gibi bileşikler sıklıkla kullanılmaktadır (Wang & Shen, 2018). Bu uygulamalar sonucunda vücut ağırlığı, kas kompozisyonu, yem dönüşüm oranı ve yağ asidi profili gibi performans parametrelerinde iyileşme rapor edilmiştir. 17 β -estradiol, estradiol valerate, 17 α -methyl testosterone ve 17 α -methyl

dihydrotestosterone ise hem erkek hem dişi yönünde cinsiyet dönüşümü için en yaygın tercih edilen preparatlardır (Hammes & Levin, 2019).

Cinsiyet dönüşümü iki temel stratejiyle gerçekleştirilmektedir: indirekt yöntem ve direkt yöntem. İndirekt yöntemde damızlık balıklara hormon uygulanarak XX (neomale) veya XY (neofemale) bireyler elde edilir; bu bireylerin çaprazlanmasıyla genetik olarak istenen cinsiyette yavrular üretilebilir. Direkt yöntemde ise hormonlar doğrudan larva veya yavru aşamasındaki bireylere verilerek gonadal gelişim yönlendirilir (Wang & Shen, 2018). Uygulamalar genellikle yeme katma, enjeksiyon veya daldırma (immersion) yoluyla gerçekleştirilir. Daldırma ve yem katkısı, çok sayıda bireye kısa sürede uygulanabilmeleri ve doz kontrolünün kolay olması nedeniyle en etkili yöntemler olarak öne çıkmaktadır (Budd & ark., 2015; Quarterman & ark., 2021).

Yapay üreme uygulamalarında hormon kullanımı, gonad gelişimi, final olgunlaşma ve ovulasyonun uyarılmasında vazgeçilmezdir. Testosteron, 17β -estradiol, $17,20$ -dihidroksi-4-pregnen-3-one (DHP) ve kortizol gibi hormonlar üreme fizyolojisinin temel düzenleyicileri arasında yer alır (Soranganba & Singh, 2018). Egzogen hormon uygulamalarıyla olgunlaşma süreci hızlandırılabilen, geciktirilebilen veya yumurtlama döneminin mevsimsel olarak kaydırılması mümkün olabilmektedir (Nelson & Habibi, 2013). Böylece üreticiler larva üretimini ekonomik olarak daha avantajlı dönemlere taşıyabilmektedir. Bu amaçla kullanılan en eski ve yaygın preparat, olgun balıklardan elde edilen hipofiz bezi ekstraktı (PE)'dir. Bunun yanında memeli (mGnRH) veya somon (sGnRH) kökenli gonadotropin salgılatıcı hormonlar (GnRH) ve analogları ile insan gonadotropinleri (GtHs) de sıklıkla tercih edilmektedir (Fontaine & ark., 2020). Günümüzde GnRH analoglarının dopamin antagonistleriyle (ör. domperidon,

metoklopramid, pimozyd) birlikte uygulanması, dopaminin gonadotropin salınımı üzerindeki baskılayıcı etkisini ortadan kaldırarak olgunlaşma oranlarını önemli ölçüde artırmaktadır. Balıklarda hormonla olgunlaştırma ve yumurtlama indüksiyonu genellikle intramüsküler veya intraperitoneal enjeksiyon yoluyla gerçekleştirilmektedir (Tapper & ark., 2020).

Bununla birlikte hormon kullanımının kontrolsüz uygulanması çevresel ve halk sağlığı bakımından ciddi riskler doğurabilmektedir. Son yıllarda yürütülen çalışmalar, farklı habitatlardan elde edilen balık dokularında steroid hormon kalıntılarının yaygın şekilde bulunduğunu göstermektedir. Yabanî populasyonlarda dahi hormon kalıntılarının tespit edilmesi, bu bileşiklerin sucul ekosistemlerde kalıcılığını ve biyolojik aktivitesinin uzun süre devam edebildiğini ortaya koymaktadır (Islam & ark., 2024). Hormon kalıntılarının uzun süreli maruziyetin endokrin sistem bozukluklarına, gelişimsel anomalilere ve kanser riskinde artışa yol açabildiği bilinmektedir. Bu nedenle FAO/WHO Ortak Uzman Komitesi (JECFA), çeşitli steroidler için kabul edilebilir günlük alım düzeyleri belirlemiştir (WHO, 1999). Mevcut çevresel, yasal ve tüketici odaklı kaygılar doğrultusunda, daha güvenli alternatif bileşiklerin geliştirilmesine yönelik araştırmalar da hız kazanmıştır.

Sonuç

Balıklarda reproduktif biyoteknoloji alanında kaydedilen gelişmeler hem akuakültür üretim verimliliğini artırmakta hem de türlerin uzun vadeli korunmasına yönelik stratejik çözümler sunmaktadır. Erkek balıklara yönelik reproduktif biyoloji çalışmalarından sperma toplama ve değerlendirme yöntemlerine, osmotik aktivasyon süreçlerinden in vitro fertilizasyon protokollerine kadar uzanan geniş bir yelpaze, modern yetiştiricilik uygulamalarının temelini oluşturmaktadır. Özellikle sperma

kriyoprezervasyonu, embriyo, oosit ve blastomerlerin dondurulması ile germ hücre kriyoprezervasyonu gibi teknikler, genetik materyalin uzun süreli saklanması imkân tanıyarak hem ekonomik açıdan değerli türlerin hem de nesli tehlike altında olan balık popülasyonlarının sürdürülebilirliğini desteklemektedir.

Germ hücre nakli teknolojileri, spermatogonyum ve oogonyum gibi olgunlaşmamış hücrelerin farklı türlere aktarılması yoluyla, alıcı gonadlarda fonksiyonel gamet üretimini mümkün kılmaktadır. Bu yöntem, yalnızca tür koruma programları için değil, aynı zamanda tek cinsiyetli üretim, genetik ıslah ve yüksek performanslı hatların devamlılığı için de kritik bir araç hâline gelmiştir.

Embriyo, oosit ve blastomer kriyoprezervasyonu hâlen membran geçirgenliği ve soğuk şok duyarlılığı gibi biyolojik sınırlamalar nedeniyle zorluklar barındırsa da uygun kriyoprotektanların seçimi, dondurma hızının optimizasyonu ve tür-spesifik protokollerin geliştirilmesiyle başarı oranları giderek artmaktadır. Bu ilerlemeler, gelecekte balık türlerinin genetik kaynaklarının çok daha güvenli ve uzun süreli biçimde saklanabilmesine olanak sağlayacaktır.

Cinsiyet belirleme, cinsiyet farklılaşması ve hormon kullanımı üzerine yapılan çalışmalar hem üretim verimliliğini artırma hem de popülasyon yönetimine katkıda bulunma açısından büyük önem taşımaktadır. Genetik, çevresel ve epigenetik mekanizmaların etkileşimiyle şekillenen cinsiyet sistemi, özellikle ardışık hermafroditlerde üretim stratejilerinin optimize edilmesine olanak vermektedir. Bununla birlikte, hormon kullanımının ekolojik ve gıda güvenliği açısından risk oluşturabileceği bilinmekte olup, kontrollü uygulamalar ile alternatif yöntemlerin geliştirilmesi önem kazanmaktadır.

Genel olarak değerlendirildiğinde, balıklarda reprodüktif biyoteknolojilerin geleceği; türler arası protokol uyarlamaları, kriyoprotektan toksisitesinin azaltılması, germ hücre biyolojisinin daha detaylı anlaşılması, gelişmiş moleküler tekniklerin (CRISPR, epigenetik analizler, transkriptomik yaklaşımlar) entegrasyonu ve çevresel etkilerin göz önünde bulundurulduğu sürdürülebilir yetiştiricilik modellerine bağlıdır. Bu çalışmaların ilerlemesiyle birlikte hem üretim kapasitesi hem de genetik çeşitlilik korunarak balık popülasyonlarının sürdürülebilir yönetimi mümkün olacaktır.

Kaynakça

Abualreesh, M. J. N., Myers, J., Gurbatow, A., Johnson, D., Xing, J., Wang, S., & Butts, I. A. (2020). Development of a spermatogonial stem cell cryopreservation protocol for blue catfish. *Cryobiology*, 97, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.010>

Abualreesh, M., Myers, J. N., Gurbatow, J., Johnson, A., Xing, D., Wang, J., ... Butts, I. A. (2021). Effects of antioxidants and antifreeze proteins on cryopreservation of blue catfish (*Ictalurus furcatus*) spermatogonia. *Aquaculture*, 531, 735966. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735966>

Adolfi, M. C., Fischer, P., Herpin, A., Regensburger, M., Kikuchi, M., Tanaka, M., & Scharl, M. (2019). Increase of cortisol levels after temperature stress activates dmrt1a causing female-to-male sex reversal and reduced germ cell number in medaka. *Molecular Reproduction and Development*, 86(11), 1405–1417. <https://doi.org/10.1002/mrd.23177>

Ahammad, M. M., Bhattacharyya, D., & Jana, B. B. (2003). Stage-dependent hatching responses of rohu (*Labeo rohita*) embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. *Cryobiology*, 46(1), 2–16. [https://doi.org/10.1016/s0011-2240\(02\)00138-4](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(02)00138-4)

Alavi, S. M. H., & Cosson, J. (2006). Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, 30(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.06.004>

Alavi, S. M. H., Barzegar-Fallah, S., Rahdar, P., Ahmadi, M. M., Yavari, M., Hatef, A., Golshan, M., & Linhart, O. (2021). A review on environmental contaminants-related fertility threat in male fishes: Effects and possible mechanisms of action learned from

wildlife and laboratory studies. *Animals*, 11(10), 2817. <https://doi.org/10.3390/ani11102817>

Alavi, S. M. H., Linhart, O., Coward, K., & Rodina, M. (2008). Fish spermatology: Implication for aquaculture management. In S. M. H. Alavi, J. Cosson, K. Coward, & G. Rafiee (Eds.), *Fish spermatology* (pp. 397–460). Oxford, UK: Alpha Science Ltd.

Alix, M., Kjesbu, O. S., & Anderson, K. C. (2020). From gametogenesis to spawning: How climate-driven warming affects teleost reproductive biology. *Journal of Fish Biology*, 97(3), 607–632. <https://doi.org/10.1111/jfb.14804>

Aramli, M. S., Sarvi Moghanlou, K., & Pourahad Anzabi, M. (2024). A brief review of the methodology and cryoprotectants in selected fish and mammalian species. *Reproduction in Domestic Animals*, 59(5), e14575. <https://doi.org/10.1111/rda.14575>

Asturiano, J. F. (2008). Different protocols for the cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm. In E. M. Cabrita, V. Robles, & P. Herraes (Eds.), *Methods in reproductive aquaculture: Marine and freshwater species* (pp. 437–442). Boca Raton, FL: CRC Press.

Avise, J. C., & Mank, J. E. (2009). Evolutionary perspectives on hermaphroditism in fishes. *Sexual Development*, 3(2–3), 152–163. <https://doi.org/10.1159/000223079>

Baroiller, J. F., D’Cotta, H., Bezault, E., Wessels, S., & Hoerstgen-Schwark, G. (2009). Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 153, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.018>

Beirão, J., & Ottesen, O. H. (2018). Optimization of a fertilization protocol for spotted wolffish (*Anarhichas minor*).

Best, C., Ikert, H., Kostyniuk, D. J., Craig, P. M., Navarro-Martin, L., Marandel, L., & Mennigen, J. A. (2018). Epigenetics in teleost fish: From molecular mechanisms to physiological phenotypes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 224, 210–244. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.01.006>

Bhat, I. A., Dar, J. Y., Ahmad, I., Mir, I. N., Bhat, H., Bhat, R. A., Sharma, R. (2021). Testicular development and spermatogenesis in fish: Insights into molecular aspects and regulation of gene expression by different exogenous factors. *Reviews in Aquaculture*, 13(4), 2142–2168. <https://doi.org/10.1111/raq.12563>

Bhattacharya, I., & Modi, D. (2021). Sex determination in teleost fish. In N. Senthilkumaran (Ed.), *Recent updates in molecular endocrinology and reproductive physiology of fish: An imperative step in aquaculture* (pp. 121–138). Singapore: Springer.

Blaxter, J. H. S. (1953). Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172(4391), 1189–1190. <https://doi.org/10.1038/1721189b0>

Bondarenko, O., Dzyuba, B., Cosson, J., Yamaner, G., Prokopchuk, G., Psenicka, M., & Linhart, O. (2013). Volume changes during the motility period of fish spermatozoa: Interspecies differences. *Theriogenology*, 79(5), 872–881. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.005>

Budd, A. M., Banh, Q. Q., Domingos, J. A., & Jerry, D. R. (2015). Sex control in fish: Approaches, challenges and opportunities for aquaculture. *Journal of Marine Science and Engineering*, 3(2), 329–355. <https://doi.org/10.3390/jmse3020329>

Butts, I. A., Trippel, E. A., & Litvak, M. K. (2009). The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture*, 286(1–2), 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.09.005>

Cabrita, E., Martínez-Páramo, S., Gavaia, P. J., Riesco, M. F., Valcarce, D. G., Sarasquete, C., ... Robles, V. (2014). Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, 432, 389–401. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.034>

Cabrita, E., Robles, V., & Herráez, P. (Eds.). (2008). Methods in reproductive aquaculture: *Marine and freshwater species*. CRC Press.

Cabrita, E., Robles, V., Chereguini, O., Wallace, J. C., & Herráez, M. P. (2003). Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos. *Cryobiology*, 47(3), 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.10.001>

Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., & Herráez, M. P. (2010). Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5), 623–635. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x>

Capel, B. (2017). Vertebrate sex determination: Evolutionary plasticity of a fundamental switch. *Nature Reviews Genetics*, 18, 675–689. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.60>

Casas, L., & Saborido-Rey, F. (2021). Environmental cues and mechanisms underpinning sex change in fish. *Sexual Development*, 15(1–3), 108–121. <https://doi.org/10.1159/000515274>

Chen, S. L., & Tian, Y. S. (2005). Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification.

Theriogenology, 63(4), 1207–1219.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.007>

Cosson, J. (2004). The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture International*, 12(1), 69–85. <https://doi.org/10.1023/b:aqui.0000017189.44263.bc>

Curzon, A. Y., Dor, L., Shirak, A., Meiri-Ashkenazi, I., Rosenfeld, H., Ron, M., & Seroussi, E. (2021). A novel c.1759T>G variant in follicle-stimulating hormone-receptor gene is concordant with male determination in the flathead grey mullet (*Mugil cephalus*). *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 11, jkaa044. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkaa044>

Curzon, A. Y., Shirak, A., Dor, L., Zak, T., Perelberg, A., Seroussi, E., & Ron, M. (2020). A duplication of the Anti-Müllerian hormone gene is associated with genetic sex determination of different *Oreochromis niloticus* strains. *Heredity*, 125, 317–327. <https://doi.org/10.1038/s41437-020-0340-x>

Dadras, H., Dzyuba, B., Cosson, J., Golpour, A., Siddique, M. A. M., & Linhart, O. (2017). Effect of water temperature on the physiology of fish spermatozoon function: A brief review. *Aquaculture Research*, 48(3), 729–740. <https://doi.org/10.1111/are.13049>

de Carvalho, A. F. S., Ramos, S. E., de Carvalho, T. S. G., de Souza, Y. C. P., Zangeronimo, M. G., Pereira, L. J., ... et al. (2014). Efficacy of fish embryo vitrification protocols in terms of embryo morphology – A systematic review. *CryoLetters*, 35, 361–370.

Diogo, P., Martins, G., Eufrazio, A., Silva, T., Cabrita, E., & Gavaia, P. (2019). Selection criteria of zebrafish male donors for sperm cryopreservation. *Zebrafish*, 16(2), 189–196. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1660>

Diogo, P., Martins, G., Quinzico, I., Nogueira, R., Gavaia, P. J., & Cabrita, E. (2018). Electric ultrafreezer (−150 °C) as an alternative for zebrafish sperm cryopreservation and storage. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(6), 1443–1455. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0500-6>

Diwan, A. D., Harke, S. N., Gopalkrishna, & Panche, A. N. (2020). Cryobanking of fish and shellfish egg, embryos and larvae: An overview. *Frontiers in Marine Science*, 7, 251. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00251>

Dougherty, L. R., Skirrow, M. J., Jennions, M. D., & Simmons, L. W. (2022). Male alternative reproductive tactics and sperm competition: A meta-analysis. *Biological Reviews*, 97(4), 1365–1388. <https://doi.org/10.1111/brv.12846>

Dzyuba, V., Shelton, W. L., Kholodnyy, V., Boryshpolets, S., Cosson, J., & Dzyuba, B. (2019). Fish sperm biology in relation to urogenital system structure. *Theriogenology*, 132, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.04.020>

Edashige, K., Yamaji, Y., Kleinhans, F. W., Kasai, M., Tada, N., & Kuwabara, S. (2006). Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos are difficult to cryopreserve by vitrification. *Cryobiology*, 53(1), 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.04.002>

Erisman, B. E., Craig, M. T., & Hastings, P. A. (2009). A phylogenetic test of the size-advantage model: Evolutionary changes in mating behavior influence the loss of sex change in a fish lineage. *The American Naturalist*, 174(3), E83–E99. <https://doi.org/10.1086/603611>

Fang, J., Li, G., Luo, W., & Hu, Q. (2025). Understanding genetic regulation of sex differentiation in hermaphroditic fish. *Animals*, 15(2), 119. <https://doi.org/10.3390/ani15020119>

FAO. (2024). FAO report: Global fisheries and aquaculture production reaches a new record high. FAORAP. Retrieved October 22, 2025, from <https://www.fao.org/asiapacific/news/news-detail/FAO-Report-Global-fisheries-and-aquaculture-production-reaches-a-new-record-high/en>

Fatriani, R., Arifin, O. Z., & Kristanto, A. H. (2020, February). Sperm motility of kancra fish (Tor soro, Valenciennes 1842) after frozen: The effect of soybean milk as a natural cryoprotectant. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science* (Vol. 441, No. 1, p. 012066). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/441/1/012066>

Fauvel, C., Boryshpolets, S., Cosson, J., Wilson Leedy, J. G., Labbé, C., Haffray, P., & Suquet, M. (2012). Improvement of chilled seabass sperm conservation using a cell culture medium. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(6), 961–966. <https://doi.org/10.1111/jai.12071>

Fontaine, R., Royan, M. R., Von Krogh, K., Weltzien, F. A., & Baker, D. M. (2020). Direct and indirect effects of sex steroids on gonadotrope cell plasticity in the teleost fish pituitary. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 605068. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.605068>

Franěk, R., Tichopád, T., Steinbach, C., Xie, X., Lujić, J., Marinović, Z., ... et al. (2019). Preservation of female genetic resources of common carp through oogonial stem cell manipulation. *Cryobiology*, 87, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.01.016>

Gallego, V., & Asturiano, J. F. (2019). Fish sperm motility assessment as a tool for aquaculture research: A historical approach. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), 697–724. <https://doi.org/10.1111/raq.12253>

Ganesan, N., & Moulali, S. (2025). Recent advances in fish genetics and biotechnology. In *Innovations in Biomedical Engineering* (pp. 387–410). *Springer*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-30146-9.00012-5>

Geffroy, B., & Wedekind, C. (2020). Effects of global warming on sex ratios in fishes. *Journal of Fish Biology*, 97(3), 596–606. <https://doi.org/10.1111/jfb.14429>

Geffroy, B., Gesto, M., Clota, F., Aerts, J., Darias, M. J., Blanc, M. O., ... & Vandeputte, M. (2021). Parental selection for growth and early-life low stocking density increase the female-to-male ratio in European sea bass. *Scientific Reports*, 11(1), 13620. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93116-9>

Gemmell, N. J., Todd, E. V., Goikoetxea, A., Ortega-Recalde, O., & Hore, T. A. (2019). Natural sex change in fish. *Current Topics in Developmental Biology*, 134, 71–117. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.12.014>

Godwin, J. (2009, May). Social determination of sex in reef fishes. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 20, No. 3, pp. 264–270). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2008.12.003>

Golshahi, K., Aramli, M. S., Nazari, R. M., & Habibi, E. (2018). Disaccharide supplementation of extenders is an effective means of improving the cryopreservation of semen in sturgeon. *Aquaculture*, 486, 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.045>

Guedes-Alonso, R., Montesdeoca-Esponda, S., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodríguez, J. J. (2014). Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 3, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2014.10.001>

Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). Guyton and Hall textbook of medical physiology (12th ed.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4160-5451-1.00089-x>

Hagedorn, M., & Carter, V. L. (2011). Zebrafish reproduction: Revisiting in vitro fertilization to increase sperm cryopreservation success. *PLoS ONE*, 6(6), e21059. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021059>

Hammes, S. R., & Levin, E. R. (2019). Impact of estrogens in males and androgens in females. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(5), 1818–1826. <https://doi.org/10.1172/jci125755>

Hayashi, Y., Kobira, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, E., Yazawa, T., Hirai, T., Kamei, Y., & Kitano, T. (2010). High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. *Molecular Reproduction and Development*, 77(8), 679–686. <https://doi.org/10.1002/mrd.21203>

Herranz-Jusado, J. G., Gallego, V., Rozenfeld, C., Morini, M. A., Pérez, L., & Asturiano, J. F. (2019). European eel sperm storage: Optimization of short-term protocols and cryopreservation of large volumes. *Aquaculture*, 506, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.019>

Herrera, F., Bondarenko, O., & Boryshpolets, S. (2021). Osmoregulation in fish sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*, 47(3), 785–795. <https://doi.org/10.1007/s10695-021-00958-1>

Higaki, S., Eto, Y., Kawakami, Y., Yamaha, E., & Yoshizaki, G. (2010). Cryopreservation of primordial germ cells by rapid cooling of whole zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 56(2), 212–218. <https://doi.org/10.1262/jrd.09-136E>

Irawan, H., Vuthiphandchai, V., & Nimrat, S. (2010). The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods

on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Animal Reproduction Science*, 122(3–4), 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.017>

Isayeva, A., Zhang, T., & Rawson, D. M. (2004). Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *Cryobiology*, 49(2), 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.05.005>

Islam, P., Hossain, M. I., Khatun, P., Masud, R. I., Tasnim, S., Anjum, M., ... & Islam, M. A. (2024). Steroid hormones in fish, caution for present and future: *A review. Toxicology Reports*, 13, 101733. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2024.101733>

Iwasaki-Takahashi, Y., Shikina, S., Watanabe, M., Banba, A., Yagisawa, M., Takahashi, K., ... & Yoshizaki, G. (2020). Production of functional eggs and sperm from in vitro-expanded type A spermatogonia in rainbow trout. *Communications Biology*, 3(1), 308. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1025-y>

Kanyilmaz, M., & İnanan, B. E. (2020). DNA damage, oxidative stress, decreased viability and motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa induced by tryptophan, phenylalanine and cysteine amino acids during short-term storage. *Turkish Journal of Zoology*, 44(3), 281–290. <https://doi.org/10.3906/zoo-1910-34>

Keivanloo, S., Akhoundzadeh, M. A., Nazari, R. M., Naghavi, M. R., Shabani, S., & Mohseni, M. (2016). Cryopreservation of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) embryos using dimethyl sulfoxide-based vitrification solutions. *Theriogenology*, 85(5), 907–914. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.012>

Kodzik, N., Ciereszko, A., Judycka, S., Słowińska, M., Szczepkowska, B., Świdarska, B., & Dietrich, M. A. (2024). Cryoprotectant-specific alterations in the proteome of Siberian

sturgeon spermatozoa induced by cryopreservation. *Scientific Reports*, 14(1), 17707. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-68395-7>

Koumpiadis, P., Sganga, D. E., Politis, S. N., Gallego, V., Butts, I. A., Asturiano, J. F., ... & Tomkiewicz, J. (2021). Sperm production and quality in European eel (*Anguilla anguilla*) in relation to hormonal treatment. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(12), 1497–1505. <https://doi.org/10.1111/rda.14011>

Krasilnikova, A., Rodina, M., Gela, D., Sotnikov, A., & Pšenička, M. (2025). Exploring cryomedium with hypotonic extender for sturgeon sperm cryopreservation. *Aquaculture*, 605, 742497. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2025.742497>

Kusuda, S., Teranishi, T., & Koide, N. (2002). Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. *Cryobiology*, 45(1), 60–67. [https://doi.org/10.1016/s0011-2240\(02\)00106-2](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(02)00106-2)

Kusuda, S., Teranishi, T., Koide, N., Nagai, T., Arai, K., & Yamaha, E. (2004). Pluripotency of cryopreserved blastomeres of the goldfish. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 301(2), 131–138. <https://doi.org/10.1002/jez.a.20017>

Kvarnemo, C., Green, L., Svensson, O., Lindström, K., Schöld, S., Grifful-Dones, M., ... & Leder, E. H. (2023). Molecular, behavioural and morphological comparisons of sperm adaptations in a fish with alternative reproductive tactics. *Evolutionary Applications*, 16(2), 338–353. <https://doi.org/10.1111/eva.13438>

Lacerda, S. M. S. N., Costa, G. M. J., Campos-Junior, P. H. A., et al. (2013). Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39, 3–11. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9606-4>

Lakra, W. S., & Ayyappan, S. (2003). Recent advances in biotechnology applications to aquaculture. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16(3), 455–462. <https://doi.org/10.5713/ajas.2003.455>

Lakra, W. S., Goswami, M., & Trudeau, V. L. (Eds.). (2022). *Frontiers in aquaculture biotechnology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/c2020-0-04477-4>

Lamm, M. S., Liu, H., Gemmell, N. J., & Godwin, J. R. (2015). The need for speed: Neuroendocrine regulation of socially-controlled sex change. *Integrative and Comparative Biology*, 55(2), 307–322. <https://doi.org/10.1093/icb/icv041>

Lee, S., Bang, W. Y., Yang, H. S., Lee, D. S., & Song, H. Y. (2021). Production of juvenile masu salmon (*Oncorhynchus masou*) from spermatogonia-derived sperm and oogonia-derived eggs via intraperitoneal transplantation of immature germ cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 535, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.12.021>

Lee, S., Iwasaki, Y., & Yoshizaki, G. (2016). Long-term (5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids. *Cryobiology*, 73(2), 286–290. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.08.001>

Lee, S., Katayama, N., & Yoshizaki, G. (2016). Generation of juvenile rainbow trout derived from cryopreserved whole ovaries by intraperitoneal transplantation of ovarian germ cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(3), 1478–1483. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.156>

Linhart, O., Gela, D., Rodina, M., & Kocour, M. (2004). Optimization of artificial propagation in European catfish, *Silurus*

glanis L. *Aquaculture*, 235(1–4), 619–632.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.031>

Malinovskiy, O., Policar, T., Rahimnejad, S., Křišťan, J., Dzyuba, B., Blecha, M., & Boryshpolets, S. (2021). Multiple sperm collection as an effective solution for gamete management in pikeperch (*Sander lucioperca*). *Aquaculture*, 530, 735870.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735870>

Marshall Graves, J. A. (2013). How to evolve new vertebrate sex determining genes. *Developmental Dynamics*, 242, 354–359.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.23887>

Martínez-Páramo, S., Horváth, Á., Labbé, C., Zhang, T., Robles, V., Herráez, P., ... & Cabrita, E. (2017). *Cryobanking of aquatic species*. *Aquaculture*, 472, 156–177.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042>

Matsuda, M., & Sakaizumi, M. (2016). Evolution of the sex-determining gene in the teleostean genus *Oryzias*. *General and Comparative Endocrinology*, 239, 80–88.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.10.004>

Merino, O., Risopatron, J., Valdebenito, I., Figueroa, E., & Farias, J. G. (2023). Effect of the temperature of activation medium on fish sperm quality: Impact on fertilization in vitro in aquaculture practice. *Reviews in Aquaculture*, 15(2), 434–451.
<https://doi.org/10.1111/raq.12729>

Miura, T., & Miura, C. I. (2003). Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1), 181–186.
<https://doi.org/10.1023/b:fish.0000030522.71779.47>

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., & Nagahama, Y. (1992). The role of hormones in the acquisition of sperm motility in

salmonid fish. *Journal of Experimental Zoology*, 261(3), 359–363.
<https://doi.org/10.1002/jez.1402610316>

Montague, H. R., Hess, H. N., Tackett, V. M., Britt, S. L., Lawson, L. L., Aguilar, G. L., ... & Butts, I. A. (2023). In vitro fertilization with frozen-thawed blue catfish (*Ictalurus furcatus*) sperm and implications for gene banking. *Aquaculture*, 574, 739611.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739611>

Morisawa, M., & Suzuki, K. (1980). Osmolality and potassium ion: Their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*, 210(4474), 1145–1147.
<https://doi.org/10.1126/science.7444445>

Morita, M., Takemura, A., & Okuno, M. (2003). Requirement of Ca^{2+} on activation of sperm motility in euryhaline tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Biology*, 206(5), 913–921. <https://doi.org/10.1242/jeb.00153>

Muchlisin, Z. A. (2005). Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. *Biodiversitas*, 6(1), 66–69. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d060114>

Muchlisin, Z. A., Aldila, D. F., Sarah, P. I., Eriani, K., Hasri, I., Fadli, N., ... & Kocabas, M. (2024). Effect of sperm extender and dilution ratio on the sperm motility, fertility, and hatching rates of depik fish *Rasbora tawarensis* (Pisces: Cyprinidae) eggs. *Macedonian Veterinary Review*, 47(2), 101–110.
<https://doi.org/10.2478/macvetrev-2024-0022>

Muchlisin, Z. A., Nadiyah, W. N., Nadiya, N., Fadli, N., Hendri, A., Khalil, M., & Siti-Azizah, M. N. (2015). Exploration of natural cryoprotectants for cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell 1822 (Pisces: Clariidae) spermatozoa. *Aquaculture Research*, 46(5), 1013–1021.
<https://doi.org/10.17221/7906-cjas>

Mylonas, C. C., Fostier, A., & Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 516–534. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.007>

Nagahama, Y., Chakraborty, T., Paul-Prasanth, B., Ohta, K., & Nakamura, M. (2021). Sex determination, gonadal sex differentiation, and plasticity in vertebrate species. *Physiological Reviews*, 101(1), 1–46. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2019>

Nelson, E. R., & Habibi, H. R. (2013). Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 192, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.032>

Nilsson, E., & Cloud, J. G. (1993). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres. *Aquatic Living Resources*, 6(1), 77–80. <https://doi.org/10.1051/alr:1993009>

Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., & França, L. R. (2009). An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1), 197–206. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9252-z>

Octavera, A., & Yoshizaki, G. (2020). Production of Chinese rosy bitterling offspring derived from frozen and vitrified whole testis by spermatogonial transplantation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 46(4), 1431–1442. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00802-y>

Oda, S., & Morisawa, M. (1993). Rises of intracellular Ca^{2+} and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleosts. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 25(2), 171–178. <https://doi.org/10.1002/cm.970250206>

Ozaki, Y., Higuchi, M., Miura, C., Yamaguchi, S., Tozawa, Y., & Miura, T. (2006). Roles of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in fish spermatogenesis. *Endocrinology*, 147(11), 5139–5146. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0391>

Parenti, L. R., & Grier, H. J. (2004). Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integrative and Comparative Biology*, 44(5), 333–348. <https://doi.org/10.1093/icb/44.5.333>

Pecio, A. (2019). Testis structure, spermatogenesis, and spermatozoa in teleost fishes. In *The histology of fishes* (pp. 177–206). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429113581-12>

Qin, W., Pan, J., Xiao, J., & Feng, H. (2025). Current progress of the long-term preservation for fish embryos, female reproductive cells, and tissues. *Reviews in Aquaculture*, 17(4), e70057. <https://doi.org/10.1111/raq.70057>

Quarterman, J. C., Geary, S. M., & Salem, A. K. (2021). Evolution of drug-eluting biomedical implants for sustained drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 159, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.12.005>

Rosengrave, P., Gemmell, N. J., Metcalf, V., McBride, K., & Montgomerie, R. (2008). A mechanism for cryptic female choice in chinook salmon. *Behavioral Ecology*, 19(6), 1179–1185. <https://doi.org/10.1093/beheco/arn089>

Rosenthal, H., Klumpp, D., & Willführ, J. (1988). Influence of sperm density and contact time on herring egg fertilization. *Journal of Applied Ichthyology*, 4(2), 79–86. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1988.tb00470.x>

Ruan, Q., Yang, S., Hua, S., Zhang, W., Li, D., Yang, Y., ... & Meng, Z. (2024). Supplementation of extender with melatonin

improves the motility, mitochondrial membrane potential, and fertilization ability of cryopreserved brown-marbled grouper sperm. *Animals*, 14(7), 995. <https://doi.org/10.3390/ani14070995>

Rurangwa, E., Roelants, I., Huyskens, G., Ebrahimi, M., Kime, D. E., & Ollevier, F. (1998). The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. *Journal of Fish Biology*, 53(2), 402–413. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb00989.x>

Ryu, J. H., Xu, L., & Wong, T. T. (2022). Advantages, factors, obstacles, potential solutions, and recent advances of fish germ cell transplantation for aquaculture—A practical review. *Animals*, 12(4), 423. <https://doi.org/10.3390/ani12040423>

Sadeghi, A., & Imanpoor, M. R. (2013). Effects of use of combinations of permeating cryoprotectant (MeOH, DMSO) and non-permeating cryoprotectant (BSA) on viability of Beluga (*Huso huso*) post-thawed sperm. *Cryobiology*, 67(2), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.02.001>

Sarosiek, B., Dryl, K., Krejszeff, S., & Źarski, D. (2016). Characterization of pikeperch (*Sander lucioperca*) milt collected with a syringe and a catheter. *Aquaculture*, 450, 14–16. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.040>

Schulz, R. W., & Miura, T. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(1), 43–56. <https://doi.org/10.1023/a:1023303427191>

Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 390–411. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013>

Sekido, R., & Lovell-Badge, R. (2012). Genetic control of testis development. *Sexual Development*, 7(1–3), 21–32. <https://doi.org/10.1159/000342221>

Shaliutina-Loginova, A., & Loginov, D. S. (2023). Oxidative stress and DNA fragmentation in frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio*) sperm with and without supplemental proteins. *Animal Reproduction Science*, 251, 107213. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107213>

Shaliutina, A., Hulak, M., Gazo, I., Linhartova, P., & Linhart, O. (2013). Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm. *Animal Reproduction Science*, 139(1–4), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.006>

Shazada, N. E., Alavi, S. M. H., Siddique, M. A. M., Cheng, Y., Zhang, S., Rodina, M., ... & Linhart, O. (2024). Short-term storage of sperm in common carp from laboratory research to commercial production—A review. *Reviews in Aquaculture*, 16(1), 174–189. <https://doi.org/10.1111/raq.12827>

Shazada, N. E., Siddique, M. A. M., Zhang, S., Ma, Z., Rodina, M., & Linhart, O. (2025). Effect of appropriate extenders to maintain sperm functionality during short-term storage of sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm with fertilization assay under hatchery conditions. *Fish Physiology and Biochemistry*, 51(1), 14. <https://doi.org/10.1007/s10695-024-01413-7>

Silakes, S., & Bart, A. N. (2010). Ultrasound enhanced permeation of methanol into zebrafish, *Danio rerio*, embryos. *Aquaculture*, 303(1–4), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.018>

Siva, C. (2021). Cryopreservation and its application in aquaculture. *In Animal Reproduction*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99629>

Soranganba, N., & Singh, I. J. (2018). Simultaneous determination of fish steroidal hormones using RP-HPLC with UV detection by multi-step gradient elution technique. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(2), 1397–1404. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2018.702.168>

Streit, D. P., Zhang, T., & Rosendo, E. P. (Eds.). (2024). Cryobiology for South American Neotropical Fish Species. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003269441>

Strüssmann, C. A., Nakatsugawa, H., Takashima, F., Hasobe, M., Suzuki, T., & Takai, R. (1999). Cryopreservation of isolated fish blastomeres: effects of cell stage, cryoprotectant concentration, and cooling rate on postthawing survival. *Cryobiology*, 39(3), 252–262. <https://doi.org/10.1006/cryo.1999.2208>

Sun, C., Huang, C., Su, X., Zhao, X., & Dong, Q. (2010). Optimization of handling and refrigerated storage of guppy *Poecilia reticulata* sperm. *Journal of Fish Biology*, 77(1), 54–66. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02658.x>

Tapper, M. A., Kolanczyk, R. C., LaLone, C. A., Denny, J. S., & Ankley, G. T. (2020). Conversion of estrone to 17 β -estradiol: A potential confounding factor in assessing risks of environmental estrogens to fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(10), 2028–2040. <https://doi.org/10.1002/etc.4828>

Taranger, G. L., Carrillo, M., Schulz, R. W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., ... & Hansen, T. (2010). Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 483–515. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.004>

Taslima, K., Khan, M. G. Q., McAndrew, B. J., & Penman, D. J. (2021). Evidence of two XX/XY sex-determining loci in the Stirling stock of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 532, 735995. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735995>

Thomas, J. T., Liu, H., Todd, E. V., & Gemmell, N. J. (2018). Sex change in fish. *Journal of Fish Biology*, 93(2), 187–205. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20555-4>

Thomas, P. C. (2003). Breeding and seed production of fin fish and shell fish. Daya Books.

Tiersch, T. R. (2006). Fish sperm cryopreservation for genetic improvement and conservation in Southeast Asia. Secretariat, Southeast Asian Fisheries Development Center.

Tsai, S., & Lin, C. (2012). Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55, 425–434. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132012000300014>

Uribe, M. C., Grier, H. J., & Mejía-Roa, V. (2014). Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis*, 4(3), e983400. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.983400>

Valdivieso, A., Anastasiadi, D., Ribas, L., & Piferrer, F. (2023). Development of epigenetic biomarkers for the identification of sex and thermal stress in fish using DNA methylation analysis and machine learning procedures. *Molecular Ecology Resources*, 23(2), 453–470. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13725>

Viveiros, A. T. M., & Komen, J. (2008). Semen cryopreservation of the African catfish, *Clarias gariepinus*. In *Methods in Reproductive Aquaculture* (pp. 425–430). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780849380549-33>

Vuthiphandchai, V., Wilairattanadilok, K., Chomphuthawach, S., Sooksawat, T., & Nimrat, S. (2015). Sperm cryopreservation of silver barb (*Barbodes gonionotus*): cryoprotectants, cooling rate and storage time on sperm quality. *Aquaculture Research*, 46(10), 2443–2451. <https://doi.org/10.1111/are.12396>

Wang, H. P., & Shen, Z. G. (2018). Theoretical and practical bases of sex control in aquaculture. In *Sex Control in Aquaculture: Concept to Practice* (pp. 1–34). <https://doi.org/10.1002/9781119127291.ch1>

World Health Organization. (1999). Evaluation of certain veterinary drug residues in food. In *Evaluation of certain veterinary drug residues in food*.

Yildiz, C., Bozkurt, Y., & Yavas, I. (2013). An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology*, 67(1), 91–94. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.05.008>

Yoshizaki, G., & Lee, S. (2018). Production of live fish derived from frozen germ cells via germ cell transplantation. *Stem Cell Research*, 29, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.03.015>

Yoshizaki, G., & Yazawa, R. (2019). Application of surrogate broodstock technology in aquaculture. *Fisheries Science*, 85(3), 429–437. <https://doi.org/10.1007/s12562-019-01299-y>

Yoshizaki, G., Ichikawa, M., Hayashi, M., Iwasaki, Y., Miwa, M., Shikina, S., & Okutsu, T. (2010). Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development*, 137(8), 1227–1230. <https://doi.org/10.1242/dev.044982>

Zhang, X. S., Zhao, L., Hua, T. C., Chen, X. H., & Zhu, H. Y. (1989). A study on the cryopreservation of common carp, *Cyprinus carpio*, embryos. *Cryo-Letters*, 10, 271–278.

Zhu, M., Sumana, S. L., Abdullateef, M. M., Falayi, O. C., Shui, Y., Zhang, C., ... & Su, S. (2024). CRISPR/Cas9 technology for enhancing desirable traits of fish species in aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(17), 9299. <https://doi.org/10.3390/ijms25179299>

Zhu, Z., Yao, J., Zeng, L., Feng, K., Zhou, C., Liu, H., ... & Xu, H. (2025). Developing efficient methods of sperm cryopreservation for three fish species (*Cyprinus carpio* L., *Schizothorax prenanti*, *Glyptosternum maculatum*). *International Journal of Molecular Sciences*, 26(10), 4648. <https://doi.org/10.3390/ijms26104648>

Zilli, L., Beirão, J., Schiavone, R., Herraéz, M. P., Cabrita, E., Storelli, C., & Vilella, S. (2011). Aquaporin inhibition changes protein phosphorylation pattern following sperm motility activation in fish. *Theriogenology*, 76(4), 737–744. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.006>

Zohar, Y. (2021). Fish reproductive biology—Reflecting on five decades of fundamental and translational research. *General and Comparative Endocrinology*, 300, 113544. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113544>

VETERİNER HEKİMLİĞİNDE REPRODÜKTİF BİYOTEKNOLOJİLER

