VETERİNER ANDROLOJİDE SPERMATOZOON EMBRİYO VE İN VİTRO FERTİLİZASYON

Editör: Prof. Dr. Ayhan ATA



BİDGE Yayınları

BİDGE Yayınları

Veteriner Androlojide Spermatozoon Embriyo ve in Vitro Fertilizasyon

Editör: Prof. Dr. Ayhan ATA

ISBN: 978-625-5474-05-6

1. Baskı
Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL
Yayınlama Tarihi: 2026-09-29
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

Sığırlarda İn-vitro Fertilizasyon 1
HASAN ALİ ÇAY, AYHAN ATA

Akış Sitometrisi ve Veteriner Reprodüksiyon Alanında Kullanımı 49
RAMAZAN ARSLAN, HASAN ALİ ÇAY, AYHAN ATA

Veteriner Androloji Alanında Bilgisayar Destekli Sperma Analizi 106
RAMAZAN ARSLAN, HASAN ALİ ÇAY, AYHAN ATA

Yardımcı Üreme Tekniklerinde Sperm Ayırma ve Seçme Yöntemlerinin Tek Katmanlı Santrifüj Tekniği ile Karşılaştırılması 154
AHMET CİHAD GÖK, AYHAN ATA

BÖLÜM 1

SIĞIRLARDA İN-VİTRO FERTİLİZASYON

[1] HASAN ALİ ÇAY
[2] AYHAN ATA

Giriş

Dünya nüfusunun sürekli artması ve buna bağlı olarak hayvansal protein kaynaklarına olan talebin yükselmesi, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde hayvancılık sektöründe verimliliğin artırılmasına yönelik genetik ıslah programlarının önemini daha da artırmıştır. Bu doğrultuda, genetik değeri yüksek damızlık hayvanlardan maksimum düzeyde yararlanılmasını sağlayan reprodüktif biyoteknolojik yöntemler, modern hayvancılıkta sürdürülebilir üretimin temel bileşenlerinden biri hâline gelmiştir (FAO, 2023; IETS, 2024). Özellikle son otuz yılda üremeye yardımcı tekniklerde (ÜYT) kaydedilen önemli ilerlemeler, üstün genetik özelliklere sahip hayvanların daha kısa sürede çoğaltılmasına olanak sağlamış ve uluslararası damızlık hayvan ticaretinde embriyo üretiminin hızla gelişmesine katkıda

[1] Öğr. Gör. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 0000-0003-1622-2719.
[2] Prof. Dr. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 0000-0003-0590-5995.

bulunmuştur (Hansen, 2020). Hayvancılık sektöründe en yaygın kullanılan reprodüktif biyoteknolojik yöntem olan suni tohumlama, üstün genetik özelliklere sahip erkek damızlıkların genetik materyal olarak kullanımı arttırarak geniş popülasyonlara kısa sürede aktarılmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte, dişi hayvanların biyolojik olarak sınırlı ovulasyon kapasitesi nedeniyle genetik potansiyellerinden aynı düzeyde yararlanılamamaktadır. Bu sınırlılığın aşılabilmesi amacıyla embriyo üretimi ve embriyo transferi gibi ileri üreme biyoteknolojileri geliştirilmiş ve üstün genetik değere sahip dişi hayvanlardan çok sayıda yavru elde edilmesi mümkün hâle gelmiştir (Hasler, 2014; Hansen, 2020). Embriyo transfer programı çerçevesinde bir yılda verici bir inekten ortalama 20 yavru elde edilebilmektedir (Berglund, 2008).

Embriyo üretimine yönelik ilk uygulamalar, çoklu ovulasyon ve embriyo transferi (Multiple Ovulation and Embryo Transfer-MOET) programlarına dayanmaktadır. Bu yöntemde donör hayvanlara gonadotropin uygulamaları ile süperfolikülasyon ve süper ovulasyon oluşturulmakta, *in vivo* olarak döllenme gerçekleşmekte ve gelişen embriyolar uygun dönemde uterusun yıkanması (uterine flushing) yöntemiyle toplanmaktadır (Jainudeen ve ark., 2000;). MOET teknolojisi uzun yıllar embriyo transfer programlarının temelini oluşturmuş olsa da son yıllarda *in vitro* embriyo üretim (In Vitro Embryo Production- IVEP) sistemlerinin gelişmesiyle birlikte embriyo üretiminde önemli dönüşüm yaşanmaktadır. 2015'te *in vitro* üretilen embriyoların sayısı, transfer edilebilir *in vivo* üretilen embriyoların sayısını geçmiştir. Bu eğilim, sperma ve embriyo üreticileri arasında geleneksel MOET'ten IVP'ye doğru bir kayma olduğunu göstermektedir. Bu üremeye yardımcı tekniklerin ticari alanda başarılı olduğu kanıtlanmış ve gün geçtikçe pazar payı artmıştır. Veteriner Hekimler ve büyükbaş hayvan üreticilerine üreme performansı, verimlilik ve genetik kazanım noktasında önemli bir rol almaya başlamıştır (Ferré et al. 2020).

İn vitro embriyo üretim teknolojisi, yalnızca üstün genetik özelliklere sahip boğaların değil, aynı zamanda yüksek genetik değere sahip dişi hayvanların da genetik ilerlemeye etkin şekilde katkı sağlamasına olanak tanımaktadır. Doğal koşullarda bir inekten yılda yalnızca bir buzağı elde edilebilirken, IVEP uygulamaları sayesinde aynı donörden yıl içerisinde çok sayıda oosit toplanabilmekte ve bunlardan çok sayıda embriyo üretilebilmektedir. Böylece damızlık hayvanların genetik potansiyelinden maksimum düzeyde yararlanılarak seleksiyon aralığı kısaltılmakta ve genetik ilerleme hızı önemli ölçüde artırılmaktadır (Granleese ve ark, 2015; Hansen, 2020).

Günümüzde sığırlarda *in vitro* embriyo üretimi, mezbahadan temin edilen ovaryumlardan elde edilen oositlerin yanı sıra, genetik değeri yüksek canlı donörlerden ultrasonografi eşliğinde gerçekleştirilen ovum pick-up (OPU) yöntemi ile toplanan oositler kullanılarak rutin olarak uygulanmaktadır. OPU-IVEP teknolojisi, donör hayvanın gebelik durumundan bağımsız olarak belirli aralıklarla tekrar edilebilmesi, genç veya fertilite problemi bulunan hayvanlardan oosit elde edilebilmesi ve genomik seleksiyon programlarıyla bütünleşmiş şekilde kullanılabilmesi nedeniyle günümüzde sığır yetiştiriciliğinde en hızlı gelişen biyoteknolojik uygulamalardan biri olarak kabul edilmektedir (Ponsart et al. 2013; Hansen, 2020; Viana, 2024). Son yıllarda kültür sistemleri, oosit maturasyon protokolleri, fertilizasyon teknikleri ve embriyo kriyoprezervasyon yöntemlerinde sağlanan gelişmeler sayesinde *in vitro* üretilen embriyoların gebelik başarısı sürekli artmakta ve ticari embriyo üretiminde *in vivo* embriyo üretimini birçok ülkede geride bırakmaktadır (Viana, 2024).

Suni tohumlama, değerli babaların genetiğini yaymanın etkili bir yolu olsa da embriyo biyoteknolojilerinin uygulanmasıyla dişi genetiği de dünya çapında yayılmasını sağlamaktadır (Wrenzycki, 2018). Avrupa'daki birçok suni tohumlama merkezi, üstün genetik

değere sahip damızlık hayvanların çoğaltılmasında birincil yöntem olarak OPU–IVEP teknolojisini kullanmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde ise OPU-IVEP kombinasyonu 1990'lı yılların sonlarından itibaren ticari ölçekte uygulanmaya başlanmıştır. İlk dönemlerde bu teknoloji, çoğunlukla MOET yöntemiyle çeşitli nedenlerle canlı embriyo elde edilemeyen veya düşük yanıt veren donörlerden embriyo üretmek amacıyla kullanılmıştır. Ancak *in vitro* embriyo üretim tekniklerinde kaydedilen önemli gelişmeler, OPU-IVEP sisteminin etkinliğini ve başarı oranını artırmış, böylece yöntem yalnızca problemli donörler için kullanılan alternatif bir uygulama olmaktan çıkıp üstün genetik özelliklere sahip hayvanların çoğaltılmasında rutin olarak tercih edilen bir biyoteknoloji hâline gelmiştir. Günümüzde embriyo üretimi yapan birçok ülkede OPU-IVEP teknolojisi ticari embriyo transfer programlarının temel bileşenlerinden biri olarak kullanılmakta ve üreme biyoteknolojileri içerisinde giderek daha fazla önem kazanmaktadır (Ferré ve ark., 2020).

2024 yılı Uluslararası Embriyo Transfer Topluluğu (The International Embryo Transfer Society-IETS) verilerine göre sığırlarda *in vitro* üretilen (*In Vitro* Production-IVP) embriyo sayısı %8,1 artarak ilk kez iki milyonu aşmıştır. Diğer yandan, toplanan *in vivo* elde edilen (*In Vivo* Derived-IVD) embriyo sayısı 2023'e kıyasla %20,1 azalmıştır ve şu anda sığırlardaki genel embriyo faaliyetinin %13'ünden daha azını oluşturmaktadır (Viana, 2024).

Şekil 1. Bölgelere göre 2024 yılında sığır, koyun, keçi ve atlarda IVD ve IVP embriyolarının toplam üretim sayıları (transfer edilebilir embriyolar).

Bölge	Sığır		At		Koyun		Keçi	
	IVD	IVP	IVD	IVP	IVD	IVP	IVD	IVP
Afrika	0	8,697	0	0	0	0	0	0
Asya	18,242	34,082	0	0	0	41,248	0	580
Avrupa	113,136	58,404	942	6,083	227	62	656	0
Kuzey Amerika	126,389	1,162,338	439	634	19,432	991	9,932	4,732
Okyanusya	11,074	51,209	0	0	10,523	0	1,328	0
Güney Amerika	27,679	714,277	23,614	9,15	12,212	215	73	0
2024 Toplam	296,52	2,029,007	24,995	15,867	42,394	42,516	11,989	5,312
2023 Toplam	371,138	1,876,591	25,703	16,369	76,084	20,785	15,893	8,568
% Değişim	-20.1	+8.1	-2.8	-3.1	-44.3	+104.6	-24.6	-38.0

Viana, 2024

İn vitro Embriyo Üretimi (IVEP)

Latince'de *in vitro*, "camda" anlamına gelir ve *in vitro* maturasyon (IVM), *in vitro* fertilizasyon (IVF) ve *in vitro* kültürü (IVC) de içeren laboratuvar ortamında embriyo üretme süreci için sıklıkla kullanılan genel bir terimdir. IVF işlemi dişi gamet hücresi olan oositlerin mature edilmesi ve erkek gamet hücresi olan spermatozoonların kapasitasyon işlemine tabi tutularak laboratuvar ortamında döllenmesi işlemidir. IVF aşamaları; oositlerin toplanması, oositlerin kalite değerlendirmesi, immatür oositlerin maturasyona alınması, spermatozoon kapasitasyonu, kapasite edilen spermatozoonlar ile mature oositlerin fertilizasyonu, embriyo denüdasyonu (soyma), embriyoların *in vitro* kültür aşaması ve oluşan embriyoların transferi veya dondurularak saklanması aşamalarını kapsamaktadır (Hasler & Barfield, 2021). IVP prosedürü

en iyi sığırlarda geliştirilmiştir ve en çok üretimin yapıldığı türdür (Wrenzycki, 2018; Viana, 2020)

Bir IVP laboratuvarının başarısı, yalnızca embriyoların kültür aşamasındaki gelişimleri değil, tüm IVP sisteminden kaynaklanmaktadır. İkincisi, inkübasyon koşullarını, gaz fazını, kültür ortamını, yağ kaplaması, plastik eşyayı ve embriyo yoğunluğunu ve ortamın hacmini içerir. Ayrıca tüm süreçte yer alan personelin becerileri sistemin başarısı için kritik öneme sahiptir (Baltz, 2012; Gardner, 2008; Leese, 2012).

IVEP teknolojisinin sunduğu başlıca avantajlar, birim zaman başına daha fazla sayıda embriyo ve gebelik ve oositlerin alınabileceği daha geniş bir dişi donör yelpazesini (3 aya kadar gebe dişilerden de embriyo elde edilebilmekte) içerir. Genomik buzağılar, embriyo üretmek için gereken spermatozoon sayısının azalması ve yavruların istenen cinsiyette elde etme şansı IVEP teknolojisinin bir diğer avantajlarıdır (Ferré et al. 2020).

Sonuç olarak, *in vivo* durumun *in vitro* olarak sürdürülmesi veya taklit edilmesi, ortaya çıkan embriyonun kalitesinin ve gelişimsel yeterliliğinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Tablo 1. Sığırlarda in vitro embriyo üretim aşamalarında kullanılan oositlerden kazanım oranları a- Olgunlaşmamış oosit sayısına göre hesaplanan oran, b-embriyo transferi başına hesaplanan oran, c-gebelik başına hesaplanan oran

Maturasyon Oranı[a]	%90
Fertilizasyon Oranı[a]	%75-80
Bölünme (Cleavage) Oranı[a]	%60-70
Blastosist Oranı[a]	%30-40
Gebelik Oranı[b]	%50-60
Doğan Buzağı[c]	%70-90

(Wrenzycki, 2018).

İn vitro Fertilizasyonun Tarihçesi

1981'de *in vivo* olarak olgunlaşmış bir oositten elde edilen ilk IVF buzağının doğumu (Brackett et al. 1982) ve 1986'da boğa spermatozoonu için kapasitör ajan olarak heparinin keşfi (Parrish et al. 1986) iki önemli olaydır. Sadece IVP ile elde edilen ilk buzağılar, yani oositlerin *in vitro* olgunlaşması (IVM), *in vitro* fertilizasyon (IVF) ve ayrıca *in vitro* embriyo gelişimi 1980'lerin sonunda rapor edilmiştir (Goto et al. 1988). Tamamen IVM-IVF-IVC'den üretilen ilk buzağılar Fukuda ve arkadaşları tarafından 1987'de yapılan çalışma sonucu doğdu (Fukuda, 1990).

1959'da IVF yöntemi ile canlı yavruların üretildiği ilk memeli türü tavşan. Tavşandan sonra 1968'de laboratuvar farelerinde elde edilmiştir. Fare, sığırlar için tam bir model olmadığı için, sığırlarda ilk başarılı IVF, 1977'de spermatozoonların bir ineğin veya tavşanın, yumurta kanalında veya uterusunda kapasite edilip ve 1981'de taşıyıcı bir ineğin yumurta kanalına 4 hücreli bir embriyo transfer edildiğinde doğan ilk canlı buzağıydı (Brackett et al. 1982; Jainudeen et al. 2000).

Ülkemizde Veteriner Hekimlikte gerçekleştirilen *in vitro* fertilizasyon çalışmaları ilk olarak 80'li yılların başlarında yapılmıştır. Bu alanda Tekeli (1984) ''Tavşan Ovumlarının *İn Vitro* Fertilizasyonu Üzerine Çalışmalar'' adlı doktora tezi ile ilk çalışmayı gerçekleştirmiştir. İlerleyen zamanlarda *in vitro* fertilizasyon çalışmaları fareler üzerinde de uygulanmıştır (Kılıçoğlu 1985, Tekeli et al. 1990, Tekeli 1992). Sığırlar üzerindeki ilk çalışmalar 90'lı yıllarda yapılırken, koyunlar üzerinde ise 2000'li yıllarda gerçekleştirilmiştir (Birler et al. 1998; Birler, 1997; Birler et al. 2002). Sığırlarda *in vitro* fertilizasyon teknolojisi kullanılarak elde edilen ilk buzağı Akyol ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışma sonucu doğmuştur.

Tablo 2. Embriyo Üretimi ve Transferinde Kilometre Taşları ve İlgili Çalışmalar.

Yıl	Araştırmacı	Tür	Yapılan
1890	Heape	Tavşan	Tavşanlarda embriyo transferinden doğan ilk yavru
1933	Nicholas	Rat	Ratlarda embriyo transferinden doğan ilk yavru
1949	Warwick & Berry	Koyun-Keçi	Embriyo transferinden kuzu oğlak doğumu
1951	Kvansnickii	Domuz	Embriyo transferinden domuz yavrusu doğumu
1951	Willet et al.	Sığır	Embriyo Transferi ile ilk buzağı doğumu
1959	Chang	Tavşan	Tavşanlarda *in vitro* fertilizasyon ile ilk yavru
1973	Wilmut & Rawson	Sığır	Embriyo dondurma sonrası ilk buzağı
1977	Iritani & Niwa	Sığır	Sığır oositi *in vitro* fertilizasyon
1982	Brackett et al.	Sığır	*İn vitro fertilizasyon ile ilk buzağı*
1985	Sirard et al.	Sığır	*İn vitro maturasyon ve fertilizasyon ile ilk buzağı*
1986	Willadsen	Koyun	Nükleer transfer (blastomer) yoluyla ilk kuzu
1996	Wilmut et al.	Koyun	Klonlama yoluyla ilk yavru (Dolly)

(Gordon, 2003; Jainudeen et al. 2000).

İn vitro Fertilizasyon Aşamaları

IVP amacıyla kullanılacak oositler; canlı hayvanlarda ultrason eşliğinde gerçekleştirilen OPU yöntemiyle foliküler aspirasyon, ovariektomi ile elde edilen ovaryumlar veya mezbahadan temin edilen ovaryumlardan gerçekleştirilen foliküler aspirasyon yoluyla elde edilmektedir. Kullanılan yönteme bakılmaksızın, oositler genellikle ovulatör ve ovulatör olmayan foliküler dalgalara ait, baskın ve ikincil (subordinat) folikülleri de içeren 2–8 mm çapındaki heterojen antral folikül popülasyonundan aspire edilmektedir (Hyttel et al. 1997). Bu heterojen yapı, elde edilen kumulus oosit komplekslerinin (KOK) gelişimsel

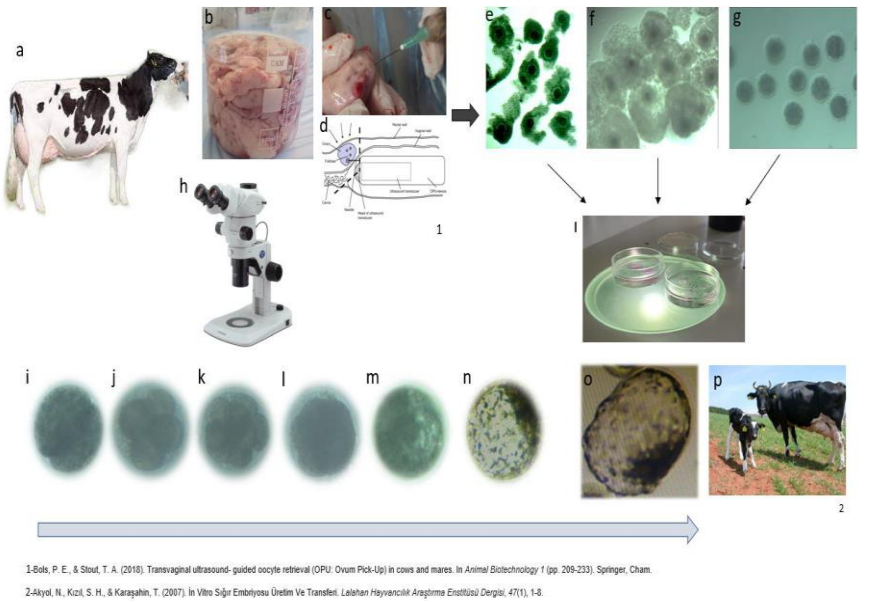
yeterliliklerinin farklı olmasına neden olmakta ve IVP başarısını etkileyen en önemli biyolojik faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Lonergan ve Fair, 2016).

İn vitro embriyo üretim sistemi, olgunlaşmamış oositlerin kontrollü laboratuvar koşullarında nükleer ve sitoplazmik olgunlaşmalarını tamamlayarak ikinci mayoz bölünmenin metafaz II (MII) evresine ulaşmasını sağlayan IVM aşamasıyla başlar. Bu süreçte oosit, mayotik duraksamadan çıkarak birinci kutup cisimciğini oluşturur ve döllenmeye hazır hale gelir. Nükleer olgunlaşmanın yanı sıra sitoplazmik olgunlaşmanın da tamamlanması, başarılı fertilizasyon ve embriyo gelişimi açısından kritik öneme sahiptir (Sirard & Blondin 1996; Gordon, 2003).

Olgunlaşmasını tamamlayan oositler daha sonra IVF işlemine tabi tutulur. Bu aşamada uygun kapasitasyonu sağlanmış spermatozoonlar ile oositlerin kontrollü koşullarda bir araya getirilmesi sonucunda döllenme gerçekleştirilir. Fertilizasyonun ardından oluşan zigotlar, IVC sistemlerinde morula ve blastosist gibi istenen preimplantasyon gelişim evrelerine ulaşıncaya kadar kültüre edilir. Embriyo gelişiminin başarısı; kültür ortamının bileşimi, gaz atmosferi, sıcaklık, pH, enerji substratları ve embriyonun metabolik gereksinimlerinin doğru şekilde karşılanmasına bağlıdır (Lonergan ve Fair, 2016).

İn vitro kültür ortamında oksijenin %10'un altında olması istenmektedir. Kültür sistemlerinde genellikle %5'lik O_2, %5 CO_2 ve %90 N_2 gazlarının kullanımı tercih edilmektedir. Kültür sistemlerinde kullanılan CO_2 solüsyonlar içerisinde çözünür, hücreler için zararlı olan alkalizasyonu engeller ve ortam pH'sını dengeler. Ortam pH'sı 7,2-7,6 arasında olması istenmektedir. Kültür ortamında en ideal ısının 38-39^oC arası, en ideal ışığın ise filtreden geçirilmiş sarı ışık olduğu bildirilmektedir (Garcia-Garcia et al. 2007).

Şekil 2. İn vitro fertilizasyon yöntem i ile buzağı üretim aşamaları. a- verici hayvan, b- mezbahaneden elde edilen ovaryumlar, c- oosit aspirasyonu, d- OPU, e- olgunlaşmamış oosit, f- mature (olgunlaşmış) oosit, g- embriyoların kültür aşaması, h- stereo mikroskop (DA-0700), ı- petrilerde yer alan embriyo damlacıkları, i- 2 blastomerli embriyo, j- 4 blastomerli embriyo, k- 8 blastomerli embriyo, l- kompakt morula, m- erken blastosist, n- blastosist, hatch blastosist, p- Akyol et al. IVF yöntemi ile elde ettikleri buzağı



1-Bols, P. E., & Stout, T. A. (2018). Transvaginal ultrasound- guided oocyte retrieval (OPU: Ovum Pick-Up) in cows and mares. In *Animal Biotechnology 1* (pp. 209-233). Springer, Cham.

2-Akyol, N., Kızıl, S. H., & Karaşahin, T. (2007). İn Vitro Sığır Embriyosu Üretim Ve Transferi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, *47*(1), 1-8.

(Çay, 2023-BURDUR).

Oosit Elde Etme Yöntemleri

IVP başarısı, başlangıç materyalini oluşturan oositin niteliğine bağlıdır. Oosit kalitesi ile eş anlamlı olarak kullanılan oositin gelişimsel yetkinliği; oositin tam bir mayotik olgunlaşma geçirme, başarıyla döllenme, blastosist aşamasına erişme ve nihayetinde sağlıklı bir gebelik oluşturarak canlı yavru doğumu sağlama kapasitesi olarak tanımlanmaktadır (Duranthon & Renard 2001; Sirard 2018). IVP protokollerinde oosit kaynağı olarak;

gebeliğin ilk trimesterindeki düve ve inekler, laktasyondaki postpartum inekler ve puberte öncesi (juvenil) buzağılar canlı donör olarak kullanılabileceği gibi, mezbaha materyali olan ovaryumlar da sıklıkla tercih edilmektedir (Galli et al. 2003; Paramio 2010).

Kumulus-oosit kompleksleri (KOK), mezbahanelerden veya ötenazi uygulanan hayvanlardan elde edilen yumurtalıklardan toplanabileceği gibi, canlı donörlerden de ekstrakta edilebilir. Mezbaha kaynaklı ovaryumlarda KOK izolasyonu; foliküler aspirasyon veya dilimleme (slicing) yöntemleriyle rutin olarak gerçekleştirilmekte, daha nadir olarak ise folikül izolasyonu ve diseksiyonu tekniklerine başvurulmaktadır (Rizos et al. 2002; Ferré et al. 2020). Bu metodolojiler vasıtasıyla, germinal vezikül (GV) evresinde duraklamış ve etrafı kumulus hücre tabakalarıyla çevrili olgunlaşmamış oositlerin toplanması hedeflenmektedir. Benzer şekilde, canlı hayvanlarda uygulanan OPU teknolojisi ile de antral foliküllerden olgunlaşmamış oositlerin aspire edilmesi sağlanmaktadır (Bols & Stout 2018; Ciftci & Dinc, 2023).

Mezbahane Materyalinden Oosit Elde Etme

Mezbahane de kesimi yapılan hayvanların ovaryumlarından oosit elde etmek amacıyla, aspirasyon, dilimleme, diseksiyon ve doku eritme gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu amaçla geliştirilen yöntemlerden aspirasyon ve dilimleme teknikleri en sık kullanılan tekniklerdir (Gordon 2003). Mezbahadan toplanılan ovaryumlar yaklaşık 30°C'lik fizyolojik tuzlu su bulunan termoslar içerisinde laboratuvara getirilmektedir. Bazı embriyo üretim laboratuvarlarında doku kültür medyumu-199 (tissue culture medium-199, TCM-199) veya fosfat tamponlu tuz çözeltisi (phospate buffered saline, PBS) gibi farklı medyumlar ile kontaminasyonu önlemek amacıyla çeşitli antibiyotikler de kullanılmaktadır. Bu solüsyonlar ile termoslara toplanan ovaryumlar 4 saat içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır (Gordon, 1994, Birler et al.

1998, Wani et al. 2000). Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda 25°C'de 8 saate kadar saklanabilen ovaryumlardan *in vitro* ortamda elde edilen embriyonun, blastosist aşamasına gelme kapasitesinde ve oositlerin fertilizasyon oranlarında bir azalma olmayacağı tespit edilmiştir.

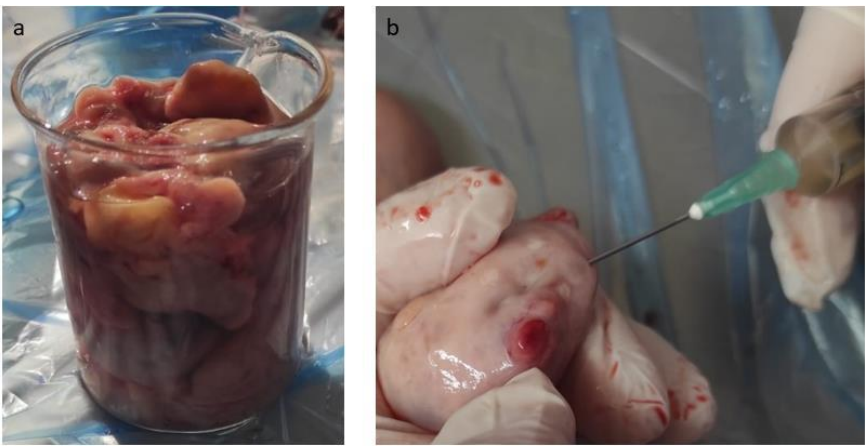
Oosit Aspirasyon Yöntemi

İneklerde en yaygın kullanılan tekniklerden bir tanesidir. Ovaryum üzerindeki antral foliküller, pipet, vakumlu aspirasyon iğnesi veya enjektör yardımı ile aspire edilmektedir. Bu tekniğin diğer yöntemlere göre avantajı hızlı yapılabilmesi ve daha fazla ovaryum ile çalışma imkânı sunmasıdır. Hızlı oosit elde etmek de embriyo üretim üniteleri için oldukça tercih edilebilir bir kriterdir. Bu yöntem ile 2-8 mm büyüklüğündeki antral foliküller aspire edilmektedir. Aspirasyon için 18-22-G, contasız, 10-20 mL'lik enjektörler tavsiye edilmekte (Gordon, 2003). Ancak Fry ve arkadaşları (1998) mevcut olan primer oositlerin sayısını ve kalitesini optimize etmek amacıyla, aspirasyon basıncı ve yıkama yönteminin oosit toplama üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında en iyi oositin, 17-G iğne ve 55/mmHg basınç ile elde edildiği sonucuna ulaşmışlardır. Yapılan bu çalışmada vakum basıncının arttırılması, muhtemelen kumulus hücrelerinin soyulması nedeniyle canlı oosit sayısını azalttı; vakum basıncı çok yüksek olduğunda bulunan KOK olmayan çıplak (nüde) oosit sayısında çarpıcı bir artış oldu.

Hashimoto ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmalarda en fazla kaliteli oositi 40 mmHg basınç ve 18-G iğne ile elde etmişlerdir. Aspirasyon yöntemi ile ovaryum başına ortalama 13.9 ± 2.3 oosit elde edildiği ve bunlarında ortalama %45-50'sinin kullanılabilir kalitede olduğu bildirilmektedir.

Foliküler aspirasyonun dezavantajı ise oositlerin kazanım oranlarının %30-60 oranında olması ve kör atış yapılarak oosite zarar verme ihtimalinin olmasıdır (Gordon, 2003).

Şekil 3. Burdur MAKÜ Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama AD. İn vitro *Fertilizasyon ve Embriyo Transfer Laboratuvarında IVF çalışması. a- mezbahaneden ovaryumların getirilmesi b- ovaryumda yer alan 2-8 mm'lik foliküllerden oosit aspirasyonu*



(Ata et al, 2022-BURDUR)

Ovaryum Dilimleme

Mezbaha materyalinden immatür oositleri elde etmenin diğer yöntemi ise ovaryumların dilimlenmesidir. Bu işlem sırasında ovaryum bir forseps yardımı ile tutulmakta ve üzerindeki foliküller bistüri yardımı ile kesilmektedir. Bu işlem önceden hazırlanmış, içerisinde yıkama solüsyonu bulunan 90 mm'lik petri içerisinde gerçekleştirilmektedir. Foliküllerden elde edilen oositler yıkama solüsyonuna boşaltılmakta ve mikroskop altında incelenmektedir (Saleh, 2017). Wang ve arkadaşları (2007), dilimleme tekniği ile aspirasyon tekniğine kıyasla daha fazla sayıda oosit elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca Hoque ve arkadaşları (2011) dilimleme

tekniği ile ovaryum başına düşen oosit sayısının da daha fazla olduğunu belirtmektedirler. Ancak Wang ve arkadaşları (2007), aspirasyon yöntemi ile elde edilen oositlerin daha kaliteli olduğunu ve dilimleme tekniği ile karşılaştırıldığında işlemin daha kısa sürdüğünü ifade etmektedirler. Dilimleme yöntemi ile ovaryum başına ortalama 10.7 oosit elde edildiği ve bunların ise 9.7'sinin kullanılabilecek kalitede olduğu bildirilmektedir (Carolan et al. 1994; Vincenti et al.1998; Wang et al. 2007; Hoque et al. 2011).

Bazı kaynaklarda, dilimleme yönteminin aspirasyon tekniği ile kombine kullanıldığı da bildirilmektedir. Bunun için önce ovaryum üzerindeki foliküller aspire edilmekte, sonrasında ise dilimlenmektedir. Bu yöntem ile elde edilen oosit sayısının arttığı ifade edilmektedir (Gordon, 2003; Hoque et al. 2011).

Canlı Hayvandan (OPU-Ovum Pick Up) Oosit Eldesi

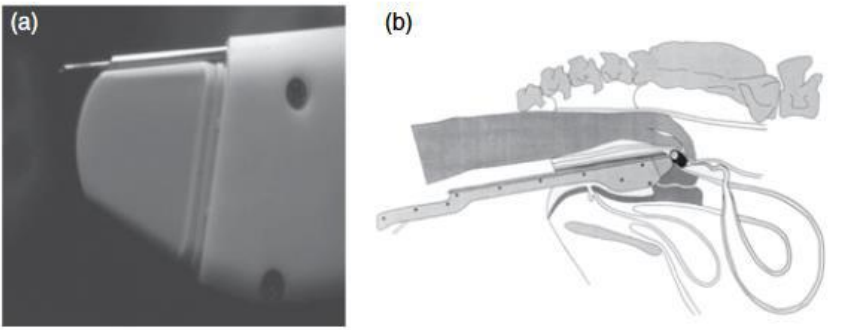
OPU, insanlarda ultrason kılavuzluğunda trans vajinal oosit aspirasyonunun geliştirilmesi ile 1988 yılından itibaren sığırlarda uygulanmaya başlanmış ve dünyada IVEP programını kullanan ülkelerde yapılmaktadır. OPU, canlı hayvanların ovaryumlarından endoskopik veya ultrasonografi rehberliğinde trans vajinal yolla foliküllerin aspire edilerek oositlerin toplanmasını sağlayan bir yöntemdir (Gordon, 2003). Sığırlarda trans vajinal ultrason kılavuzluğunda aspirasyonu içeren ilk tekrarlanabilir etkili teknik 1987'de Callesen ve arkadaşları tarafından gerçekleştirildi (Hasler & Barfield, 2021).

Donörler süper stimülasyon uygulanarak veya süper stimülasyon olmaksızın 7.5 MHz' lik özel OPU probu ve aspirasyon sistemine sahip ultrasonografi cihazları ile haftada bir ya da iki kez foliküler aspirasyona tabi tutulabilmektedir (Chaubal et al. 2007). Folikül aspirasyonu işlemi ile donör hayvanlardan OPU seansı başına ortalama 4-8 oosit elde edilebilmektedir (Hasler, 1998). Haftada iki kez uygulanılan OPU seansı, donör hayvanın reprodüktif

verimi komplikasyon oluşturmaksızın uzun bir süre kullanılmalarına ve seans başına daha fazla sayıda embriyo üretilmesine olanak sağlamaktadır (Chastant-Maillard et al. 2003). Tekrarlayan OPU uygulama aralıklarının 2-5 gün (3-4 gün) olması ile daha iyi sonuçlar elde edildiği ifade edilmektedir (Merton et al. 2003). Diğer taraftan yoğun olarak uygulanılan OPU programlarında (örneğin, haftada iki kez) donör hayvanın genel sağlık sorunları, tekrarlayan epidural anestezi ile ilgili problemler, ovaryum stroma bütünlüğünün bozulması ve yapışmalar gibi durumların oluşabileceği göz ardı edilmemelidir (McEvoy, Alink, Moreira, Watt, & Powell, 2006).

Hormonal ön stimülasyon olmadan OPU rutin olarak haftada iki kez yapılabilir. Haftada iki kez OPU, donör ineğin fertilitesi üzerinde zararlı etkiler olmaksızın uzun bir süre boyunca yapılabilir ve her bir inekte seans başına daha fazla sayıda embriyo üretilmesine neden olur (Chastant-Maillard et al. 2003). Hormonal ön stimülasyon kullanılarak folikül sayısı artırılabilir. Ön stimülasyonun dezavantajı, hormon kullanımını içermesidir, oysa OPU durumunda hormonlara gereksinim olmaması MOET'e kıyasla genellikle bir avantaj olarak kabul edilmiştir (Merton et al. 2003). Tek bir OPU seansı sırasında bir inekten toplanan oosit sayısı çeşitli faktörlere bağlıdır. Mekanik tarafta, oositi folikülden çıkarmak için kullanılan vakum basıncı, iğnenin ölçüsü ve iğne üzerindeki eğimin uzunluğu, toplanan KOK'ların kalite ve sayılarını etkiler. Toplama sıklığı başka bir faktördür. OPU, eksojen hormonlar kullanılmadan aynı ineğe haftada bir veya iki kez yapılabilir (Chaubal et al. 2007). OPU'da Hormonal stimülasyonda foliküler dalga gelişimini kontrol etmek adına en çok FSH uygulaması yapılmakta ve FSH uygulamasından 36-48. saatler arasında OPU yapılmakta. Bu uygulamada FSH'yı içeren haftalık OPU seansında ortalama 10.6 oosit ve 2.4 blastosist bulunurken, FSH'sız guruplarda haftalık OPU'da ortalama 4.6 oosit ve 0.9 blastosist vardı (Hasler ve Barfield, 2021).

Şekil 4. (a) Ultrason kılavuzluğunda çıkıntı yapan oosit aspirasyon iğnesi. (b) Ultrason transdüserinin vajinal fornikse bastırılıp, yumurtalığın rektum başına manuel olarak manipüle edilir ve vajinal duvara karşı tutulduğu pozisyonunu gösteren diyagram



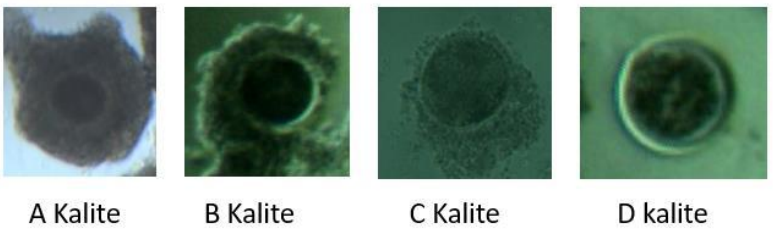
(Hasler & Barfield, 2021).

Oositlerin Kalite Değerlendirilmesi

Oosit kalitesinin etkisini inceleyen birçok çalışma, IVEP sistemi içerisinde sınırlayıcı faktörün oosit kalitesi olduğunu ileri sürmüştür (Blondin & Sirard, 1995; Lonergan et al. 1994; Pavlok et al. 1992). Oosit kalitesi, *in vitro* embriyo üretiminde maturasyon ve fertilizasyonda başarının anahtarı olmasının yanı sıra, gebeliğin oluşması ve devamlılığın sağlanması ile doğumdan sonra meydana gelebilecek hastalıklar açısından da çok önemlidir (Krisher, 2004). Tam olarak gelişimini tamamlamış bir oosit, acellüler bir matrix tabaka olan zona pellusida, korona radiata ve kumulus hücrelerince sarılmıştır. Bu üçlü yapı kumulus oosit kompleksini (KOK) oluşturur. *İn vitro* embriyo üretiminde, homojen görünüşte bir sitoplazmaya sahip ve zona pellusidaya sıkıca tutunmuş kompakt yapıda, çok katlı kumulus hücreleriyle çevrili oositlerin kullanılması maturasyon ve devamında blastosiste ulaşma yeteneğinin en önemli işaretlerindendir (Hazeleger & Stubbings, 1992). Aspirasyon işlemini takiben immatür oositler yalnızca kumulus hücrelerinin morfolojisine bakılarak A, B, C ve D şeklinde sınıflandırılmaktadır.

Bu sınıflandırmaya göre sadece dördüncü grup oositler çok düşük *in vitro* maturasyon yeteneğine sahiptir ve 16 maturasyon vasatlarına alınması tavsiye edilmemektedir (Brackett & Zuelke 1993, Kanagawa et al. 1995).

Şekil 5. Burdur MAKÜ Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama AD. İn vitro Fertilizasyon ve Embriyo Transfer Laboratuvarında çalışma sırasında elde edilen oositler de kalite sınıflandırması



(Çay, 2022-BURDUR).

A Kalite; Zonanın çevresinde kumulus hücreleri 5 veya daha fazla kat olarak görülmektedir.

B Kalite; Zona çevresinin 1/3'ünden fazlasını kumulus hücreleri 2 veya daha az kat olarak kaplamaktadır. Ya da az bir kısmında kumulus olmayabilir.

C Kalite; Oositler genellikle tamamen çıplak ya da B kalite oositten çok daha az kumulus hücresine sahiptir.

D Kalite; Kumulus hücreleri örümcek ağı gibi dağılmış ve dejenere ooplazmaya sahip

Tablo 3. Oosit Kalitesinin Morfolojik Sınıflandırması

Kalite derecesi	Tanım
1	Homojen yapıda ooplazma, çok katmanlı kompakt kumulus yapısı, total KOK açık ve şeffaf.
2	Çok katmanlı kumulus yapısı, homojen yapıda ooplazma, kaba görünüm, zonada koyuluk, total KOK biraz daha koyu ve daha az şeffaf.
3	Daha az kumulus katmanına sahip, ooplazma düzensiz koyu dejenere alanlar, total KOK 1-2 sıra ve koyu
4	Genişlemiş kumulus yapısı, dağınık kumulus hücreleri, ooplazma ve KOK yapısı düzensiz, dejeneratif.

(Gordon, 2003)

İn Vitro Maturasyon (Olgunlaşma)

Oositlerinin *in vitro* maturasyonu, *in vitro* embriyo üretim sistemindeki en önemli adımlardan birisidir ve tekniğin başarısı için çok önemlidir (Lee et al. 2016; Schwarz et al. 2008). Oosit maturasyonu, fertilizasyonu takiben embriyonun ilk gelişimini, embriyonik genomun aktivasyonu zamanına kadar desteklemek için içsel kapasiteyi kazandığı uzun ve hassas bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Oositlerin toplanma şekli ve olgunlaşma durumları, toplama sonrasında nasıl ele alınması gerektiğini belirler (Ferreira et al. 2009; Meirelles et al. 2004). Mezbaha materyalinden elde edilen ovaryumlarından veya OPU aracılığıyla canlı hayvanlardan toplanılan KOK'leri, ilk mayoz bölünmenin diploten aşamasında durakladıkları için *in vitro* maturasyon aşamasına ihtiyaç duyulmaktadır. Mezbahane materyali veya OPU seansından elde edilen sığır oositleri, öncelikle 2-8 mm çapındaki foliküllerden elde edilir ve toplanan KOK'lerinin olgunlaşma durumları değişir. Buna rağmen, bu oositlerin çoğunluğu 24 saatlik bir IVM periyodunda olgunlaşmayı başarabilir (Hasler & Barfield, 2021). Çoğu laboratuvarda, sığır oositleri TCM-199 ortamında %10 fetal buzağı serumu ile gonadotropinlerin varlığında 38,5 °C' de, %5 CO2 içinde, 22-24 saat mature edilmektedir (Galli & Moor, 1991). Ayrıca IVM

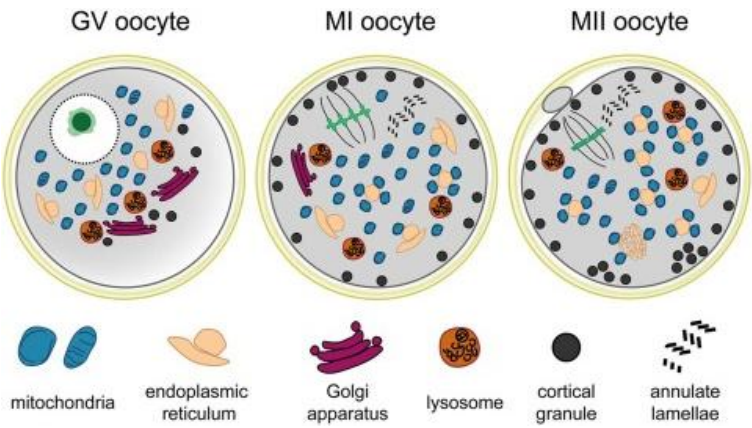
için Sentetik Ovidukt Sıvısı (SOF), North Carolina State University (NCSU-37) ve ve Ham's F10'a gibi birçok vasat tercih edilmektedir. Bu vasatlara; hormonlar, sığır serum albümini, folikül sıvısı, büyüme faktörleri, vitaminler, serumlar ve farklı antioksidan madde ilaveleri yapılabilmektedir. Yapılan her ilave, maturasyon vasatını daha da iyileştirmeye yöneliktir (Strejček & Petrovičová 2012). Maturasyon, daha önce mayoz bölünmeyle birlikte fetal yaşamda başlayan bir dizi olaydan oluşmaktadır (Monniaux et al. 2014).

Oosit olgunlaşması, gelişmekte olan gamette nükleer ve sitoplazmik değişiklikleri içerir. Nükleer oosit olgunlaşması, ovulasyon anında mayozun birinci mayotik bölünmenin profazından ikinci mayotik bölünmenin metafazına ilerlemesini ifade eder. Oositlerde nükleer olgunlaşma ile sitoplazmik olgunlaşma, organellerde, proteinlerde ve transkriptlerde bir dizi değişiklik meydana getirir (Hyttel et al. 1997). Sitoplazmik olgunlaşmada, karbonhidrat ve lipid metabolizması, mitokondriyal fonksiyon ve konum, oksijen radikallerinin azaltılması, follistatin birikimi, epigenetik programlama, kumulus hücreleri ile oosit arasındaki iletişim ve oosit kaynaklı büyüme faktörlerinin salgılanması dahil olmak üzere çoklu süreçler yer alır (Sirard, 2016). Mayoz bölünme, fertilizasyona kadar mayoz-II'nin metafaz aşamasında kalır, fertilizasyonla birlikte ikinci kutup hücresinin perivitellin boşluğa atılmasıyla mayoz bölünme tamamlanır. IVM de pratik olarak oositlerin mature olmasını kumulus ekspansiyonu ve I. Kutup hücrenin perivitellin boşlukta görünmesi olarak kabul edilir (Sirard & Pate, 2001)

Kültüre alınan olgunlaşmamış oositlerin yaklaşık %85–90'ı, uygun kültür koşullarında gerçekleştirilen IVM sürecinin sonunda metafaz II (MII) evresine ulaşmaktadır. Bu oran nükleer olgunlaşma açısından başarılı kabul edilmekle birlikte, oositin sitoplazmik olgunlaşmasının ve gelişimsel yetkinliğinin aynı düzeyde tamamlandığını her zaman göstermez. Nitekim, sitoplazmik

olgunlaşma çoğu durumda nükleer olgunlaşmaya tam olarak eşlik etmediğinden, fertilizasyon başarısında azalma ve erken embriyonik gelişimde görülen yetersizliklerin temel nedenlerinden biri olarak değerlendirilmektedir (Watson, 2007). Bu durum, nükleer ve sitoplazmik olgunlaşma süreçlerinin birbirini tamamlayan ancak farklı mekanizmalar tarafından düzenlenen olaylar olduğunu göstermektedir. Bu doğrultuda, *in vivo* koşullarda olgunlaşan oositlerin, IVM ile olgunlaştırılan oositlere kıyasla daha yüksek gelişimsel yetkinliğe sahip olduğu ve daha fazla sayıda blastosist oluşturduğu bildirilmiştir (Sirard & Blondin, 1996).

Şekil 6. Oositin maturasyon sırasında, hücre içi meydana gelen değişikliklerin şematik gösterimi



(Trebichalská, Z et al. 2021)

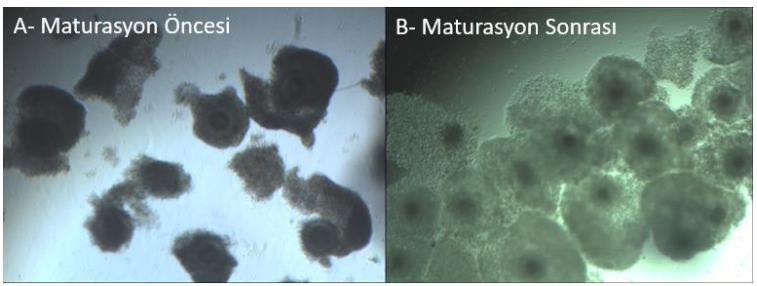
Maturasyon süresi hayvan türlerine göre farklılık göstermektedir. Sığırlar için 22-24 saat olan maturasyon süresinin aşılması durumunda oositler yaşlanacaktır (Strejček & Petrovičová 2012). Yaşlı oositlerde polispermi insidansı yüksektir ve oosit çok yaşlıysa embriyonik gelişim anormaldir veya döllenme hiç gerçekleşmeyebilir (Jainudeen et al. 2000).

İn vivo koşullarda bu süreçler, oosit ile çevresindeki kumulus ve granüloza hücreleri arasındaki çift yönlü iletişim, foliküler sıvının

dinamik yapısı ve endokrin–parakrin sinyallerin koordinasyonu sayesinde fizyolojik olarak gerçekleşmektedir. Buna karşın IVM sırasında oosit, doğal foliküler mikro çevresinden ayrıldığı için bu karmaşık biyolojik etkileşimlerin önemli bir kısmı tam olarak taklit edilememektedir. Sonuç olarak, oositler yüksek oranda MII evresine ulaşabilse de sitoplazmik olgunlaşma çoğu zaman yetersiz kalmakta ve bu durum fertilizasyon oranlarını, embriyo kalitesini ve blastosist gelişimini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Lonergan ve Fair, 2016).

Bu nedenle günümüzde IVM çalışmalarının önemli bir bölümü, *in vivo* foliküler ortamı daha başarılı şekilde taklit edebilen kültür sistemlerinin geliştirilmesine odaklanmaktadır. Büyüme faktörleri, hormonlar, antioksidanlar, metabolik düzenleyiciler ve ko-kültür sistemleri gibi çeşitli yaklaşımlarla oositin sitoplazmik olgunlaşmasının iyileştirilmesi ve buna bağlı olarak gelişimsel yetkinliğin artırılması hedeflenmektedir (Gilchrist et al. 2008; Sirard, 2017).

Şekil 7. Burdur MAKÜ Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama AD. İn vitro Fertilizasyon ve Embriyo Transfer Laboratuvarında çalışma sırasında elde edilen oositleri, A- Maturasyon Öncesi, B- Maturasyon Sonrası



(Ata et al. 2022-BURDUR)

İn vitro Fertilizasyon

Fertilizasyon, kapasite olan spermatozoonun, mature olan oosite penetrasyonu ile pronükleusların kaynaşması ve oositten embriyoya geçişin sinyallerini taşıyan kompleks olaylar zinciridir. IVP çalışmalarında en önemli adımlardan birisi de IVF aşamasıdır. IVF başarısı için oositlerin olgunlaşması, sperma seçimi, spermatozoon kapasitasyonu ve uygun sayıda motil spermatozoon sayısı gerekmektedir. (Gordon, 2003). Spermatozoonun dişi üreme kanalına bırakılmasının ardından, ovidukta kadar olan yolculuğu boyunca değişimlere uğrayarak kapasite olur ve ovumu dölleme yeteneği kazanır. Bütün memeli türlerinde, spermatozoon dişi genital kanalına bırakıldığı anda oositi fertilize etme yeteneğinde değildir. Spermatozoon, oositin zona pellusida'sına (ZP) nüfuz etme yeteneği kazanması için kapasitör ajanlarla karşılaşmalıdır (Parrish et al. 1986). Bundan dolayı fertilizasyona hazırlık sürecinin geçirilmesi gerekmektedir. Bir spermatozoon hücresinin bir oositi dölleyebilmesi için geçirmesi gereken değişikliklere topluca kapasitasyon denir (Akyol & Nesrin, 2005). Bu süreç 1951'de Chang ve Austin tarafından keşfedilmiş. Kapasitasyon, spermatozoonların dış membranında morfolojik olarak gözlemlenebilen, akrozom reaksiyonunun oluşmasına imkân sağlayan biyokimyasal değişiklikleri içerir. Kapasitasyon işleminde uterus, ovidukt ve ovulasyon esnasında foliküler sıvı görev almaktadır (Moore & Akhondi, 1996). Kapasitasyon prosedürü başarılı bir *in vitro* fertilizasyonun gerçekleşmesi için en önemli etkendir. IVF sistemlerinde birincil kapasitasyon ajanı heparindir (Gordon, 2003). Döllenme ortamına eklenen heparin, proteinlere bağlanarak ve kolesterol ve fosfolipitlerin dışarı akışını uyararak seminal plazma bileşenlerinin spermatozoon yüzeyinden uzaklaştırılmasına yardımcı olduğu düşünülmekte (Breininger et al. 2010).

Sığır IVF'de kullanılan spermatozoaların çoğu dondurulup çözülmüştür (Galli et al. 2003). Dondurulmuş bir sperma payeti ile

800-1000 adet oosit döllenebilmektedir (Rasmussen et al. 2013).Spermanın dondurulup-çözdürülme sırasında spermatozoon hücrelerinde, plazma membran proteinlerinde hasar ve ROS oluşumunda artış oluşmakta. Bu spermler aynı zamanda, IVF için ideal olan taze spermatozoaya göre kapasitasyon ajanlarına daha kısa ve daha düşük dozlarda maruz kalmayı gerektirir. İyi yönetilen bir IVF laboratuvarında donmuş spermatozoa ile fertilizasyon oranları ortalama %80 veya daha yüksek olabilir. IVF'de yüksek fertilizasyon oranları, yüksek motiliteye sahip optimal fertilize edebilir spermatozoon sayısına ve birinci polar gövdeye sahip mature olmuş fertilize edilebilir bir ovuma bağlıdır (Jainudeen et al. 2000).

IVF için en çok kullanılan vasatlar Tirode'nin Albümin Laktat Pirüvat Solüsyonu (TALP), Sentetik Ovidukt Sıvısı (SOF), Brackett ve Oliphant Medyum (BO) ve Potasyum Simpleks Optimizasyon Medyum (KSOM)'dur (Nedambale et al. 2006).

Fertilizasyon işlemi için mL'de ortalama 1-2 milyon spermatozoon olacak şekilde ayarlanır (Chian, Okuda ve Niwa, 1995). Bu hesaba göre oosit başına ortalama 5.000-10.000 bin spermatozoon hücresi düşmektedir. Ward ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada oosit başına spermatozoon sayısı ortalama 1.000-10.000 bin olan guruplar en iyi fertilizasyon ve blastosist oranına sahiptir. 1.000'nin altında fertilizasyon ve blastosist oranı ciddi bir şekilde düşmektedir (Ward, et al., 2002). Mature oositler yetersiz spermatozoon sayısına maruz kaldığında IVF'da oranları düşmektedir. Bununla birlikte, *in vivo* durumun aksine, *in vitro* spermatozoon sayılarının optimal konsantrasyondan daha yüksek kullanılması, polispermi ve poliploid zigot üretimi ile sonuçlanır (Hasler, 1998).

Oositin fertilize olduğunu anlamak için;

1 - Oosit ooplazmasında penetre olmuş spermatozoon

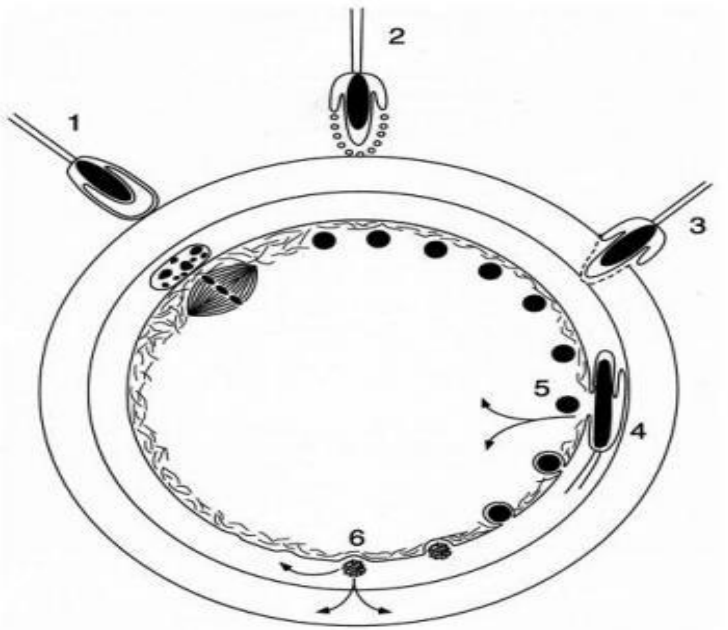
2 - Penetre olan spermatozoonun baş kısmının şişmesi, pronükleer değişim

3 - Blastomer ve blastosist oluşumu

4 - Kortikal granülün yıkımlanması

5 - Spermatozoonun kuyruğunun ooplazmada olması (Jainudeen et al. 2000)

Şekil 8. Fertilizasyon işlemi sırasında erkek ve dişi pronükleusun gösterimi.1- Spermatozoonun ZP'ya bağlanması, 2-Akrozom reaksiyonu, 3- Akrozom reaksiyonu gerçekleşen spermatozoonun ZP'ya penetrasyonu, 4- Spermatozoonun ekvatoral segmenti ile oositin ooplazmasının birleşmesi, 5- Spermatozoonun penetrasyonu ile birlikte, çözünen pronükleusların aktivasyonu, 6- Kortikal granül reaksiyonu ile polispermi blok oluşumu



(Gadella et al. 2004).

Spermanın Hazırlanması

IVF'da kullanılan spermaların çoğu ticari olarak satılan payetlerde dondurulmuş spermalardır. Spermanın dondurulması esnasında kullanılan sulandırıcılarda yer alan çeşitli kimyasallar (kriyoprotektanlar, antibiyotikler, antioksidanlar), IVF başarısını olumsuz olarak etkilemektedir. Bu yüzden fertilizasyon işlemi için kullanılacak spermada, sperma sulandırıcısı, anormal spermatozoa, bakteri, enzim, içerikleri uzaklaştırılması için bazı teknikler geliştirilmiştir. IVF'da sperma seçiminde çeşitli seperasyon yöntemleri yer almakta. Bunlar; santrifüj yöntemi, yüzdürme yöntemi, tabakalandırma, manyetik alanda aktif hücre ayırma ve cam yünü filtrasyonu gibi çeşitli yöntemlerdir (Beydola et al. 2013). Sığırlarda Spermanın seperasyonu için en çok swim-up ve percoll tekniği kullanılmaktadır. Swim-up migrasyon (göç ettirme) teknikleri arasında yer alırken, percoll gradient ise yoğunluk farkına dayanarak tabaka oluşturup santrifüj etme tekniğine dayanmaktadır. Seperasyon tekniği uygulamaları sırasında aranan ideal kriterler vardır. Bu kriterler; hızlı ve kolay olmalı, çok sayıda motil spermatozoa elde etmeli, ekonomik olmalı, toksik maddeleri, ROS oluşumunu engellemeli, yüksek volümde spermada çalışmaya izin vermeli ve en önemlisi spermanın yapısında minimum hasara neden olmalıdır (Kaymaz 2012).

Santrifüj Yöntemi

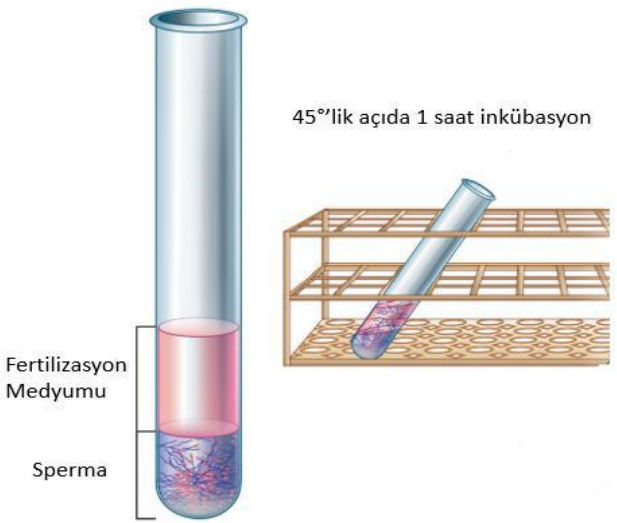
Santrifüj yöntemi için ticari firmaların çeşitli yıkama vasatları yer alırken temelinde IVF'de kullanılan solüsyonlar yer almakta. Spermanın hazırlanması için gerekli olan yıkama solüsyonu kullanmadan önce 37°C'ye ısıtılır. Azot tankından çıkarılan sperma payeti 37°C' sıcak su içerisinde 30 saniye bekletilerek çözdürülür ve konik uçlu 15 mL'lik tüpe sperma konur. Daha sonra yıkama solüsyonu kademeli bir şekilde ilave edilerek, 1500 g'de 10 dakika santrifüj edilir. Bu işlem 2 kez aynı solüsyon ile tekrar edilip sperma

sulandırıcısı komple uzaklaştırılmaya çalışılır. Daha sonra istenen spermatozoon/oosit oranında fertilizasyon sıvısı ile sulandırılma işlemi yapılır. Hazır olan spermanın, santrifüj öncesi ve sonrası motilite kontrolü yapılır ve konsantrasyonu belirlendikten sonra mature olan oositler ile 38,5°C'de %5,5 CO_2 ve atmosferik O_2 ile CO_2 inkübatörde 12-18 saat fertilizasyona bırakılır (Satılmış, 2019).

Swim Up (Yüzdürme) Yöntemi

IVF'da en yaygın kullanılan tekniklerden birisi de yüzdürme tekniğidir. 15 mL'lik Konik bir tüp içerisine konulan spermaya çeşitli fertilizasyon medyumları ile tabaka oluşturup 45 derecelik açı verilir. Açı vermemizin sebebi yüzey alanını en üst düzeye çıkarmak ve çok fazla sayıda motil spermatozoon elde etmektir. 45 derecelik açı ile yaklaşık 1 saat boyunca 38,5°C'de %5 CO_2'lik inkübatöre konulur. İnkübasyon sonucunda üst tabakaya motil spermatozoonlar yüzerken alt tabakada ise ölü ve motil spermatozoonlar yer almaktadır (Beydola et al. 2013).

Şekil 9. Swim-up Tekniği

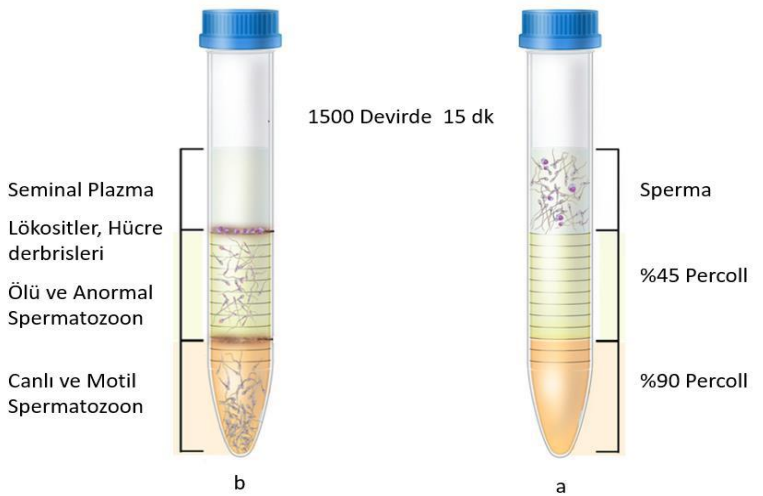


(Beydola et al. 2013).

Percoll Gradient (Tabakalandırma) Yöntemi

Percoll gradient yöntemi için 15 mL'lik santrifüj tüpünde %45 ve %90 olmak üzere iki katman hazırlanır. Tüpün alt kısma %90'lık Percoll koyulur, üst kısmına ise %45'lik Percoll solüsyonu edilir. Katmanların en üst kısmına, yavaşça çözdürülen sperma ilave edilerek 1500 g. de 15 dk süre ile santrifüj edilir. Süre sonunda santrifüj tüpünün dibinde oluşan peletin üzerindeki sıvı kısım uzaklaştırılır ve kalan bölümün üzerine 2 ml HSOF (HEPES tamponlu Sentetik Ovidukt Sıvısı) ilave edilir, tekrar 600 g. de 6 dk santrifüj edilir. Süre sonunda santrifüj tüpünün dibinde oluşan peletin üzerinde kalan sıvı uzaklaştırıldı ve peletten örnek alınarak hemositometrik yöntem ile spermatozoon motilitesi ve yoğunluğu belirlenir. Motilite ve yoğunluk sonucuna göre fertilizasyon sıvılarıyla istenen oranda sulandırılıp mature olan oositlerin yer aldığı droplara katılarak 12-18 saat inkübasyona bırakılır (Birler et al. 2002).

Şekil 10. Percoll Gradient Tekniği. a- santrifüj öncesi, b- santrifüj sonrası



(Malvezzi et al. 2014).

IVM tamamlandığında, oositler döllenmeye hazırdır. Bu, oositlerin spermatozoonlar ile fertilizasyonunu içerir. Döllenme olaylarının çoğu 12 saat tamamlanacak olsa da çoğu laboratuvar 18 saatlik fertilizasyon süresine izin vermekte (Hasler & Barfield, 2021).

Cinsiyet ayrımı yapılmış spermaların IVF'de kullanımı oldukça kısıtlıdır. Bunun sebebi olarak çözüm sonu canlılık ve hareketliliğin düşük olması, bozulmuş kapasitasyon, hiper aktivasyon, akrozom bütünlüğü ve floresan boya-DNA etkileşimi ile ilgili sorunlar gösterilmekte (Norman et al. 2010). Spermatozoon sayısı ve motilitesi yeterli düzeyde olmadığı takdirde fertilizasyona yardımcı olmak için dört yöntem mevcuttur. Bunlar; kısmi zona diseksiyonu, zona inceltme/zona delme, subzonal sperm yerleştirme (SUZI) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonudur (ICSI) (Wrenzycki, 2018).

Minimum polispermi ile maksimum döllenme elde etmek için her bir boğa için gerekli olan spermatozoa konsantrasyonu, farklı sperm konsantrasyonları ile IVF testleri yapılarak ampirik olarak belirlenir. Oositler, spermatozoonlar ile inkübasyonda 18±20 saat bekletilir ve lakmoid boyamanın ardından kromatin konfigürasyonu analiz edilir. Bu testin sonuçları, her boğa için en uygun sperm konsantrasyonunu gösterir. IVF, spermatozoon ve oositlerin 18±20 saat birlikte fertilizasyonu bir gece kaldıktan sonra oositler, kalan kumulus hücrelerinden ve spermlerden tamamen arındırılır ve embriyo gelişimi için uygun bir kültür sistemine aktarılır (Galli et al. 2003).

İn Vitro Embriyo Kültürü

İn vitro fertilizasyon aşamalarından biri de embriyo kültürüdür. Embriyo kültürlerine erken embriyonik gelişim aşamalarında katılan büyüme faktörleri, aminoasitler, vitaminler ve antioksidanların embriyo gelişimine büyük oranda katkıda

bulunduğu bilinmektedir. Embriyo kültürlerine ilave edilen kimyasalların yetersizliği başta olmak üzere, embriyo kalitesi üzerinde birçok stres faktörünün rolü bulunmaktadır (Kaymaz 2012).

İn vitro kültür ortamında oksijenin %10'un altında olması istenmektedir. Kültür sistemlerinde genellikle %5'lik O_2, %5 CO_2 ve %90 N_2 gazlarının kullanımı tercih edilmektedir. Kültür sistemlerinde CO_2 stabilizasyonu sağlamaktadır. Ortam pH'nın 7,2-7,6 arasında olması istenmektedir. Kültür ortamında en ideal ısının 38-39^oC arası, en ideal ışığın ise filtreden geçirilmiş sarı ışık olduğu bildirilmektedir (Garcia-Garcia et al. 2007).

IVP yöntemi ile üretilen sığır embriyosunun dünya çapında artan ticari uygulamasıyla, blastosist verimini ve kalitesini optimize etmeye artan bir odaklanma var. Sığır embriyolarının IVC'ü, IVP'deki son adımdır ve tahmini fertilizasyondan itibaren ortalama 6-9 günlük bir dönemi kapsar. Fertilizasyon sonrası dönemde, embriyoda ilk bölünme, embriyonik genomun aktivasyonu, morulanın kompaktlaşması blastosist oluşumu dahil olmak üzere birçok önemli gelişimsel olay meydana gelir (Gordon, 2003; Hansen, 2020).

Embriyo kültür gereksinimlerinin anlaşılması ve optimize edilmesi için tanımlanmış sistemlerin kullanılması esastır. Genel olarak, kültürlenmiş varsayımsal zigotların %20 ila %40'ı blastosist aşamasına ulaşacaktır (Rizos et al. 2008). Oosit olgunlaşması ve erken embriyo gelişimi olaylarını anlamamızdaki birçok ilerlemeye rağmen, çoğu IVEP sistemi, olgunlaşan oositlerin %30-40 arasında blastosist verimi bildirmektedir (Brackett & Zuelke, 1993).

Embriyo üretiminin başlangıcında, sığır embriyolarının kültürü *in vitro* olarak değil, çeşitli türlerin (fare, tavşan, koyun) oviduktlarında gerçekleştirilmiştir (Lazzari et al. 2010). Yumurta kanalı koşullarını taklit etmek için, ilk IVC, yüksek kalitede

dondurulabilir blastosistlerin üretilmesinde etkili olduğu kanıtlanan ortak kültür için sığır ovidukt epitelyum hücreleri. Embriyo desteği olarak ortak kültürün tanıtımı, 8 ila 16 hücreli aşamada erken embriyonik gelişim durmasının/blokajının üstesinden gelmeyi, blastosist oranını artırmayı ve embriyo kalitesini ve kriyoprezervasyon başarısını iyileştirmeyi amaçladı (BOEC) içermiştir (Abe & Hoshi, 1997). Hayvan türlerine göre farklılık göstermekle birlikte sığırlarda IVF çalışmalarında embriyonun 8-16 blastomerli aşamada gelişiminde blok meydana gelir yani hücre bölünmesine devam edemez. Birçok araştırıcı bunun nedeninin genellikle kültür medyumlarına erken dönemde ilave edilen glukozdan kaynaklandığını belirtilmektedir (Rubessa et al. 2011; Thompson, 2000). Geçmişte, çoğu ticari IVP, somatik hücrelerin tek tabakasını içeren ortak kültür sistemlerinin kullanımını içeriyordu. Sığır embriyolarının başarılı bir şekilde ortak kültüründe kullanılan hücre tipleri arasında, yumurta kanallarından (sığır veya domuz), fare yumurta kanalı, kumulus, granüloza ve uterustan elde edilen birincil hücrelerin yanı sıra Buffalo Rat Liver (BRL) ve Vero hücreleri. Bu hücreler, TCM-199, Menezo's B2 ve Ham's F-10 dahil olmak üzere bir dizi farklı ortamlarla ortak kültür sistemleri birleştirildi. Bu ortamlar, embriyoların yumurta kanallarından rahme geçerken *in vivo* olarak karşılaştıkları fizyolojik değişimi taklit etmeye çalışır (Hasler & Barfield, 2021).

Embriyo kültür vasatı olarak ilk zamanlarda Sığır Ovidukt Epitel Hücreleri (BOEC) kullanılmış sonrasında ise; TCM-199, SOF, Hamster Embriyo Kültür Vasatı-6 (HECM-6), Chatot Ziomek Bavister Medium (CZB), CR1aa (Charles Rosenkrans), KSOM ve Complete Defined Medium (CDM) gibi vasatlar da kullanılmıştır. TCM-199 gibi kompleks embriyo kültür vasatları, memelilerin erken embriyonal dönem gelişiminden ziyade somatik hücrelerin *in vitro* gelişimi için tasarlanmıştır. Sığır embriyoları ve somatik hücreler serumda çok sayıda embriyotrofin geliştirmektedir ve bunlar da

embriyo gelişiminde farklı görevler üstlenmektedir (Gordon 2003, Feugang et al. 2009). Günümüzde embriyo kültür vasatı olarak SOF'lar en çok kullanılan medyum haline gelmiştir. SOF'lar ovidukt sıvısının biyokimyasal analizi sonucu oluşturulmuştur (Gordon 2003). Sığır embriyolarının kültürlenmesi için en yaygın ortam, orijinal sentetik ovidukt sıvısı (SOF) ortamının varyasyonlarıdır (Tervit et al. 1972). SOF artık serumlu/serumsuz çoğu rutin sığır IVP sisteminin bir parçasıdır.

Hücre sayılarındaki farklılıklara ek olarak, embriyonik gelişim hızı IVC ortamları arasında farklılık gösterir. Belirli bir IVC ortamı içinde, daha hızlı gelişen embriyoların, hücre sayısı, gelişimin son aşaması ve transfer sonrası gebelik oranı temelinde sıklıkla daha yüksek kalitede olduğu açıktır (Hasler & Barfield, 2021). Başarılı bir embriyo kültür vasatı hazırlayabilmek için, *in vivo* ovidukt biyokimyasının iyi analiz edilerek taklit edilmesi ve bazı parametreler için optimum şartların sağlanması gerekmektedir. *İn vivo* ortamda ovidukt sıvısı yaklaşık 245-290 mOsm / kg arasında osmolariteye sahip ve pH'sı 7,2-7,6 arasında olduğu bildirilmektedir. Aynı zamanda ovidukt sıvısında Na^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2}+ ve Cl^{-} konsantrasyonları düşükken, K ve bikarbonat ($HCO3^{-}$) seviyeleri yüksektir. *İn vitro* ortamda enerji kaynağı olarak erken embriyonal gelişim döneminde laktat, pirüvat ve glutamin tercih edilirken morula aşamasından sonra ise glikoz tercih edilmektedir. Kültür sistemlerinde protein kaynağı olarak ise aminoasit ve makromoleküller kullanılmaktadır (Kaymaz, 2012).

Embriyonun oviducttan uterusa kadar olan göçünde ortama bağlı meydana gelen değişiklikler, bilim insanları tarafından araştırma konusu olmuş ve bu ortam değişimine bağlı olarak *in vitro* sıralı sistemler geliştirmişlerdir. *İn vivo* zigotların gelişimin ilk 6 veya 7 günü boyunca yumurta kanallarından aşağı ve uterusa doğru hareket ederken karşılaştıkları fizyolojik değişiklikleri taklit etme girişimine dayanır. SOF tabanlı kültür, IVC süresi boyunca bir

besiyeri formülasyonu veya kültür periyodunun belirli noktalarında besiyeri formülasyonunun değiştiği iki veya üç adımlı "sıralı" bir sistem içerebilir. Erken embriyonik gelişim sırasında sığır embriyoları için optimal glikoz seviyelerinin düşük, yaklaşık 0,5 mmol/L olması gerektiği iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, geç morula aşamasına ulaşıldığında, daha yüksek glikoz seviyeleri arzu edilir ve çoğu embriyo transfer ortamı yaklaşık 2.0 mmol/L glikoz içerir (Hasler & Barfield, 2021). Sığır embriyoları morula döneminden önceki bölünme aşamalarında enerji ihtiyaçlarını özellikle pirüvat ve laktattan sağlarken, morula döneminden sonra glukoza gereksinim duymaktadırlar. Buna ek olarak sitratın *in vitro* kültür aşamasında miyoinositol ile kullanıldığı durumlarda sığır embriyo gelişimine yüksek oranda destek olduğu bildirilmektedir (Jacobsen et al. 1999).

Mevcut yetersiz IVP embriyo geliştirme mikro ortamını telafi etmek için farklı stratejiler kullanılmıştır. En popüler stratejilerden biri, fetal bovine serum (FBS), serum replasmanları veya bovine serum albümin (BSA) gibi takviyelerin eklenmesini içerir. Belirli konsantrasyonların (>%5 v/v) üzerindeki FBS, embriyo üretimini iyileştirebilir, ancak kriyotoleransı tehlikeye atmakla (Rizos et al. 2003) ve LOS'yi tetiklemekle (Lazzari et al. 2002) ilişkilendirilmiştir.

IVC koşulları, son yıllarda, esas olarak besiyeri formülasyonlarının ayarlanmasıyla iyileştirilmiştir. Kültür koşulları embriyo gelişimi, kalitesini ve kriyotoleransı etkilemektedir (Rizos et al. 2008). Bununla birlikte, çoğu kültür sisteminde %30'dan fazla blastosist oluşumu elde edilebilirken, kısa sürede miktarın her zaman kaliteyle eşleşmediği ortaya çıktı (Lonergan et al. 2006; Niemann & Wrenzycki 2000; Wrenzycki et al. 2005, 2007) ve Serum takviyesi, değişen embriyonik ve fetal büyüme, sapkın embriyonik ve fetal gen ekspresyon paternleri ve yüksek perinatal kayıplar ile karakterize edilen iri buzağı sendromunun (LOS) ana nedensel faktörlerinden

biri olarak embriyo/fetal gelişim için zararlıydı (Young et al. 1998; Lazzari et al. 2002). Geniş bir saha çalışması, hücresiz ve serumsuz SOF ortamındaki *in vitro* kültür ile LOS insidansının büyük ölçüde azaldığını göstermiştir (Van Wagtendonk-de Leeuw et al. 2000).

FBS düşük konsantrasyonlarda bile (<%3 v/v) kültürün 4. gününden 5. gününe kadar embriyo gelişimini uyarıyor gibi görünmektedir (Thompson et al. 1998; Holm et al. 1999).

Ayrıca, patojenleri yayma riskinden dolayı hayvan bazlı serum içeren ortamlarda kültürlenen embriyoların ithalatı/ihracına ilişkin düzenleyici kısıtlamalara vurgu yapılması, serumu IVP ortamından çıkarma isteğini artırmıştır (Ferré et al. 2020).

SOF ortamının glutamin, sitrat ve esansiyel olmayan amino asitlerle (Holm et al. 1999; Keskintepe et al. 1995) ve BSA'nın polivinil alkol ile değiştirilmesiyle (Keskintepe & Brackett 1996) geliştirilen tamamen tanımlanmış medyum ortamıdır. Danimarkalı şirket EmbryoTrans Biotech ApS (Haslev, Danimarka), IVM'den IVF ve IVD'ye, blastosist aşamasına kadar tüm adımların serumsuz ortamda gerçekleştirildiği sentetik serum ikameli eksiksiz bir IVP ortamı portföyü geliştirdi. Bununla birlikte, gelecekte değişebilecek bir husus, IVP elde etmek için örneğin mikroakışkanlar veya bir kapsülleme teknolojisi kullanarak *in vivo* ortamı daha iyi taklit ederek IVP sürecinin otomasyonu ve minyatürleştirilmesidir (Wheeler et al. 2007; Blockeel et al. 2009).

Embriyo Değerlendirme

IVC ortamına alınan embriyoların morfolojisinin değerlendirilmesi, transferden önce canlı embriyoların seçilmesi için tercih edilen yöntem olmaya devam etmektedir. Bir embriyonun kalitesinin nihai testi, bir alıcıya transfer edildikten sonra canlı ve sağlıklı yavrular üretme yeteneğidir. Son yıllarda embriyonun morfolojisi, ultra strüktür yapısı, kriyotoleransı ve gen yapısı üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. Embriyo kalitesini etkileyen birçok

faktör bulunmaktadır. Blastosistin rengi, kompaktlığı ve hatch olma aşamasındaki büyüklüğü kalitesi üzerine etkilidir. Sığır embriyolarındaki anormal kromozom dağılımı veya kromozomal bozuklukları mevcut kullanılan morfolojik yöntemlerle tespit etmek mümkün değildir. Ancak zigot aşamasında iken ultra santrifüjleme veya multifoton lazer mikroskobu ile genetik analiz yapılabilmektedir. Bir diğer seçenek olarak biyopsi yönteminden yararlanılır. Preimplantasyon dönemde embriyonun yaşama kabiliyetini en çok normal bir morfoloji, hızlı bölünme oranı ve embriyodan salınan erken gebelik faktörleri (EPF, sitokinler ve luteotrofik faktörler) etkilemektedir. Bu faktörler ovumun taşınması ve aktivitesi üzerine doğrudan etkilidir (Makarevich, 2012).

Sığırlarda embriyoların kalitesinin değerlendirilmesi için 50X veya 100X'lik büyütme ile mikroskopta farklı perspektiflerden inceleme yapılmaktadır. Sığır embriyosunun büyüklüğü 150 ile 190 µm arasında değişmektedir. Embriyonun genel olarak çapı 1 hücreli aşama ile blastosist aşaması arasında hemen hemen aynıdır. En iyi kalite değerlendirme ovulasyondan hemen sonraki günlerde olmaktadır. İdeal embriyonun; kompakt ve küresel, perivitellin boşluğu net ayırt edilebilen, sitoplazmasında granül ve vezikül içermeyen, renk dağılımı eşit olan ve zona pellusidasının üniform olması istenmektedir (Bó & Mapletoft, 2018).

Embriyoların morfolojileri değerlendirilirken bazı kriterlere önem verilmektedir. Bu kriterler;

1. Hücresel fragmentlerin varlığı ya da yokluğu; erken embriyonal gelişim döneminde değerlendirilmesi kolaydır. İlerleyen aşamalarda değerlendirme daha zor olmaktadır. Hücreler zona pellusidaya dayanmakta ve perivitellin aralık görülememektedir. Bu nedenlerden dolayı değerlendirme oldukça zor olmaktadır.

2. Kompaklaşma derecesi; genellikle morulanın dış çevresinin yuvarlaklığı ve keskinliği değerlendirilmektedir.

3. Blastomerin renk ve dokusu; açıktan koyuya kadar değişir. Bu değişime birçok faktör etkilidir. IVF'de elde edilen embriyoların rengi *in vivo* yoldan elde edilen embriyolara göre daha koyu olmaktadır.

4. Düzensiz bölünme; zamanla senkronize olmayan bölünmeler nedeniyle oluşmaktadır (Makarevich, 2012)

Tablo 4. Embriyonun gelişim aşamalarının tanımlanması

Kod	**Aşama**	**Morfolojik Tanımlama**	**Kalite Kodu**	**Kalite Tanımlama**
1	1 Hücre	Fertilize olmayan tek hücre (UFO)	**1**	Mükemmel, İyi
2	2–12 Hücre	2–12 blastomerli aşama	**2**	Orta
3	Erken Morula	16–32 blastomerli, kompakt olmayan	**3**	Zayıf / Vasat
4	Morula	32–64 blastomerli kompakt hücre kümesi	**4**	Dejenere veya Ölü
5	Erken Blastosist	Blastoseller <%50		
6	Blastosist	Blastoseller>%50		
7	Expanded Blastosist	Embriyonun büyüklüğü artar ve zona pellusida duvarı incelir.		
8	Hatched Blastosist	Zona pellusida rüptürü/parçalanması sonucu embriyo kısmen atılır.		
9	Expanded-Hatched Blastosist	Embriyo tamamen atılır ve büyüklüğü artar, zona pellusida boştur.		

(Makarevich, 2012).

SONUÇ

Her bir spermatozoon ve oosit, uygun fizyolojik koşullar sağlandığında yeni bir canlıyı oluşturma potansiyeline sahip gametlerdir. Bu temel biyolojik prensipten hareketle geliştirilen IVP ve in vitro embriyo üretimi (IVEP) teknolojileri, ilk başarılı memeli embriyosunun 1959 yılında laboratuvar koşullarında elde edilmesinden günümüze kadar önemli bilimsel ve teknolojik ilerlemeler kaydetmiştir. Günümüzde IVEP, yalnızca deneysel bir yöntem olmaktan çıkmış, ticari sığır yetiştiriciliğinde embriyo üretiminin temel bileşenlerinden biri hâline gelmiştir (Hasler ve Barfield, 2021; Viana, 2024).

Son yıllarda oosit maturasyonu, fertilizasyon ve embriyo kültür sistemlerinde gerçekleştirilen iyileştirmeler sayesinde laboratuvar ortamı, embriyonun doğal gelişim ortamını daha başarılı bir şekilde taklit edebilmekte ve bunun sonucunda daha yüksek gelişim potansiyeline sahip embriyolar üretilebilmektedir. Bunun yanı sıra genomik seleksiyon, cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı, OPU uygulamaları ve gelişmiş embriyo kriyoprezervasyon tekniklerinin IVEP sistemleriyle entegre edilmesi, özellikle süt ve et sığırı yetiştiriciliğinde genetik ilerleme hızını önemli ölçüde artırmıştır. Vitrifikasyon ve embriyo transferindeki gelişmeler sayesinde in vitro üretilen embriyoların uzun süre güvenli şekilde saklanabilmesi ve ulusal ya da uluslararası ölçekte taşınabilmesi mümkün olmuş, böylece ticari embriyo üretimi küresel ölçekte daha yaygın bir uygulama hâline gelmiştir (Hasler ve Barfield, 2021; Viana, 2024).

İn vitro embriyo üretim teknolojileri yalnızca üstün genetik özelliklere sahip damızlık hayvanların çoğaltılmasına katkı sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda genom düzenleme, transgenik hayvan üretimi, somatik hücre çekirdeği transferi (SCNT), hastalık modellerinin oluşturulması ve biyomedikal araştırmalar gibi ileri biyoteknolojik uygulamaların da temelini oluşturmaktadır. Bu

nedenle IVEP sistemlerinin başarısı, yalnızca embriyo elde edilmesiyle değil, aynı zamanda embriyo kalitesinin artırılması, gebelik oranlarının yükseltilmesi ve sağlıklı yavru elde edilmesiyle değerlendirilmelidir.

Bununla birlikte, laboratuvar koşullarında geliştirilen embriyoların *in vivo* gelişim gösteren embriyolarla eşdeğer biyolojik kaliteye ulaştırılması, kültür ortamlarının optimize edilmesi, epigenetik değişimlerin en aza indirilmesi ve kriyoprezervasyon sonrası canlılık oranlarının artırılması hâlen araştırılması gereken önemli konular arasında yer almaktadır. Bu hedeflere ulaşılabilmesi için embriyoloji, moleküler biyoloji, genomik, epigenetik ve biyoinformatik alanlarının birlikte değerlendirildiği multidisipliner araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak, in vitro fertilizasyon ve embriyo üretim teknolojileri, günümüz sığır yetiştiriciliğinde genetik ilerlemeyi hızlandıran en etkili reprodüktif biyoteknolojilerden biri olarak kabul edilmektedir. Laboratuvar altyapısının güçlendirilmesi, standart protokollerin geliştirilmesi ve yeni biyoteknolojik uygulamaların IVEP sistemlerine entegrasyonu ile bu teknolojilerin gelecekte hem hayvancılık sektöründe hem de biyomedikal araştırmalarda çok daha geniş kullanım alanı bulacağı öngörülmektedir.

Kaynakça

Abe, H., & Hoshi, H. (1997). Bovine oviductal epithelial cells: their cell culture and applications in studies for reproductive biology. Cytotechnology, 23(1-3), 171–183. https://doi.org/10.1023/A:1007929826186

Akyol, N., Kızıl, S. H., & Karaşahin, T. (2007). İn Vitro Sığır Embriyosu Üretim ve Transferi. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 47(1), 1-8. https://izlik.org/JA47LT34BB

Akyol, N., & Sulu, N. (2005). Östrustaki İnek Serumu ve Fötal Buzağı Serumunun İn Vitro Embriyo Elde Edilmesine Etkisi. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 45(1), 1-8. https://izlik.org/JA93XW49HF

Ata, A., Güngör, Ş., Inanc, M. E., Cay, H. A., Herdoğan, M., Mart, F. N., Kahraman, D. (2022). Uygulamalı İn Vitro Fertilizasyon (İvf) Yöntemi ile Sığırlarda Embriyo Üretimi ve Embriyonun Dondurulması Sertifika Proğramı Kurs Notları.

Bavister, B. D., Rose-Hellekant, T. A., & Pinyopummintr, T. (1992). Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. Theriogenology, 37(1), 127–146. https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90251-L

Berglund B. (2008). Genetic improvement of dairy cow reproductive performance. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene, 43 Suppl 2, 89–95. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01147.x

Beydola, T., Sharma, R. K., Lee, W., Agarwal, A., Rizk, B., Aziz, N., ve Agarwal, A. (2013). Sperm preparation and selection techniques. Male Infertility Practice. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 244-251.

Blondin, P., & Sirard, M. A. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. Molecular reproduction and development, 41(1),54–62.https://doi.org/10.1002/mrd.1080410109

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.org/10.1007/978-3-319-92327-7_10

Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F., & Dressel, M. A. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. Biology of reproduction, 27(1), 147–158. https://doi.org/10.1095/biolreprod27.1.147

Brackett, B. G., & Zuelke, K. A. (1993). Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. Theriogenology, 39(1), 43–64. https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90023-X

Breininger, E., Cetica, P. D., & Beconi, M. T. (2010). Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm. Theriogenology, 74(6), 1036–1049. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.034

Carolan, C., Monaghan, P., Gallagher, M., & Gordon, I. (1994). Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. Theriogenology, 41(5), 1061–1068. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(05)80029-9

Chastant-Maillard, S., Quinton, H., Lauffenburger, J., Cordonnier-Lefort, N., Richard, C., Marchal, J., Mormede, P., & Renard, J. P. (2003). Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. Reproduction (Cambridge, England), 125(4), 555–563. https://doi.org/10.1530/rep.0.1250555

Chaubal, S. A., Ferre, L. B., Molina, J. A., Faber, D. C., Bols, P. E., Rezamand, P., Tian, X., & Yang, X. (2007). Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. Theriogenology, 67(4), 719–728. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.022

Chian, R. C., Okuda, K., & Niwa, K. (1995). Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation. Animal Reproduction Science, 38(1–2), 37–48. https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01357-R

Ciftci, M. F., & Dinc, D. A. (2023). The effect of different FSH administration before ovum pick up on superstimulation response and oocyte yield. *Reproduction in Domestic Animals*, *58*(8), 1055-1062. https://doi.org/10.1111/rda.14394

FAO. (2023). The State of Food and Agriculture 2023. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., & Navarro, P. A. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. Theriogenology, 71(5), 836–848. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023

Fukuda, Y., Ichikawa, M., Naito, K., & Toyoda, Y. (1990). Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. Biology of reproduction, 42(1), 114–119. https://doi.org/10.1095/biolreprod42.1.114

Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., Lagutina, I., & Lazzari, G. (2003). Bovine embryo technologies. Theriogenology, 59(2), 599–616. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01243-8

Galli, C., & Moor, R. M. (1991). Gonadotrophin requirements for the in vitro maturation of sheep oocytes and their subsequent embryonic development. Theriogenology, 35(6), 1083–1093. https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90356-I

Garcia-Garcia, R. M., Ward, F., Fair, S., O'Meara, C. M., Wade, M., Duffy, P., & Lonergan, P. (2007). Development and quality of sheep embryos cultured in commercial G1.3/G2.3 sequential media. Animal reproduction science, 98(3-4), 233–240. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.007

Gordon, I. (2003). Laboratory production of cattle embryos (2nd ed.). CABI Publishing.

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 : GSE, 47(1), 70. https://doi.org/10.1186/s12711-015-0151-3

Gilchrist, R. B., Lane, M., & Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human reproduction update*, *14*(2), 159-177. https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040

Hasler, J. F. (1998). The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. Journal of Animal Science, 76(Suppl. 3), 52–74. https://doi.org/10.2527/1998.76suppl_352x

Hasler, J. F. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminisces. *Theriogenology*, *81*(1), 152-169. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010

Hasler, J. F., & Barfield, J. P. (2021). In vitro fertilization. In R. M. Hopper (Ed.), Bovine reproduction (2nd ed., pp. 1124–1141). Wiley Blackwell.

Hazeleger, N. L., & Stubbings, R. B. (1992). Developmental potential of selected bovine oocyte-cumulus complexes. Theriogenology, 37(1), 219.

Hoque, S.A., Kabiraj, S.K., Khandoker, M.Y., Mondai, A., & Tareq, K.M. (2011). Effect of collection techniques on cumulus oocyte complexes (COCs) recovery, in vitro maturation and fertilization of goat oocytes. African Journal of Biotechnology, 10, 9177-9181.

Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., & Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology, 47(1), 23–32. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00336-6

International Embryo Technology Society (IETS). (2024). 2024 Data Retrieval Committee Report. Champaign, IL, USA.

Jacobsen, H., Holm, P., Schmidt, M., Sangild, P., Greve, T., ve Callesen, H. (1999). In vitro embryo production versus artificial insemination: Delivery type, birth weight and blood chemistry of the newborn calf. Theriogenology, 51(1), 226.

Jainudeen, M. R., Wahid, H., & Hafez, E. S. E. (2000). Ovulation induction, embryo production and transfer. In B. Hafez & E. S. E. Hafez (Eds.), Reproduction in farm animals (7th ed.). Lippincott Williams & Wilkins. https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch29

Hansen, P. J. (2020). The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle—why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it?. *Journal of Animal Science*, *98*(11), skaa288.

Krisher R. L. (2004). The effect of oocyte quality on development. *Journal of animal science*, *82 E-Suppl*, E14–E23. https://doi.org/10.2527/2004.8213_supplE14x

Lazzari, G., Colleoni, S., Lagutina, I., Crotti, G., Turini, P., Tessaro, I., Brunetti, D., Duchi, R., & Galli, C. (2010). Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus in vitro culture for different domestic species. *Theriogenology*, *73*(6), 748–757. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.08.001

Lee, Y., Lee, H., Park, B., Elahi, F., Lee, J., Lee, S. T., Park, C. K., Hyun, S. H., & Lee, E. (2016). Alpha-linolenic acid treatment during oocyte maturation enhances embryonic development by influencing mitogen-activated protein kinase activity and intraoocyte glutathione content in pigs. *Journal of animal science*, *94*(8), 3255–3263. https://doi.org/10.2527/jas.2016-0384

Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M. P., & Gordon, I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular reproduction and development*, *37*(1), 48–53. https://doi.org/10.1002/mrd.1080370107

Lonergan, P., & Fair, T. (2016). Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*, *4*(1), 255-268. https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110822

Makarevich, A. V. (2012). 8 Quality Assessment of Mammalian Preimplantation Embryos. Jozef Laurinčík et al., 115.

McEvoy, T. G., Alink, F. M., Moreira, V. C., Watt, R. G., & Powell, K. A. (2006). Embryo technologies and animal health - consequences for the animal following ovum pick-up, in vitro embryo production and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, *65*(5), 926–942. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.008

Meirelles, F. V., Caetano, A. R., Watanabe, Y. F., Ripamonte, P., Carambula, S. F., Merighe, G. K., & Garcia, S. M. (2004). Genome

activation and developmental block in bovine embryos. *Animal reproduction science*, *82-83*, 13–20. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.012

Merton, J. S., de Roos, A. P., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. L., & Dieleman, S. J. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, *59*(2), 651–674. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01246-3

Monniaux, D., Clément, F., Dalbiès-Tran, R., Estienne, A., Fabre, S., Mansanet, C., & Monget, P. (2014). The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link?. *Biology of reproduction*, *90*(4), 85. https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.117077

Moore, H. D., & Akhondi, M. A. (1996). In vitro maturation of mammalian spermatozoa. *Reviews of reproduction*, *1*(1), 54–60. https://doi.org/10.1530/ror.0.0010054

Nedambale, T. L., Du, F., Xu, J., Chaubal, S. A., Dinnyes, A., Groen, W., Faber, D., Dobrinsky, J. R., Yang, X., & Tian, X. C. (2006). Prolonging bovine sperm-oocyte incubation in modified medium 199 improves embryo development rate and the viability of vitrified blastocysts. Theriogenology, 66(8), 1951–1960. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.044

Norman, H. D., Hutchison, J. L., & Miller, R. H. (2010). Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. Journal of Dairy Science, 93(8), 3880–3890. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2781

Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., & First, N. L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, *25*(4), 591–600. https://doi.org/10.1016/0093-691x(86)90143-3

Pavlok, A., Lucas-Hahn, A., & Niemann, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular reproduction and development*, *31*(1), 63–67. https://doi.org/10.1002/mrd.1080310111

Paramio, M. T. (2010). In vivo and in vitro embryo production in goats. *Small Ruminant Research*, *89*(2-3), 144-148. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.037

Ponsart, C. A. H. D., Le Bourhis, D., Knijn, H., Fritz, S., Guyader-Joly, C., Otter, T., ... & Mullaart, E. (2013). Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, *26*(1), 12-21. https://doi.org/10.1071/RD13328

Rasmussen, S., Block, J., Seidel, G. E., Jr, Brink, Z., McSweeney, K., Farin, P. W., Bonilla, L., & Hansen, P. J. (2013). Pregnancy rates of lactating cows after transfer of in vitro produced embryos using X-sorted sperm. *Theriogenology*, *79*(3), 453–461. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.017

Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., de La Fuente, J., Lonergan, P., & Gutiérrez-Adán, A. (2008). Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *43 Suppl 4*, 44–50. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x

Rizos, D., Ward, F., Duffy, P. A. T., 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 blastocyst quality. *Molecular reproduction and development*, *61*(2), 234-248. **https://doi.org/10.1002/mrd.1153**

Rubessa, M., Boccia, L., Campanile, G., Longobardi, V., Albarella, S., Tateo, A., Zicarelli, L., & Gasparrini, B. (2011). Effect of energy

source during culture on in vitro embryo development, resistance to cryopreservation and sex ratio. *Theriogenology*, *76*(7), 1347–1355. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.004

Satılımış, F. (2019). *Farklı antioksidanların (pentoksifilin ve borik asit) in vitro sığır embriyo kültür medyumlarına ilavesinin embriyo gelişimi ve kalitesi üzerine etkileri* [Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı].

Saleh, W. (2017). Assessment of different methods of bovine oocytes collection, maturation and in vitro fertilization of abattoir specimens. Iraqi Journal of Veterinary Sciences, 31(1), 55–65. https://doi.org/10.33899/ijvs.2017.126711

Schwarz, K. R., Pires, P. R., Adona, P. R., Câmara de Bem, T. H., & Leal, C. L. V. (2008). Influence of nitric oxide during maturation on bovine oocyte meiosis and embryo development in vitro. Reproduction, Fertility and Development, 20(4), 529–536.

Sirard, J. R., & Pate, R. R. (2001). Physical activity assessment in children and adolescents. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, *31*(6), 439–454. https://doi.org/10.2165/00007256-200131060-00004

Sirard, M., & Blondin, P. (1996). Oocyte maturation and IVF in cattle. *Animal Reproduction Science, 42*, 417-426.

Sirard M. A. (2016). Somatic environment and germinal differentiation in antral follicle: The effect of FSH withdrawal and basal LH on oocyte competence acquisition in cattle. *Theriogenology*, *86*(1), 54–61. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.018

Sirard, M. A. (2017). The influence of in vitro fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model. *Journal of*

Developmental Origins of Health and Disease, *8*(4), 411-417. https://doi.org/10.1017/S2040174417000125

Sirard, M. A. (2018). 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction*, *156*(1), R1-R7.

Sungur, H., & Yurdaydın, N. (1991). Sığır embriyosunun dondurulması. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 31*(1–2), 96–110.

Trebichalská, Z., Kyjovská, D., Kloudová, S., Otevřel, P., Hampl, A., & Holubcová, Z. (2021). Cytoplasmic maturation in human oocytes: an ultrastructural study †. *Biology of reproduction*, *104*(1), 106–116. https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa174

Thompson J. G. (2000). In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. *Animal reproduction science*, *60-61*, 263–275. https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00096-8

Viana J, 2020. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. Embryo Technology Newsletter, 38, 4, 6-7.

Viana, J. H. M. (2024). 2024 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals, In: Embryo Technology Newsletter, v. 43, n.4, 2025.

Vincenti, L., Starvaggi Cucuzza, A., Girgis, S. M., Teodoro, P. L., & Quaranta, G. (1998). IVF, oocytes, embryos, bovine, Piedmontese breed. In Proceedings of the 14th Scientific Meeting of the European Embryo-Transfer Association (Vol. 14, p. 266). Edition Fondation Marcel Meirieux.

Wang, Z.-G., Yu, S.-D., & Xu, Z.-R. (2007). Effects of collection methods on recovery efficiency, maturation rate and subsequent embryonic developmental competence of oocytes in Holstein cow.

Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 20(4), 496–500. https://doi.org/10.5713/ajas.2007.496

Ward, F., Enright, B., Rizos, D., Boland, M., & Lonergan, P. (2002). Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*, *57*(8), 2105–2117. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00696-9

Watson A. J. (2007). Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of animal science*, *85*(13 Suppl), E1–E3. https://doi.org/10.2527/jas.2006-432

Wrenzycki, C. (2018). In vitro production of (farm) animal embryos. In H. Niemann & C. Wrenzycki (Eds.), *Animal biotechnology 1* (pp. 279–311). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92327-7_12

BÖLÜM 2

AKIŞ SİTOMETRİSİ VE VETERİNER REPRODÜKSİYON ALANINDA KULLANIMI

[1] RAMAZAN ARSLAN
[2] HASAN ALİ ÇAY
[3] AYHAN ATA

Giriş

Sperma kalitesinin tutarlı biçimde analiz edilmesi ve fertilite potansiyelinin daha kapsamlı değerlendirilebilmesi yönündeki gereksinimle, fertiliteyle ilişkili temel spermatozoon özelliklerinin in vitro olarak daha ayrıntılı biçimde incelenmesine olanak tanıyan tekniklerin sayısında belirgin bir artış meydana gelmiştir (Gilian et al., 2005; Del Olmo et al., 2013; Ata, 2023). Sperma analizi yapmak kolay gibi görünsede, doğru ve tekrarlanabilir bir analiz elde etmek için detaylara ve tekniğe titizlikle dikkat etmek çok önemlidir. Işık mikroskobu kullanılarak yapılan geleneksel sperma analizi, çoğu sperma üretim

[1] Arş. Gör., Aksaray Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 0009-0000-6275-5861.
[2] Öğr. Gör., Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 0000-0003-1622-2719.
[3] Prof. Dr. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 0000-0003-0590-5995.

merkezlerinde standart analiz yöntemi olmuştur. Ancak, manuel analizler öznel olabilmekte, teknisyenler arasında ve kendisinden kaynaklı hatalara yol açabilir. Benzer şekilde, spermatozoaların akrozom, membran ve DNA bütünlüğünü değerlendirmek için floresan mikroskobunun kullanımı, her numuneden analiz edilen spermatozoa sayısının az olması ve kapsamlı çok parametreli analiz yapamama nedeniyle oldukça yavaş ve sınırlıdır (Vincent et al., 2021). Zaman alıcı ve hataya açık geleneksel spermatozoon analiz teknikleri, yerini giderek yaygınlaşan akış sitometrisine bırakmaktadır. Akış sitometrinin, çoklu spermatozoon parametrelerini eş zamanlı olarak analiz etme yeteneği, sperma kalitesinin değerlendirilmesinde yenilikçi yaklaşımlar sunmaktadır. Bu yaklaşımlar, spermatozoon fonksiyonelliğinin daha kapsamlı anlaşılması için farklı testlerin entegrasyonunu hedeflemektedir. (Petrunkina et al., 2007). Akış sitometrisinin sperma kalite parametrelerinin objektif, güvenilir ve tekrarlanabilir şekilde değerlendirilmesine olanak sağlayarak, ticari sperma üretim merkezlerinde yüksek kaliteli ejakülatların seçimi sürecinde etkin bir karar destek aracı olarak kullanılabileceğini göstermektedir (DeJarnette et al., 2022). Akış sitometrisi ve bilgisayar destekli sperma analiz (BDSA) sistemleri nesnel ölçümleri, subjektif ölçümlere kıyasla her zaman döl verimi ile daha yüksek korelasyon göstermemiş olsa da, nesnel ölçümlerin kendi aralarında çok daha güçlü bir korelasyon sergilediği belirlenmiştir. Nesnel ölçümler arasındaki bu yüksek korelasyon, bireysel sperma numunelerinin saklanıp saklanmayacağına ilişkin karar sürecinde daha yüksek tutarlılık sağlamaktadır. Ayrıca, farklı laboratuvar teknisyenlerinin nesnel ölçümlerle benzer sperma kalite tahminlerine ulaşma tutarlılığı, subjektif ölçümlere kıyasla çok daha yüksektir (DeJarnette et al., 2022). Akış sitometrisi kullanılarak spermatozoaların çeşitli fonksiyonel özellikleri tespit edilebilir. Bunlar arasında spermatozoon plazma membran ölçümleri, akrozom bütünlüğü, mitokondriyal membran potansiyeli (MMP), reaktif

oksijen türleri (Reactive Oxygen Species, ROS), Deoksiriboz nükleik asit (DNA) hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinin belirlenmesi ve kromozomlardan cinsiyet ayrımı sayılabilir (Givan, 2001; Love, 2018; Chávez et al., 2018).

Genel Bilgiler

Akış Sitometrisinin Tarihçesi

Veteriner androlojide sitometrik uygulamaların gelişimi, diğer yaşam bilimlerinde ve hatta veteriner hekimliğin diğer uzmanlık alanlarında sitometrik teknolojinin ilerlemesine kıyasla ciddi şekilde gecikmiştir (Petrunkina ve Harrison, 2011). Sıvı akış içerisinde hücrelerin tek sıra halinde dizilerek analiz edilmesi ilkesini temel alan yöntem, hücre sayımında kullanılmak üzere ilk olarak Moldavan tarafından 24 Ağustos 1934'te Montreal'de tanımlanmıştır (Moldavan, 1934). Otomatik hücre sayımı için öncü çalışmalar Andrew Moldavan tarafından kırmızı kan hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir (Brito et al., 2016).

1945 yılında Coulter, iletkenlikteki değişimleri kullanarak olayların sayılmasını ve hücre boyutlarının ölçülmesini mümkün kılan bir yöntem geliştirmiştir. Bu ilk sistemde, hücreler çok ince bir kapillerden tek tek geçerken bir ışık demetini kesmekte, ışık sönme sayısı ise hücre sayısına karşılık gelmekteydi. Ancak bu teknik, sık sık tıkanmalara yol açmaktaydı. 1949 yılında Coulter, dış akış sıvısı ile hücre süspansiyonunun iyonik özellik göstermesi ve lipit membranla çevrili hücrelerin tuzlu sıvıya kıyasla zayıf iletkenler olması gerçeğinden yola çıkarak, elektriksel empedans değişimlerinin büyüklüğüyle orantılı olarak hücre hacmini tuzlu su süspansiyonlarında yüksek hassasiyetle ölçmeyi başarmıştır. Coulter tarafından geliştirilen bu sistem, zamanla hücre analiz cihazına (Coulter counter) evrilmiş ve kan hücresi sayımı amacıyla klinik laboratuvarlarda hızla benimsenmiştir (Brecher et al., 1956; Mattern et al., 1957). Tarihte ilk " akış (flow) " sitometri cihazı Wallace H.

Coulter tarafından ‘High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer’ başlığıyla 1956 yılında yayınlanmıştır (Coulter, 1957). 1965’te Mack Fulwyler, hücreleri boyutlarına göre ayırabilen ilk flow sitometri cihazını icat etti (Silveira, 2015). 1968’de Wolfgang Göhde, floresan temelli ilk flow sitometri sistemini tanıttı (Dittrich & Göhde, 1969). Dalak hücresi üzerinden 1970’lerde Len Herzenberg, floresanla aktive edilen hücre ayırıcı (FAHA) sistemini geliştirerek, akış sitometrinin hücre alt gruplarını ayırmada kullanılmasını sağladı (Julius et al., 1972).

Akış Sitometrisi Çalışma Prensibi

Akış sitometrisi sistemi dışarıdan bakıldığında, hücreleri analiz eden bir akış sitometri cihazı, cihazın akışkanlar sistemini oluşturan sıvıyı depo eden ve kullanıldıktan sonra toplandığı atık deposu ve akış sitometrisinin analizini elektronik ortama aktarıldığı bir bilgisayardan oluşmaktadır. Şekil 1.’ de akış sitometrisi ve dış akış sıvısı deposu ve atık deposu gösterilmiştir.

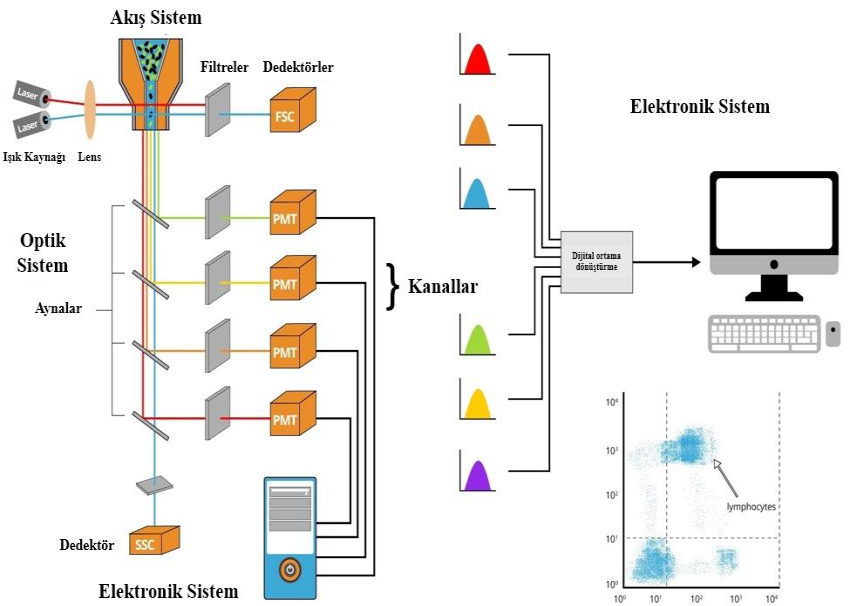
Şekil 1. Akış sitometrisi, dış akış sıvısı deposu ve atık deposu.



(Arslan, 2025, Yayınlanmamış veri)

Akış sitometrileri, akışkanlar, optik ve elektronik olmak üzere üç sistemden oluşur (McKinnon, 2018). Hücre süspansiyonu tamponlu bir çözelti içinde boru şeklindeki bir sistemden akar, belirli noktalarda lazer (veya bazı eski cihazlarda cıva ark lambası) ışığına maruz kalır. Geçen her parçacık sayılır ve görünür ışık saçılımı ve birden fazla floresan parametresi açısından analiz edilir. Hücrelerden kaydedilen yansımalar dijitalleştirilir ve bilgisayar tarafından işlenerek anlaşılır sonuçlar elde edilir. Bu şekilde, akış sitometrisi, tek tek spermatozoalarla ilişkili çoklu florokromlar tarafından yapılan işaretlemeyi algılar, böylece birden fazla spermatozoon özelliği aynı anda değerlendirilebilir (Hulett et al., 1969; Hossain et al., 2011). Şekil. 2.' de akış sitometri sisteminin çalışmasının şematize edilmiş hali gösterilmiştir.

Şekil. 2. Akış sitometri sisteminin çalışmasının şematize edilmiş görüntüsü. SSC:Yan Saçılım FSC:İleri Saçılım PMT: Fotomultipler tüp



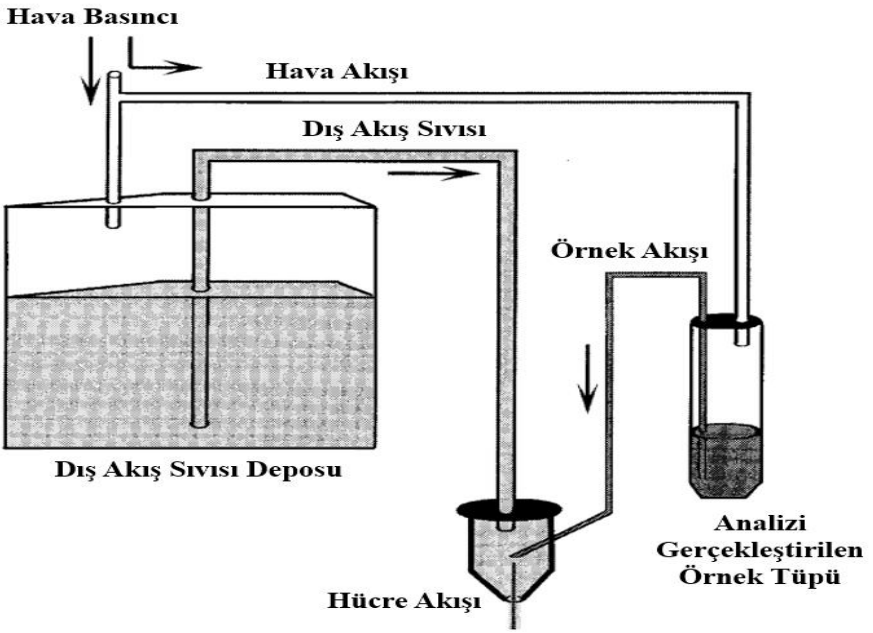
(Hamnett, 2024; Boster Bio)

Akışkanlar Sistemi

Akış sitometrisinin temel prensiplerinden biri, tek tek olacak şekilde partiküllerin özelliklerinin ölçülebilmesidir. İncelenen numune akış sitometrisine girdiğinde, partiküller örnek hattının üç boyutlu hacminde rastgele dağılmıştır ve bu hattın çapı çoğu hücrenin çapından önemli ölçüde daha büyüktür. Bu nedenle, örnek akışının, cihazın algılama sistemi tarafından tek tek analiz edilebilecek şekilde tek hücrelerden oluşan bir akış hâline getirilmesi gerekir. Bu sürecin düzenlenmesi ve kontrolü ise akışkanlar sistemi tarafından sağlanır (Bio-Rad Laboratories, 2022).

Akış sitometrileri, odaklanmış bir çekirdek akışı oluşturmak için bir kılıf hattı ve bir numune hattı kullanır; daralan akış kanalı, hücreleri tek sıra halinde tutar ve onları sorgulama noktasından geçirir (Aydınlatma kaynağı), ardından akış atık veya ayırma modüllerine gider. Dış akış sıvısı, basınçlı hatlar aracılığıyla cihazın merkezinde bulunan akış kısmına enjekte edilen seyreltici genellikle fosfat tamponlu salin (Phosohate Buffer Saline, PBS)'dir. Basınçlı bir hava hattı da numune tüpündeki askıda kalan hücreleri akış odasına enjekte eder. Numune akışı, dış akış sıvısı akışı içinde eş eksenli (koaksiyel) bir akış olarak adlandırılan merkezi bir çekirdek haline gelir; bu yapı, dış akış ile numune akışı arasındaki basınç farkına dayanır (Macey, 2010). Şekil. 3.'de akış sitometrisinin akışkanlar sistematiğinin şematize edilmiş görüntüsü gösterilmiştir.

Şekil. 3. Akış sitometrisinin akışkanlar sistematiğinin şematize edilmiş görüntüsü



(Givan, 2001)

Parçacıklar ile lazer ışını arasında doğru etkileşimin sağlanmasında kritik parametre, akışkan sistem bileşenlerinin düzgün çalışmasıdır. Bu nedenle, analizi yapan kişi her zaman akışkan sisteminin hava kabarcıklarından ve partikül kalıntılarından tamamen arındırılmış ve uygun şekilde basınçlandırılmış olduğundan emin olmalıdır (Adan et al., 2017).

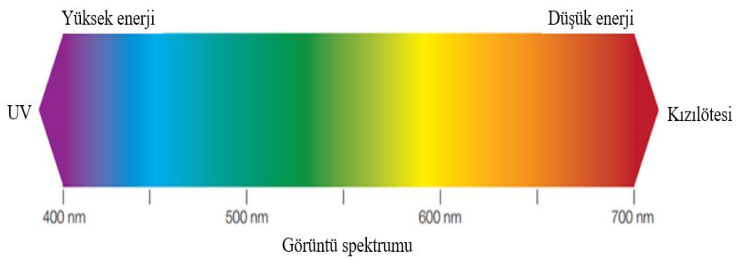
Optik Sistemi

Akış sitometrisi, lazer, mercek ve toplama optiklerini sabit pozisyonlarda tutan bir optik platforma sahiptir (Wilkerson, 2012).

Mercekler, lazer ışınını şekillendirmek ve odaklamak için kullanılır. Bu sırada lazer, elektronları yüksek voltajlı elektrik akımıyla yüksek enerji düzeylerine çıkararak ışık üretir. Uyarılmış elektronlar daha düşük enerji düzeylerine geri döndüklerinde, fotonlar yani ışık parçacıkları açığa çıkar (Wilkerson, 2012).

Lazerler, belirli bir frekansta tek bir dalga boyunda ışık (lazer ışını) üreten ve derin ultraviyole bölgesinden kızılötesi bölgesine kadar geniş bir spektrumda bulunabilen ışık kaynaklarıdır. Ürettikleri ışığın yoğunluğu genellikle milivat (mW) cinsinden ifade edilir ve bu değer belirli bir zamanda yayılan foton miktarını yansıtır. Akış sitometrisinde kullanılan lazerler, florokromların seçilmesinde ve tespit edilebilecek sinyallerin belirlenmesinde temel rol oynar. Geleneksel akış sitometrilerinde en yaygın kullanılan lazer dalga boyları arasında 355 nm (ultraviyole), 405 nm (mor), 488 nm (mavi), 532 nm ve 552 nm (yeşil), 561 nm (yeşil–sarı) ile 640 nm (kırmızı) bulunmaktadır. İleri düzey ve spesifik uygulamalar için farklı lazer dalga boyları da cihazlara entegre edilebilmektedir (McKinnon, 2018; Bio-Rad Laboratories, 2023). Şekil 4.'de görüntü spektrumu gösterilmiştir.

Şekil 4. Görüntü spektrumu



(Bio-Rad Laboratories, 2023)

Bir partikül ile etkileşime girdikten sonra lazer ışınının ekseninden genellikle 20° açıya kadar sapmayla ileri yönde saçılan ışık, bir fotomultipler tüp (PMT) veya fotodiyot tarafından toplanır ve ileri saçılım (forward scatter, FSC) kanalı olarak adlandırılır. FSC

ölçümü, genellikle partikül boyutunun tahmini için kullanılır. Büyük partiküller küçük partiküllere göre daha fazla ışık kırar. Bununla birlikte, bu ilişki örnek tipi, lazer dalga boyu, toplama açısı, örneğin ve dış akış sıvısının kırılma indisi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Uyarma hattına (lazer ışınına) 90° açıyla ölçülen ışık, yan saçılım (side scatter, SSC) olarak adlandırılır. SSC, bir hücre veya partikülün granüler yapısı ve içsel kompleksliği gibi özellikleri hakkında bilgi sağlar. Ancak tıpkı ileri saçılım (forward scatter, FSC) gibi, bu ölçüm de çeşitli faktörlerden etkilenebilir. FSC ve SSC özellikleri örnek tipine ve örnek hazırlama kalitesine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Bu nedenle, daha ayrıntılı ve güvenilir bilgi elde edebilmek için genellikle floresan işaretleme yöntemleri kullanılmaktadır. FSC ve SSC değerleri her partikül için özgün bir dağılım gösterir bu nedenden dolayı heterojen bir popülasyondaki farklı hücre tiplerini ayırt edebilmek için, FSC ve SSC'nin ilişkili ölçümleri birlikte kullanılabilir (Hulett et al., 1969; Givan, 2001; Reggeti & Bienzle, 2011; Bio-Rad Laboratories, 2023).

Toplama optiği, partikül ve lazer ışını etkileşiminden yayılan ışığı toplamak için kullanılan mercekler ile, toplanan ışığın belirli dalga boylarını ayırmak ve uygun optik dedektörlere yönlendirmek için kullanılan optik aynalar ve filtreler sisteminden oluşur (Reggeti & Bienzle, 2011).

Bir dedektörün belirli bir floresan boya için özgüllüğü, uygun bir filtre yerleştirilerek belirlenir. Üç ana filtre tipi bulunmaktadır. Şekil 5., Şekil 6. ve Şekil 7.'de filtreler gösterilmiştir.

1- Bant Geçişli Filtreler: Dedektöre yalnızca floresan boyanın emisyon tepe noktasına yakın dar bir dalga boyu aralığındaki ışığın ulaşmasına izin verir (Reggeti & Bienzle, 2011; Thermo-Fisher, 2025).

Şekil 5. Bant geçişli filtre görünümü



(Bio-Rad Laboratories, 2023)

2- Kısa Geçişli Filtreler: Belirtilen dalga boyuna eşit veya daha kısa dalga boyundaki ışığı geçirir (Reggeti & Bienzle, 2011; Thermo-Fisher, 2025).

Şekil 6. Kısa geçişli filtre görünümü



(Bio-Rad Laboratories, 2023)

3- Uzun Geçişli Filtreler: Belirtilen dalga boyuna eşit veya daha uzun dalga boyundaki ışığı geçirir (Reggeti & Bienzle, 2011; Thermo-Fisher, 2025).

Şekil 7. Uzun geçişli filtre görünümü



(Bio-Rad Laboratories, 2023)

Dikroik aynalar (veya dikroik ışın ayırıcılar), ayna kaplamasına sahip uzun geçişli ve kısa geçişli filtre türleridir. Bu aynalar, belirli bir dalga boyunun üzerindeki ya da altındaki ışığın geçişine izin vermekle kalmaz, aynı zamanda belirli dalga boyundaki ışığı farklı bir yöne yansıtırlar. Filtrelerin doğru seçimi ve sıralaması, birden fazla floresan sinyalin eşzamanlı olarak tespit edilmesini sağlar. Bu dikroik aynalar, ışığın dedektörlere doğru yönlendirilmesi ve yakalanması sürecinde kritik bir role sahiptir. Çoğu akış sitometrisi, yayılan ışığı algılamak için ayrı kanallar ve dedektörler kullanır; bu dedektörlerin sayısı kullanılan cihazın modeline ve üreticisine bağlı olarak değişir. Detektörler, uyarılmış floroforlar tarafından yayılan ve saçılan lazer ışığını algılar ve bunları fotokurrente (fotonlardan üretilen elektrik akımı) dönüştürerek elektronik sisteme iletir. Akış sitometrisinde en yaygın olarak kullanılan detektörler fotodiyotlar (PD) ve fotomultipler tüpler (PMT)'dir. Son yıllarda, floresan tespitinde hassasiyeti artırmak amacıyla PMT yerine daha yüksek verimlilik sunan çığ fotodiyotlarının (Avalanche Photodiode; APD) kullanıldığı modern akış sitometri sistemleri geliştirilmektedir. APD, başlangıçta fiber optik telekomünikasyonda kullanılmakla birlikte, özellikle 650 nm üzerindeki uzun dalga boyu emisyonlarının tespitinde yüksek hassasiyet göstermektedir (Thermo-Fisher; McKinnon, 2018; Bio-

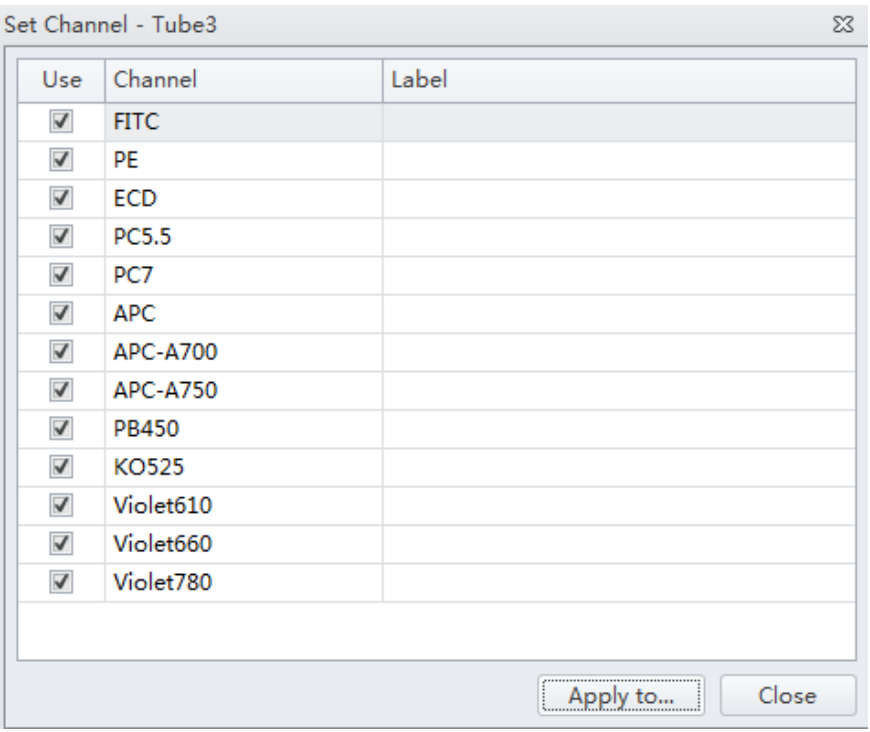
Rad Laboratories, 2023). PD'ler genellikle FSC tarafından üretilen daha güçlü ışık sinyallerini algılamak için kullanılırken, PMT'ler, SSC ve floresans tarafından üretilen daha zayıf sinyallerin tespitinde yaygın olarak kullanılır (Reggeti & Bienzle, 2011).

Sinyal Algılama ve İşleme

PMT veya PD tarafından yakalanan ışık sinyalleri, orantılı sayıda elektrona dönüştürülerek bir elektrik akımı oluşturur. Bu elektrik akımı yükselticiye (amplifikatöre) iletilir ve burada voltaj darbesine (voltage pulse) dönüştürülür. Partikül ışın demetinin merkezine geldiğinde, en yüksek saçılma veya floresans miktarı elde edilir. Partikül ışın demetinden ayrıldığında ise, darbenin genliği (pulse) yeniden bazal seviyeye (baseline) döner. Dedektörler tarafından başlangıçtaki ışık sinyalinin elektrik akımına dönüştürülmesinden sonra, analog bir nicelik olarak ölçülen analog sinyal üretilir. Bu elektrik akımı daha sonra iki tip yükseltici (amplifikatör) tarafından güçlendirilir: doğrusal (linear) ve logaritmik (logarithmic) amplifikatörler. Elde edilen analog sinyal, bilgisayar tarafından işlenebilmesi için analog–dijital dönüştürücüler aracılığıyla dijital sinyale dönüştürülmelidir. Bu dönüşümden sonra sinyaller, grafikler veya histogramlar biçiminde görüntülenebilen dijital verilere dönüşür. Her iki amplifikatörle elde edilen veriler özünde aynı olsa da, analog sinyalin dijital veriye dönüştürülme biçimine bağlı olarak dağılımlar farklı görünür. Ayrıca, dinamik aralık (dynamic range), doğrusal veya logaritmik yükseltme seçimini belirleyen önemli bir parametredir: Doğrusal amplifikasyon, sınırlı bir dinamik aralık gerektiğinde örneğin DNA analizi gibi DNA içeriğinde iki kat farkın ölçülmesi durumunda kullanılır. Buna karşılık, logaritmik amplifikasyon, çok daha geniş bir dinamik aralık gerektiğinde örneğin yüzey belirteci ekspresyonunun (100–10.000 kat arası) analizinde tercih edilir (Snow, 2004). Kanal isimlendirmeleri markalara göre değişmektedir. Örneğin Cytoflex, Beckman Coulter cihazında kanallar boya isimleri

ile (FITC, PE, ECD, PC5.5, PC7, APC, APC-A700, APC-A750, PB450, KO525, Violet610, Violet 660, Violet 780) isimlendirilirken, BİO-RAD markasında FL1, FL2 ve FL3 gibi isimlendirilmektedir (Beckman Coulter, 2015; Bio-Rad Laboratories, 2023. Şekil 8.'de Cytoflex cihazında kullanılan kanallar verilmiştir. Tablo 1.'de Cytoflex cihazında kullanılan lazer, floresan kanal, kanal ismi ve yaygın kullanılan floresan boyaları verilmiştir.

Şekil 8. Cytoflex cihazı kanal isimlendirmesi



(Beckman Coulter, 2015)

Tablo 1. Cytoflex cihazında kullanılan lazer, floresan kanal, kanal ismi ve yaygın kullanılan floresan boyalar BP: Bant Geçişli Filtre

Lazer	Floresan Kanal	Cytoflex Kanal İsmi	Yaygın Kullanılan Floresan Boyalar
405 nm (Mor)	450/45 BP	PB450	Pacific Blue™, V450, eFluor™ 450, BV421
	525/40 BP	KO525	Krome Orange, AmCyan, V500, BV510
	610/20 BP	Violet610	BV605, Qdot® 605
	660/20 BP	Violet660	BV650, Qdot® 655
	780/60 BP	Violet780	BV785, Qdot® 800
488 nm (Mavi)	525/40 BP	FITC	FITC, Alexa Fluor™ 488, CFSE, Fluo-3
	585/42 BP	PE	PE, PI (Propidium Iodide)
	610/20 BP	ECD	ECD, PE-Texas Red®, PE-CF594, PI
	690/50 BP	PC5.5	PC5.5, PC5, PerCP, PerCP-Cy5.5, PI
	780/60 BP	PC7	PC7
638 nm (Kırmızı)	660/20 BP	APC	APC, Alexa Fluor™ 647, eFluor™ 660
	712/25 BP	APC-A700	APC-A700, Alexa Fluor™ 700
	780/60 BP	APC-A750	APC-A750, APC-Cy7, APC-H7, APC-eFluor™ 780

(Beckman Coulter, 2015)

Floresan Boyalar

Floresan özellikler gösteren bileşiklere genellikle floresan problar veya boyalar denir ve fiilen "florokrom" terimi en uygunudur. Genellikle "florokrom" ve "florofor" terimleri birbirinin yerine kullanılır. Kesin olarak "florofor" terimi, nükleik asitler, lipitler veya proteinler gibi biyolojik makromoleküllere kovalent olarak veya adsorpsiyon yoluyla bağlanan florokromları ifade eder (Ishikawa-Ankerhold et al., 2012). Akış sitometrisinde 'prob' terimi, belirli bir molekül sınıfıyla reaksiyona girdiğinde veya kompleks oluşturduğunda floresans veren ve böylece o molekülün nicel olarak ölçülmesini sağlayan herhangi bir kimyasal için kullanılan genel bir terimdir (Givan, 2001). Bir floresan bileşik, kendine özgü bir dalga boyu aralığında ışık enerjisini soğurur. Bu ışığın soğurulması, bileşikteki bir elektronun daha yüksek bir enerji düzeyine yükselmesine neden olur. Uyarılmış elektron kısa sürede temel durumuna geri dönerken, fazla enerjiyi bir ışık fotonu olarak yayar. Bu enerji geçişi floresans olarak adlandırılır. Bir floresan bileşiğin uyarılabildiği dalga boyu aralığı soğurma spektrumu (absorption spectrum) olarak adlandırılır. Soğurma (absorption, excitation) geçişlerinde harcanan enerji, floresan geçişlerinde yayılan enerjiden daha fazla olduğundan, yayılan (emission) dalga boyları soğurulanlardan daha uzundur. Belirli bir bileşiğe ait yayılan dalga boylarının aralığı ise emisyon spektrumu (emission spectrum) olarak tanımlanır (Becton, Dickinson & Company, 2002). Tablo 2.'de Veteriner Androlojide kullanılan bazı floresan boyaların uyarılma ve yayma dalga boyları ve akış sitometrisinde hangi lazer kaynağı ile uyarılabileceği verilmiştir.

Tablo 2. Veteriner androlojide kullanılan bazı floresan boyaların uyarılma ve yayma dalga boyları, akış sitometrisindeki uyarıldıkları lazer kaynakları

BOYADAN BEKLENEN ETKİ	BOYALAR ve DALGA BOYLARI	UYARILMA VE YAYMA DALGA BOYLARI	LAZER
Membran Stabilitesi	Merocyanine-540 Yo-PRO-1 SNARF-1 pH 6 SNARF-1 pH 9	(555/578 nm) (491/509 nm) (549/586 nm) (574/639 nm)	Yeşil-Sarı Mavi Yeşil Sarı
Plazma Membranı ve Akrozom Bütünlüğü	FITC-PNA /PSA-PI Ethidium Homodimer-1 7-Aminoaktinomisin D TO-PRO-3 YO-PRO-1 LysoTracker DND-99 LysoSensor Green DND189 CFDA SYBR-14 PI DRAQ7 Dihydrorhodamine 123	(495/519 nm) (528/617 nm) (546/647 nm) (642/661 nm) (491/509 nm) (577/590 nm) (443/505 nm) (492/517 nm) (488/516 nm) (535/617 nm) (599/678 nm) (508/528 nm)	Mavi-Yeşil Mavi Mavi-Yeşil Uzak kırmızı Mavi Yeşil-Kırmızı Mor Mavi Mavi Mavi Kırmızı Mavi
Mitokondriyal Membran Potansiyeli	Rhodamine 123 JC-1 JC-9 MitoTracker Deep Red FM MitoTracker Red FM MitoTracker Green FM MitoTracker CMX-Ros MitoProbe DiIC1(5) DiOC6(3) TMRE Tetramethylrhodamine	(511/ 534 nm) (515/530 nm) (514/585 nm) (644/665 nm) (581/644 nm) (490/516 nm) (579/599 nm) (638/658 nm) (484/501 nm) (552/574 nm) (522/ 578 nm)	Mavi Mavi Mavi Kırmızı Yeşil-Kırmızı Mavi Mavi-Yeşil Yeşil-Kırmızı Mavi Mavi-Yeşil Mavi - Yeşil

Oksidatif Stres Lipid Peroksidasyon	MITOSOX Red	(396/610 nm)	Mor
	MITOSOX Green	(488/510 nm)	Mavi
	CellROX Deep Red	(644/665 nm)	Kırmızı
	CellROX Green	(485/520 nm)	Mavi
	CellROX Orange	(545/565 nm)	Mavi-Yeşil
	H2DCFDA	(492/517 nm)	Mavi
	DAF-2 DA	(495/515 nm)	Mavi
	DAF-FM DA	(495/515 nm)	Mavi
	5-IAF	(494/518 nm)	Mavi
	Alexa Fluor 488	(490/520 nm)	Mavi
	BODIPY FL	(502/511 nm)	Mavi
	BODIPY C11	(581/591 nm)	Yeşil
	roGFP	(490/511 nm)	Mavi
Esteraz Aktivitesi	CellTrace	(405/450 nm)	Mor
	Calcein AM	(494/517 nm)	Mavi
Kromatin/DNA Bütünlüğü	TUNEL (tdTomato)	(554/581 nm)	Mavi-yeşil
	COMET(Etidyum bromür)	(301/603 nm)	Ultraviyole
	SCSA (Akridin Turuncu)	(490/520 nm)	Mavi
	DAPI	(350/470 nm)	Ultraviyole
	Hoechst 33342	(350/461 nm)	Ultraviyole
	Hoechst 33258	(352/454 nm)	Ultraviyole
Apoptozis	Alexa Fluor 488	(490/525 nm)	Mavi
	Annexin-V	(485/535 nm)	Mavi
	YO-PRO-1	(491/506 nm)	Mavi
	SNARF-1 pH 6	(549/586 nm)	Yeşil
	SNARF-1 pH 9	(574/639 nm)	Sarı
	SYTO 16 Green (RNA/DNA)	(494/525 nm)	Mavi
	FLICA 660	(660/685 nm)	Kırmızı
	FAM-VAD-FMK	(493/517 nm)	Mavi
Sürfaktan Protein A	CL488-11850	(493/522 nm)	Mavi
Kapasitasyon Durumunun Değerlendirilmesi	Merocyanine-540	(555/578 nm)	Yeşil-Sarı
	BCECF AM	(503/524 nm)	Mavi
	Indo-1 AM	(349/482 nm)	Ultraviyole
	Fluo-3 AM	(504/ 526 nm)	Mavi
	Fluo-4 AM	(495/528 nm)	Mavi
	Rhod-5N-AM	(540/590 nm)	Yeşil-Sarı
	Fura-2	(368/510 nm)	Ultraviyole
	eFluor 506	(419/508 nm)	Mor
	eFluor 660	(651/668 nm)	Kırmızı

Veteriner Androlojide Akış Sitometrisinin Kullanımı

Spermatozoonun membran fonksiyonları, akrozomal bütünlüğü, DNA yapısı, kapasitasyon süreci ve mitokondriyal aktivitesi hakkında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu yapıların oldukça karmaşık mekanizmalarla ilişkili olduğu ortaya konmuştur. BDSA, floresan mikroskobu ve akış sitometrisi gibi ileri teknolojilerin kullanımına dayanan modern boyama yöntemleri, spermatozoonun daha önce sınırlı biçimde tanımlanabilen veya tespit edilemeyen yapısal ve fonksiyonel bozukluklarının belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu gelişmeler, fertiliteyle ilişkili spermatozoon hasarların daha güvenilir biçimde değerlendirilmesine ve spermanın in vivo döllenme potansiyelinin daha doğru tahmin edilmesine katkı sunmaktadır. Ayrıca bu parametrelerin in vivo döl verimiyle olan korelasyonlarının belirlenmesi, fertiliteye yansımalarının daha doğru şekilde değerlendirilmesi, üreme toksikolojisi alanında çevresel ve terapötik maruziyetlerin etkilerini incelemek için değerli bir kaynaktır (Cordelli et al., 2005; İnanç, 2016; Ata et al., 2023).

Florokromlara konjuge edilmiş bileşiklerin kullanımı ile plazma membranı, DNA ve kromatin bütünlüğü, akrozom bütünlüğü, kapasitasyon durumu, mitokondriyal aktivite, kromozomlardan cinsiyet ayrımı, hücre içi kalsiyum seviyesinin belirlenmesi ve oksidatif stresin araştırılmasını mümkün kılmıştır (Givan, 2001; Chavez et al., 2018; de Lima Rosa et al., 2023).

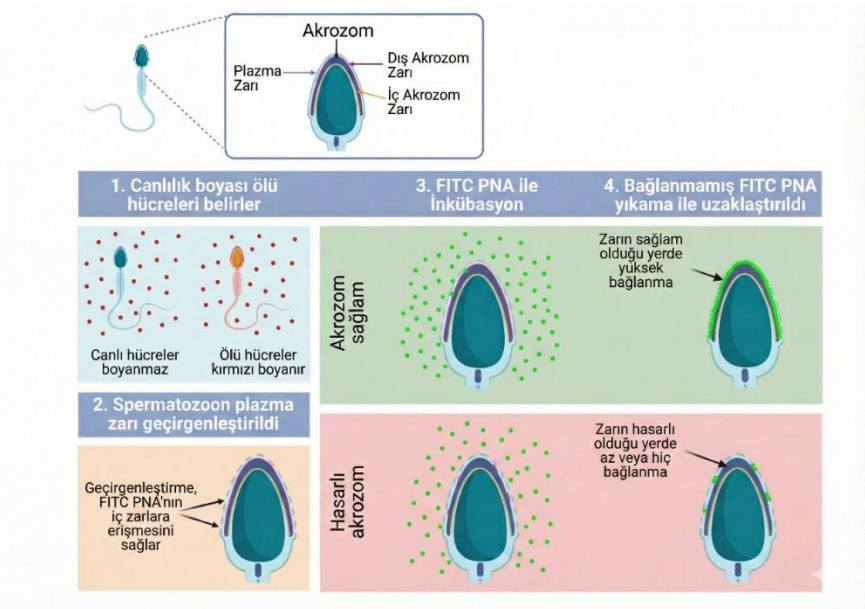
Spermatozoon Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Spermatozoon aktivitesi ve akrozom yapısının bütünlüğü, oositin döllenme başarısını doğrudan etkileyen önemli faktörlerdendir (Kowalczyk et al., 2020). Akrozomal durumun değerlendirilmesi, genellikle akrozomal ligandları tanıyan bitki kökenli lektinlerin kullanımıyla gerçekleştirilir. Bu amaçla en sık tercih edilen lektinler Pisum sativum agglutinin (PSA) ve Arachis

hypogaea agglutinin (PNA) olup, genellikle fluorescein izotiyosiyanat (FITC) ile konjuge edilir. Bu konjugasyon, florokromların tüm akış sitometre sistemlerinde kolaylıkla kullanılabilmesini sağlar (Vincent et al., 2021). Yumurta sarısı içeren sulandırıcılarla dondurulmuş spermanın analizinde sorun oluşturabilir ve spermatozoonların akrozomal bütünlüğünün yanlış değerlendirilmesine neden olabilir. *P*NA, dış akrozomal membranda yer alan galaktoz rezidülerine bağlanan bir lektindir ve akım sitometrisi ile akrozomal membran bütünlüğünün değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan belirteçlerden biridir. (Carvalho et al., 2010; Yi et al., 2012). PNA, dış akrozomal membranla ilişkili β-galaktoz parçalarına bağlanır ve akrozomal bölgeyle sınırlı bir boyanma gösterir. Bu nedenle, PSA'ya kıyasla daha yüksek spesifiklik gösterdiğinden akrozomal bütünlüğün değerlendirilmesinde daha sık tercih edilir (Carver et al., 1997). PSA-FITC, akrozomal matrikste bulunan mannoz ve galaktoz kalıntılarına özgül olarak bağlanmaktadır. PSA, sağlam akrozomal membranı geçemediği için yalnızca akrozom reaksiyonu gerçekleşmiş veya akrozomal membranı hasar görmüş spermatozoonları boyar (Maxwell et al. 1996; Januskauskas et al., 1999; Nagy et al. 2003). Plazma membranı ve dış akrozomal membran hasar gördüğünde lektinlerin akrozomal karbonhidrat molekülleriyle etkileşimi mümkün hale gelir. Bu nedenle, lektin temelli boyama yöntemleri yalnızca yapısal bütünlüğü değerlendirir; döllenme sürecinde işlevsel olarak rol oynayan moleküller hakkında doğrudan bilgi sağlamaz (Graham et al., 1990). Akrozomal ve plazma membran bütünlüğünün eş zamanlı değerlendirilmesi amacıyla, PNA-FITC/ propidium iodide (PI) ve PSA-FITC/PI protokolleri birçok çalışmada başarılı şekilde kullanılmıştır (Boe-Hansen & Satake, 2019). Ayrıca, insan spermatozoasında akrozom durumunun belirlenmesi amacıyla 46. Başkalaşım Kümesi (Cluster of differentiation 46, CD46) antikoruna bağlı FITC-konjuge keçi anti-fare immünoglobülini kullanılabilmektedir (BD Pharmingen™,

Ticari kodu 555988) (Carver-Ward et al., 1994). Şekil 10.'da fare spermatozoonunun FITC-PNA floresan boya ile boyanmasının floresan mikroskop altındaki görüntüsü, şekil 9.'de FITC-PNA boyasının çalışma mekanizmasının şematize edilmiş görüntüsü ve şekil 11.'de akış sitometrisi değerlendirme görüntüsü verilmiştir.

Şekil 9. FITC-PNA, floresan boyasının bağlanmasının şematize edilmiş görünütüsü

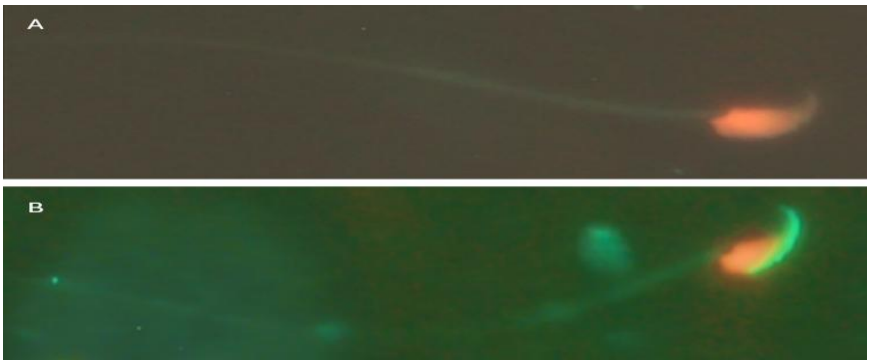


(Breeding Diagnostic, 2025)

Şekil 10. Fare spermatozoonun FITC-PNA floresan boya ile boyanmasının floresan mikroskop altındaki görüntüsü

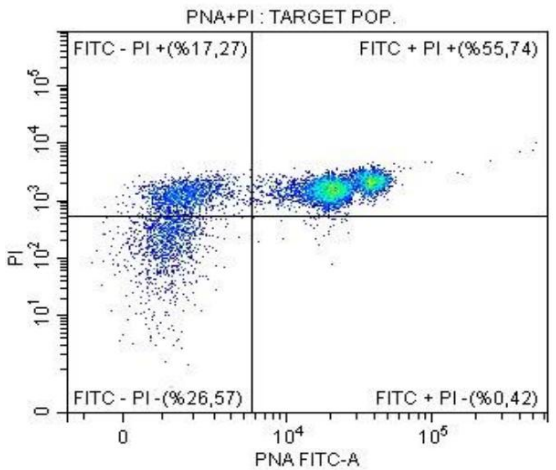
(A) Akrozomu sağlam spermatozoon

(B) Akrozomu sağlam olmayan spermatozoon



(Arslan, 2025, Yayınlanmamış veri)

Şekil. 11. Spermatozoon plazma membran/akrozom hasarının akış sitometri olarak değerlendirilmesi



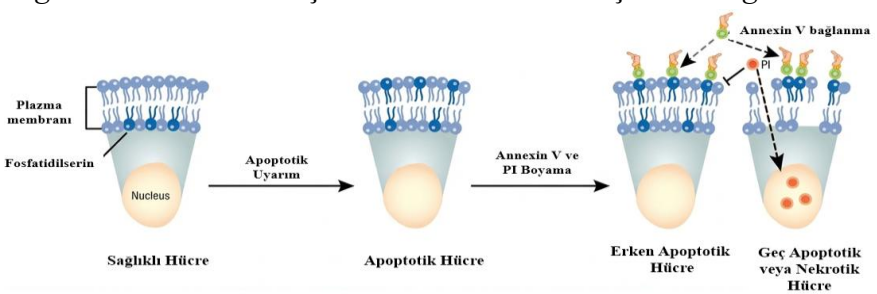
(Dönmez, 2023)

Spermatozoon Plazma Membran Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Plazma membranının bütünlüğü ve seçici geçirgenliği, hücrelerin hayatta kalabilmesi için temel bir gerekliliktir (Cabrita et al., 2010). Spermatozoon plazma zarı, hücreyi dış etkenlere karşı koruyan ve fizyolojik zorluklara yanıt verme yeteneği kazandıran kritik bir yapıdır. Ayrıca, spermatozoon kapasitasyon sürecinde, oosit ile etkileşim ve fertilizasyon olaylarında önemli bir rol oynar (Tapia et al., 2012). Hücre ölümü gerçekleştiğinde plazma zarının bütünlüğü hızla kaybolur, ancak spermatozoon ölümünün diğer biçimlerinde zar yapısında daha ince değişiklikler meydana gelir. Spermatozoon biyolojisinde canlılığın belirlenmesi için geleneksel yöntemler arasında zar geçirgenliğine dayalı canlılık testleri yer almaktadır. Bu testlerde, plazma zarını geçen DNA bağlayıcı boya SYBR-14 ile plazma zarından geçemeyen DNA bağlayıcı boya PI kombinasyonu yaygın biçimde kullanılmakta olup, spermatozoonun canlılığının değerlendirilmesi için kit olarak da pazarlanmaktadır. Özellikle 1990'lı yılların başlarında tanıtılmasından sonra, bu yöntem veterinerlik alanında büyük popülerlik kazanmıştır. Bu kombinasyon, o dönemde androloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan tek lazerli (mavi) akış sitometrileri için oldukça uygun bir yaklaşım olduğu belirtilmiştir (Peña & Rodriguez-Martinez, 2023). Şekil 13.'de fare spermatozonunun SYBR-14/PI ile boyanmış görüntüsü verilmiştir. Sadece ölü spermatozoaları boyayan bisbenzimidazol Hoechst 33258 boyası canlılık değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Hoechst 33258 boyası canlı spermatozoon hücrelerinde güçlü bir floresan yansımasına neden olmamaktadır (Garzón et al., 2007). Canlılık belirteci olarak kullanılan bir diğer boya YoPro-1, yalnızca ölü hücreleri değil, aynı zamanda sağlam zarları da özel iyon kanalları aracılığıyla geçebilir. YoPro-1, Pannexin-1 kanalları üzerinden hücre içine girebilmektedir (Chekeni et al., 2010). Zarı sağlam olmasına rağmen fizyolojik

olarak zedelenmiş spermatozoaların tanımlanmasına olanak tanıyan bu boya, apoptotik hücrelerin saptanmasında ve lipid peroksidasyonu sonucu artan zar geçirgenliğinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Normal koşullarda canlı spermatozoa YoPro-1 boyasını hücre içine alamadıkları için boyanmazlar; ancak ATP (Adenozin Tri Phosphate) tükenmesi sonucu bu mekanizmanın bozulması, boyanın hücre içinde birikmesine ve dolayısıyla fizyolojik bütünlüğü bozulmuş spermatozoa tespitine olanak sağlar (Balao da Silva et al., 2013; Peña & Rodriguez-Martinez, 2023). Merocyanine 540 (M540), fosfolipidlerin paketleme düzeni azaldığında plazma membranının dış tek tabakasına yerleşir ve bu özelliği sayesinde spermatozoon plazma membran kalitesinin değerlendirilmesinde yararlanılmaktadır (Savvuldi et al., 2023). Programlanmış hücre ölümü (apoptoz), spermatogenez sürecinde sık gözlenen fizyolojik bir olaydır (Cabrita et al., 2010). Konjuge Annexin-V FITC kullanılarak balık spermatozoalarında apoptoz durumu tanımlanmıştır. Behnam et al. (2023), sığır spermatozoalarında apoptotik benzeri değişikliklerin belirlenmesi amacıyla fosfatidilserinin hücre membranının dışında yer değiştirmesini saptamaya yönelik Annexin-V ve PI kitini kullanmışlardır. Şekil 12.'de şematize edilmiş görüntü verilmiştir.

Şekil 12. Spermatozoon fosfatidilserinin hücre membranının dışında yer değiştirmesini saptamaya yönelik Annexin-V ve PI'nın bağlanmasının şematize edilmiş görüntüsü



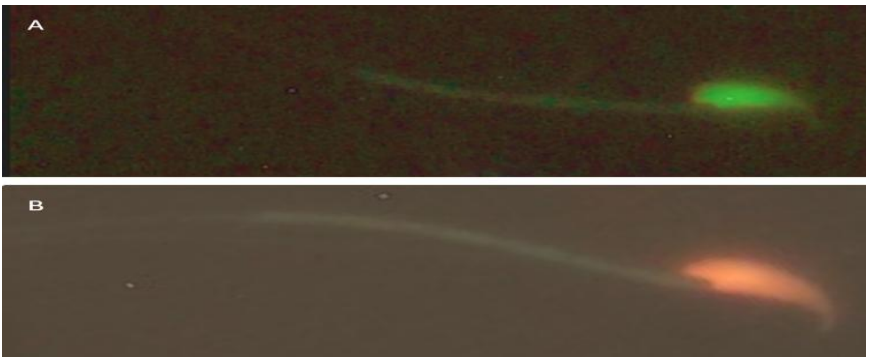
(Novus Biologicals, 2025)

Ayrıca Müller et al. (2008), 1,6-difenil-1,3,5-heksatriyen (DPH) florokomunu floresan anizotropisiyle ölçülen membran akışkanlığının, balık spermatozoon kriyotoleransını belirleyen en güçlü aday olduğunu bildirmiştir. Sadece zar bütünlüğü bozulmuş spermatoozonların DNA'sına bağlanan PI, ölü hücrelerin tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır (Savvuldi et al., 2023). Benzer şekilde Bernecic et al. (2021), plazma zarının bütünlüğünü tahmin etmek amacıyla 4′,6-Diamidine-2′-phenylindole dihydrochloride (DAPI) boyasını kullanmışlardır. Akış sitometri analizlerinde, ölü veya zar bütünlüğü bozulmuş spermatozoa ayırt edilmesi amacıyla 7-amino-aktinomisin-D (7-AAD) sıklıkla kullanılmaktadır. PI gibi, 7-AAD de yalnızca ölü hücrelere nüfuz eder; ancak daha düşük floresan yoğunluğuna ve daha uzun emisyon dalga boyuna sahiptir (PI için 610 nm'ye karşılık 670 nm). Bu iki özellik, yüzey antijenlerinin FITC ve fikoeritrin ile etiketlendiği çalışmalarda minimal spektral örtüşme sağladığından, 7-AAD'yi tercih edilen bir canlılık belirteci haline getirmektedir (Schmidt et al., 1992). Ayrıca, ölü, membran bütünlüğü veya fonksiyonu bozulmuş hücrelerin çekirdeklerini boyayan yeni bir uzak-kırmızı (far-red) floresan canlılık boyası olan DRAQ7, mikroskopi ve akış sitometrisiyle hücre sağlığının uzun süreli izlenmesi için geçerli bir belirteç olduğu bildirilmiştir (Akagi et al., 2013). Şekil. 13. ve şekil 14. SYBR-14/PI boyasının mikroskop altındaki görüntüsü ve akış sitometri değerlendirmesi verilmiştir.

Şekil 13. SYBR-14/PI floresan boya ile boyanmış fare spermatozoonun floresan mikroskop altındaki görüntüsü.

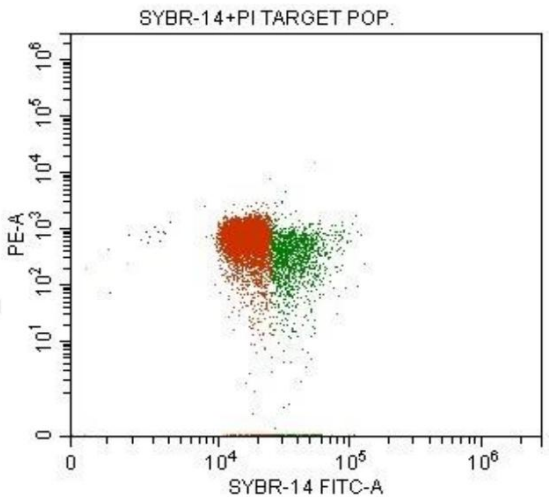
A: Membran bütünlüğü sağlam spermatozoon

B: Membran bütünlüğü sağlam olmayan spermatozoon



(Arslan, 2025, Yayınlanmamış veri)

Şekil 14. Spermatozoon ölü-canlı muayenesinin akış sitometrik olarak değerlendirilmesi



(Dönmez, 2023)

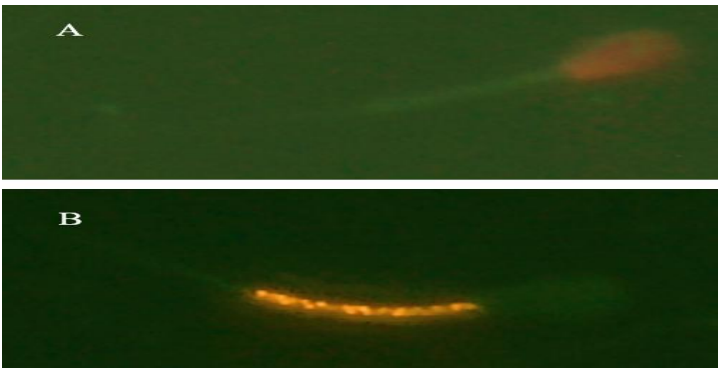
Spermatozoon Mitokondriyal Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Mitokondriler, hücre fonksiyonunda önemli rol oynayan çok işlevli organellerdir ve mitokondriyal biyogenezin sağlanabilmesi için çekirdek ve mitokondriyal DNA arasındaki düzenlenmiş etkileşimler gereklidir (Piomboni et al., 2012). Oksidatif fosforilasyon ve ATP sentezi yoluyla enerji üretiminden sorumlu olan mitokondriler, normal spermatooozon fonksiyonunun ve enerji dengesinin korunmasında hayati bir öneme sahiptir (Ruiz-Pesini et al., 2007). Akış sitometrisi, spermatozoon mitokondriyal biyolojisinin ve mitokondriyal oksijen tüketiminin değerlendirilmesinde kullanılan teknolojiler arasında yer almaktadır. Spermatozoon mitokondrilerinin, son yıllarda spermatozoa sağlığı ve fertilitenin biyolojik belirteçleri olarak öne çıktığı bildirilmektedir (Moraes ve Meyers, 2018). Ayrıca mitokondriler, apoptozun tetiklenmesinde görev alan faktörler olup spermatozoon olgunlaşmasında da rol oynamaktadırlar (Hossain et al., 2011). Artmış mitokondriyal aktivite, yüksek kaliteli spermatozoaların bir diğer önemli göstergesi olarak kabul edilmektedir (Vasicek et al., 2022). MMP'nin değerlendirilmesi karbosiyanin, rodamin ve rozamin türevleri gibi spesifik katyonik florokromlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Sousa et al., 2011). Rhodamine 123, mitokondriyal aktivitenin izlenmesinde kullanılan ilk florokromlardan biridir (Evenson et al., 1982). MitoTracker ailesine ait floresan boyalar, özellikle boğa spermatozoonlarının mitokondriyal fonksiyonelliğinin değerlendirilmesinde kullanılmakta olup, bu değerlendirme önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir (Savvuldi et al., 2023). 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) ise, yüksek ve düşük MMP'yi ayırt edebilme özelliğiyle bilinmektedir (Amaral & Ramalho-Santos, 2010). MMP'deki değişikliklerin spermatozoon kapasitasyonunun birincil belirteci olup olmadığı tam olarak açıklığa kavuşmamış olsa da, hareketli yaban domuzu

spermatozoalarının hareketsiz olanlara göre daha yüksek mitokondriyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Guo et al., 2017). Yüksek membran potansiyeline sahip mitokondrilerde JC-1 mitokondriyal matrikse girerek burada birikir, J-agregatları oluşturur ve kırmızı floresan yayılımına neden olur. Buna karşılık, düşük membran potansiyeline sahip mitokondrilerde JC-1 birikemez ve sitoplazmada yeşil floresan monomer formunda kalır (Vincent et al., 2021). PI ile birlikte Rhodamine 123, JC-1 veya MITO kullanılarak gerçekleştirilen çift boyama sistemleri, metabolik olarak aktif mitokondrilere sahip canlı spermatozoaları, ölü spermatozoaları ve apoptoz sürecindeki spermatozoaları ayırt etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bozulmuş plazma membranına sahip ölü spermatozoaların çekirdekleri PI ile kırmızı renkte boyanırken, aktif mitokondriye sahip spermatozoalar Rhodamine 123 veya MITO ile yeşil, JC-1 ile ise yeşilden kırmızı-turuncuya kadar değişen tonlarda floresan yayılımı göstermektedir. Apoptoz sürecindeki spermatozoalarda ise baş kısmı kırmızı, mitokondriyal bölge yeşil renkte gözlenmektedir (Garner et al., 1997). Ayrıca 3,3'-diheksiloksakarbosiyanin iyodür (DiOC6(3)) probu da boğa spermatozoalarının mitokondriyal durumunun değerlendirilmesinde kullanılabilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda (<20 nM) DiOC6(3), mitokondriyal membranlar arası boşlukta spesifik olarak birikmekte ve MMP'ye sahip hücrelerde yeşil floresan yoğunluğunda artışa yol açmaktadır (Savvuldi et al., 2023). Siyanin boyası DilC1(5) kullanılarakta MMP analizi gerçekleştirilebilmektedir (Bucher et al., 2019). MMP'deki azalma, soğuk hasarı ve spermatozoonun morfolojik anormallikleri ile ilişkilendirilmektedir (Petrunkine & Harrison, 2011). JC-1 ve DRAQ7 floresan boyalarının birlikte kullanımıyla, MMP ve spermatozoon canlılığı eş zamanlı olarak değerlendirilebilmektedir (Gaitskell-Phillips et al., 2022). Şekil 15.'de JC-1 floresan boya ile boyanmış boğa spermatozoonunun floresan mikroskop altındaki görüntüsü şekil 16.'da akış sitometrik değerlendirilmesi verilmiştir.

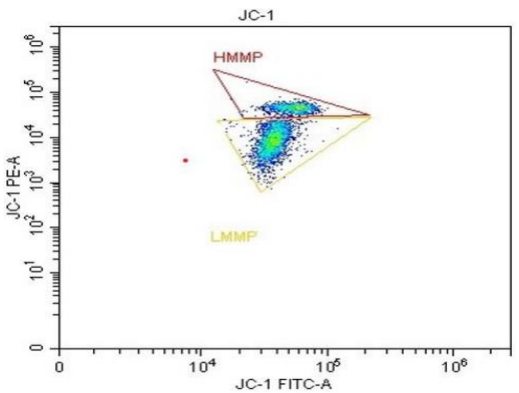
Şekil 15. JC-1 floresan boya ile boyanmış boğa spermatozoonunun floresan mikroskop altındaki görüntüsü

A: Mitokondriyal membran potansiyeli bulunmayan spermatozoon
B: Mitokondriyal membran potansiyeli bulunan spermatozoon



(Arslan, 2025, Yayınlanmamış veri)

Şekil 16. Spermatozoon mitokondrial aktivasyonun akış sitometrik değerlendirilmesi



(Dönmez, 2023)

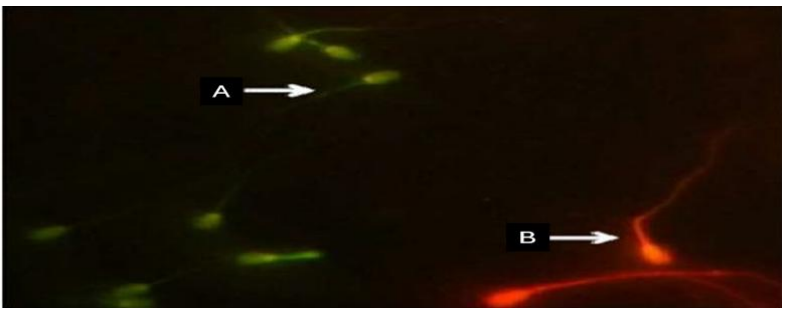
Spermatozoon DNA Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Erkeklerdeki infertilite genellikle spermatozoalarda yüksek oranda DNA hasarı ile ilişkilidir ve bu hasar da infertilite, embriyonik gelişim bozukluğu, yüksek atık oranı ve doğan yavrularda kusur riskinin artması gibi çok çeşitli olumsuz klinik sonuçlarla bağlantılıdır (Aitken et al. 2004; Aitken & Lullis, 2010). Spermatozoon DNA hasarı, akridin turuncusu (AT) boyası kullanılarak akış sitometrisi ile veya alternatif olarak TUNEL tekniği aracılığıyla rutin olarak değerlendirilmektedir (Evenson & Jost, 2000; Waterhouse et al., 2006). AT, çift sarmallı ve tek sarmallı DNA'ya farklı biçimlerde bağlanarak floresan özelliklerinde değişim oluşturur; bu sayede DNA parçalanma indeksi (%DPI), yani denatüre olmuş tek sarmallı DNA içeren hücrelerin toplam hücre sayısına oranı hesaplanabilir (Savvulidi et al., 2023). Şekil 17.'de boğa spermatozoonunun akridin turuncu floresan boyası ile boyanmasının floresan mikroskop altındaki görüntüsü verilmiştir. Spermatozoon Kromatin Yapısı Testi (Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA), AT boyasının akış sitometrisi ile tespit edilen metakromatik özelliklerinden yararlanarak, memeli spermatozoon çekirdeği DNA'sının asit kaynaklı hücre içi denatürasyona duyarlılığını ölçmek için yaygın biçimde kullanılan bir yöntemdir (Cabrita et al., 2010). DNA bütünlüğündeki bozulmaların, gebelik süresinin uzaması ve doğal gebelik olasılığının düşmesiyle yakından ilişkili olduğu bildirilmektedir (Giwercman et al., 2010; Spano et al., 2000). Çözüm sonrası spermatozoon canlılığı ve DNA bütünlüğü, sperma kalitesinin değerlendirilmesinde vazgeçilmez parametreler olarak kabul edilir. Bununla birlikte, bu özellikler farklı hücre alt popülasyonlarında aynı düzeyde varyans göstermeyebilir; dolayısıyla, spermatozoonların kriyo-direnci ve fertilite kapasitesi hakkında tamamlayıcı bilgiler sağlar (Odinius et al., 2024). Her ne kadar spermatozoon DNA hasarındaki artış genellikle küçük bir fark olarak görünse de DPI, "buzdağının görünen kısmı" etkisi olarak

tanımlanmakta ve spermatozoon fonksiyonundaki daha derin bozulmaların bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Evenson & Wixon, 2006). Şekil 18.'de spermatozoa DNA bütünlüğünün akış sitometrik değerlendirilmesi verilmiştir.

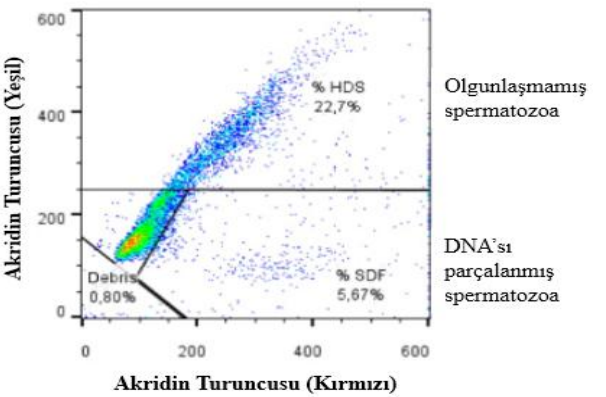
Şekil 17. Boğa spermatozoonunun akridin turuncu floresan boyası ile boyanmasının floresan mikroskop altındaki görüntüsü A: Normal DNA'ya sahip spermatozoon

B: Hasarlı DNA'ya sahip spermatozoon



(Khaki et al., 2013)

Şekil 18. Spermatozoon DNA bütünlüğünün akış sitometrisinde değerlendirilmesi



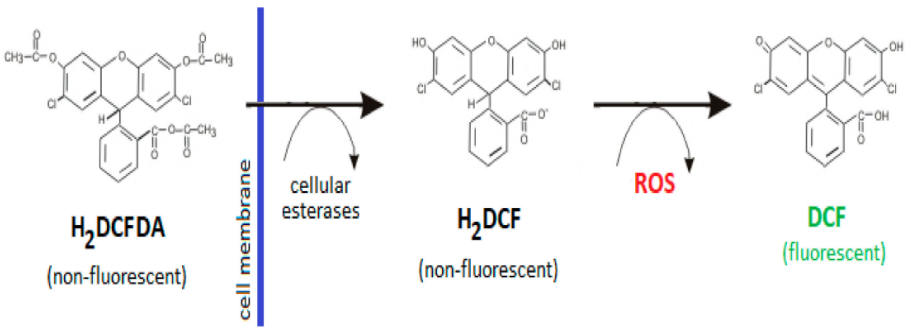
(Vašíček et al., 2022)

Spermatozoon Oksidatif Stres ve Lipit Peroksidasyonunun Değerlendirilmesi

Spermatozoon mitokondriyal biyolojisine ve seminal plazma ile spermatozoon etkileşimlerine olan ilginin artmasıyla birlikte, spermadaki ROS varlığı ve etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir (Boe-Hansen & Satake, 2019). Lipid peroksidasyonu, oksidatif stresin bir sonucu olup, birbirine yakın peroksidasyon ürünlerinin oluştuğu bir zincir reaksiyonudur. Spesifik fosfolipitlerin iç membrandan dış membrana yer değiştirmesinin tanımlanması, apoptotik hücrelerin saptanması için klasik bir testtir. Normal koşullar altında, fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin hücre zarının iç tabakasında bulunur. Hücre apoptoza girdiğinde, fosfatidilserinin dış zara taşınarak bir "beni ye" sinyali oluşturur. PS'nin varlığı, hücrelere sessiz, iltihaplanma olmadan fagositoz edileceklerini bildirir (Peña & Rodriguez-Martinez, 2023). Şekil 12.'de şematize edilmiş görüntüsü verilmiştir. Oksidatif stres, spermatozoonun döllenme potansiyelini bozmakla kalmaz, aynı zamanda normal ve sağlıklı bir embriyo oluşturma yeteneğini de bozar (Aitken et al., 2009). Hücrelerde biriken ve oksidasyon sonrası floresan hale gelen ve böylece spermatozoadaki ROS'un saptanması için kullanılabilecek çeşitli problar bulunmaktadır (Vasicek et al., 2022). Örneğin, MitoSOX probu, boğa spermatozoasında süperoksit üretimini değerlendirmek için rutin olarak kullanılır. CellRox probu, spermatozoon hücrelerinde ROS tespiti için kullanılır. Prob, spermatozoona nüfuz eder ve hücre içi ROS tarafından okside edildiğinde yoğun yeşil floresan yayar. Hidroetidin, süperoksit anyonunu (O_2^-) varlığında etidyuma okside olan bir bileşiktir. Bu florokrom, hücre içi süperoksit seviyelerini belirlemek için kullanılır.. 2',7'-diklorodihidrofloresin diasetat (H2DCFDA), ROS varlığında diklorofloreseine dönüşen ve yeşil floresan yayan, hücre geçirgen bir bileşiktir ve PI ile kombine boyaması gerçekleştirilebilir (Savvuldi et al., 2023). Şekil 19.'da şematize edilmiş görüntüsü

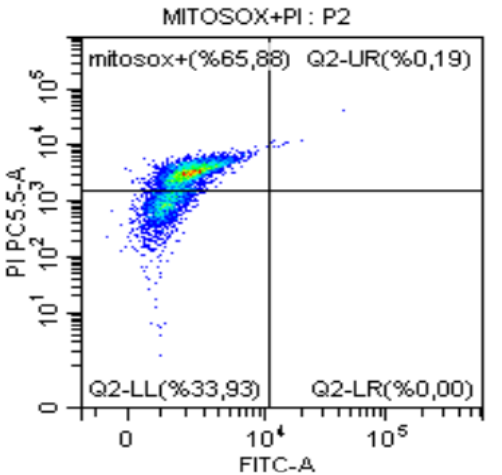
verilmiştir ROS'un tetiklediği oksidatif stres veya hasar, spermatozoanın dölleme yeteneği üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabilir (Vasicek et al., 2022). Lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için BODIPY 581/591 C11, BODIPY FL ve Alexa Fluor 488, Glutatyon seviyesinin tespiti için DAPI, nitrik oksit seviyesinin tespiti için DAF-FM, hidrojen peroksit tespiti için roGFP probu kullanılır (Thermo Fisher Scientific, 2025). Nitrik oksit seviyesinin tespiti için DAF-2 DA kullanılmaktadır (Ortega Ferrusola et al., 2009). Şekil 20.'de spermatozoon mitokondrial oksidatif stresin akış sitometrik değerlendirilmesi ve Şekil 21.'de spermatozoon mitokondrial oksidatif stresin akış sitometrik değerlendirilmesi gösterilmiştir.

Şekil 19. H2DFCDA floresan boyasının çalışma prensibi



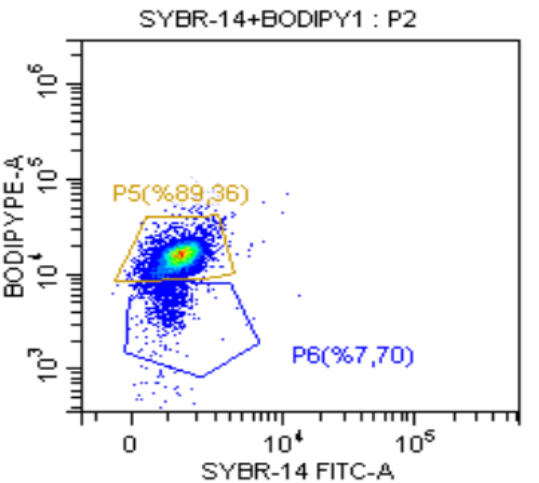
(Nova et al., 2020)

Şekil 20. Spermatozoon mitokondrial oksidatif stresin akış sitometrik değerlendirilmesi



(Dönmez, 2023)

Şekil 21. Spermatozoon lipit peroksidasyon seviyesinin akış sitometri değerlendirilmesi



(Dönmez, 2023)

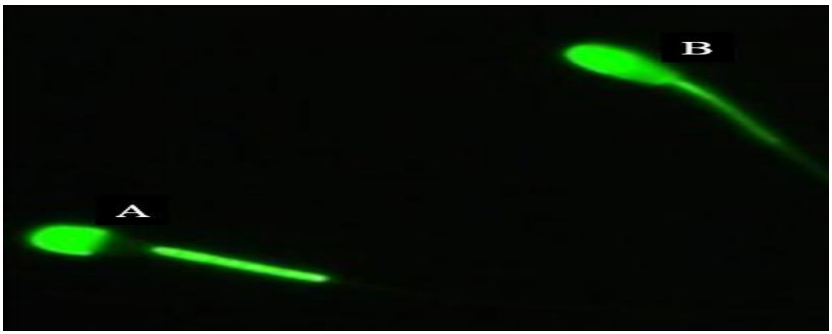
Spermatoozon Hücre İçi Kalsiyumun Belirlenmesi

Ejakülasyondan sonra, spermatozoonlar aktif hareket edebilselerde, dölleme yeteneğinden yoksundurlar. Spermatozoonlar, dişi genital kanalında zamana bağlı bir süreç olan kapasitasyon adı verilen işlemle dölleme yeteneğini kazanırlar (Austin, 1951; Chang, 1951). Spermatozoonlar, in vivo olarak dişi üreme sisteminde etkileşime girerek veya in vitro olarak sığır serum albümini, kalsiyum ve bikarbonat içeren tanımlanmış bir kapasitasyon medyumu içinde kapasite kazanır (Luque et al., 2018). Kalsiyum, spermatozoon hareketini, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu düzenleyen ve bunların tümü başarılı döllenme için kritik öneme sahip olan temel bir iyondur. Başarılı bir fertilizasyon için bu üç süreç gereklidir. Akrozom reaksiyonu, spermatozoonun oosite nüfuz etmesini sağlar. Akrozom reaksiyonuna girebilmek için, spermatozoonun dişi üreme sisteminde birkaç saat kalması gerekir. Bu süre zarfında, topluca kapasitasyon olarak adlandırılan bir dizi biyokimyasal dönüşüm gerçekleşir (Finkelstein et al. 2020). Kapasite kazanmış canlı spermatozoanlar bir alt popülasyonunda, kapasite kazanmamış spermatozoalara kıyasla Ca^{+2}'de bir artış gözlemlenmektedir (Luque et al., 2018). Spermatozoon hücrelerindeki hücre içi kalsiyum konsantrasyonu, Ca^{+2} bağlanmasının ardından floresan artışını gösteren hücre geçirgen bir gösterge olan Fluo-3 AM, Fluo-4 AM, Rhod-5N-AM , Indo-1 AM, Fura-2 ve eFluor™ 514 probu kullanılarak değerlendirilir. Spermatozoa popülasyonları, yüksek ve düşük kalsiyum seviyelerine sahip spermatozoa olarak sınıflandırılır (Dubé et al., 2003; Petrunkina & Harrison, 2013; Yeste et al., 2015; Chávez et al., 2018; Savvuldi et al., 2023). Fluo-3 ve Fluo-4 floresan problarının, merocyanine 540'a kıyasla kapasitasyon sürecini göstermede daha başarılı olduğu bildirilmiştir (Vašíček et al., 2022). Şekil 22.'de Fluo-4 AM ile boyanmış spermatozoon gösterilmiştir. Şekil 23.'de akış sitometrisi ile değerlendirme sonucu gösterilmiştir.

Şekil 22. Fluo-4 AM ile boyanmış boğa spermatozoalarının floresan mikroskop altındaki görüntüleri.

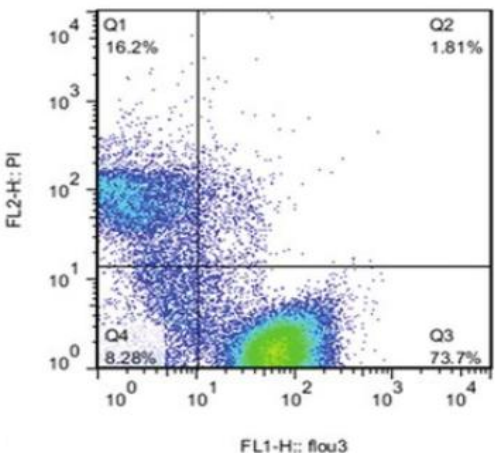
A:Kapasite olmuş spermatozoon

B: Kapasite olmamış spermatozoon



(Camara Pirez et al., 2021)

Şekil 23. Hücre içi kalsiyum seviyesinin akış sitometri değerlendirilmesi



(Ghanbari et al., 2019)

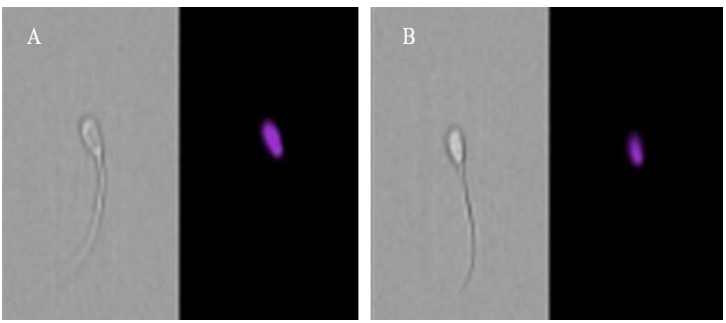
Cinsiyet Kromozomlarının Ayrılması

X ve Y kromozomu taşıtan spermatozoonların ayrılmasına dayalı cinsiyet tayini ilk kez 1989 yılında tavşanlarda gerçekleştirilmiştir (Johnson et al., 1989). Akışla ayırma (flow sorting) yöntemi, X ve Y kromozomları taşıyan spermatozoonları ayırmak için kullanılmıştır (Givan, 2001). Teknik, spermatozoon DNA'sının floresan bir boya (Hoechst 33342) ile etiketlenmesine ve bir akış sitometresi kullanılarak X dişilik cinsiyet kromozomonu taşıyan speramtoozonların biraz daha fazla miktarda floresanının tespit edilmesine dayanır (Johnson & Welch, 1999). Sığırların X kromozomları, Y kromozomlarından oldukça büyük olduğu için, X kromozomu taşıyan spermatozoonlar, Y kromozomu taşıyan erkek kardeşlerine göre yaklaşık %4 daha fazla DNA'sı vardır. Hoechst boyası ile boyama yapılarak, iki spermatozoon sınıfı, akış sitometrisi yardımıyla, floresan yoğunluklarına göre ayrılabilir (Givan, 2001). Şekil 24.'te gösterilmiştir.

Şekil 24. Hoechst 33342 ile boyanmış boğa spermatozoalarının floresan mikroskop altındaki görüntüleri

A: X kromozomu taşıyan spermatozoon

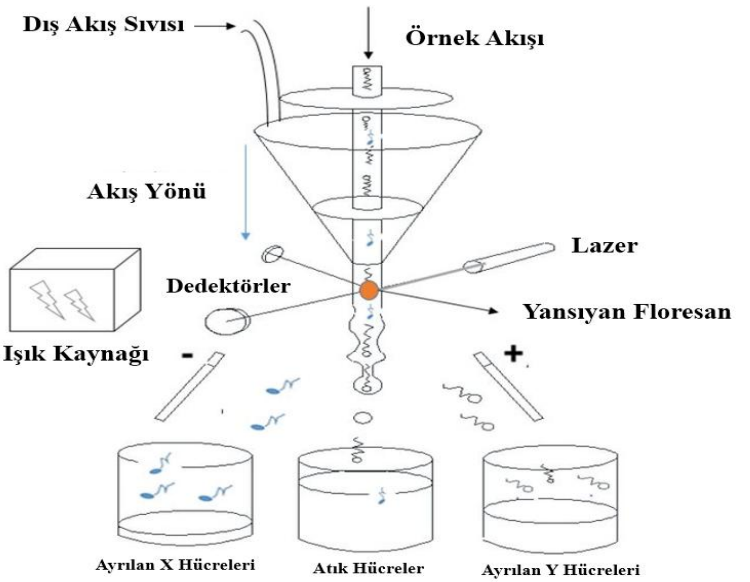
B: Y kromozomu taşıyan spermatozoon



(Sringarm et al., 2022)

Elektrostatik hücre ayırma, önceden belirlenmiş özelliklere sahip hücrelerin yakalanmasından ve ayrılmasından sorumludur. İlgili hücreler toplandıktan sonra, bunlar mikroskobik, biyokimyasal veya fonksiyonel analizler gibi ileri çalışmalarda kullanılabilir. Hücre ayırma işlemi, tek bir parametreye veya birden fazla parametrenin kombinasyonuna dayanarak gerçekleştirilebilir. Hücre ayırmayı sağlamak için genellikle hücre ayırıcılar kullanılır. Akış hücre ayırıcılarının genel prensibi, yüklenmiş damlacıkların elektrostatik sapmasına dayanır; bu damlacıkların bazıları hücreleri içerir. Bu yöntemde, hücreler nozula (nozzle) enjekte edilir ve nozula titreşim uygulanarak düzenli damlacıklardan oluşan bir akış sağlanır. Daha sonra bu damlacıklar, bir veya daha fazla lazer ışını üzerinden geçerken aynı anda yükleme elektrodu tarafından yüklenir. Damlacıklar, taşıdıkları yüklere göre ana akıştan saptırılabilir: Pozitif elektrik yüklü X dişilik cinsiyet kromozomu taşıyan spermatozoonlar, negatif yüklü platin plakasına doğru sapar. Negatif elektrik yüklü Y dişilik cinsiyet kromozomu taşıyan spermatozoonlar, pozitif yüklü platin plakasına doğru sapar. Yüksüz damlacıklar ise atık kabına yönlendirilir. FAHA, her bir hücrenin kendine özgü floresan özelliklerine göre, floresanla işaretlenmiş heterojen bir hücre karışımını aynı anda birer birer olmak üzere iki veya daha fazla kaba ayırmaya olanak tanıyan özel bir akış sitometrisi türüdür (Davies, 2010). Bu durumda, operatör lazer ışını içinden geçerken floresanla işaretlenmiş hedef hücreyi bilgisayar aracılığıyla seçer. Damladaki işaretli hücreler yüklenir (şarj edilir) ve bu yük, hücrelerin farklı toplama kaplarına ayrılmasında kullanılır (Wilkerson, 2012). Şekil 25.'de akış sitometrisinde elektrostatik hücre ayrımı ile cinsiyet kromozomu ayırımı şematize görüntüsü gösterilmiştir.

Şekil 25. Akış Sitometrisinde elektrostatik hücre ayrımı ile cinsiyet kromozomu ayırımı şematize görüntüsü



(Naniwa et al., 2018)

Akış Sitometrisinde Sorunlar

Mevcut literatür incelendiğinde, farklı araştırma gruplarının boya konsantrasyonlarını tanımlamak için birbirinden oldukça farklı yöntemler kullandığı görülmektedir. Sunulan çalışmalarda konsantrasyon birimlerinin standart olmadığı ve bu nedenle karşılaştırılabilirliklerinin sınırlı kaldığı dikkat çekmektedir. Ayrıca birçok yayında ışık kaynağının tipi ve gücü yeterince açık biçimde belirtilmemiştir. Oysa bu bilgiler, kullanılan yöntemlerin ve elde edilen akış sitometrisi verilerinin güvenilir bir şekilde karşılaştırılabilmesi açısından kritik öneme sahiptir ve mutlaka raporlanması gerektiği ve laboratuvarda mevcut akış sitometrisinin ışık kaynaklarına uygun uyarılma özelliklerine sahip florokromların seçilmesinin zorunlu olduğu bildirilmiştir (Savvuldi et al., 2023). Bir başka sorun ise dondurma ve boyama sırasında kullanılan sulandırıcı türlerinin, özellikle boyama aşamasında akış sitometri

değerlendirme sonuçları üzerinde anlamlı düzeyde etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, membran geçirgenliğinde farklılıklara yol açabilecek sulandırıcı bileşenlerinin (örneğin yumurta sarısı veya süt bazlı içerikler) değerlendirme sonuçlarını etkileyebileceğine işaret etmektedir. iki tür sulandırıcının membran geçirgenliğini farklı etkileyerek akış sitometri boyama sonuçlarında artefaktlara neden olabileceği belirtilmiştir (DeJarnette et al., 2022). Önemli sorunlardan biri de akış sitometrisi kullanıldığında bile her bir spermatozoonun tüm özelliklerinin test edilememesidir. Sitometri analizlerin sonuçları yalnızca popülasyon veya en iyi durumda alt popülasyon verilerini sağlarken, ideal olarak bilinmesi istenen şey, kaç spermatozoonun tüm doğru özelliklere sahip olduğudur (Petrunkina ve Harrison, 2011). Floresan boya üreticileri boyaların çözdürüldüğü maddenin yapısının boyanın yayılım ve emilim dalga boylarını değiştirebildiğini de bildirmişlerdir. Rhodamine 123 boyası örnek olarak gösterilecek olursa çözücü olarak etanol kullanıldığında 511 nm dalga boyunda yayılım, 534 nm dalga boyunda emilim gösterirken, PBS ile çözdürüldüğünde 515 nm dalga boyunda yayılım, 575 nm dalga boyunda emilim göstermektedir (Sigma Aldrich, 2022).

Akış Sitometrisi ve Yapay Zeka

Cytomics, yeni tasarlanmış hareketlilik analizörleri, çok parametreli akış sitometreleri ve gelişmiş dijital görüntülemeyi yapay zeka ile birleştirerek androloji laboratuvarlarının alanını domine edecek ve spermatozoon fonksiyonu ve dolayısıyla fertilite ile yakından ilgili belirteçler için büyük spermatozoon sayılarının hızlı bir şekilde belirlenmesini sağlayacaktır. Ancak bu tür gelişmeler, temel klinik androloji uygulamalarının yerini almayacaktır (Peña & Rodriguezi, 2023).

Sonuç

Akış sitometrisi, veteriner androlojide spermatozoaların fertilizasyon kapasitesinin değerlendirilmesine yönelik geleneksel spermatolojik yöntemleri tamamlayan, objektif, kantitatif ve çok parametreli bir analiz platformu olarak giderek daha önemli bir konuma gelmektedir. Spermatozoon canlılığı, plazma membran bütünlüğü, akrozom bütünlüğü, mitokondriyal membran potansiyeli, reaktif oksijen türleri, intraselüler kalsiyum düzeyi ve lipid peroksidasyonu gibi fertilizasyon süreciyle doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili çok sayıda fonksiyonel özelliğin aynı örnek içerisinde değerlendirilebilmesi, akış sitometrisini klasik mikroskobik değerlendirmelerden ayıran başlıca özelliklerden biridir. Bu yaklaşım, yalnızca sperma örneğinin ortalama özelliklerini belirlemek yerine, sperma içerisindeki fonksiyonel heterojenliğin ve farklı spermatozoon alt popülasyonlarının ortaya konmasına olanak sağlayarak fertilite değerlendirmesinin başarısını artırmaktadır. Bununla birlikte, akış sitometrisinin veteriner androlojideki potansiyelinin henüz bütünüyle kullanılabildiğini söylemek mümkün değildir. Özellikle multiparametrik floresan boyama protokollerinin geliştirilmesi, aynı spermatozoonda birden fazla fonksiyonel özelliğin eş zamanlı olarak değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır. Böylece membran bütünlüğü, mitokondriyal aktivite, oksidatif stres ve akrozomal durum gibi birbiriyle ilişkili süreçlerin tek tek değerlendirilmesinin ötesine geçilerek, spermatozoon fonksiyonunun bütüncül bir biyolojik profili oluşturulabilecektir. Mevcut lazer, filtre ve optik sistemlerin uygun biçimde kullanılmasıyla, spermatozoonların fertilizasyon yeteneğinin kazanılması sırasında meydana gelen fonksiyonel değişimlerin zamana bağlı olarak izlenmesi de mümkün görünmektedir. Bu tür yaklaşımlar, yalnızca belirli bir zaman noktasındaki spermatozoon durumunun belirlenmesini değil, spermatozoon popülasyonunun fonksiyonel değişim hızının, alt popülasyonlar arasındaki geçişlerin

ve fertilizasyon kapasitesiyle ilişkili biyolojik süreçlerin daha ayrıntılı biçimde değerlendirilmesini sağlayabilir. Akış sitometrisinin spermatozoon fertilitesiyle ilişkili sonuçlarının geleneksel spermatolojik değerlendirmeler ve BDSA sistemleriyle birlikte ele alınması, fertilite tahmininin doğruluğunu daha da artırabilecek bir yaklaşım sunmaktadır. Bununla birlikte, farklı çalışmalarda akış sitometrisi ile mikroskobik veya diğer analiz yöntemleri arasında özellikle canlılık, spermatozoon yoğunluğu ve bazı fonksiyonel parametreler bakımından farklı sonuçların bildirildiği görülmektedir. Bu farklılıkların değerlendirilmesinde yalnızca kullanılan yöntemin kendisine odaklanmak yeterli değildir. Numune hazırlama koşulları, inkübasyon süresi ve sıcaklığı, kullanılan floresan probların özellikleri ve konsantrasyonları, cihazın optik ve elektronik ayarları, günlük performans kontrolleri, kalibrasyon prosedürleri, kullanılan floresan yoğunluğu ve özellikle analiz sonrası kapılama stratejileri sonuçlar üzerinde önemli etkilere sahip olabilir. Dolayısıyla akış sitometrisinden elde edilen sonuçların karşılaştırılabilirliği, yalnızca yüksek teknolojili bir cihazın kullanılmasına değil, örnek hazırlamadan veri analizine kadar tüm sürecin standardize edilmesine bağlıdır. Bu nedenle veteriner androlojide akış sitometrisinin daha yaygın ve güvenilir biçimde kullanılabilmesi için türlere ve hatta mümkün olduğunda sperma işleme protokollerine özgü validasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi, uygun referans aralıklarının oluşturulması ve laboratuvarlar arası standardizasyonun sağlanması gerekmektedir. Özellikle farklı hayvan türlerinde spermatozoa hücresel özelliklerinin ve sperma işleme süreçlerinin farklılık göstermesi nedeniyle, bir tür için optimize edilmiş bir boyama veya analiz protokolünün başka bir türe doğrudan aktarılması her zaman uygun olmayabilir. Bu nedenle standart uygulama prosedürlerinin oluşturulması, cihaz performansının düzenli olarak izlenmesi ve analizi yapan kişinin kapılama ile veri yorumlama konusunda yeterli deneyime sahip olması, elde edilen sonuçların biyolojik olarak doğru

yorumlanması açısından temel gerekliliklerdir. Gelecekte yapay zekâ ve makine öğrenmesi tabanlı algoritmaların akış sitometrisi verilerinin analizine daha fazla entegre edilmesi, özellikle yüksek boyutlu multiparametrik verilerin yorumlanmasında önemli katkılar sağlayabilir. Çok sayıda floresan parametrenin aynı anda değerlendirilmesiyle oluşan karmaşık veri setlerinin otomatik olarak sınıflandırılması, spermatozoon alt popülasyonlarının belirlenmesi ve belirli hücresel profillerin fertilite sonuçlarıyla ilişkilendirilmesi, kullanıcıya bağlı değerlendirme farklılıklarını azaltabilir. Bu gelişmelerin, akış sitometrisi verilerinin yalnızca tanımlayıcı bir kalite değerlendirme aracı olmaktan çıkarılarak fertiliteyi öngören prediktif modellere dönüştürülmesine katkı sağlaması beklenmektedir. Sonuç olarak akış sitometrisi, veteriner androlojide spermatozoonların yalnızca morfolojik veya genel kalite özelliklerini değil, fertilizasyon sürecinin farklı basamaklarında görev alan çok sayıda hücresel ve moleküler fonksiyonu aynı anda değerlendirme potansiyeline sahip güçlü bir teknolojidir. Bununla birlikte, yüksek teknolojik kapasitenin tek başına yüksek doğruluk anlamına gelmediği; güvenilir sonuçların ancak uygun numune hazırlama, validasyon, cihaz standardizasyonu, kalibrasyon, multiparametrik analiz ve doğru kapılama stratejilerinin birlikte uygulanmasıyla elde edilebileceği unutulmamalıdır. Gelecekte akış sitometrisinin BDSA, moleküler biyobelirteçler ve yapay zekâ tabanlı veri analizleriyle bütünleştirilmesi, bireysel spermatozoon fonksiyonlarının daha hassas biçimde karakterize edilmesine ve in vitro fertiliteyi öngören daha güçlü biyobelirteçlerin belirlenmesine olanak sağlayabilir. Bu doğrultuda akış sitometrisinin, veteriner üreme sağlığında sperma kalitesinin değerlendirilmesinden fertilite tahminine, damızlık seçiminden sperma işleme ve saklama protokollerinin optimizasyonuna kadar uzanan geniş bir kullanım alanında giderek daha merkezi bir rol üstlenmesi beklenmektedir.

Kaynakça

Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. Critical reviews in biotechnology, 37(2), 163–176. https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876

Akagi, J., Kordon, M., Zhao, H., Matuszek, A., Dobrucki, J., Errington, R., Smith, P. J., Takeda, K., Darzynkiewicz, Z., & Wlodkowic, D. (2013). Real-time cell viability assays using a new anthracycline derivative DRAQ7®. Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology, 83(2), 227–234. https://doi.org/10.1002/cyto.a.22228

Amaral, A., & Ramalho-Santos, J. (2010). Assessment of mitochondrial potential: implications for the correct monitoring of human sperm function. International journal of andrology, 33(1), e180–e186. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.00987.x

Arslan (2025). Yayınlanmamış veri.

Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., & McLachlan, R. I. (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International journal of andrology*, *32*(1), 46–56. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2008.00943.x

Ata, A., İnanç, M. E., & Güngör, Ş. (2023). Reprodüktif toksisite testleri. İçinde A. Kart (Ed.), *Toksisite testleri* (1. baskı, ss. 43–56). Türkiye Klinikleri.

Ata, A. (2023). Spermanın değerlendirilmesi ve genel kategorizasyonu. İçinde M. K. Soylu, K. Ak, E. Akçay, A. Baran, M. Evecen, & M. B. Tırpan (Ed.), *Hayvanlarda reprodüksiyon, androloji ve yardımcı üreme teknikleri* (ss. 174–178). Ankara Nobel Tıp Kitabevleri.

Austin C. R. (1951). Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. Australian journal of scientific research. Ser. B: Biological sciences, 4(4), 581–596. https://doi.org/10.1071/bi9510581

Balao da Silva, C. M., Ortega Ferrusola, C., Morillo Rodriguez, A., Gallardo Bolaños, J. M., Plaza Dávila, M., Morrell, J. M., Rodriguez Martínez, H., Tapia, J. A., Aparicio, I. M., & Peña, F. J. (2013). Sex sorting increases the permeability of the membrane of stallion spermatozoa. Animal reproduction science, 138(3-4), 241–251. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.021

Beckman Coulter. (2015). *CytoFLEX flow cytometer: Instructions for use* (PN B49006AE).

Becton, Dickinson and Company. (2002). Introduction to flow cytometry: A learning guide (11-11032-03 Rev. A) [PDF]. Boston University Flow Cytometry Core Facility PDF (Erişim tarihi: 04.03.2026).

Behnam, M., Asadpour, R., Topraggaleh, T. R., & Hamali, H. (2023). Improvement of post-thaw quality and fertilizing ability of bull spermatozoa using Rho kinase inhibitor in freezing extender. Frontiers in veterinary science, 10, 1155048. https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1155048

Bernecic, N. C., Donnellan, E., O'Callaghan, E., Kupisiewicz, K., O'Meara, C., Weldon, K., Lonergan, P., Kenny, D. A., & Fair, S. (2021). Comprehensive functional analysis reveals that acrosome integrity and viability are key variables distinguishing artificial insemination bulls of varying fertility. Journal of dairy science, 104(10), 11226–11241. https://doi.org/10.3168/jds.2021-20319

Bio-Rad Laboratories. (2022). *Flow cytometry basics guide* [PDF]. Bio-Rad PDF Guide (Erişim tarihi: 03.03.2026).

Boe-Hansen, G. B., & Satake, N. (2019). An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA. *Theriogenology*, *137*, 93–103. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.043

Boster Bio. (t.y.). *Flow cytometry principle: How FACS works and data analysis*. Boster Bio Flow Cytometry Principle Page (Erişim tarihi: 10.03.2026)

Bucher, K., Malama, E., Siuda, M., Janett, F., & Bollwein, H. (2019). Multicolor flow cytometric analysis of cryopreserved bovine sperm: A tool for the evaluation of bull fertility. Journal of dairy science, 102(12), 11652–11669. https://doi.org/10.3168/jds.2019-16572

BRECHER, G., SCHNEIDERMAN, M., & WILLIAMS, G. Z. (1956). Evaluation of electronic red blood cell counter. American journal of clinical pathology, 26(12), 1439–1449. https://doi.org/10.1093/ajcp/26.12.1439

Breed Diagnostics. (2025). *Individual assessment pages: Acrosome integrity and viability (flow cytometry)*. (Erişim tarihi: 18.03.2026).

Brito, L. F. C., Althouse, G. C., Aurich, C., Chenoweth, P. J., Eilts, B. E., Love, C. C., Luvoni, G. C., Mitchell, J. R., Peter, A. T., Pugh, D. G., & Waberski, D. (2016). Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology*, *85*(9), 1507–1527. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.002.

Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S. and Herráez, M.P. (2010), Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. Journal of Applied Ichthyology, 26: 623-635. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x

Camara Pirez, M., Li, S., & Koelle, S. (2021). Assessment of Sperm Binding Capacity in the Tubal Reservoir Using a Bovine Ex Vivo

Oviduct Culture and Fluorescence Microscopy. *Methods and protocols*, *4*(4), 67. https://doi.org/10.3390/mps4040067

Carvalho, J. O., Sartori, R., Machado, G. M., Mourão, G. B., & Dode, M. A. (2010). Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology*, *74*(9), 1521–1530. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.030

Carver-Ward, J. A., Jaroudi, K. A., Einspenner, M., Parhar, R. S., al-Sedairy, S. T., & Sheth, K. V. (1994). Pentoxifylline potentiates ionophore (A23187) mediated acrosome reaction in human sperm: flow cytometric analysis using CD46 antibody. *Human reproduction (Oxford, England)*, *9*(1), 71–76. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138323

Carver-Ward, J. A., Moran-Verbeek, I. M., & Hollanders, J. M. (1997). Comparative flow cytometric analysis of the human sperm acrosome reaction using CD46 antibody and lectins. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *14*(2), 111–119. https://doi.org/10.1007/BF02765780

CHANG M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, *168*(4277), 697–698. https://doi.org/10.1038/168697b0

Chávez, J. C., De la Vega-Beltrán, J. L., José, O., Torres, P., Nishigaki, T., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2018). Acrosomal alkalization triggers Ca^{2+} release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Journal of cellular physiology*, *233*(6), 4735–4747. https://doi.org/10.1002/jcp.26262

Chekeni, F. B., Elliott, M. R., Sandilos, J. K., Walk, S. F., Kinchen, J. M., Lazarowski, E. R., Armstrong, A. J., Penuela, S., Laird, D. W., Salvesen, G. S., Isakson, B. E., Bayliss, D. A., & Ravichandran, K. S. (2010). Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and

membrane permeability during apoptosis. *Nature*, *467*(7317), 863–867. https://doi.org/10.1038/nature09413

Wallace H. Coulter. (1956). High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *National Electronics Conference*, Chicago, USA, 1034–1040.

Cordelli, E., Eleuteri, P., Leter, G., Rescia, M., & Spanò, M. (2005). Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception*, *72*(4), 273–279. https://doi.org/10.1016/j.contraception.2005.03.004

Davies D.. (2010). Cell sorting by flow cytometry. İçinde M. G. Macey (Ed.), *Flow cytometry: Principles and applications* (ss. 257–276). Humana Press.

DeJarnette, J. M., Harstine, B. R., McDonald, K., & Marshall, C. E. (2022). Commercial application of flow cytometry for evaluating bull sperm. *Animal reproduction science*, *246*, 106838. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106838

Del Olmo, E., Bisbal, A., Maroto-Morales, A., García-Alvarez, O., Ramon, M., Jimenez-Rabadan, P., Martínez-Pastor, F., Soler, A. J., Garde, J. J., & Fernandez-Santos, M. R. (2013). Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Animal reproduction science*, *138*(1-2), 102–109. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.007

de Lima Rosa, J., de Paula Freitas Dell'Aqua, C., de Souza, F. F., Missassi, G., & Kempinas, W. G. (2023). Multiple flow cytometry analysis for assessing human sperm functional characteristics. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *117*, 108353. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2023.108353

Dittrich, W., & Göhde, W. (1969). Impulsfluorometrie bei Einzelezellen in Suspensionen [Impulse fluorometry of single cells in suspension]. *Zeitschrift fur Naturforschung. Teil B, Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie und verwandte Gebiete*, *24*(3), 360–361.

Dönmez, H., & İnanç. M. E. (2024). Spermatological parameters *in vitro* of Holstein bulls and relationship with male fertility. *Acta Scientiae Veterinariae, 52*.

Dönmez, H. (2023). Holstein boğalarda in vitro spermatolojik parametrelerin erkek fertilitesi ile ilişkisi (Yüksek lisans tezi). Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Dubé, C., Tardif, S., LeClerc, P., & Bailey, J. L. (2003). The importance of calcium in the appearance of p32, a boar sperm tyrosine phosphoprotein, during in vitro capacitation. *Journal of andrology*, *24*(5), 727–733. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02734.x

Evenson, D., & Jost, L. (2000). Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in cell science : an official journal of the Society for In Vitro Biology*, *22*(2-3), 169–189. https://doi.org/10.1023/a:1009844109023

Evenson, D. P., & Wixon, R. (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, *65*(5), 979–991. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.011

Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z., & Melamed, M. R. (1982). Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, *30*(3), 279–280. https://doi.org/10.1177/30.3.6174566

Fu, K., Gao, C., Li, X., Zhang, H., & Xue, B. (2024). 3-chloro-1,2-propanediol induces oxidative stress and promotes testicular damage and infertility in rats through CYP2C9. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *128*, 108633. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2024.108633

Gaitskell-Phillips, G., Martín-Cano, F. E., Ortiz-Rodríguez, J. M., Silva-Rodríguez, A., da Silva-Álvarez, E., Gil, M. C., Ortega-Ferrusola, C., & Peña, F. J. (2022). The seminal plasma proteins Peptidyl arginine deaminase 2, rRNA adenine N (6)-methyltransferase and KIAA0825 are linked to better motility post thaw in stallions. *Theriogenology*, *177*, 94–102. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.10.010

Garner, D. L., Thomas, C. A., Joerg, H. W., DeJarnette, J. M., & Marshall, C. E. (1997). Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of reproduction*, *57*(6), 1401–1406. https://doi.org/10.1095/biolreprod57.6.1401

Garzón DL, Peñaranda DS, Pérez L, Marco-Jiménez F, Espert X, Müller T, Jover, M, Asturiano JF (2008). Effects of pH, sodium bicarbonate, cryoprotectants and foetal bovine serum on the cryopreservation of European eel sperm. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene, 43(1), 99–105.

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

Givan, A.L., (2001). *Flow cytometry: First principles* (2nd ed.). Wiley-Liss.

Giwercman, A., Lindstedt, L., Larsson, M., Bungum, M., Spano, M., Levine, R. J., & Rylander, L. (2010). Sperm chromatin structure

assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *International journal of andrology*, *33*(1), e221–e227. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.00995.x

Ghanbari, H., Keshtgar, S., Zare, H. R., & Gharesi-Fard, B. (2019). Inhibition of CatSper and Hv1 Channels and NOX5 Enzyme Affect Progesterone-Induced Increase of Intracellular Calcium Concentration and ROS Generation in Human Sperm. *Iranian journal of medical sciences*, *44*(2), 127–134.

Graham, J. K., Kunze, E., & Hammerstedt, R. H. (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of reproduction*, *43*(1), 55–64. https://doi.org/10.1095/biolreprod43.1.55

Guo, H., Gong, Y., He, B., & Zhao, R. (2017). Relationships between mitochondrial DNA content, mitochondrial activity, and boar sperm motility. *Theriogenology*, *87*, 276–283. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.005

Hamnett, R. (2024). *Flow cytometry guide: The complete flow cytometry & FACS technique guide*. Antibodies.com. https://www.antibodies.com/applications/flow-cytometry

Hossain, M. S., Johannisson, A., Wallgren, M., Nagy, S., Siqueira, A. P., & Rodriguez-Martinez, H. (2011). Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian journal of andrology*, *13*(3), 406–419. https://doi.org/10.1038/aja.2011.15

Hulett, H. R., Bonner, W. A., Barrett, J., & Herzenberg, L. A. (2014). Pillars article: cell sorting: automated separation of Mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. Science. 1969. 166: 747-749. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *193*(5), 2045–2047.

Ishikawa-Ankerhold, H. C., Ankerhold, R., & Drummen, G. P. (2012). Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *17*(4), 4047–4132. https://doi.org/10.3390/molecules17044047

İnanç, M.E., (2016). Akkaraman Koçlarda Spermanın Kolesterol ve 7-Dehidrokolesterol İle Dondurulması ve Değerlendirilmesi. Doktora Tezi. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,* Ankara/Türkiye.

Jacobs, L., Hammond, T., Calatayud, N., Byrne, P., & Jensen, T. (2025). Developing flow cytometry for precise evaluation of amphibian sperm viability: technical report. *Reproduction, fertility, and development*, *37*, RD24117. https://doi.org/10.1071/RD24117

Januskauskas, A., Gil, J., Söderquist, L., Håård, M. G., Håård, M. C., Johannisson, A., & Rodriguez-Martinez, H. (1999). Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, *52*(4), 641–658. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00159-4

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. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00220-4

Julius, M. H., Masuda, T., & Herzenberg, L. A. (1972). Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *69*(7), 1934–1938. https://doi.org/10.1073/pnas.69.7.1934

Khaki, A., Batavani, R. A., & Najafi, G. (2013). The in vitro effect of leptin on semen quality of water buffalo (Bubalus bubalis)

bulls. *Veterinary research forum : an international quarterly journal*, *4*(1), 7–12.

Korkmaz, F., & Çil, B. (2020). Akış Sitometrisinin (Flow Cytometry) Sperma Kalite Analizlerinde Kullanımı. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 15(1), 76-83. https://doi.org/10.17094/ataunivbd.614120

Kowalczyk, A., Łukaszewicz, E., Strzała, T., Partyka, A., & Rosenberger, J. (2020). Characteristics of capercaillie (Tetrao urogallus) semen analysed with flow cytometry combined with fertility results. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *55*(8), 984–991. https://doi.org/10.1111/rda.13740

Love C. C. (2018). Sperm quality assays: How good are they? The horse perspective. *Animal reproduction science*, *194*, 63–70. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.077

Luque, G. M., Dalotto-Moreno, T., Martín-Hidalgo, D., Ritagliati, C., Puga Molina, L. C., Romarowski, A., Balestrini, P. A., Schiavi-Ehrenhaus, L. J., Gilio, N., Krapf, D., Visconti, P. E., & Buffone, M. G. (2018). Only a subpopulation of mouse sperm displays a rapid increase in intracellular calcium during capacitation. *Journal of cellular physiology*, *233*(12), 9685–9700. https://doi.org/10.1002/jcp.26883

Macey, M. G. (2010). Principles of flow cytometry. In M. G. Macey (Ed.), *Flow cytometry: Principles and applications* (pp. 1–15). Humana Press.

Mattern, C. F., Brackett, F. S., & Olson, B. J. (1957). Determination of number and size of particles by electrical gating: blood cells. *Journal of applied physiology*, *10*(1), 56–70. https://doi.org/10.1152/jappl.1957.10.1.56

Maxwell, W. M., Welch, G. R., & Johnson, L. A. (1996). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal

plasma. *Reproduction, fertility, and development*, *8*(8), 1165–1178. https://doi.org/10.1071/rd9961165

McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: An overview. *Current Protocols in Immunology*, *120*, 5.1.1–5.1.11. https://doi.org/10.1002/cpim.40

Moldavan A. (1934). Photo-Electric Technique For The Counting Of Microscopical Cells. *Science (New York, N.Y.)*, *80*(2069), 188–189. https://doi.org/10.1126/science.80.2069.188

Moraes, C. R., & Meyers, S. (2018). The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. *Animal reproduction science*, *194*, 71–80. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.024

Müller, K., Müller, P., Pincemy, G., Kurz, A., & Labbe, C. (2008). Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. *Biology of reproduction*, *78*(3), 390–399. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064253

Nagy, S., Jansen, J., Topper, E. K., & Gadella, B. M. (2003). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology of reproduction*, *68*(5), 1828–1835. https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011445

Naniwa, Y., Sakamoto, Y., Toda, S., & Uchiyama, K. (2018). Bovine sperm sex-selection technology in Japan. *Reproductive medicine and biology*, *18*(1), 17–26. https://doi.org/10.1002/rmb2.12235

Nova, Z., Skovierova, H., Strnadel, J., Halasova, E., & Calkovska, A. (2020). Short-Term versus Long-Term Culture of A549 Cells for Evaluating the Effects of Lipopolysaccharide on Oxidative Stress, Surfactant Proteins and Cathelicidin LL-37. *International journal of molecular sciences*, *21*(3), 1148. https://doi.org/10.3390/ijms21031148

Novus Biologicals. (2025). *Phosphatidylserine externalization in apoptosis*.https://www.novusbio.com/researchtopics/apoptosis/phosphatidylserine-externalization

Odhiambo, J. F., Sutovsky, M., DeJarnette, J. M., Marshall, C., & Sutovsky, P. (2011). Adaptation of ubiquitin-PNA based sperm quality assay for semen evaluation by a conventional flow cytometer and a dedicated platform for flow cytometric semen analysis. *Theriogenology*, *76*(6), 1168–1176. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.009

Odinius, T. S., Siuda, M., Lautner, M., Leiding, C., Neuner, S., Bollwein, H., & Malama, E. (2024). Sperm Functional Status: A Multiparametric Assessment of the Fertilizing Potential of Bovine Sperm. Veterinary Sciences, 11(12), 678. https://doi.org/10.3390/vetsci11120678

Ortega Ferrusola, C., González Fernández, L., Macías García, B., Salazar-Sandoval, C., Morillo Rodríguez, A., Rodríguez Martinez, H., Tapia, J. A., & Peña, F. J. (2009). Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. *Biology of reproduction*, *81*(6), 1106–1111. https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078220

Özkan, H., Olğaç, K. T., Keçeli, H. H., Yazlık, M. O., Kaya, U., Tırpan, M. B., & Akçay, E. (2025). Seminal plasma MicroRNA dynamics in stallion semen due to progressive motility and conception success. *Animal reproduction science*, *278*, 107876. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2025.107876

Peña , F., & Rodriguez-Martinez , H. (2023). Clinical applications of flow cytometric sperm analyses. Clinical Theriogenology, 15. https://doi.org/10.58292/ct.v15.9406

Petrunkina, A. M., & Harrison, R. A. (2011). Cytometric solutions in veterinary andrology: Developments, advantages, and limitations. *Cytometry. Part A : the journal of the International*

Society for Analytical Cytology, *79*(5), 338–348. https://doi.org/10.1002/cyto.a.21044

Petrunkina, A. M., & Harrison, R. A. (2013). Fluorescence technologies for evaluating male gamete (dys)function. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *48 Suppl 1*, 11–24. https://doi.org/10.1111/rda.12202

Petrunkina, A. M., Waberski, D., Günzel-Apel, A. R., & Töpfer-Petersen, E. (2007). Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction (Cambridge, England)*, *134*(1), 3–17. https://doi.org/10.1530/REP-07-0046

Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A., & Zara, V. (2012). The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *International journal of andrology*, *35*(2), 109–124. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x

Reggeti, F., & Bienzle, D. (2011). Flow cytometry in veterinary oncology. *Veterinary pathology*, *48*(1), 223–235. https://doi.org/10.1177/0300985810379435

Ruiz-Pesini, E., Díez-Sánchez, C., López-Pérez, M.J., & Enríquez, J.A. (2007). The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Current topics in developmental biology, 77*, 3-19.

Savvulidi, F.G., Ptáček, M., Nagy, S., & Stádník, L. (2023). Meta-analysis of fluorochrome concentrations to assess bull sperm quality by flow cytometry in 2021–2023. Czech Journal of Animal Science, 68(12), 469-485. doi: 10.17221/152/2023-CJAS

Sigma-Aldrich. (2022). *Rhodamine 123, mitochondrial specific fluorescent dye* (Product No. R8004). Merck.

Silveira, G.F. (2015). Evolution of Flow Cytometry Technology. *Journal of Microbial & Biochemical Technology, 7*, 213-216.

Sringarm, K., Thongkham, M., Mekchay, S., Lumsangkul, C., Thaworn, W., Pattanawong, W., Rangabpit, E., Rachtanapun, P., Jantanasakulwong, K., Sathanawongs, A., & Hongsibsong, S. (2022). High-Efficiency Bovine Sperm Sexing Used Magnetic-Activated Cell Sorting by Coupling scFv Antibodies Specific to Y-Chromosome-Bearing Sperm on Magnetic Microbeads. *Biology*, *11*(5), 715. https://doi.org/10.3390/biology11050715

Sousa, A. P., Amaral, A., Baptista, M., Tavares, R., Caballero Campo, P., Caballero Peregrín, P., Freitas, A., Paiva, A., Almeida-Santos, T., & Ramalho-Santos, J. (2011). Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. *PloS one*, *6*(3), e18112. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018112

Snow C. (2004). Flow cytometer electronics. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, *57*(2), 63–69. https://doi.org/10.1002/cyto.a.10120

Spanò, M., Bonde, J. P., Hjøllund, H. I., Kolstad, H. A., Cordelli, E., & Leter, G. (2000). Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertility and sterility*, *73*(1), 43–50. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(99)00462-8

Tapia, J. A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Peña, F. J., & Aparicio, I. M. (2012). The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *47 Suppl 3*, 65–75. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02046.x

Thermo Fisher Scientific. (2025). *Oxidative stress detection*. https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/oxidative-stress.html

Yeste, M., Fernández-Novell, J. M., Ramió-Lluch, L., Estrada, E., Rocha, L. G., Cebrián-Pérez, J. A., Muiño-Blanco, T., Concha, I. I.,

Ramírez, A., & Rodríguez-Gil, J. E. (2015). Intracellular calcium movements of boar spermatozoa during 'in vitro' capacitation and subsequent acrosome exocytosis follow a multiple-storage place, extracellular calcium-dependent model. *Andrology*, *3*(4), 729–747. https://doi.org/10.1111/andr.12054

Vašíček, J., Baláži, A., Svoradová, A., Vozaf, J., Dujíčková, L., Makarevich, A. V., Bauer, M., & Chrenek, P. (2022). Comprehensive Flow-Cytometric Quality Assessment of Ram Sperm Intended for Gene Banking Using Standard and Novel Fertility Biomarkers. *International journal of molecular sciences*, *23*(11), 5920. https://doi.org/10.3390/ijms23115920

Vincent, P., Underwood, S. L., Dolbec, C., Bouchard, N., Kroetsch, T., & Blondin, P. (2021). Bovine semen quality control in artificial insemination centers. In R. M. Hopper (Ed.), Bovine reproduction (2nd ed., pp. 685–695). John Wiley & Sons.

Yi, Y. J., Zimmerman, S. W., Manandhar, G., Odhiambo, J. F., Kennedy, C., Jonáková, V., Maňásková-Postlerová, P., Sutovsky, M., Park, C. S., & Sutovsky, P. (2012). Ubiquitin-activating enzyme (UBA1) is required for sperm capacitation, acrosomal exocytosis and sperm-egg coat penetration during porcine fertilization. *International journal of andrology*, *35*(2), 196–210. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01217.x

Wilkerson M. J. (2012). Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, *42*(1), 53–71. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.09.012

BÖLÜM 3

VETERİNER ANDROLOJİ ALANINDA BİLGİSAYAR DESTEKLİ SPERMA ANALİZİ

[1] RAMAZAN ARSLAN
[2] HASAN ALİ ÇAY
[3] AYHAN ATA

Giriş

İn vitro sperma değerlendirmesi için giderek artan sayıda teknik, fertilite için gerekli olan spermatozoon özelliklerini daha kesin bir şekilde değerlendirmeyi amaçlamıştır (Del Olmo et al., 2013). Kanada, Danimarka, Hollanda, Norveç ve ABD (Amerika Birleşik Devletleri)'de sperma kalitesi, suni tohumlama ünitelerinde boğa değiştirme nedenlerinin yaklaşık %30'unu oluşturmakta ve genetik faktörlerden sonra ikinci sırada yer almaktadır (Robinson & Buhr, 2005). Erkek infertilitesi ile ilgili teşhislerin kalitesini, görselleştirilmesini ve erişimini iyileştirmek için hesaplama ve teknolojik ilerlemeler alanında da yeni teknolojiler

[1] Arş. Gör., Aksaray Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 0009-0000-6275-5861.
[2] Öğr. Gör., Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 0000-0003-1622-2719.
[3] Prof. Dr. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 0000-0003-0590-5995.

geliştirilmektedir. Bu bağlamda ilk Bilgisayar Destekli Sperma Analizi (BDSA) sistemi 1980'li yıllara dayanmaktadır. Bir faz kontrast mikroskobuna bağlı bir kamera ile bir sperma örneğinin ardışık görüntülerinin elde edilmesinden oluşur. Geleneksel yöntemlerle yapılan sperma analizleri, gözlemciye bağlı subjektiflik içerdiği için tekrarlanabilirliği ve doğruluğu sınırlı kalmaktadır (Bendayan & Boitrelle, 2024). Yüksek çözünürlüklü kameralar ve yazılımlar vasıtasıyla objektif olarak spermatozoonun baş hareketlerini, motilite özelliklerini, çıplak gözle ölçülemeyen hız parametrelerini, morfolojisini, konsantrasyonunu, spermatozoaların hiperaktivasyonunu, testiküler ve epididimal toksisiteyi, objektif, hassas, hızlı ve otomatik olarak analiz edilmesini sağlayan bu sistemler sayesinde hem canlı hem de dondurulmuş sperma örneklerinin kalite kontrolü daha güvenilir bir şekilde yapılabilmesinin yanı sıra BDSA cihazlarının sağladığı standartlaştırılmış ölçümler, bilimsel araştırmalarda karşılaştırılabilir veri elde edilmesini de kolaylaştırmaktadır (Bendayan & Boitrelle, 2024; Brito et al., 2016; Amann &Waberski, 2014; Verstegen et al., 2002; Perreault, 1998; Slott et al., 1997; Toth et al., 1989; WHO, 2021). Geleneksel sperma analizine kıyasla bu teknolojinin başlıca avantajları, bir sperma örneğinden alınan birkaç görüntüyü işlerken güvenilirlik, tutarlılık, doğruluk ve tekrarlanabilirlik sağlamasıdır (Yániz, 2018; WHO, 2021). BDSA sistemleri 1 dakikadan az bir sürede birkaç bin hücreyi sayabilmektedir. Bu da günlük kullanım için pratikliğe sebep olur (Rijsselaere et al., 2012). Suni tohumlama merkezleri artık spermatozoonun hareketliliğinin belirlenmesinde nesnelliği artırmak için BDSA sistemlerini benimsemiştir fakat rutin sperma analizinin kısmi otomasyonunu sağlayabilmesine rağmen, karmaşık çalışması nedeniyle daha geniş bir kullanım alanına sahip değildir. (Kathiravan et al., 2011; Mortimer et al. 2015). BDSA spermatozoonları, toplam motilite (TM), progresif motilite (PM), Eğrisel Hız (Velocity of Curvilinear - VCL), Ortalama Yol Hızı (Velocity of Average Path -

VAP), Düz Yol Hızı (Velocity of Straight Line - VSL), Yanal Baş Yer Değiştirme Genliği (Amplitude Lateral Head - ALH), Çapraz Frekans Geçişi (Beat Cross Frequency - BCF), Gidiş Doğrultusu (Straightness - STR) ve Doğrusallık (Linearity - LIN) gibi çeşitli motilite özellikleri açısından analiz eder (Kathiravan et al., 2011). Bae et al. (2024), spermatozoon motilitesinin ve kinematik parametrelerin analizinin erkek fertilitesinin değerlendirilmesinde faydalı olabileceğini bildirmişlerdir.

BDSA Güvenirliği, Doğruluğu ve Standardizasyonu

Bilgisayar destekli sperma analizi sistemleri esas olarak laboratuvarda araştırma amacıyla kullanılmıştır. Fakat öznelliği, insan hatasını azalttığı ve spermatozoon analiz sürecini standartlaştırdığı bildirildiği için kullanımı klinik uygulamaya yayılmıştır. BDSA sistemleri ile daha yüksek sayıda örneğin analizi, daha az zaman ve artan üretkenlik sağlanabilmektedir (Amann & Katz, 2004; Amann & Waberski, 2014). Günümüzde kullanılan BDSA sistemleri evrensel olarak artan bir şekilde kullanılmaktadır. Mevcut farklı sistemler sperma muayenesini gerçekleştiren kişi tarafından seçilen bilgisayar parametreleri, kullanılan yazılım, mikroskop, laboratuvar koşulları ve laboratuvarlar arasında öznellik kaynağının bulunmasından dolayı geleneksel sperma analizine kıyasla geçerliliği ve güvenirliği konusunda endişeler devam etmektedir. (Rijsselaere et al., 2012; Douglas et al., 2021). Bu bağlamda BDSA cihazlarında doğru sonuçlarla güvenilirliği artırmak ve karşılaştırma kriterlerini tanımlamak için etkili faktörlerin belirlenmesi ve gerekli standartların sağlanması önemlidir (Tekin & Daşkın, 2016). Dünya Sağlık Örgütünün insan spermasının incelenmesi ve işlenmesine yönelik laboratuvar el kitabının 5. baskısından bu yana, sperma analizinin bir laboratuvardan diğerine tekrarlanabilir olması için kalite kontrolüne ve standardizasyonuna büyük önem verilmektedir (WHO, 2010; Bendayan & Boitrelle, 2024). Son yıllarda, en güncel üçüncü nesil

BDSA sistemleri, dünya genelindeki çiftlik hayvanları suni tohumlama merkezlerinde ve sperma işlemenin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. ABD'deki 200'den fazla damızlık domuz yetiştiriciliği yapan çiftliklerin çoğunluğunda, anonim verilere dayanarak, BDSA sistemlerinin kullanıldığı bildirilmiştir (Ehlers et al., 2011). Bunun nedeni, BDSA sistemlerinin spermatozoon hareketliliği ve konsantrasyonunun hızlı, objektif ve eşzamanlı olarak değerlendirilmesine imkân tanımasıdır ancak cihazların temel sorunları arasında yüksek yatırım maliyetleri ve pratik kullanıma geçmeden önce standardizasyon ve doğrulama gerekliliği bulunmaktadır (Rijsselaere et al., 2012; Tekin & Daşkın, 2016). Doğruluğu gerçekleştirildikten sonra BDSA sistemleri, fertilite değerlendirmesi, sperma sulandırıcısı, soğutma ve kriyoprezervasyon prosedürlerinin iyileştirilmesi için veterinerlik merkezlerinde rutin olarak kullanılabilir (Ehlers et al., 2011). BDSA tarafından belirlenen motilite değeri, böylece bireysel teknisyenler ve laboratuvarlar arasında standardize edilebilir (Vicente-Fiel et al., 2014). BDSA teknolojisi iyi geliştirilmiş olsa da, elde edilen verilerde analiz yapan kişiler arasında yüksek değişkenlikler rapor edilmiştir (Ehlers et al., 2011). Bu durum, standardize edilmiş yöntemler ve etkili eğitim tekniklerine olan ihtiyacı desteklemiştir. BDSA cihazlarıyla sperma analizi performansında çeşitli standardizasyon seviyeleri elde etmek için birçok girişimde bulunulmuştur. Androloji Özel İlgi Grubu, "Spermatozoa Analizinde BDSA Teknolojisinin Uygulanmasına İlişkin Kılavuz" sağlamış ve BDSA analizi, Androloji Özel İlgi Grubu esas sperma analizi kurslarında uygulanmıştır (Björndahl et al., 2002; ESHRE, 1998). Bu kurslardaki eğitimlerin maddi yükü ve zaman kısıtlamaları nedeniyle, elektronik öğrenme (e-learning) veteriner üreme alanında, belirli bir zaman dilimine bağlı kalmadan verimli ve etkili öğrenme için kabul görmüş bir araç olmuştur (Leidl, 2002). Ehlers et al. (2011), gerçekleştirdiği, 8 kişinin katıldığı ve 160 örneğin incelendiği çalışmada, DVD ile sunulan elektronik öğrenme sonrası

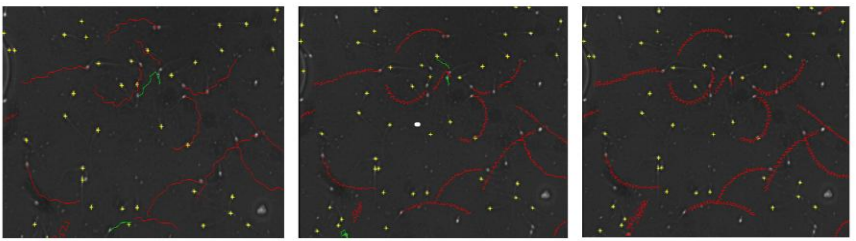
motilite ve konsantrasyon testlerinde varyasyon katsayılarının önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Elektronik öğrenmeden önceki grup ortalamasından bireysel sapmalar, elektronik öğrenme sonrasında belirgin bir şekilde azalmıştır. BDSA prosedürlerini içeren tüm çalışmalarda materyal ve yöntemlerin ayrıntılı açıklamalarının önemi vurgulanmaktadır. Ayrıca, taze sperma için BDSA ayarlarının, soğutulmuş veya dondurulmuş sperma için optimal olmayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Çünkü dondurulmuş ortamlarda genellikle yumurta sarısı partikülleri bulunur (Rijsselaere et al., 2012). Çeşitli deneysel koşullar altında BDSA analizinin güvenilirliği, doğruluğu ve hassasiyeti, kalibrasyonlar, validasyon, standardizasyon ve analiz öncesi sperma işlemesinin optimizasyonu gibi belirli konularda kullanıcıların uzmanlığına ve eğitimine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir (Verstegen et al., 2002). Brito et al. (2025), on farklı boğadan elde edilen konvansiyonel ve cinsiyeti belirlenmiş dondurulmuş sperma örnekleri, altı farklı laboratuvara gönderip, üç farklı zaman diliminde, dokuz teknisyen tarafından BDSA sistemleriyle spermatozoon motilitesi değerlendirmişlerdir. Tüm teknisyenler aynı BDSA sistemini (HT-IVOS II) ve aynı yazılım versiyonunu kullanmışlardır. Eğitim müdahalesi olarak elektronik öğrenme programı uygulanmıştır. Sonuç olarak elektronik öğrenme eğitimi, sonuçlar üzerinde belirgin bir farka neden olmadığı görülmüştür. Bunun muhtemel nedeninin teknisyenlerin zaten deneyimli ve eğitilmiş olmasıdır.

BDSA sistemlerinde optimum saniyede kare hızı (SKH) tam olarak standardize edilmemiştir. Gacem et al. (2020), optimum kare hızını spermanın koyulduğu hazne tipine ve derinliğine bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Optimum kare hızını Bompart et al. (2019), boğalarda 256 SKH, Gacem et al. (2020), SpermTrack 10 odasın eşeklerde 250 SKH, Valverde et al. (2019b), yaban

domuzlarında 212 SKH, Caldeira et al. (2019), Atlantik Somon balıklarında 250 SKH olduğunu bildirmişlerdir.

Spermatozoon yörüngesi SKH arttıkça farklı bir form göstermektedir. Düşük SKH'de takdir edilmesi mümkün olmayan çok daha yüksek bir salınım göstermiştir (Gacem et al. 2020). Şekil 1.'de ISAS D4C10 odasında farklı SKH'de hızlı (kırmızı), orta (yeşil), yavaş (mavi) ve statik (sarı) olmak üzere 4 grup spermatozoa motilitesi sergileyen farklı kare hızlarında eşek spermatozoon VCL'si verilmiştir.

Şekil 1. ISAS D4C10 odasında hızlı (kırmızı), orta (yeşil), yavaş (mavi) ve statik (sarı) olmak üzere 4 grup spermatozoa motilitesi sergileyen farklı kare hızlarında eşek spermatozoon VCL'si



(Gacem et al., 2020).

BDSA Sistemini Oluşturan Mekanik Bölümler

BDSA sistemi başlıca faz kontrast mikroskoba bağlanmış video kamera, ısıtıcı tabla, video karelerini kaydedecek kart ve verileri analiz edecek bilgisayardan meydana gelmektedir (Nafisi et al., 2005; Ehlers et al., 2011; Rijsselaere et al., 2012; Valverde et al., 2020).

BDSA Nasıl Çalışır ve Spermatozoon Görünümü Nasıldır?

Spermatozoon, genellikle karanlık alan (negatif faz kontrast, floresan optik mikroskop) kullanılarak algılanmaktadır (WHO, 1999; Nafisi et al., 2005). Floresan optik mikroskopta spermatozoon

başı, DNA'ya bağlanan floresan bir boya ile boyanarak belirlenir. Negatif faz kontrast mikroskopta, koyu arka planda beyaz sperm başı görüntülenir ve sperm başının parlaklığı, ardışık alanlardaki merkez konumlarını belirlemek için kullanılır (Nafisi et al., 2005). BDSA sistemleri tipik olarak, bir kayan görüntüyü önceden belirlenmiş X/Y konumlarına taşımak ve ardından Z ekseninde otomatik odaklama yapmak için bir aşama sunar. İnsan gözünün odak dışı bir görüntüye uyum sağlaması, görüntüyü dedektör dizisinin düzleminin dışına yerleştirebilir. Odaklama için okülerler yerine video ekranı kullanılmalıdır. Otomatik aşama, spermin işlenmesi sürecinde daha hızlı ve standartlaştırılmış bir verim sağlar (Amann & Waberski, 2014).

Video kamera, spermatozoonun mikroskobik görüntülerini yakalar ve bilgisayar aracılığıyla sperm başının kapladığı piksel sayısına göre dijitalleştirir. Analizi yapan kişi, farklı sperm örnekleri için sperm başlarının kapsadığı piksel aralığını tanımlayabilir. Çeşitli BDSA sistemleri, bu verilerdeki hataları en aza indirmek için farklı yaklaşımlar kullanmaktadır (Nafisi et al., 2005).

İki tür BDSA sistemi vardır: faz kontrast mikroskobu kullanan sistemler ve elektro-optik teknik kullanan sistemler. Bir operatörün genellikle optik ayarları yapması, alanları seçmesi ve nihai sonucun tutarlılığını doğrulaması gerekir. Bu tekniği kullanan modeller arasında en iyi bilinenleri Hamilton Thorne Research (IVOS ve CEROS modelleri) ve Microptic Automatic Systems (SCA modeli) modelleridir. Mevcut versiyonlar ayrıca sperma morfolojisi ve sperm DNA fragmantasyonu çalışması gibi ek analizlere de izin vermektedir. Diğer bir yöntem, spektrofotometre ile sperma örneğinden geçen bir ışık sinyalinin analizinden oluşur. Spermatozoon konsantrasyonu bu şekilde ölçülür. Spermatozoon motilitesi de spermatozoon motilitesinin neden olduğu ışık bozuklukları yoluyla ölçülür. Spermatozoon morfolojisi, belirli algoritmalar kullanılarak konsantrasyon ve hareketlilik

sonuçlarından tahmin edilir. Bu metodolojiyi kullanan en iyi bilinen model, tıbbi elektronik sistemlerden SQA'dır (Bendayan & Boitrelle, 2024).

BDSA Analizi İçin Örneklerin Hazırlanması ve Farklı Sperma Sulandırıcıların Kullanılması

Bilgisayar Destekli Sperma Analizi sistemlerinde sperma örneklerinin hazırlanması, spermatozoon konsantrasyonu, sulandırıcı türü ve analiz için kullanılan hacim açısından kritik bir öneme sahiptir. Sperma örneğinin uygun şekilde seyreltilmesi, bireysel olarak spermatozoonların analiz edilebilirliğini artırmak için gereklidir. Doğru kinematik ölçümler elde edebilmek adına, spermatozoon konsantrasyonunun uygun seviyede olması gerekir; çünkü yüksek konsantrasyona sahip numunelerde, spermatozoonların birbiriyle çarpışma olasılığını artırarak hareketlilik sonuçlarını olumsuz etkileyebilir (Rijsselaere et al., 2002). Örneğin, Broekhuijse et al. (2012), BDSA sisteminde domuz spermasını 1:1 oranında sulandırarak incelemişlerdir. Farrell et al. (1998), numunenin yoğunluğunu $25x10^6$ sperm/ml olacak şekilde sulandırmışlardır. Valverde et al. (2019a), köpek spermasını $>50x10^6$ olacak şekilde CaniPlus Chill® ile sulandırmışlardır. Sugai et al. (2024) köpek spermasının $200x10^6$ spermatozoon/ml gibi yüksek değerler veya 1:3 oranında sulandırılmasını bildirmişlerdir. Taberner et al. (2010), Katalonya eşeklerinde yapmış oldukları çalışmada sperma muayenesinde son yoğunluğu 2×10^6 spermatozoon/ml olacak şekilde sulandırmışlardır. Vigolo et al. (2022), boğa spermasını 30×10^6 spermatozoa/ml olacak şekilde sulandırmışlardır. Gacem et al. (2020), eşek spermasını düşük ($30\text{-}60\times10^6$ spermatozoa/ml) ve yüksek (80×10^6 spermatozoa/ml) olacak şekilde sulandırmışlar ve optimum sonuçların düşük yoğunlukta elde edildiğini bildirmişlerdir.

Bilgisayar destekli sperm analizi sistemlerinin, spermatozoon motilitesindeki küçük veya gözle fark edilmesi zor değişiklikleri tespit edebilmesi, farklı sperma sulandırıcılarının objektif olarak değerlendirilmesi, köpek spermasının soğutma ve kriyoprezervasyon süreçlerinin iyileştirilmesi açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır (Verstegen, 2002; Schafer-Somi & Aurich, 2007). Sperma örneklerinin seyreltilmesi için kullanılan sulandırıcı, spermatozoon başlarıyla benzer büyüklükte partiküller içermemelidir (Anzar et al., 1991). Bu amaçla fizyolojik salin, Tyrode albumin-laktat-piruvat (TALP), sodyum sitrat-kazein, Tris-yumurta sarısı, gliserol ve Cornell Üniversitesi sulandırıcısı gibi çeşitli çözeltiler kullanılabilmektedir. Ancak BDSA sonuçlarını yorumlamadan önce, kullanılan sulandırıcının spermatozoon motil üzerindeki etkisinin tam olarak anlaşılması gerekmektedir (Kathiravan et al., 2011).

BDSA, köpek spermasının kriyoprezervasyonunda etilen glikol, gliserol ve otolog prostatik sıvı ile çözülme sonrası sulandırma etkilerinin değerlendirilmesi gibi çalışmalarda başarıyla kullanılmıştır (Rota et al., 2006; Rota et al., 2007; Milani et al., 2010). Örneğin, fosfat tampon salin ile seyreltilen sperma örneklerinde VCL ve VSL gibi hız parametrelerinde %10-17 oranında bir artış gözlenmiş, ancak homolog seminal plazma ile bu artış kaydedilmemiştir. Ayrıca, motil spermatozoon yüzdesi ve ALH değerlerinde her iki sulandırıcıda da azalma tespit edilmiştir (Rijsselaere et al., 2003).

Daha fazla karşılaştırmalı analizde, HEPES-TALP, prostatik sıvı, Tris-yumurta sarısı ve fizyolojik salin gibi dört farklı sulandırıcının spermatozoon hareket parametreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. HEPES-TALP veya prostatik sıvı içinde seyreltilen sperma örneklerinde VAP, VSL, VCL ve progresif motil spermatozoon yüzdeleri, Tris-yumurta sarısı ve fizyolojik salin çözeltilerine kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Öte yandan, Tris-

yumurta sarısı ve fizyolojik salinle seyreltilmiş örneklerde, BCF hariç değerlendirilen birçok parametrede benzer sonuçlar elde edilmiştir. Tris-yumurta sarısı sulandırıcısında, VAP ve VCL gibi hız parametrelerinin en düşük seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, sulandırıcının yüksek viskozitesinin motil spermatozoaların hareketini yavaşlatmasından kaynaklanmaktadır (Kathiravan et al., 2011).

Yükleme hacmi öncelikle spermanın konsantrasyonuna, kullanılan yükleme kompartımanlarının türüne, kullanılan sulandırıcının türüne ve oranına bağlıdır (Kathiravan et al., 2011). Normalde, Makler's odasında analiz için 4-7 µl seyreltilmiş sperma damlası kullanılmaktadır (Hirai et al., 1997; Januskauskas et al., 1999; Hoflack et al., 2007). Sellem et al. (2015), Leja kompartımanına 2.7 µl sperma yüklemişlerdir. Sugai et al. (2024), Fosfat tampon salin ile sulandırılmış spermadan Leja kompartımanına (20 µm derinliğinde) 25–50x10^6 konsantrasyon olacak şekilde yüklemişlerdir. Silva et al. (2023), Makler's kompartımanına 8 µl sperma yüklemişlerdir. Vigolo et al. (2022), hacimsel olarak değil, konsantrasyon olarak 30x10^6 spermatozoon/mL olacak şekilde Leja kompartımanına yükleme yapmışlardır. Tardif et al. (1997), Microcell kompartımanına (20 µm derinliğinde) kullanmış ve yaklaşık 20x10^6 spermatozoon/ml olacak şekilde seyreltilmiş 7 µl sperma yüklemişlerdir. Li et al. (2016), SQA odası kullanmışlardır. Lam-lamel arası 6 µl hacme ve 10 µm derinliğe, Spermtrack 3 µl hacme ve 10 µm derinliğe, ISAS (D4C10) 2 µl hacme ve 10 µm derinliğe, ISAS (D4C20) 3.3 µl hacme ve 20 µm derinliğe sahiptir (Del Gallego et al., 2017).

Palacin et al. (2013), tarafından yapılan çalışmada, koç spermasının BDSA sistemi ile analizinde bölme tipi ve damlacıkların farklılıkları incelenmiş; mikroskopi alanı başına düşen spermatozoon sayısı ve motilite üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda, görüntüleme odasının türünün ölçüm hassasiyeti

ve doğruluğu üzerinde önemli bir etkisi olduğu, ancak damlacık hacminin bu faktörler üzerindeki etkisinin oldukça sınırlı kaldığı belirlenmiştir.

Tablo 1.'de BDSA'da kullanılan farklı görüntüleme odalarının sonuçlara olan etkisi verilmiştir.

Tablo 1. BDSA'da kullanılan farklı görüntüleme odalarının sonuçlara olan etkisi

Yöntem	Canlılık (%)	MS(%)	PM (%)	VCL(µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
Lam- Lamel	60.9±3.4	69.0±3.4	51.5 ± 1.5	143.5 ± 2.7	111.8 ± 3.0	124.9 ± 2.3	75.1 ± 1.3	86.0 ± 0.7	85.1 ± 1.0	3.1 ± 0.1	8.9 ± 0.1
Makler Odası	60.9±3.4	77.0±1.4	50.1 ± 1.5	127.3 ± 2.3	88.6 ± 2.7	104.8 ± 2.8	67.2 ± 1.1	81.0 ± 0.7	81.0 ± 1.4	2.8 ± 0.1	8.9 ± 0.2
ISAS Odası	53.6±3.4	35.1±1.5	35.1 ± 1.5	101.3 ± 2.5	72.6 ± 2.5	82.1 ± 2.5	67.1 ± 1.0	82.5 ± 0.8	78.4 ± 1.2	2.8 ± 0.1	8.5 ± 0.2

(Palacin et al., 2013)

BDSA'nın Veteriner Hekimlikte Hayvan Spermatozoalarında Kullanımı

Domuz eti talebini karşılamak amacıyla, domuz spermasının fertilizasyon kapasitesinin BDSA parametreleri ile tahmin edilip edilemeyeceğini belirlemek için optimize edilmiş ve standart saha koşullarında elde edilen geniş örnek gruplarının analizi

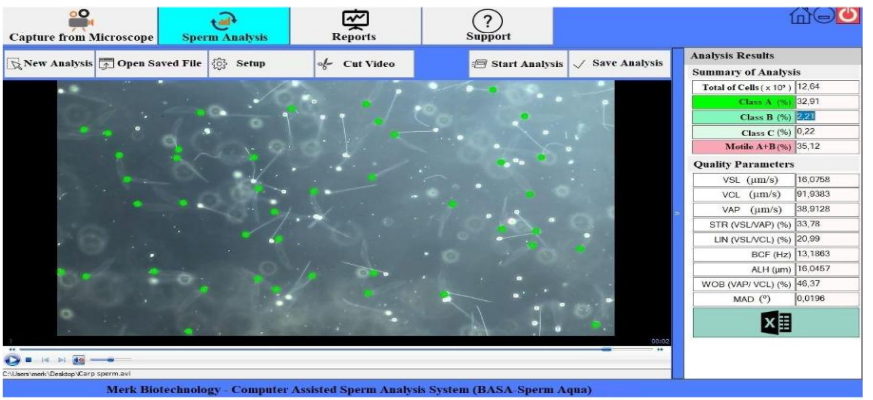
yapılmaktadır (Didion, 2008). BDSA sistemi kullanılarak domuzlarda iki farklı fertilite özelliği değerlendirilmiştir: biri yavrulama oranı, diğeri ise toplam doğan domuz yavrusu sayısıdır. Fertilitedeki değişkenliğin bir kısmı doğrudan domuzun kendisinden kaynaklanmaktadır. Ancak, progresif motilite ile fertilite arasındaki ilişkiyi ele alan bazı çalışmalarda bu parametreye doğrudan değinilmemiştir. Bunun nedeni, progresif motilitenin farklı BDSA sistemlerinde kullanılan temel parametrelerin eşik değerlerine bağlı olarak değişkenlik göstermesi olabilir (Broekhuijse et al., 2012). Broekhuijse et al. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, yavrulama oranındaki değişkenliğin bir kısmının progresif motilitedeki farklılıklardan kaynaklandığı belirlenmiştir. Köpek ve kedilerde BDSA fertilitenin değerlendirilmesi, sperma sulandırıcılarının etkinliğinin belirlenmesi, soğutma ve kriyoprezervasyon süreçlerinin iyileştirilmesi amacıyla veterinerlik merkezlerinde rutin olarak kullanılabilir (Rijsselaere et al., 2012). Köpeklerde ve kedilerde kullanımı ilk kez sırasıyla Günzel Apel et al. (1993) ile Stachecki et al. (1993) tarafından tanımlanmıştır. Yüksek spermatozoon konsantrasyonu nedeniyle, taze köpek sperması BDSA analizi öncesinde sulandırılmalıdır (Rijsselaere et al., 2012). Standartlaştırılmamış parametre ve koşulların eksikliği ile farklı cihazların kullanımı, köpeklerde spermatozoon motilitesi ve hızına ilişkin güvenilir referans değerlerin belirlenmesini zorlaştırmaktadır (Rijsselaere et al., 2012). BDSA sistemleri ayrıca köpek spermatozoon hücrelerinin alt popülasyonlarını (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN) belirlemek amacıyla da kullanılmıştır (Nunez-Martinez et al., 2006; Cassatella et al., 2013). BDSA ile elde edilen veriler, çevresel faktörlere maruz kalan erkek köpeklerde spermatozoon hareketliliğinde meydana gelen küçük değişikliklerin tespit edilmesine yardımcı olabilir. Bunun yanı sıra, ilaçların sperma kalitesi üzerindeki etkisinin değerlendirilmesine ve özellikle köpeklerde spermatozoon hareket özelliklerinin objektif olarak analiz edilmesine olanak tanımaktadır (Rijsselaere et al., 2012).

Kedilerde BDSA kullanımı hakkında daha az veri bulunmaktadır ve mevcut çalışmaların çoğu, in vitro fertilizasyon için yaygın olarak kullanılan epididimal spermanın özelliklerini incelemektedir (Stachecki et al., 1993; Filliers et al., 2008; Rijsselaere et al., 2012). BDSA sistemlerin doğruluğunu değerlendiren araştırmalar nadirdir. Kedilerde uygulanması, evcil ve nesli tükenmekte olan vahşi kedi türlerinde yardımcı üreme tekniklerinin daha da geliştirilmesine katkı sağlayabilir (Rijsselaere et al., 2012). Bununla birlikte, sperma kalitesinin hızlı ve hassas bir şekilde değerlendirilmesini sağlayan biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi, hem evcil kedilerde hem de nesli tükenmekte olan vahşi kedigillerde yardımcı üreme tekniklerinin daha da ileriye taşınması açısından önemli olabilir (Rijsselaere et al., 2012). Normozoospermi çoğunlukla toplam spermatozoon hesabının %60-70'inde mevcuttur, ancak spermanın fertilizasyon potansiyelinde rol oynayabilecek bazı kedi spermatozoon parametreleri hakkında çok az bilgi vardır. Bu nedenle, evcil kedi spermatozoon hareketliliği ve spermadaki apoptotik profil üzerine yapılacak tanıtıcı çalışmalar, yetiştirilen ve vahşi kedilerde sperma kalitesinin belirli parametrelerini tahmin etmeye yardımcı olabilir (Siemieniuch & Woclawek-Potocka, 2008).

Balık spermatozoonlarının kısa süreli hareketlilik dönemlerini belirlemede BDSA sistemleri kritik bir araç haline gelmiştir (Kime et al., 2001). Kemikli balıkların sperma özellikleri, memelilerden belirgin şekilde farklıdır. Balık spermatozoon hücreleri ejakülasyon anında hareketsiz olup, suyla temas ettiklerinde hareketlenir. Ancak, bu hareketlilik süresi oldukça kısadır ve aktivasyonun ardından hızla azalma eğilimi gösterir (genellikle 2 dakikadan kısa) ve akrozom içermez (Elofsson et al., 2000; Coward et al., 2002; Alavi & Cosson, 2005; Kime et al., 2001). Balık spermatozoon hücreleri, hızlı, tekrarlanabilir ve pratik bir yöntemle değerlendirilmelidir, çünkü ATP tüketimi daha hızlı olup,

ömürleri daha kısadır. BDSA sistemi ilk olarak memeliler için geliştirilmiş olmasına rağmen, günümüzde balık spermasının incelenmesi için de yaygın şekilde kullanılmaktadır (Alavi et al., 2012; Özgür et al., 2019). Balıklarda kullanılan BDSA sistemlerinde görüntü işleme için Microsoft Visual Studio IDE üzerinde C++ dili, kullanıcı arayüzleri için ise C#.NET programlama dili ile geliştirilen BASA-Sperm Aqua yazılımı, balıklar ve diğer sucul canlılar için özel olarak tasarlanmış yeni bir BDSA sistemidir (Özgür et al., 2019). Şekil 2.'de Balık spermasının BDSA sisteminde analizi sırasındaki görüntüsü verilmiştir.

Şekil 2. Balık spermasının BDSA sistemi üzerinde görünümü



(Özgür et al. 2019).

Koç sperma muayenesinde BDSA, suni tohumlama için pazarlanan koç spermasının kalite güvencesi de dahil olmak üzere, evcil hayvan üretim laboratuvarlarında sperma kalitesini ve fonksiyonunu değerlendirmek amacıyla giderek daha yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ancak, BDSA motilite analizi doğrudan koçların fertilizasyon kapasitesini tahmin etmek için yeterli değildir. Bununla birlikte, BDSA sistemi sperma kalitesinin değerlendirilmesi ve mikro çevrede meydana gelen değişimlerin spesifik spermatozoon hareket özellikleri üzerindeki etkilerinin incelenmesine yönelik

önemli bilgiler sunabilir (Van de Hoek et al., 2022). Rajashri et al., (2018), Deccani koçlarından suni vajen yöntemiyle elde ettikleri spermaları Tris, sodyum sitrat ve Hindistan cevizi suyu ile sulandırarak, BDSA kullanarak kinematik parametrelerini incelemiş ve bu sistemin Deccani koç spermatozoon kinematiğine ilişkin parametreleri değerlendirdiğini göstermiştir. Vigolo et al. (2022), taze ve dondurulmuş boğa spermasının kinetik ve biyokimyasal parametrelerini dölleme kapasitesi ile ilişkilendirmişlerdir. Francolino da Silva et al. (2025), boğalarda mizaç olarak sakin ve reaktif olan hayvanların çözüm sonu BDSA parametrelerini incelemiş ve istatistiki olarak herhangi bir fark bulamamışlardır

BDSA ve Yapay Zeka

Sengupta et al. (2023), günümüz BDSA sistemleri ile kıyaslandığında Mojo AISA'nın daha iyi performans sunduğu kayda geçmiştir. Mojo AISA sisteminde sperma örneklerini hızlı ve doğru bir şekilde analiz etmek için yapay zekâ ve detaylı öğrenme algoritmaları kullanır. Aynı anda birden fazla analiz gerçekleştirebilir ve tek bir testte sperma kalitesinin kapsamlı bir değerlendirmesini sağlar. Spermanın yapısında bulunan anormallikleri en detaylı şekilde araştırmaya olanak sağlayabilmektedir. Şekil 3.'de Standart BDSA Sistemi ve Mojo AISA'nın kıyaslanması verilmiştir.

Mohammadi et al. (2020), spermatozoon tespiti için RetinaNet adlı derin konvolüsyonel bir sinir ağı kullanılmış ve geleneksel yöntemlerin aksine, yalnızca tek bir kare yerine ardışık birden fazla kare (frame) birleştirilerek ağa sunulmuştur. Bu yöntem, spermatozoaların sadece morfolojik özelliklerini değil, aynı zamanda motilite özelliklerini de dikkate alarak daha doğru bir tespit yapılmasına olanak sağlamıştır. Spermatozoon takibi için ise klasik CSR-DCF algoritması çoklu nesne takibini destekleyecek şekilde modifiye edilmiştir. Modifiye edilmiş CSR-DCF algoritması, yoğun

örneklerde, spermatozoaların çarpıştığı veya kareyi terk edip yeniden giriş yaptığı durumlarda dahi yüksek doğrulukla çalışabilmiştir (Mohammadi et al., 2020).

Şekil 3. Standart BDSA Sistemi ve Mojo AISA'nın kıyaslanması



(Sengupta et al., 2023)

BDSA Kinematik Parametreleri

Bilgisayar Destekli Sperma Analizi, vasıtasıyla spermatozoaların motilite muayenesinde hız özellikleri sınıflandırılmaktadır. Yapılan muayene sonucu elde edilen çıktıların ortalama (en az 3 tekrar) verileri, türe ait sonuçlar ile kıyaslanarak tanı koyulmalıdır (Ata, 2023). Motilite parametrelerini elde etmek için, BDSA'yı kullanırken her numune için en azından 200 hareketli spermatozoon incelenmelidir. Bu tespit, "çok daha fazla sayıda spermanın saptanmasının gerekeceği" anlamı taşımaktadır. Spermatozoonlar, hareketin tipine göre kategorize edilecekse veya bir numune içinde başka değişkenlik analizleri de planlanacaksa, en azından 200 ve mümkünse 400 hareketli spermatozoonun incelenmesine gerek duyulacaktır (WHO, 2021). Motilite kavramı spermatolojik muayenelerde TM ve PM olmak üzere iki kısımda incelenir. Toplam motilite, sperma içindeki spermatozoaların hareketli olan spermatozoalara oranıdır. Progresif motilite, sperma içerisinde bulunan motil spermatozoaların arasında herhangi bir yönde doğrusal ve hızlı hareket eden spermatozoaları ifade etmektedir (Sönmez & Fırat, 2022). Vigolo et al. (2022), TM'yi , 25 μm/s'den daha yüksek VAP ve 20 μm/s'den daha yüksek VSL gösteren spermatozoa yüzdesi olarak tanımlarken, progresif motiliteyi ise 25 μm/s'den daha yüksek VAP ve %75'ten daha yüksek STR gösteren spermatozoa yüzdesi olarak tanımlamışlardır. Başka bir ifade ile progresif motilite, orta limit değerinden daha büyük VCL ile hareket eden ve standartlaşmış eşikten daha büyük STR'ye sahip olan yüzde olarak ifade edilen hücre sayısıdır (Kathiravan et al., 2011). Progresif motilite alt parametreleri boğa spermasında, hızlı (rapid) (>100 μm/s), orta (medium) (>75 μm/s), yavaş (slow) (>50 μm/s) ve hareketsiz (static) olarak ayrılmaktadır (İnanç et al., 2018). Tablo 2.'de hayvan türlerine göre spermatozoon hızı kategorileri verilmiştir.

Tablo 2. Hayvan türlerine göre spermatozoon hızı kategorileri

Tür	Hızlı (rapid) hareket (μm/s)	Orta (medium) hareket (μm/s)	Yavaş (slow) hareket (μm/s)	Yerinde duran (statik) (v = 0 μm/s)
İnsan	v > 25	5 < v < 25	v < 5	v = 0
Boğa	v > 80	15 < v < 80	v < 15	v = 0
Köpek (Kangal)	v > 80	v > 50	v > 20	v = 0
Teke (Norduz)	v > 100	v > 70	v > 40	v = 0
Teke (Ankara)	v > 120	v > 90	v > 60	v = 0
Koç (Santa Ines)	v > 75	45 < v < 75	10 < v < 45	v < 10
Aygır	v > 50	20 < v < 50	v > 20	v < 0

(Ata, 2024)

Farklı BDSA donanımları, motiliteye ilişkin birçok değişkeni hesaplamak için birbirinden farklı matematiksel algoritmalar kullanmaktadır. Ancak, bu cihazların ölçüm kriterlerinin ne düzeyde denkliğe sahip olduğu halen netlik kazanmamıştır (WHO, 2021).

İnsan spermatozoalarında hareket, ileri hızlı progresif motilite (Grade a), yavaş ve yerinde progresif hareketli (Grade b), progresif olmayan motilite (Grade c) ve hareketsiz (Grade d) olarak sınıflandırılmaktadır (Menkveld, 2007). 37 °C'de progresif motilite için, spermatozoa saniyede 25 μm'nin üzerinde, oda ısısında ise saniyede 20 μm yada üzerinde ileriye doğru hareket etmelidir. Bundan başka 37 derecede hareket ederken 4 yada 5 baş büyüklüğünde hareket etmelidir (WHO, 1999). İleri progresif hareket saniyede <5 baş büyüklüğünden az ise hem oda sıcaklığında hem de 37 °C sıcaklıkta spermatozoanın non-progresif yada grade c motilitesine sahip olduğu kabul edilmelidir. Bu sınırlar içerisinde spermatozoa, grade b yada yavaş ileri hareketli olarak düşünülmelidir (Menkveld, 2007). Tablo 3.'de taze spermada bazı normozoospermi parametre değerleri verilmiştir.

Tablo 3. Taze spermada bazı normozoospermi parametre değerleri.

Tür	Spermatozoon Konsantrasyonu ($\times 10^6$/ml)	Motil (%) (natif spermatozoon)	Morfolojik Normal Spermatozoon (%)
Boğa	1000 (300–2000)	40–75	65–95
Koç	2500 (1000–6000)	60–80	80–95
Teke	2400 (1000–6000)	60–85	75–95
Domuz	370 (140–735)	>75 (50–80)	>80 (70–90)
Aygır	120 (30–600)	40–75	60–90
Horoz	5000 (3000–8000)	>80	>80
Köpek	125 (4–400)	50–90	>80 (50–90)
Kedi	1730 (96–3740)	40–90	44–71
Tavşan	500 (10–1000)	80	80
İnsan	>15	40–65	30–70

(Ata, 2023)

Motilitenin olması gereken sınırından az olmasına, terminolojik olarak asthenozoospermi adı verilir. İnsanda %40'tan az, koçta %50'den az, köpekte %50'den az, aygırda %40'tan az ve boğada %50'den az değerler asthenozoospermi olarak adlandırılır (Ata, 2023). Tablo 4.'de hayvan türlerine göre BDSA parametreleri verilmiştir

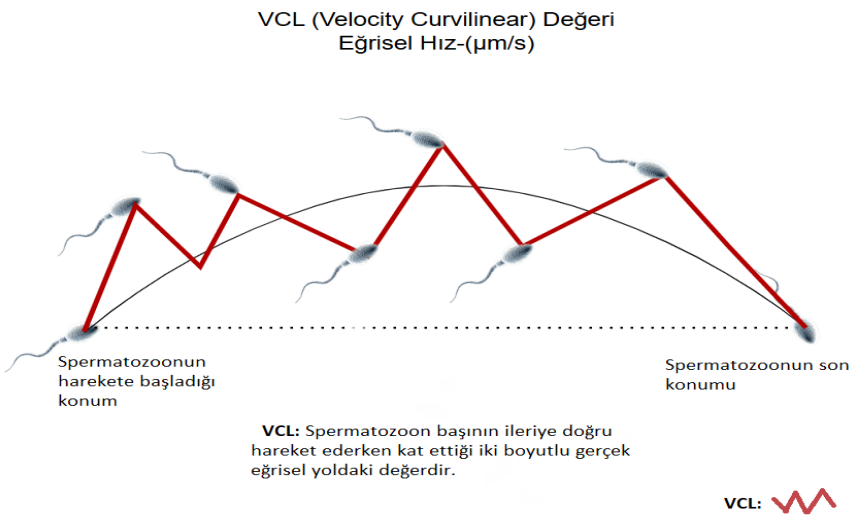
Tablo 4. Hayvan türlerine göre BDSA parametreleri

Tür	Motilite (%)	PM (%)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	ALH (µm/s)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	Kaynak
Boğa	79-93	52-82	116-176	102-151	109-165	4-6	15-16	90-94	85-89	Farrell et al. (1998)
Koç	-	76.76 ± 3.92	274.75 ± 63.77	146.1± 47.74	156.24 ± 44.27	1.9 3 ± 0.59	28.90±11.45	93 ± 11	54±13	Jaswandi et al. (2024)
Teke	91.40 ± 0.65	64.81± 1.06	205.55 ± 6.89	134.21 ± 1.93	158.77 ± 2.93	5.49 ± 0.36	-	87.27 ± 0.41	77.51 ± 0.74	Dorado et al. (2009)
Kedi	79.9 ± 14.4	65.6 ± 15.0	123.1± 19.8	85.2± 16.6	94.6± 15.6	3.8±0.4	33.9± 4.4	89.0± 5.4	70.4± 9.4	Filliers et al. (2008)
Köpek	68.50	60.40	170.26	119.14	126.35	5.19	33.14	92.80	71.17	Belala et al. (2024)
Balık	-	-	114.13± 10.41	48.44± 5.1	45.65± 7.19	20.91± 6.13	11.07± 2.98		19.74± 8.17	Özgür et al. (2019)
Tavşan	65.0±27.4	-	84.3± 19.6	48.5± 16.1	58.1± 16.1	3.2±1.1	-	80.7± 11.2	59.5± 15.8	Lavara et al. (2012)

Eğrisel Hız (VCL - Velocity of Curvilinear -µm/s)

Spermatozoon başının ileriye doğru hareket ederken kat ettiği iki boyutlu gerçek eğrisel yoldaki hız değeridir ve istikamete yönelimdeki gerçekte ne kadar yol aldığının göstergesidir. VAP, VSL ve VCL esas hız göstergelerinin en yüksek değere sahip olanıdır (Sönmez & Fırat, 2022). Hücre canlılığının bir göstergesidir (Şerefoğlu. 2011). Boğalarda ortalama VCL değeri 116-176 (µm/s)'dir (Farrell et al., 1998). Tekelerde VCL değeri 171.1 ± 6.7 (µm/s)'dir (Cox et al., 2006). Robayo et al. (2008), koçlarda VCL değerini 206.1 ± 1.0 µm/s olarak bildirirken, Jawandi et al. (2024), 274.75 ± 63.77 µm/s olarak bildirmişlerdir. Şekil 4.'de spermatozoon eğrisek hız değerinin şematize edilmiş gösterimi verilmiştir

Şekil 4. Spermatozoonun eğrisel hız değerinin şematize edilmiş gösterimi

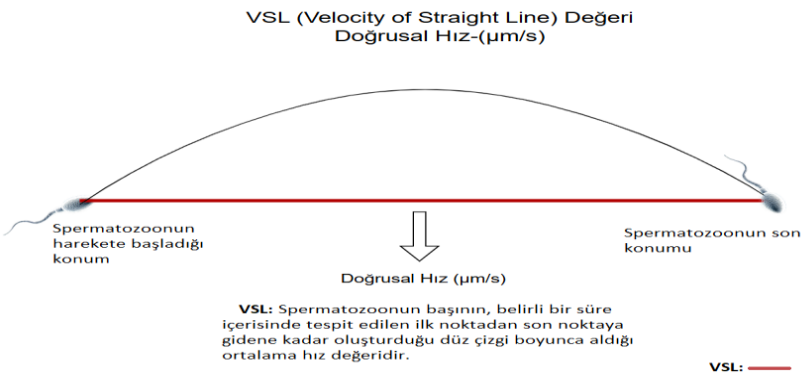


Van de Hoek et al. (2022), göre yeniden çizilmiştir.

Doğrusal Hız (VSL- Velocity of Straight Line - µm/s)

Spermatozoonun hareketinin başlangıç ve bitiş noktaları arasındaki düz çizgi mesafesindeki hızıdır (Selvi, 2021). Başka bir ifadeyle hareketin başlangıç ve bitiş noktasının kuş bakışı uzaklığının zamana bölünmesiyle elde edilir. Üç temel hız parametresinin en düşük değere sahip olanıdır. VAP değeri düzenli ve düz yol üzerinde süregelen spermatozoon hareketinde; genelde VSL'ye çok yakın iken; doğrusal olmayan hareketlerde ise VAP, VSL'ye göre oldukça yüksektir. (Sönmez & Fırat, 2022). Boğalarda ortalama VSL değeri 102-151 (µm/s)'dir (Farrell et al., 1998). Tekelerde VSL değeri 109.1 ± 4.9 (µm/s)'dir (Cox et al., 2006). Robayo et al. (2008), koçlarda VSL değerini 99.8 ± 3.1 µm/s olarak bildirirken, Jawandi et al. (2024), 146.10 ± 47.74 µm/s olarak bildirmişlerdir. Şekil 5.'de spermatozoon doğrusal hız değerinin şematize edilmiş gösterimi verilmiştir.

Şekil 5. Spermatozoonun doğrusal hız değerinin şematize edilmiş gösterimi

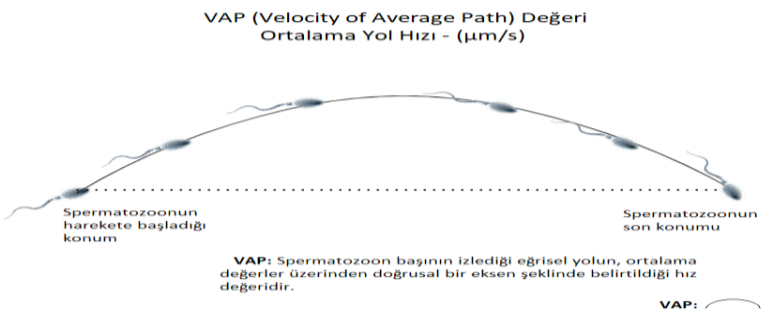


Van de Hoek et al. (2022), göre yeniden çizilmiştir.

Ortalama Yol Hızı (VAP- Velocity of Avarage Path - µm/s)

Spermatozoon başının ortalama yolaktaki hızı. Bu yolak eğrisel yolun BDSA cihazlarındaki algoritmalara göre düzleştirilmesi ile hesaplanır. Bu algoritmalar cihazlar arasında farklılık gösterebileceği için VAP farklı BDSA sistemleri arasında mukayese edilebilir bir ölçüt değildir (Şerefoğlu, 2011) Bu parametre, spermatozoonun izlediği eğrisel yolun (VCL‟nin), BDSA cihazlarındaki algoritmalara göre düzleştirilmesi ile hesaplanan ortalama değer olup bu algoritmalar, cihazların yazılımları arasında farklılık gösterebilir. VAP değeri, spermatozoonun hedefe doğru ortalama kat ettiği yol bilgisini vermekte olup her zaman için üç hız değeri içinde aradaki değerdir (Sönmez & Fırat, 2022). Boğalarda VAP değeri 10 µm/sn'de az ise yavaş, 10-25 µm/sn arasında ise orta, 50 µm/sn'den yüksek ise hızlı olarak değerlendirilir (Farrell et al., 1998). Tekelerde VAP değeri 129.6 ± 4.7 (µm/s)'dir (Cox et al., 2006). Robayo et al. (2008), koçlarda VAP değerini 121.6 ± 2.3 µm/s olarak bildirirken, Jawandi et al. (2024), 156.24 ± 44.27 µm/s olarak bildirmişlerdir. Ratlarda VAP değeri Sprauge-Dawley ırkında 121.5 ± 3.94, F344 ırkında 129. 7 ± 3.8'dir. Şekil 6.'da spermatozoon ortalama yol hız değerinin şematize edilmiş gösterimi verilmiştir.

Şekil 6.Spermatozoonun ortalama yol hız değerinin şematize edilmiş gösterimi

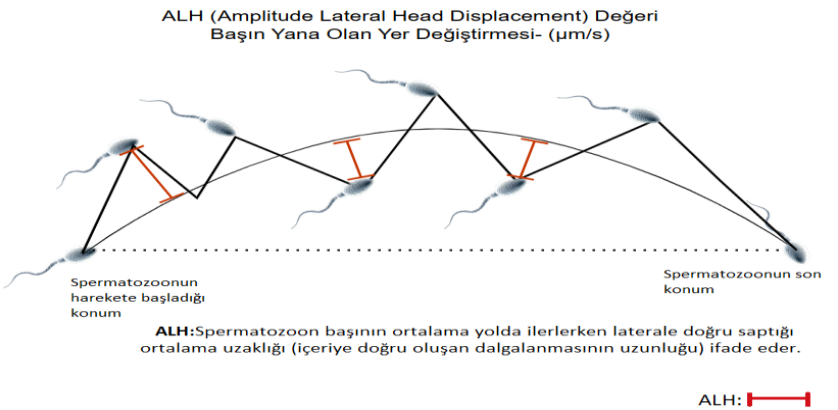


Van de Hoek et al. (2022), göre yeniden çizilmiştir.

Yanal Baş Yer Değiştirme Genliği (ALH- Amplitude of Lateral Head Displacement - µm/s)

Spermatozoon başının yanal hareketinin genişliği, başın ortalama yolda ilerlerken laterale doğru saptığı uzaklıktır ve mesafe maksimum veya ortalama değer halinde verilir (Peter et al., 2021; WHO, 2021; Demirhan, 2020; Şerefoğlu, 2011). ALH, spermatozoon kapasitasyon sırasında elde edilen ve kümülüs hücre katmanları ve zona pellusida gibi oositi çevreleyen döllenme bariyerlerine penetrasyonu gerçekleştirmek için gerekli olan önemli bir hareketlilik parametresi olarak kabul edilir (Gadea, 2005). Boğalarda ortalama ALH değeri 4-6 µm/sn 'dir (Farrell et al., 1998). Tekelerde ALH değeri 4.6 ± 0.3 (µm/s)'dir (Cox et al., 2006). Robayo et al. (2008), koçlarda ALH değerini 6.1 ± 0.2 µm/s olarak bildirirken, Jawandi et al. (2024), 1.93 ± 0.59 µm/s olarak bildirmişlerdir. Şekil 7.'de spermatozoon başının yana olan değiştirme genliği şematize edilmiş gösterimi verilmiştir.

Şekil 7.Spermatozoon başının yana olan değiştirme genliği değerinin şematize edilmiş gösterimi

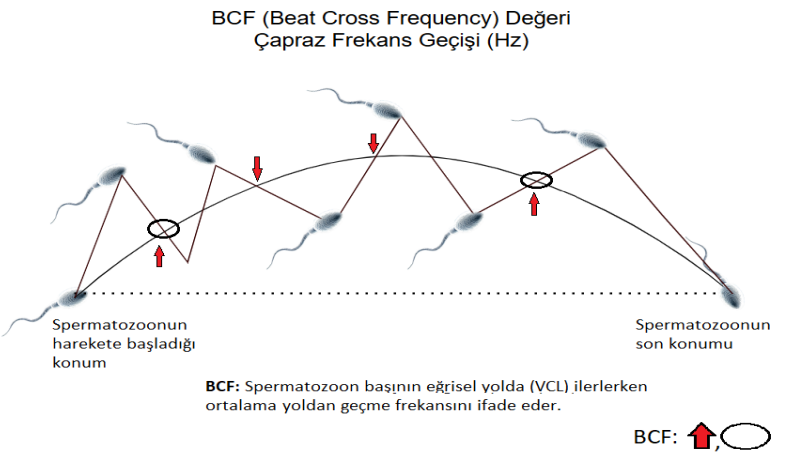


Van de Hoek et al. (2022), göre yeniden çizilmiştir.

Çapraz Frekans Geçişi (Beat Cross Frequency – BCF - Hz)

Spermatozoonun yörüngesi ile yaptığı ortalama kesişme frekansı olarak ifade edilmektedir (Selvi, 2021; WHO, 2021). BCF kuyruk hareketlerinin yön değiştirme ritminin incelenmesi açısından önemli olabilmektedir (Sönmez & Fırat, 2022). Boğalarda ortalama BCF değeri 15-16 Hz'dir (Farrell et al., 1998). Şekil 8.'de spermatozoon çapraz geçiş değerinin şematize edilmiş gösterimi verilmiştir.

Şekil 8. Spermatozoonun çapraz geçiş değerinin şematize edilmiş gösterimi



Van de Hoek et al. (2022), göre yeniden çizilmiştir.

Dengeleme/Yalpalama (WOB - Wobbel Balancing -%)

Spermatozoonun kat etmiş olduğu yolda ilerlerken izlenen dalgalanmasının ölçüsüdür (Selvi, 2021; WHO, 2021). Kararsızlık, sapma olarakta ifade edilebilmektedir (Demirhan, 2020). VAP/VCL x 100 ile ölçülür 0-100 arasında değerlendirilir. Değer ne denli 100'e

yakınlaşır ise spermatozoonun yalpalanmasının veya kararsızlığının o kadar azaldığına işaret eder (Sönmez & Fırat, 2022).

Eğrisel Yolun Doğrusallığı (LIN- Linearity -%)

VSL / VCL x 100 formülü ile hesaplanır. Spermatozoonun hareketinin düzgün çizgisel harekete yatkınlık oranını simgeler (Selvi, 2021; WHO, 2021). Aynı zamanda spermatozoaların doğrusal yoldan ne ölçüde saptığını da ifade eder. LIN parametresi 0-100 aralığında değerlendirilmektedir. 100'e olan yakınlığı ne ölçüde artar ise spermatozoonun ilerlemesinin düzlüğü de o denli artmış demektir (Sönmez & Fırat, 2022).

Gidiş Doğrultusu (Straightness - STR- %)

Spermatozoonun kat etmiş olduğu ortalama yolun doğrusallığını ifade eder. Spermatozoonun doğrusal hızının, ortalama yol hızına bölünmesiyle (VSL/VAPX100) hesaplanır (Selvi, 2021; WHO, 2021; Sönmez ve Fırat 2022). STR ölçütü 0-100 değer aralığındadır. Değer 100'e ne kadar yakın olursa spermatozoonun ilerleme yörüngesinin doğrusallığı da o kadar artacaktır (Sönmez & Fırat, 2022).

Ortalama Açısal Yer Değiştirme (MAD - Mean Angular Displacement - °)

Spermatozoon başının eğri çizgisel yolu boyunca anlık dönüş açısının zamana göre ortalama mutlak değerleri (WHO, 2021).

Genetik Farklılığın BDSA Kinematik Parametleriyle İlişkisi

Genetik gruplar arasındaki motilite farklılıklarını kabaca tahmin edebilmek amacıyla, spermatozoon hareket parametreleri karşılaştırılmıştır. Ancak, farklı çalışmaların değişken parametre ayarları kullanması nedeniyle sonuçlar doğrudan karşılaştırılamamaktadır. Aynı BDSA parametreleri altında yapılan bir araştırmada, sütçü ırklardan Holstein-Friesian ile etçi ırklardan Belçika Mavisi boğalarının spermatozoon motilite özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada, Belçika Mavisi boğalarında Holstein-Friesian'a kıyasla daha fazla hareketsiz spermatozoa ve daha düşük hızlı hareket eden spermatozoa bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca, TM ve PM spermatozoon yüzdeleri ile VAP, VSL ve STR gibi hız parametrelerinin Belçika Mavisi ırkında daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Bunun yanı sıra, Belçika Mavisi boğalarının kinetik aktivitesinin daha düşük olduğu, BCF değerlerinin daha az ve ALH seviyelerinin ise daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Hoflack et al., 2007). Tablo 5.'de farklı boğa ırklarında dondurma öncesi, tablo 6.'da BDSA çözüm sonu BDSA değerleri verilmiştir.

Tablo 5. Farklı boğa ırklarında dondurma öncesi BDSA değerleri

	Dondurma Öncesi			
Irk	**-**	**Jersey**	**Belçika Mavisi**	**Holstein-Friesian**
TM (%)	89	95.9±0.5	70.4±15.2	82.9±12.0
PM (%)	70	54.1±1.9	53.8±14.8	68.9±11.7
VAP (µm/s)	138	127.1±3.4	114.0±18.3	120.9±14.4
VSL (µm/s)	127	88.4±1.9	98.8±1.8	109.4±14.2
VCL (µm/s)	144	239.3±6.1	-	-
ALH (µm/s)	5	10.4±2	5.0±1.0	4.5±0.8
BCF (µm/s)	15	25.7±0.8	36.9±3.7	39.0±3.0
STR (%)	92	69.2±1.2	84.9±4.0	89.2±3.1
LIN (%)	88	38.1±0.8	-	-
Kaynaklar	Farrell et al. (1998)	Karthikeya (2003)	Hoflack et al. (2007)	Hoflack et al. (2007)

(Kathiravan et al., 2011)

Tablo 6. Farklı boğa ırklarında çözüm sonu BDSA değerleri

	Çözüm Sonrası			
Irk	**Holstein**	**Jersey**	**Kangaam**	**Friesian x Sahiwal**
TM (%)	67.2±2.3	65.4±2.2	64.8±1.8	48.2±3.8
PM (%)	36.6±5.1	35.1±1.7	39.5±0.9	24.3±2.3
VAP (µm/s)	95.3±1.5	98.8±2.2	89.2±1.9	86.9±2.5
VSL (µm/s)	84.5±2.0	74.8±1.5	69.9±1.6	68.1±1.9
VCL (µm/s)	163.4±5.4	184.9±5.5	169.2±4.2	172.2±5.4
ALH (µm/s)	-	9.3±0.3	9.0±0.2	9.5±0.3
BCF (µm/s)	-	27.6±1.0	27.9±0.5	28.1±0.4
STR (%)	-	73.4±1.0	74.8±0.6	76.4±0.8
LIN (%)	-	40.5±0.9	48.0±0.7	40.3±0.7
Kaynaklar	Hallap et al. (2006)	Karthikeya (2003)	Rengarajan (2004)	Hoflack et al. (2007)

(Kathiravan et al., 2011).

VCL ve VAP, Duroc x Pietrain domuzlarında, Pietrain domuzlarına göre daha yüksekken, VSL, LIN ve STR gibi progresif motilite değişkenleri Pietrain'de Duroc x Pietrain domuzlarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Tüm kinematik değişkenlerin tahmini değerlerinin Duroc x Pietrain domuzlarında Pietrain domuzlarına göre ortalama değerlere daha yakın olduğunu göstermiştir (Barquero et al., 2021).

Staffordshire, Bull Terrier, Labrador Retriever, Spanish Mastiff, Valencian Rat Hunting Dog, British Bulldog ve Chihuahua arasında yapılan çalışmada parametrelerin çoğu tüm ırklar arasında önemli farklılıklar göstermiştir. En yüksek VCL, VSL, VAP ve BCF Staffordshire Bull Terrier'de, en yüksek LIN, STR ve WOB İngiliz Bulldog'da ve en yüksek ALH Labrador Retriever ve İspanyol Mastiff'te görülmüştür. Tüm parametreler için en düşük değerler Chihuahua'da elde edilmiştir (Valverde et al., 2019a). Tablo 7.'de farklı köpek ırklarına ait BDSA değerleri verilmiştir.

Tablo 7. Farklı köpek ırklarına ait BDSA değerleri

BB: British Bulldog; CHI: Chihuahua; LR: Labrador Retriever; SBT: Staffordshire Bull Terrier; SM: Spanish Mastiff; VRH: Valencian Rat Hunting.

Parametre	SBT	LR	SM	VRH	BB	CHI
VCL	158.4 ± 54.4	150.1 ± 48.4	130.3 ± 50.0	124.7 ± 50.0	93.9 ± 42.0	81.5 ± 53.5
VSL	66.2 ± 34.7	57.0 ± 33.1	49.8 ± 31.9	47.4 ± 32.0	53.0 ± 35.9	27.5 ± 26.4
VAP	95.1 ± 31.8	83.7 ± 29.9	76.6 ± 32.4	66.7 ± 30.1	67.3 ± 35.1	44.0 ± 29.9
LIN	41.9 ± 18.4	37.1 ± 18.1	37.3 ± 18.4	36.5 ± 19.1	51.5 ± 24.3	30.7 ± 16.1
STR	67.0 ± 23.4	64.4 ± 24.2	61.9 ± 24.0	65.8 ± 26.1	71.9 ± 26.4	55.6 ± 23.7
WOB	61.1 ± 11.5	55.9 ± 11.4	58.5 ± 11.5	53.3 ± 12.5	68.1 ± 14.2	53.7 ± 10.8
ALH	3.6 ± 1.2	3.7 ± 1.2	3.7 ± 1.4	3.1 ± 1.1	3.3 ± 1.3	2.8 ± 1.2
BCF	18.3 ± 5.9	16.3 ± 5.5	14.5 ± 6.7	14.5 ± 6.0	10.3 ± 4.5	9.5 ± 6.2

(Valverde et al., 2019a)

IVF ortamındaki VCL, BCF ve ALH'deki tür farklılıkları, kapasitasyon ajanlarına verilen yanıtın türler arasında değiştiğini göstermektedir. Spermatozoon plazma zarı bileşimindeki potansiyel tür farklılıkları, antilop türleri arasındaki ALH, VSL, LIN ve STR farklılıklarının gösterdiği gibi kapasitasyon derecesindeki farklılıkları açıklayabilir (Chatiza et al., 2012).

Sonuç

Son yıllarda in vitro sperma değerlendirme yöntemlerinde kaydedilen teknolojik gelişmeler, spermatozoaların fertilite ile ilişkili özelliklerinin daha objektif, hassas, hızlı ve tekrarlanabilir biçimde değerlendirilmesine önemli katkılar sağlamıştır. Geleneksel spermatolojik yöntemlerin önemli bir bölümünün gözlemci deneyimine ve subjektif değerlendirmeye dayanması, özellikle motilite, morfoloji ve konsantrasyon gibi temel parametrelerde gözlemciler arası farklılıklara ve ölçüm hatalarına neden olabilmektedir. Bu bağlamda geliştirilen BDSA sistemleri, spermatozoaların görüntü temelli olarak otomatik ve kantitatif biçimde değerlendirilmesini sağlayarak sperma analizinde standardizasyon ve objektiflik açısından önemli bir ilerleme ortaya koymuştur. BDSA sistemlerinin sağladığı en önemli avantajlardan biri, kısa süre içerisinde çok sayıda spermatozoonun analiz edilebilmesi ve böylece sperma örneğinin daha geniş bir hücre popülasyonu üzerinden değerlendirilmesine olanak sağlamasıdır. Özellikle spermatozoon motilitesi ve kinematik özelliklerinin VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH ve BCF gibi çok sayıda parametre üzerinden değerlendirilmesi, spermatozoon hareketinin yalnızca tek bir yüzde değeriyle ifade edilmesinin ötesine geçilmesini mümkün kılmaktadır. Bu yaklaşım, spermatozoaların farklı hareket modellerinin ve sperma örneği içerisindeki heterojen spermatozoon alt popülasyonlarının daha ayrıntılı biçimde ortaya konmasına katkı sağlamaktadır. Dolayısıyla BDSA, yalnızca klasik spermatolojik parametrelerin otomatik olarak ölçülmesini sağlayan bir teknoloji değil, aynı zamanda spermatozoon hareket davranışının nicel olarak karakterize edilmesine olanak tanıyan ileri bir analiz platformu olarak değerlendirilmelidir. Bununla birlikte, BDSA ile elde edilen parametrelerin tek başına erkek fertilitesinin bütün yönlerini açıklaması beklenmemelidir. Spermatozoonun fertilizasyon kapasitesi; motilite ve morfolojinin yanı sıra hücresel ve moleküler

düzeyde çok sayıda fonksiyonun birlikte etkisiyle belirlenmektedir. Bu nedenle BDSA sonuçlarının fertilite açısından yorumlanmasında yalnızca yüksek motilite veya belirli bir kinematik parametrenin üstünlüğüne dayalı değerlendirmeler yerine, spermatozoon hareket özelliklerinin fertilizasyon sonuçlarıyla ilişkisini ortaya koyan kontrollü ve türlere özgü çalışmaların sonuçları dikkate alınmalıdır. Özellikle farklı hayvan türlerinde ve farklı üretim koşullarında belirlenen kinematik özelliklerin fertilite ile ilişkisinin değişebilmesi, BDSA parametreleri için evrensel eşik değerlerin oluşturulmasını güçleştirmektedir. BDSA sistemlerinin güvenilirliği ve farklı çalışmalar arasında elde edilen sonuçların karşılaştırılabilirliği de önemli ölçüde standardizasyon düzeyine bağlıdır. Numune hazırlama koşulları, spermatozoon yoğunluğu, kullanılan görüntüleme sistemi, büyütme ve optik özellikler, analiz yazılımı, algoritmalar, değerlendirme kriterleri ve kullanılan eşik değerler aynı örnekten elde edilen sonuçları etkileyebilmektedir. Bu nedenle BDSA sonuçlarının yalnızca cihazın teknik özellikleri üzerinden değerlendirilmemesi; örnek hazırlamadan görüntü elde edilmesine, görüntü analizinden veri yorumlamaya kadar bütün sürecin standardize edilmesi gerekmektedir. Cihazların düzenli kalite kontrol ve kalibrasyonlarının yapılması, analiz protokollerinin açık biçimde tanımlanması ve laboratuvarlar arası metodolojik farklılıkların azaltılması, elde edilen verilerin güvenilirliğinin artırılması açısından temel önem taşımaktadır. Gelecekte BDSA teknolojilerindeki gelişmelerin yalnızca analiz hızının artırılmasına değil, spermatozoonun fertilite potansiyelini daha doğru biçimde yansıtan yeni görüntü temelli biyobelirteçlerin belirlenmesine odaklanması beklenmektedir. Özellikle yapay zekâ ve makine öğrenmesi tabanlı görüntü analiz algoritmalarının BDSA sistemlerine entegrasyonu, spermatozoaların morfolojik ve kinematik özellikleri arasındaki karmaşık ilişkilerin ortaya çıkarılmasına ve insan kaynaklı değerlendirme farklılıklarının azaltılmasına olanak sağlayabilir. Büyük veri havuzlarının

kullanılmasıyla oluşturulacak modeller, gelecekte yalnızca mevcut sperma kalitesinin tanımlanmasından ziyade belirli bir sperma örneğinin veya erkeğin fertilite potansiyelinin öngörülmesine yönelik yeni yaklaşımların geliştirilmesini mümkün kılabilir. Ancak bu tür modellerin güvenilir biçimde kullanılabilmesi için farklı tür, ırk, yaş, sperma işleme yöntemi ve fertilite düzeylerini içeren geniş veri setleriyle gerçekleştirilecek bağımsız validasyon çalışmalarına ihtiyaç bulunmaktadır.

Sonuç olarak BDSA sistemleri, sperma değerlendirmesinde subjektif gözlemci etkisini azaltan, çok sayıda spermatozoonun kısa sürede analiz edilmesine olanak sağlayan ve spermatozoon motilitesi, morfolojisi, konsantrasyonu ve kinematik özelliklerini objektif ve kantitatif biçimde ortaya koyabilen önemli teknolojik araçlardır. Bununla birlikte, BDSA'nın gerçek değeri yalnızca daha hızlı veya daha ayrıntılı ölçüm yapabilmesinde değil, elde edilen nicel spermatozoon özelliklerinin gerçek fertilite sonuçlarıyla ilişkilendirilebilmesinde yatmaktadır. Bu nedenle gelecekte yapılacak araştırmaların, BDSA parametreleri ile gerçek döl verimi arasındaki ilişkilerin farklı türlerde ve kontrollü koşullarda belirlenmesine, türlere özgü referans değerlerin oluşturulmasına ve analiz protokollerinin standardize edilmesine öncelik vermesi gerekmektedir. Yapay zekâ ve makine öğrenmesi destekli analizlerin yaygınlaşmasıyla birlikte BDSA teknolojilerinin, klasik sperma kalitesi değerlendirmesinin ötesine geçerek fertilite tahmini, damızlık seçiminde karar desteği ve üreme biyoteknolojilerinin optimizasyonunda daha etkin biçimde kullanılacağı öngörülmektedir.

Kaynakça

Alavi, S. M., & Cosson, J. (2005). Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell biology international*, *29*(2), 101–110. https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.11.021

Alavi, S. M. H., Hatef, A., Psenicka, M., Kašpar, V., Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Cosson, J., Bondarenko, V., Rodina, M., Gela, D., & Linhart, O. (2013). Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: II. Sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 22, 861–886. https://doi.org/10.1007/s11160-012-9270-x

Amann, R. P., & Katz, D. F. (2004). Reflections on CASA after 25 years. *Journal of andrology*, *25*(3), 317–325. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02793.x

Amann, R. P., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, *81*(1), 5–17.e173. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004

Anzar, M., Hassan, M. M., Graham, E. F., Deyo, R. C., & Singh, G. (1991). Efficacy of the Hamilton Thorn Motility Analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. *Theriogenology*, *36*(2), 307–317. https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90388-t

Ata, A. (2024). Dölerme ve Suni Tohumlama Ders Notları.

Ata, A. (2023). Spermanın Değerlendirilmesi ve Genel Kategorizasyonu M. K. Soylu, K. Ak, E. Akçay, A. Baran, M. Evecen & M. B. Tırpan (Ed.), *Hayvanlarda Reprodüksiyon, Androloji ve Yardımcı Üreme Teknikleri, (ss. 174-178).* Ankara Nobel Tıp Kitabevleri.

Bae, J. W., Hwang, J. M., Lee, W. J., Kim, D. H., Yi, J. K., Ha, J. J., Oh, D. Y., & Kwon, W. S. (2024). Application of sperm motion kinematics and motility-related proteins for prediction of male fertility. *Theriogenology*, *218*, 223–230. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.02.007

Barquero, V., Soler, C., Sevilla, F., Calderón-Calderón, J., & Valverde, A. (2021). A Bayesian analysis of boar spermatozoa kinematics and head morphometrics and their relationship with litter size fertility variables. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *56*(7), 1024–1033. https://doi.org/10.1111/rda.13946

Belala, R., Bourahmoune, D., & Mimoune, N. (2024). *The use of computer assisted sperm analysis (CASA) in domestic animal reproduction: A review*. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. Advance online publication. https://doi.org/10.9775/kvfd.2024.32819

Bendayan, M., Boitrelle, F. (2024). Computer-assisted semen analysis (CASA). In: Agarwal A, Boitrelle F, Saleh R, Shah R (Eds.), *Human semen analysis: From the WHO manual to the clinical management of infertile men*, pp. 317–327. Springer International Publishing.

Björndahl, L., Barratt, C. L., Fraser, L. R., Kvist, U., & Mortimer, D. (2002). ESHRE basic semen analysis courses 1995-1999: immediate beneficial effects of standardized training. *Human reproduction (Oxford, England)*, *17*(5), 1299–1305. https://doi.org/10.1093/humrep/17.5.1299

Bompart, D., Vázquez, R. F., Gómez, R., Valverde, A., Roldán, E. R. S., García-Molina, A., & Soler, C. (2019). Combined effects of type and depth of counting chamber, and rate of image frame capture, on bull sperm motility and kinematics. *Animal reproduction*

science, *209*, 106169. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106169

Brito, L. F. C., Althouse, G. C., Aurich, C., Chenoweth, P. J., Eilts, B. E., Love, C. C., Luvoni, G. C., Mitchell, J. R., Peter, A. T., Pugh, D. G., & Waberski, D. (2016). Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology*, *85*(9), 1507–1527. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.002

Brito, L. F. C., González-Marín, C., & Ross, P. (2025). Effective standardization of bovine frozen semen sperm motility analysis in a multi-laboratory setting. *Animal reproduction science*, *274*, 107793. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2025.107793

Broekhuijse, M. L., Šoštarić, E., Feitsma, H., & Gadella, B. M. (2012). Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *Journal of animal science*, *90*(3), 779–789. https://doi.org/10.2527/jas.2011-4311

Caldeira, C., Hernández-Ibáñez, S., Valverde, A., Martin, P., Herranz-Jusdado, J.G., Gallego, V., Asturiano, J.F., Dzyuba, B., Pšenička, M., & Soler, C. (2019). Standardization of sperm motility analysis by using CASA-Mot for Atlantic salmon (Salmo salar), European eel (Anguilla anguilla) and Siberian sturgeon (Acipenser baerii). *Aquaculture*. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.001

Cassatella, D., Martino, N. A., Valentini, L., Guaricci, A. C., Cardone, M. F., Pizzi, F., Dell'Aquila, M. E., & Ventura, M. (2013). Male infertility and copy number variants (CNVs) in the dog: a two-pronged approach using Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) and Fluorescent In Situ Hybridization (FISH). *BMC genomics*, *14*, 921. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-921

Chatiza, F. P., Bartels, P., Nedambale, T. L., & Wagenaar, G. M. (2012). Computer assisted sperm analysis of motility patterns of

postthawed epididymal spermatozoa of springbok (Antidorcas marsupialis), impala (Aepyceros melampus), and blesbok (Damaliscus dorcus phillipsi) incubated under conditions supporting domestic cattle in vitro fertilization. *Theriogenology*, *78*(2), 402–414. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.020

Coward, K., Bromage, N. R., Hibbitt, O., & Parrington, J. (2002). Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 12, 33–58. https://doi.org/10.1023/A:1022613404123

Cox, J. F., Alfaro, V., Montenegro, V., & Rodriguez-Martinez, H. (2006). Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*, *66*(4), 860–867. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.062

David, G., Serres, C. and Jouannet, P. (1981), Kinematics of human spermatozoa. Gamete Res., 4: 83-95. https://doi.org/10.1002/mrd.1120040202

Del Gallego, R., Sadeghi, S., Blasco, E., Soler, C., Yániz, J. L., & Silvestre, M. A. (2017). Effect of chamber characteristics, loading and analysis time on motility and kinetic variables analysed with the CASA-mot system in goat sperm. *Animal reproduction science*, *177*, 97–104. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.12.010

Del Olmo, E., Bisbal, A., Maroto-Morales, A., García-Alvarez, O., Ramon, M., Jimenez-Rabadan, P., Martínez-Pastor, F., Soler, A. J., Garde, J. J., & Fernandez-Santos, M. R. (2013). Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Animal reproduction science*, *138*(1-2), 102–109. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.007

Demirhan, A. (2020). *Farklı sıcaklık ve sürelerde çözdürülen dondurulmuş boğa spermalarının CASA parametreleri ile*

değerlendirilmesi (Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye).

Didion B. A. (2008). Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. *Theriogenology*, *70*(8), 1374–1376. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.014

Donnelly, E. T., McClure, N., & Lewis, S. E. (2000). Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*, *15*(1), 61–68. https://doi.org/10.1093/mutage/15.1.61

Donnelly, E. T., Lewis, S. E., McNally, J. A., & Thompson, W. (1998). In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertility and sterility*, *70*(2), 305–314. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(98)00146-0

Douglas, C., Parekh, N., Kahn, L. G., Henkel, R., & Agarwal, A. (2021). A Novel Approach to Improving the Reliability of Manual Semen Analysis: A Paradigm Shift in the Workup of Infertile Men. *The world journal of men's health*, *39*(2), 172–185. https://doi.org/10.5534/wjmh.190088

Dorado, J., Hidalgo, M., Muñoz, A., & Rodríguez, I. (2009). Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Animal reproduction science*, *112*(1-2), 150–157. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.005

Ehlers, J., Behr, M., Bollwein, H., Beyerbach, M., & Waberski, D. (2011). Standardization of computer-assisted semen analysis using an e-learning application. *Theriogenology*, *76*(3), 448–454. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.021

Elofsson, H., McAllister, B. G., Borg, B., & Kime, D. E. (2000, July 31–August 3). Sperm motility in the three-spine stickleback (Gasterosteus aculeatus) [Conference abstract]. 4th International Symposium on Fish Endocrinology, Seattle, WA, United States.

Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. ESHRE Andrology Special Interest Group. European Society for Human Reproduction and Embryology. (1998). *Human reproduction (Oxford, England)*, *13*(1), 142–145.

Farrell, P. B., Presicce, G. A., Brockett, C. C., & Foote, R. H. (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, *49*(4), 871–879. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00036-3

Filliers, M., Rijsselaere, T., Bossaert, P., De Causmaecker, V., Dewulf, J., Pope, C. E., & Van Soom, A. (2008). Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4 degrees C) on sperm quality. *Theriogenology*, *70*(9), 1550–1559. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.004

Francolino da Silva MK, Nichi M, Sant'Ana Borges M, Landgraf RG, Arantes Pereira MF, Crespilho AM (2025). Influence of animal temperament on body and reproductive development of beef bulls. Animal Reproduction Science, 274, 107788.

Gacem, S., Catalán, J., Valverde, A., Soler, C., & Miró, J. (2020). Optimization of CASA-Mot Analysis of Donkey Sperm: Optimum Frame Rate and Values of Kinematic Variables for Different Counting Chamber and Fields. *Animals : an open access journal from MDPI*, *10*(11), 1993. https://doi.org/10.3390/ani10111993

Gadea J. (2005). Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, *63*(2), 431–444. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.023

Günzel-Apel, A. R., Günther, C., Terhaer, P., & Bader, H. (1993). Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, *47*, 271–278.

Hallap, T., Jaakma, U., & Rodriguez-Martinez, H. (2006). Changes in semen quality in Estonian Holstein AI bulls at 3, 5 and 7 years of age. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *41*(3), 214–218. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00682.x

Hirai, M., Cerbito, W. A., Wijayagunawardane, M. P., Braun, J., Leidl, W., Ohosaki, K., Matsuzawa, T., Miyazawa, K., & Sato, K. (1997). The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. *Theriogenology*, *47*(7), 1463–1478. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00136-2

Hoflack, G., Opsomer, G., Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., & Duchateau, L. (2007). Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian blue and Holstein-Friesian bulls. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *42*(2), 153–161. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00745.x

Januskauskas, A., Gil, J., Söderquist, L., Håård, M. G., Håård, M. C., Johannisson, A., & Rodriguez-Martinez, H. (1999). Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, *52*(4), 641–658. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00159-4

Jaswandi, J., Prastowo, S., Widyastuti, R., & Ananda, A. (2024). Quality and protein profiles in local Indonesian ram sperm before

and after cryopreservation. *International Journal of Veterinary Science, 13*, 841–852. https://doi.org/10.47278/journal.ijvs/2024.175

Karthikeya, G. (2003). Computer automated motility and morphometric analysis of bull and buck spermatozoa. MSc Thesis, Tamil Nadu Veterinary and Animal Sciences University, Chennai, India.

Kaskar, K., Franken, D. R., van der Horst, G., & Kruger, T. F. (1994). The effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics and zona pellucida binding potential of teratozoospermic men. *Human reproduction (Oxford, England)*, *9*(3), 477–481. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138530

Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K., & Kadirvel, G. (2011). Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system--a review. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *46*(1), 165–172. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x

Katz, D. F., & Dott, H. M. (1975). Methods of measuring swimming speed of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility, 45*(2), 263–272. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0450263

Kime, D. E., Van Look, K. J., McAllister, B. G., Huyskens, G., Rurangwa, E., & Ollevier, F. (2001). Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, *130*(4), 425–433. https://doi.org/10.1016/s1532-0456(01)00270-8

Lavara, R., Vicente, J. S., & Baselga, M. (2012). Estimation of genetic parameters for semen quality traits and growth rate in a paternal rabbit line. *Theriogenology*, *78*(3), 567–575. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.002

Leidl W (2002). New media in specialization and continuing education in andrology. *Proceedings of the Annual Meeting of the Association for Applied Animal Andrology*, 18–31.

Li, Y., Kalo, D., Zeron, Y., & Roth, Z. (2016). Progressive motility - a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovines. *Zygote (Cambridge, England)*, *24*(1), 70–82. https://doi.org/10.1017/S0967199414000720

Menkveld, R. (2007). *Male İnfertility Diagnosis and Treatment* (Erkek İnfertilitesi Teşhis ve Tedavi). Çev: Erdemir F., Boylu U. ve Kilciler M. 2. Baskı. Ankara, Habitat Yayıncılık, s: 117-139.

Milani, C., Fontbonne, A., Sellem, E., Stelletta, C., Gérard, O., et al. (2010). Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen. *Theriogenology,* *74*(1), 153–164. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.026

Mohammadi, M.R., Rahimzadeh, M., & Attar, A. (2020). Sperm Detection and Tracking in Phase-Contrast Microscopy Image Sequences using Deep Learning and Modified CSR-DCF. *ArXiv, abs/2002.04034*.

Mortimer, S. T., van der Horst, G., & Mortimer, D. (2015). The future of computer-aided sperm analysis. *Asian journal of andrology*, *17*(4), 545–553. https://doi.org/10.4103/1008-682X.154312

Nafisi, V. R., Moradi, M. H., & Nasr-Esfahani, M. H. (2005). A template matching algorithm for sperm tracking and classification. *Physiological measurement*, *26*(5), 639–651. https://doi.org/10.1088/0967-3334/26/5/006

Núñez-Martínez, I., Morán, J. M., & Peña, F. J. (2006). A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in

canine ejaculates: Changes after cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals, 41*(4), 408–415. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00685.x

Özgür, M. E., Okumuş, F., & Kocamaz, A. F. (2019). A Novel Computer Assisted Sperm Analyzer for Assessment of Spermatozoa Motility in Fish; BASA-Sperm Aqua. El-Cezeri, 6(1), 208-219. https://doi.org/10.31202/ecjse.486342

Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Santolaria, P., & Yániz, J. (2013). Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Ruminant Research, 112*, 128–135. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.014

Perreault, S.D. (1998). Gamete toxicology: The impact of new technologies. In Korach KS (Ed.), Reproductive and developmental toxicology (pp. 635–654). Marcel Dekker.

Peter , A. T., Brito , L., Althouse , G., Aurich , C., Chenoweth , P., Fraser , N., Lopate , C., Love , C., Luvoni , G., & Waberski , D. (2021). Andrology laboratory review: evaluation of sperm motility. Clinical Theriogenology, 13(1), 24-36. https://doi.org/10.58292/ct.v13.9359

Rajashri, M., Reddy, K.R., Kumari, G.A., Kumari, N.N., & Srinivas, G. (2018). Computer assisted semen analysis of deccani ram semen presevability at 5ºC. *Indian Journal of Animal Research, 52*, 1695-1700.

Rengarajan, K. (2004). *Effect of different cooling rates on the post-thaw motility of bovine spermatozoa assessed using computer assisted semen analyzer (CASA)* (Yüksek lisans tezi, Tamil Nadu Veterinary and Animal Sciences University, Chennai, India).

Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., & Nizanski, W. (2012). Computer-assisted sperm analysis in dogs and cats: an update after

20 years. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *47 Suppl 6*, 204–207. https://doi.org/10.1111/rda.12057

Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., & de Kruif, A. (2003). Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, *60*(8), 1553–1568. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00171-7

Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., & de Kruif, A. (2002). Use of the Sperm Quality Analyzer (SQA II-C) for the assessment of dog sperm quality. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *37*(3), 158–163. https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00356.x

Robayo, I., Montenegro, V., Valdés, C., & Cox, J. F. (2008). CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *43*(4), 393–399. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00920.x

Robinson, J. A., & Buhr, M. M. (2005). Impact of genetic selection on management of boar replacement. *Theriogenology*, *63*(2), 668–678. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.040

Rota, A., Milani, C., Cabianca, G., & Martini, M. (2006). Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, *65*(9), 1848–1858. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.015

Rota, A., Milani, C., & Romagnoli, S. (2007). Effect of post-thaw dilution with autologous prostatic fluid on dog semen motility and sperm acrosome status. *Theriogenology*, *67*(3), 520–525. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.001

Schäfer-Somi, S., & Aurich, C. (2007). Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability

of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Animal reproduction science*, *102*(1-2), 1–13. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.03.019

Sengupta, P., Dutta, S., Roychoudhury, S., Vizzarri, F., & Slama, P. (2023). Revolutionizing semen analysis: introducing Mojo AISA, the next-gen artificial intelligence microscopy. *Frontiers in cell and developmental biology*, *11*, 1203708. https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1203708

Sellem, E., Broekhuijse, M. L., Chevrier, L., Camugli, S., Schmitt, E., Schibler, L., & Koenen, E. P. (2015). Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology*, *84*(9), 1447–1454.e5. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.035

Selvi, E. (2021). *Bilgisayar temelli bir sperm hareket analiz sisteminin amaca uygun şekilde geliştirilerek gebelik başarısının öngörülmesinde kullanımı* (Uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye).

Siemieniuch, M. J., & Woclawek-Potocka, I. (2008). Assessment of selected quality parameters of epididymal cat (Felis catus s. domestica, L. 1758) sperm using flow cytometry method and computer assisted sperm analyser. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *43*(5), 633–637. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00958.x

Silva, C. S., Vianna da Costa-E-Silva, E., Nunes Dode, M. A., Mendes Cunha, A. T., Garcia, W. R., Sampaio, B. F. B., Borges Silva, J. C., Vaz, F. E. M., Kerns, K., Sutovsky, P., & Nogueira, E. (2023). Semen quality of Nellore and Angus bulls classified by fertility indices and relations with field fertility in fixed-time artificial

insemination. *Theriogenology*, *212*, 148–156. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.09.001

Slott, V.L., Jeffay, S.C., Dyer, C.J., Barbee, R.R., & Perreault, S.D. (1997). Sperm motion predicts fertility in male hamsters treated with alpha-chlorohydrin. *Journal of andrology, 18 6*, 708-16.

Sönmez M., & Fırat, F. (2022). Bilgisayar destekli sperma analiz (CASA) sistemiyle yapılan incelemelerde spermatozoonların motilitesini ve kinematik değerlerini etkileyen faktörler. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, **36**(2), 153–164.

Stachecki, J. J., Ginsburg, K. A., Leach, R. E., & Armant, D. R. (1993). Computer-assisted semen analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat. *Journal of andrology*, *14*(1), 60–65.

Sugai, N., Werre, S., Cecere, J. T., & Balogh, O. (2024). Comparing different sperm concentrations for optimizing cooled semen use in the dog. *Frontiers in veterinary science*, *10*, 1339840. https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1339840

Şerefoğlu, E.C. (2011). Bilgisayar Yardımlı Sperm Analizi (Derleme Makale). *Türk Üroloji Seminerleri*, **2**, 8–10.

Tardif, A. L., Farrell, P. B., Trouern-Trend, V., & Foote, R. H. (1997). Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. Journal of Dairy Science, 80(8), 1606–1612. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76091-0

Tekin, K., & Daşkın, A. (2016). Effect of different extenders on motility and some sperm kinematics parameters in Norduz goat semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 40*(4), 490–495. https://doi.org/10.3906/vet-1509-5

Toth, G. P., Stober, J. A., Read, E. J., Zenick, H., & Smith, M. K. (1989). The automated analysis of rat sperm motility following subchronic epichlorohydrin administration: methodologic and

statistical considerations. Journal of andrology, 10(5), 401–415. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1989.tb00127.x

Valverde, A., Barquero, V. & Soler, C. (2020). The application of computer-assisted semen analysis (CASA) technology to optimise semen evaluation. A review. Journal of Animal and Feed Sciences, 29(3), 189–198. https://doi.org/10.22358/jafs/127691/2020

Valverde, A., Arnau, S., García-Molina, A., Bompart, D., Campos, M., Roldán, E. R. S., & Soler, C. (2019a). Dog sperm swimming parameters analysed by computer-assisted semen analysis of motility reveal major breed differences. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene, 54(5), 795–803. https://doi.org/10.1111/rda.13420

Valverde, A., Madrigal, M., Caldeira, C., Bompart, D., de Murga, J. N., Arnau, S., & Soler, C. (2019b). Effect of frame rate capture frequency on sperm kinematic parameters and subpopulation structure definition in boars, analysed with a CASA-Mot system. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene, 54(2), 167–175. https://doi.org/10.1111/rda.13320

Van de Hoek, M., Rickard, J. P., & de Graaf, S. P. (2022). Motility Assessment of Ram Spermatozoa. Biology, 11(12), 1715. https://doi.org/10.3390/biology11121715

Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology, 57(1), 149–179. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00664-1

Vigolo, V., Giaretta, E., Da Dalt, L., Damiani, J., Gabai, G., Bertuzzo, F., & Falomo, M. E. (2022). Relationships between Biomarkers of Oxidative Stress in Seminal Plasma and Sperm Motility in Bulls before and after Cryopreservation. Animals : an

open access journal from MDPI, 12(19), 2534. https://doi.org/10.3390/ani12192534

Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Santolaria, P., Fantova, E., Quintín-Casorrán, F. J., Sevilla-Mur, E., & Yániz, J. L. (2014). In vitro assessment of sperm quality from rams of high and low field fertility. Animal reproduction science, 146(1-2), 15–20. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.005

Yániz, J. L., Silvestre, M. A., Santolaria, P., & Soler, C. (2018). CASA-Mot in mammals: an update. *Reproduction, fertility, and development*, *30*(6), 799–809. https://doi.org/10.1071/RD17432

World Health Organization (1999). WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction (4th ed.). Cambridge University Press.

World Health Organization (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (5th ed.). World Health Organization.

World Health Organization (2021). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (6th ed.) pp. 139–160). World Health Organization.

BÖLÜM 4

YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİNDE SPERM AYIRMA VE SEÇME YÖNTEMLERİNİN TEK KATMANLI SANTRİFÜJ TEKNİĞİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

[1]AHMET CİHAD GÖK
[2]AYHAN ATA

Giriş

Fertilite hem erkek hem de dişi faktörleri içeren karmaşık ve çok yönlü bir olgudur. Geleneksel olarak damızlık hayvanların fertilitesi öncelikle sperm kalitesine bağlanırken, spermanın diğer önemli bileşeni olan seminal plazmanın rolü çoğu zaman göz ardı edilmiştir (Goodla et al., 2014). Sperm kalitesini artırmaya yönelik stratejilerden biri, ejakülat içerisinden en canlı spermatozoaların seçilmesidir. Rodriguez-Martinez & Morrell'e (2009) göre, yalnızca yüksek kaliteli spermatozoaları izole etmekle kalmayıp aynı zamanda bunları seminal plazmadan etkili biçimde ayıran yeni sperm seçme teknikleri geliştirilmiştir.

[1] Dr., Swansea Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon ve Bağışıklık Bölümü, Yaşam Bilimleri Enstitüsü 1, Sketty SA2 8PP, Swansea, Birleşik Krallık ORCID:0000-0003-1773-7634.
[2] Prof. Dr. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 0000-0003-0590-5995.

Doğal üreme sürecinde spermatozoalar dişi üreme kanalında çeşitli seçilim mekanizmalarına maruz kalır ve bu mekanizmalar kusurlu veya olgunlaşmamış sperm hücrelerinin uzaklaştırılmasını sağlar. Böylece yalnızca fonksiyonel olarak yeterli ve sağlıklı spermatozoaların fertilizasyon bölgesi olan isthmus-ampullar birleşim noktasına ulaşması beklenir (Morrell & Rodriguez-Martinez, 2010; Morrell, 2011). Yardımcı üreme uygulamalarında laboratuvar sperm seçme yöntemleri bu doğal süreçleri taklit edecek şekilde tasarlanmıştır ve biyomimetik teknikler olarak adlandırılır. Bu yöntemler iki ana gruba ayrılabilir: filtrasyon, kolloid santrifüjü ve migrasyon gibi sperm seçme teknikleri ile yalnızca seminal plazmayı uzaklaştıran sperm yıkama yöntemleri (Morrell et al., 2010).

Sperm örnekleri laboratuvar ortamında farklı yöntemlerin kullanıldığı bir dizi aşamayla hazırlanır. Bu işlemler, spermin fertilizasyon kapasitesini belirleyen en önemli iki parametre olan motilite ve morfolojiyi iyileştirebilir. Seminal plazma, ölü veya hasarlı anormal spermatozoalar, olgunlaşmamış germ hücreleri, bakteriler, hücresel artıklar ve beyaz kan hücreleri uzaklaştırılır (Ďuračka et al., 2023). Ayrıca son yıllarda spermde reaktif oksijen türlerinin (ROS), DNA fragmantasyonunun, apoptozun ve mitokondriyal membran potansiyelinin önemini gösteren çalışmalar da dikkat çekmektedir (Gök, 2021).

Sperm hazırlama, yardımcı üreme tedavilerinde seminal plazmanın uzaklaştırılması ve canlı spermlerin seçilmesi açısından kritik bir aşamadır. İn vitro fertilizasyon programlarında optimum sonuçlar elde etmek amacıyla sperm seçme yöntemlerinden yararlanılır. Spermatozoaların seminal plazmadan izolasyonu için yıkama/santrifüj, swim-up, hyalüronik asit bağlanma tekniği, yoğunluk gradyan santrifüjü, tek katman tekniği, Manyetik Aktive Hücre Ayırma (MACS) ve sperm analizinde akış sitometrisi gibi çeşitli yöntemler tanımlanmıştır.

Üreme, bilim insanları tarafından henüz tam olarak açıklanamamıştır. Fertilite hem erkek hem de dişi bileşenlerden oluşan karmaşık ve çok yönlü bir olgudur. Bunun nedeni erkek ve dişi üreme sistemlerinin karmaşık yapısıdır. İlişkilendirilmiş damızlık hayvanların fertilitesi öncelikle sperm kalitesiyle ilişkilendirilmiş, ancak seminal plazmanın rolü sıklıkla göz ardı edilmiştir. Sperm seçme yöntemleri, üremeyi doğrudan etkileyen temel faktörler arasındadır. Bu seçme yöntemleri kullanılarak sperm kalitesinin ve fertilizasyon yeteneğinin artırılmasında sperm motilitesi ve morfolojisinin önemli olduğu gösterilmiştir. Sperm seçme yöntemleri ayrıca istenmeyen seminal plazma, ölü veya hasarlı anormal spermatozoa, olgunlaşmamış germ hücreleri, bakteriler, hücresel artıklar ve beyaz kan hücreleri gibi unsurları uzaklaştırır. Bu bölümde yıkama/santrifüj, swim-up, hyalüronik asit bağlanma tekniği, yoğunluk gradyan santrifüjü, tek katman tekniği ve Manyetik Aktive Hücre Ayırma (MACS) yöntemi ele alınmaktadır. Ardından Tek Katmanlı Santrifüj (SLC) tekniğinin avantajları ve sınırlılıkları tartışılmaktadır.

Yıkama

Basit sperma yıkama, sperma örneğinden seminal plazmanın ve çözünebilir seminal bileşenlerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılan en temel sperm hazırlama yöntemlerinden biridir. Yöntem esas olarak sperma örneğinin uygun bir sperm hazırlama veya kültür medyumu ile seyreltilmesi, santrifüj edilmesi, üst sıvının uzaklaştırılması ve tüpün tabanında oluşan sperm pelletinin yeniden süspanse edilmesine dayanır. Diğer sperm seçim tekniklerinden farklı olarak basit sperm yıkama, spermatozoaları hareketlilik, morfoloji, membran özellikleri veya DNA bütünlüğü gibi belirli kalite özelliklerine göre güçlü biçimde seçmez. Bu nedenle teknik daha çok bir sperm preparation yöntemi olarak değerlendirilir; yüksek derecede seçici bir sperm selection yöntemi değildir (World Health Organization (WHO, 2021).

Basit sperm yıkamanın temel amaçlarından biri, spermatozoaların seminal plazmadan ayrılması ve yardımcı üreme uygulamalarında kullanılabilecek uygun bir sperm süspansiyonunun elde edilmesidir (Mortimer & Mortimer, 1992; World Health Organization (WHO), 2021). Seminal plazma, spermatozoaların ejakülasyon sonrasındaki fonksiyonlarının desteklenmesinde önemli rol oynayan kompleks bir biyolojik sıvıdır. İnsanlarda seminal plazmanın büyük bölümü seminal veziküller ve prostat bezinden kaynaklanmakla birlikte epididimis, bulbouretral ve diğer yardımcı üreme bezlerinin salgıları da seminal plazmanın bileşimine katkıda bulunmaktadır (Juyena & Stelletta, 2012; Druart & de Graaf, 2018). Seminal plazma; proteinler ve peptitler, lipidler, karbonhidratlar, elektrolitler ve diğer inorganik iyonlar, metabolitler, enzimler, hormonlar, antioksidanlar ve çeşitli biyolojik olarak aktif moleküllerden oluşan karmaşık bir ortamdır (Juyena & Stelletta, 2012; Druart & de Graaf, 2018). Bu bileşenler spermatozoaların hareketliliğinin düzenlenmesi, membran stabilitesinin korunması, enerji metabolizmasının desteklenmesi, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi fertilizasyonla ilişkili süreçlerin düzenlenmesi ve spermatozoaların dişi üreme kanalındaki çevresel koşullara karşı korunması gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara sahiptir (Druart & de Graaf, 2018).

Bununla birlikte, seminal plazmanın ejakülat içerisindeki fizyolojik yararları, spermatozoaların yardımcı üreme teknikleri için hazırlanması sırasında seminal plazmanın tamamen korunması gerektiği anlamına gelmemektedir. Sperm hazırlama işlemlerinde spermatozoaların seminal plazmadan hızlı ve kontrollü biçimde ayrılması, fertilizasyon kapasitesi daha uygun bir sperm popülasyonunun elde edilmesinin temel basamaklarından biri olarak kabul edilmektedir (Mortimer & Mortimer, 1992). Bu amaçla basit sperm yıkama işleminde sperma örneği uygun kültür medyumu ile seyreltilmekte, santrifüj yoluyla spermatozoalar pellet hâline

getirilmekte ve seminal plazmayı içeren süpernatant uzaklaştırılmaktadır. Sperm pelleti daha sonra taze kültür medyumunda yeniden süspanse edilerek sonraki laboratuvar veya yardımcı üreme uygulamaları için hazırlanmaktadır (WHO, 2021). Dolayısıyla basit sperm yıkamanın temel işlevi seminal plazmayı ve çözünmüş seminal bileşenlerin önemli bir bölümünü uzaklaştırarak spermatozoaları kontrollü bir kültür ortamına aktarmaktır.

WHO'nun *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Sperma* kılavuzunun altıncı baskısında basit yıkama işlemi, özellikle sperma kalitesi iyi olan örneklerde yüksek sperm geri kazanımı sağlayabilen bir yöntem olarak tanımlanmaktadır. Bununla birlikte WHO, basit yıkamanın sperma örneğinde bulunan hücresel artıkları ve lökositleri etkili şekilde elimine etmediğini özellikle belirtmektedir (WHO, 2021). Bu özellik yöntemin en önemli sınırlamalarından biridir.

Basit yıkama yönteminin temel işlevlerinden biri spermatozoaların seminal plazmadan ayrılması ve seminal plazma konsantrasyonunun önemli ölçüde azaltılmasıdır. Seminal plazma ejakülat içerisinde spermatozoaların fizyolojik fonksiyonlarının desteklenmesinde önemli roller üstlenmekle birlikte, yardımcı üreme teknikleri için sperm hazırlanırken spermatozoaların seminal plazmadan hızlı ve etkili biçimde ayrılması gerekmektedir. Nitekim seminal plazmada spermatozoaların fertilizasyon kapasitesini inhibe edebilecek faktörlerin bulunabildiği ve bu nedenle yardımcı üreme uygulamaları öncesinde seminal plazmanın uzaklaştırılmasının sperm hazırlamanın temel amaçlarından biri olduğu bildirilmiştir (Mortimer & Mortimer, 1992; World Health Organization (WHO), 2021).

Spermatozoaların seminal plazmadan ayrılması özellikle intrauterin tohumlama (Intrauterine Insemination-IUI) gibi

uygulamalarda önemlidir. Ham sperma doğrudan uterus içerisine verilmek yerine, sperma örneği laboratuvarda işlenerek spermatozoalar seminal plazmadan ayrılır ve uygun kültür medyumu içerisinde klinik kullanıma hazır bir sperm süspansiyonu oluşturulur. Bu işlem seminal plazma ve içerisindeki prostaglandinler başta olmak üzere çeşitli seminal bileşenlerin önemli ölçüde uzaklaştırılmasını sağlar (Mortimer & Mortimer, 1992; WHO, 2021).

Bununla birlikte basit yıkama, spermatozoaları seminal plazmadan ayırmak açısından etkili olmasına rağmen, sperma içerisindeki bütün istenmeyen hücresel elemanları seçici biçimde uzaklaştıran bir sperm seçim yöntemi değildir. Basit yıkamada sperma kültür medyumu ile seyreltilerek santrifüj edilir, spermatozoaları içeren pelet elde edilir, seminal plazmayı içeren süpernatant uzaklaştırılır ve pelet uygun medyum içerisinde yeniden süspanse edilir. Dolayısıyla yöntem spermatozoaların spesifik fonksiyonel veya morfolojik özelliklerine dayanan ileri bir seçim mekanizması içermez (Mortimer & Mortimer, 1992; WHO, 2021).

Basit yıkamanın önemli avantajlarından biri sperm geri kazanımının görece yüksek olabilmesidir. Swim-up yönteminde sperm seçimi, spermatozoaların kültür medyumuna aktif olarak yüzebilme yeteneğine dayandığından, yalnızca yeterli progresif hareketliliğe sahip spermatozoalar seçilen fraksiyona ulaşır. Bu yüksek seçicilik, elde edilen toplam spermatozoa sayısının azalmasına neden olabilir. Basit yıkamada ise spermatozoalar santrifüj yoluyla pellet içerisinde toplandığından başlangıç örneğindeki sperm hücrelerinin daha büyük bir bölümü geri kazanılabilir. WHO (2021), basit yıkama yönteminin özellikle iyi kalitedeki sperma örneklerinde yüksek spermatozoa verimi sağlayabildiğini belirtmektedir. Bu özellik, başlangıç sperma kalitesinin yeterli olduğu ve ileri düzey sperm seçiminin gerekli

olmadığı durumlarda yöntemi pratik bir seçenek haline getirebilir (WHO, 2021). Ancak yüksek sperm geri kazanımı her zaman yüksek sperm kalitesi anlamına gelmez. Basit yıkamanın seçiciliğinin sınırlı olması nedeniyle hareketli spermatozoalarla birlikte immotil veya morfolojik olarak anormal spermatozoalar ve sperma örneğinde bulunan diğer hücresel elemanların bir kısmı pelet içerisinde kalabilir. Bu nedenle basit yıkamanın yüksek sperm recovery avantajı, daha seçici sperm hazırlama yöntemlerine kıyasla daha düşük düzeyde hücresel ayrıştırma ile birlikte değerlendirilmelidir (Mortimer & Mortimer, 1992; WHO, 2021).

Sperma örneğinde bulunan lökositler ve diğer reactive oxygen species (ROS) üretebilen hücreler, sperm hazırlama yönteminin seçiminde ayrıca önem taşımaktadır. Fizyolojik düzeylerde ROS sperm fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayabilmekle birlikte, aşırı ROS üretimi spermatozoalarda oksidatif strese neden olabilir. Özellikle sperm plazma membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyona duyarlı olması nedeniyle yüksek ROS düzeyleri lipid peroksidasyonuna, sperm fonksiyonunda bozulmaya ve hareketlilik kaybına katkıda bulunabilir. ROS oluşumunun sperm hazırlama tekniklerinin etkinliğini önemli ölçüde etkileyebileceği ve özellikle santrifüj sırasında ROS üreten hücrelerin fonksiyonel spermatozoalar üzerinde zararlı etkiler oluşturabileceği gösterilmiştir (Aitken & Clarkson, 1988; Shekarriz et al., 1995).

Basit sperm yıkama, lökositler ve diğer istenmeyen hücresel elemanları spermatozoalardan yüksek seçicilikle ayırmak için tasarlanmış bir yöntem değildir. Santrifüj sırasında spermatozoalar ve sperma içerisinde bulunan diğer hücresel elemanlar aynı pelet içerisinde yoğunlaşabilir. Bu nedenle lökosit veya hücresel debris içeriği yüksek sperma örneklerinde basit yıkama yerine density gradient centrifugation gibi daha seçici sperm hazırlama yöntemleri

tercih edilebilir. Density gradient yöntemlerinin motil spermatozoaları seçmenin yanı sıra lökositlerin ve diğer kontaminant hücrelerin önemli bir bölümünün uzaklaştırılmasına katkıda bulunabildiği bildirilmiştir (WHO, 2021).

Basit sperm yıkama santrifüj temelli bir yöntem olduğundan, santrifüj koşullarının sperm kalitesi üzerindeki potansiyel etkileri ayrıca dikkate alınmalıdır. Aitken & Clarkson (1988), motil spermatozoaların ayrılmasından önce santrifüj uygulanan fraksiyonlanmamış sperm süspansiyonlarında ROS üretiminin arttığını ve bu ROS'un aynı süspansiyondaki fonksiyonel spermatozoaların özelliklerini olumsuz etkileyebildiğini göstermiştir. Araştırmacılar bu etkiyi özellikle düşük hareketlilik ve fertilizasyon kapasitesine sahip ROS üreten sperm alt popülasyonlarıyla ilişkilendirmiştir.

Benzer şekilde Shekarriz et al. (1995), IVF ve IUI için kullanılan sperm hazırlama tekniklerinde spermatozoaların seminal plazmadan ayrılması amacıyla uygulanan santrifüjün ROS aracılı iyatrojenik sperm hasarına katkıda bulunabileceğini araştırmıştır. Çalışmanın sonuçları, santrifüj koşullarının spermatozoaların oksidatif hasar açısından maruz kaldığı riski etkileyebileceğini ve sperm hazırlama protokollerinde santrifüj koşullarının dikkatli biçimde optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir (Shekarriz et al., 1995).

Santrifüj sırasında spermatozoaların ROS üreten hücrelerle aynı ortamda yoğunlaştırılması özellikle düşük kaliteli sperma örneklerinde önem kazanabilir. Bu nedenle sperm hazırlama sırasında gereksiz yüksek santrifüj kuvvetlerinden ve uzun veya tekrarlayan santrifüj basamaklarından kaçınılması önemlidir. WHO (2021) sperm hazırlama protokollerinde santrifüj koşullarını ×g ve

süre temelinde standardize etmekte ve uygulanacak yönteme göre kontrollü santrifüj koşulları önermektedir.

Basit yıkamanın temel amacı yüksek motiliteye sahip spermatozoaları seçmek değildir. Bu nedenle işlem sonunda progresif hareketlilik oranında swim-up gibi doğrudan motiliteye dayanan sperm seçim yöntemlerinde görülen düzeyde bir zenginleşme beklenmez. Swim-up yönteminde yalnızca yeterli hareket yeteneğine sahip spermatozoalar kültür medyumuna geçerken, basit yıkamada hareketli ve hareketsiz spermatozoalar birlikte santrifüj peletine girebilir. Dolayısıyla basit yıkamanın hareketlilik açısından seçiciliği sınırlıdır (Mortimer & Mortimer, 1992; WHO, 2021).

Benzer şekilde basit sperm yıkamada sperm başı, orta parçası veya kuyruğunun morfolojik özelliklerine göre doğrudan bir seçim mekanizması bulunmamaktadır. Bu nedenle yöntem normal morfolojiye sahip spermatozoaları spesifik olarak zenginleştirmek amacıyla kullanılmaz. Başlangıç örneğinin sperm konsantrasyonu ve hareketliliğinin yeterli, hücresel kontaminasyonunun ise düşük olması basit yıkamanın uygulanabilirliğini artırmaktadır (WHO, 2021).

Sperm DNA bütünlüğü açısından da basit yıkamanın önemli bir sınırlılığı bulunmaktadır. Yöntem yüksek DNA fragmantasyonuna sahip spermatozoaları düşük DNA fragmantasyonuna sahip spermatozoalardan doğrudan ayıran herhangi bir biyolojik veya fiziksel seçim mekanizmasına sahip değildir. DNA bütünlüğü bozulmuş bir spermatozoa hareketliliğini koruyabilir ve diğer spermatozoalarla birlikte santrifüj peletinde bulunabilir. Dolayısıyla basit sperm yıkama sperm DNA fragmantasyonuna dayalı doğrudan bir sperm seçim yöntemi olarak değerlendirilmemelidir.

Buna ek olarak santrifüj sırasında ortaya çıkabilecek ROS üretimi oksidatif sperm hasarı açısından dikkate alınmalıdır. Fraksiyonlanmamış sperma örneklerinin santrifüj edilmesinin ROS oluşumunu artırabileceği ve bunun normal fonksiyonel spermatozoaları olumsuz etkileyebileceği deneysel olarak gösterilmiştir (Aitken & Clarkson, 1988). Shekarriz et al. (1995) da sperma santrifüjü sırasında oluşabilecek ROS aracılı iyatrojenik sperm hasarını azaltmak amacıyla santrifüj protokollerinin optimize edilmesinin önemini ortaya koymuştur. Bu nedenle özellikle ROS üreten hücrelerin fazla olduğu düşük kaliteli sperma örneklerinde santrifüjün potansiyel etkileri daha dikkatli değerlendirilmelidir.

Zimmerman et al. (1994), basit yıkamayı hiyalüronat temelli bir sperm migrasyon yöntemiyle karşılaştırmış ve basit yıkamada hareketli sperm geri kazanımının belirgin şekilde daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte hiyalüronat temelli seçimin, elde edilen spermatozoaların hareketlilik, canlılık ve morfolojik özelliklerini daha fazla zenginleştirdiği görülmüştür. Bu bulgu basit yıkamanın temel avantajının yüksek sperm geri kazanımı olduğunu, ancak daha seçici yöntemlerin daha yüksek kaliteli bir sperm alt popülasyonu sağlayabileceğini göstermektedir (Zimmerman et al., 1994).

Basit yıkama santrifüj temelli bir yöntem olduğu için santrifüjün sperm hücreleri üzerindeki potansiyel etkileri önem taşımaktadır. Santrifüjün sperma örneklerinde ROS oluşumunu artırabileceği uzun süredir bilinmektedir. Shekarriz et al. (1995), farklı santrifüj süreleri ve kuvvetlerinin ROS üretimi üzerindeki etkisini araştırmış ve özellikle uzun santrifüj süresinin ROS oluşumunda önemli olduğunu göstermiştir. On dakikalık santrifüjün iki dakikalık santrifüje kıyasla daha fazla ROS oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (Shekarriz et al., 1995).

Santrifüj sırasında oluşan oksidatif stres yalnızca sperm hareketliliğini değil, sperm DNA bütünlüğünü de etkileyebilir. Aitken & Clarkson (1988) tarafından yapılan çalışmada yıkanmış sperm peletinden swim-up ile hazırlanan örneklerde, seminal plazmadan doğrudan ayrılan spermatozoalara kıyasla daha yüksek ROS üretimi ve daha fazla DNA hasarı tespit edilmiştir. İlginç olarak sperm hareketliliğinde belirgin bir bozulma olmadan DNA hasarının artabilmesi, yalnızca konvansiyonel sperm parametrelerinin değerlendirilmesinin hücresel hasarı her zaman ortaya koymayabileceğini göstermektedir.

Rappa et al., (2016) sperm hazırlama tekniklerini değerlendiren derlemesinde de geleneksel santrifüj temelli yöntemlerde tekrar eden santrifüj basamaklarının ROS oluşumunu artırabileceği ve bunun sperm DNA bütünlüğü üzerinde olumsuz etki oluşturabileceği vurgulanmıştır.

Henkel & Schill (2003), sperm ayırma tekniklerinin gelişiminin esas olarak immotil, morfolojik olarak yetersiz veya fertilizasyon kapasitesi düşük spermatozoalardan fonksiyonel hücrelerin ayrılması ihtiyacından kaynaklandığını belirtmiştir. Basit yıkama bu tekniklerin en erken ve en az seçici biçimlerinden biridir.

Bu yöntemin temel amacı spermleri seminal plazmadan ayırmak ve istenen hacimde yoğunlaştırmaktır (Risopatrón et al., 1996). Bu amaçla steril, konik tabanlı santrifüj tüpleri kullanılır. Biyogüvenlik açısından tüplerin santrifüj kullanımına uygun olması önemlidir. Likefiye örnek kültür solüsyonu ile bire bir oranında seyreltilerek 2.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir (Nguyen et al., 2023). Buradaki temel prensip, santrifüj sırasında reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu önlemek için optimum hız ve sürenin belirlenmesidir (Parinaud et al., 1997). Yıkama yöntemi yoğunluk gradyan santrifüjü, swim-up veya manyetik hücre ayırma gibi farklı sperma hazırlama protokolleriyle birlikte uygulanabileceği gibi

normozoospermik olgularda tek başına da kullanılabilir (Özkavukcu & Aras, 2017).

Sonuç olarak basit sperm yıkama, seminal plazmanın uzaklaştırılması ve yüksek sayıda spermatozoanın kültür medyumu içerisinde geri kazanılması için basit ve pratik bir sperm hazırlama yöntemidir. Bununla birlikte yöntemin yüksek sperm geri kazanımı, sınırlı sperm seçiciliği ile birlikte değerlendirilmelidir. Basit yıkama motilite, morfoloji, apoptoz veya DNA bütünlüğüne göre doğrudan seçim yapmadığından, lökosit, hücresel debris, düşük kaliteli spermatozoa veya yüksek oksidatif stres içeren sperma örneklerinde swim-up veya density gradient centrifugation gibi daha seçici sperm hazırlama yöntemleri daha uygun olabilir (Mortimer & Mortimer, 1992; WHO, 2021).

Swim-up

Swim-up, yardımcı üreme tekniklerinde hareketli spermatozoaların sperma örneğinden ayrılması amacıyla kullanılan en eski ve yaygın konvansiyonel sperm hazırlama yöntemlerinden biridir. Yöntemin temel prensibi, hareketli spermatozoaların seminal plazmadan veya önceden hazırlanmış sperm peletinden uygun kültür medyumuna doğru aktif olarak yüzebilme yeteneğine dayanır. Böylece hareketliliği yüksek spermatozoalar kültür medyumunda zenginleşirken, hareketsiz spermatozoaların ve hücresel artıkların önemli bir kısmı başlangıç örneğinde kalır (Henkel & Schill, 2003).

Swim-up işlemi temel olarak iki farklı şekilde gerçekleştirilebilir:

1.Direct swim-up: Spermatozoaların santrifüj uygulanmadan doğrudan sıvılaşmış sperma örneğinden kültür medyumuna yüzmesine dayanır.

2.Pellet swim-up veya conventional swim-up: Sperma örneği önce medyumla yıkanır ve santrifüj edilerek sperm pelleti oluşturulur.

Daha sonra pelletin üzerine kültür medyumu eklenir ve hareketli spermatozoaların bu medyuma yüzmesi beklenir.

Bu iki yaklaşım arasındaki en önemli fark, swim-up öncesinde santrifüj uygulanıp uygulanmamasıdır. WHO, mümkün olduğunda sperma örneğinin swim-up öncesinde seyreltilip santrifüj edilmemesini önermektedir. Bunun nedeni santrifüj işleminin sperm membranlarında peroksidatif hasar oluşturma potansiyelidir. Bu nedenle WHO, hareketli spermatozoaların ayrılması amacıyla direct swim-up yöntemini tercih edilen yaklaşım olarak tanımlamaktadır (WHO, 2021).

Swim-up yöntemi, spermatozoaların motilitesinden yararlanılarak hücrelerin belirli bir ortamda toplanması prensibine dayanır. Yıkanmış örnekler düşük hacimde süspanse edilerek steril tüplere yerleştirilir. Hazırlanan sperm süspansiyonunun üzerine yaklaşık 1 mL kültür sıvısı eklenir. Kültür sıvısı tüpün tabanına da eklenebilir; bu durumda yöntem swim-down olarak adlandırılır, ancak temel prensip aynıdır. Her iki yöntemde de sıvıların karışmaması ve tabakaların korunması gerekir. Tabakalama sonrasında yüzey alanını en üst düzeye çıkarmak amacıyla tüpler 45° eğimde, 37°C'de 1 saat inkübe edilir. Santrifüj sonrası pellet uzaklaştırılmadan üzerindeki sıvı kolonunun dikkatlice yenilenmesiyle de aynı yöntem uygulanabilir. Bu durumda süpernatant uzaklaştırılır ve yaklaşık 0,5-1 mL taze sperm medyumu dikkatlice eklenir. Yeterli inkübasyon süresinden sonra motil spermleri içeren süpernatant başka temiz bir tüpe aktarılır. Swim-up yönteminde inkübasyon süresi, sperm hazırlama amacı ve başlangıç sperm parametrelerine göre değiştirilebilir (Madrid-Bury et al., 2003). Temel amaç motil sperm hücrelerini motil olmayanlardan ayırmaktır. Çözündürülmüş sperma üzerine uygun miktarda medyum eklenir ve motil sperm hücreleri bu medyuma doğru göç eder. Böylece çok yüksek motiliteye sahip sperm hücreleri elde edilebilir; ancak elde edilen sperm miktarı düşüktür. Özellikle pahalı

sperma kullanıldığında bu durum göz önünde bulundurulmalıdır (Gordon, 2003). Dondurulmuş spermain motilitesi genellikle değişkenlik gösterir. Swim-up işlemi, dondurulmuş boğa spermainde çözündürme sonrası gözlenen motilite farklılıklarını azaltarak yüksek motiliteli sperma elde edilmesini sağlar (Özkavukcu & Aras, 2017).

Swim-up yönteminin en önemli avantajlarından biri progresif hareketliliği yüksek spermatozoaların seçilmesidir. Yalnızca kültür medyumuna aktif olarak hareket edebilecek yeterli motiliteye sahip spermatozoalar seçilmiş fraksiyona ulaşabildiğinden, işlem sonrasında progresif hareketli sperm oranı genellikle başlangıç sperma örneğine göre belirgin biçimde artmaktadır.

Amano et al. (2024), çalışmasında işlenmemiş sperma örneklerinde progresif sperm hareketliliği %53.1 iken, swim-up sonrasında bu oran %92.9'a yükselmiştir. Aynı çalışmada density gradient centrifugation sonrasında progresif hareketlilik %81.3 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla swim-up ile elde edilen sperm fraksiyonu bu çalışmada density gradient centrifugation ile elde edilenden de daha yüksek progresif hareketlilik göstermiştir (Amano et al., 2024).

Bu durum swim-up yönteminin temel biyolojik seçiciliğini göstermektedir: yüksek hareketlilik yalnızca yöntemin sonucunda ölçülen bir özellik değil, aynı zamanda spermatozoaların seçilmesini sağlayan temel mekanizmadır.

Swim-up sperm morfolojisine göre doğrudan seçim yapan bir yöntem değildir. Bununla birlikte morfolojik olarak normal spermatozoaların çoğunlukla daha iyi hareket özelliklerine sahip olması nedeniyle motiliteye dayalı seçim, normal morfolojiye sahip spermatozoaların dolaylı olarak zenginleşmesini sağlayabilir.

Amiri et al. (2012), swim-up ve density gradient centrifugation yöntemlerini yüksek motilite, normal morfoloji ve düşük DNA fragmentasyonuna sahip spermatozoaları geri kazanma kapasiteleri açısından karşılaştırmıştır. Çalışma, sperm hazırlama yöntemlerinin başlangıç örneğine göre daha kaliteli sperm fraksiyonlarının elde edilmesini sağlayabildiğini göstermiştir (Amiri et al., 2012).

Swim-up yönteminin önemli araştırma alanlarından biri sperm DNA bütünlüğü üzerindeki etkisidir. Hareketliliği yüksek spermatozoaların DNA bütünlüğünün de daha iyi olabileceği düşüncesi nedeniyle swim-up işleminin DNA fragmentasyonu düşük sperm popülasyonlarını zenginleştirebileceği öne sürülmüştür.

Younglai et al. (2001), santrifüj içeren conventional swim-up ile santrifüj içermeyen direct swim-up yöntemlerini DNA fragmentasyonu açısından karşılaştırmıştır. Araştırmada iki swim-up yöntemi arasında DNA fragmentasyonu bakımından anlamlı bir fark görülmemiş ve kullanılan conventional swim-up protokolünün normal sperma örneklerinde direct swim-up'a kıyasla ek DNA hasarı oluşturduğu gösterilmemiştir (Younglai et al., 2001).

Swim-up yönteminde yüksek hareketliliğe sahip spermatozoaların seçilmesi dolaylı biçimde daha iyi morfolojik özelliklere sahip sperm popülasyonunun zenginleşmesine katkıda bulunabilir. Benzer şekilde, density gradient centrifugation yoğunluk özellikleri üzerinden daha olgun ve morfolojik olarak normal spermatozoaları zenginleştirebilir. Basit yıkamada ise bu düzeyde seçici bir mekanizma bulunmamaktadır.

Conventional veya pellet swim-up yönteminde sperma örneğinin swim-up öncesinde santrifüj edilmesi potansiyel bir dezavantajdır. Santrifüj sırasında spermatozoaların lökositler, immotil spermatozoalar ve diğer hücresel elemanlarla birlikte pellet oluşturması reactive oxygen species (ROS) oluşumunu artırabilir.

WHO bu nedenle mümkün olduğunda sperma örneğinin swim-up öncesinde seyreltilip santrifüj edilmemesini ve direct swim-up uygulanmasını önermektedir. WHO'ya göre ön santrifüj sperm membranlarında peroksidatif hasar meydana getirebilir (WHO, 2021).

Bununla birlikte, santrifüj içeren swim-up'ın her durumda DNA hasarı oluşturduğu söylenemez. Younglai et al. (2001) çalışmasında santrifüj içeren swim-up ile direct swim-up arasında DNA fragmentasyonu açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Dolayısıyla santrifüjün etkisi başlangıç sperma kalitesi, santrifüj kuvveti, süresi ve kullanılan laboratuvar protokolüne bağlı olabilir (Younglai et al., 2001). Bu nedenle, santrifüjün sperm üzerinde oksidatif/peroksidatif hasar oluşturma potansiyeli bulunduğu ve bu nedenle WHO tarafından direct swim-up'ın tercih edildiği, ancak uygun kontrollü santrifüjün mutlaka DNA hasarına yol açtığının söylenemeyeceğidir.

Hyalüronik Asit(HA) Bağlanma Tekniği

Hyalüronik asit (HA), ekstrasellüler matriksin önemli bir bileşenidir ve hücre hareketi, hücre–hücre etkileşimi ve farklılaşma gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynar. Üreme sistemi açısından HA'nın sperm penetrasyonu ve gamet etkileşimindeki rolü uzun süredir bilinmektedir. Ranganathan, Ganguly ve Datta (1994), rat, fare, boğa ve insan spermatozoalarında yaklaşık 68 kDa büyüklüğünde hücre yüzeyi hyalüronik asit bağlayıcı glikoproteinin varlığını immunoblot ve immünofloresan yöntemlerle göstermiştir. Aynı çalışmada bu proteinin epididimal olgunlaşma sırasında dağılımının değiştiği, motil spermatozoalarda fosforile olduğu ve anti-HABP antikorlarıyla sperm–oolemma adezyonunun inhibe edilebildiği bildirilmiştir. Bu bulgular, sperm yüzeyindeki hyalüronik asit bağlayıcı proteinin sperm olgunlaşması, motilitesi ve

fertilizasyon süreçlerinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Ranganathan et al., 1994).

Hyalüronik aside bağlanabilme kapasitesi bu nedenle spermatozoanın yalnızca morfolojik görünümünü değil, fonksiyonel olgunluğunu da yansıtabilecek bir özellik olarak değerlendirilmiştir. Veteriner reprodüksiyonunda bu yaklaşım özellikle damızlık erkek fertilitesinin tahmin edilmesi, sperm fonksiyonunun değerlendirilmesi ve daha kaliteli sperm alt popülasyonlarının belirlenmesi açısından araştırılmaktadır. Örneğin Nili-Ravi manda boğalarında yapılan bir çalışmada hyalüronan bağlanma testi (hyaluronan binding assay; HBA) ile gerçek fertilite arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur ($r = 0.824$; $p < 0.01$). Aynı çalışmada HBA değeri sperm canlılığı, motilitesi, plazma membran bütünlüğü, normal akrozomal yapı, sperm olgunluğu ve non-fragmented DNA oranı ile de pozitif ilişkili bulunmuştur (Awan et al., 2021).

Bu sonuçlar, HBA'nın veteriner hekimliğinde yalnızca sperm–HA etkileşimini ölçen bir laboratuvar testi değil, aynı zamanda sperm fonksiyonel yeterliliği ve damızlık erkek fertilitesinin değerlendirilmesine yardımcı olabilecek potansiyel bir biyobelirteç olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte HBA, sperm DNA bütünlüğünü veya membran bütünlüğünü doğrudan ölçen bir test değildir; bu parametrelerle ilişkili dolaylı bir fonksiyonel değerlendirme yöntemi olarak ele alınmalıdır. Nitekim Awan et al. (2021), HBA'nın tek başına Nili-Ravi manda boğalarında fertilite varyasyonunun yaklaşık %67.9'unu açıklayabildiğini bildirmiştir.

Veteriner yardımcı üreme uygulamalarında HA'nın etkisi yalnızca bağlanma testi ile sınırlı değildir. Boğa spermatozoalarında HA içeren fertilizasyon ortamlarının sperm motilitesi, kapasitasyon ve akrozomal durum üzerinde etkili olabildiği de gösterilmiştir. Fonseca Junior et al. (2020), HA ilavesinin fertilizasyon ortamının viskozitesini değiştirdiğini ve düşük HA konsantrasyonlarında motil,

hızlı ve progresif spermatozoa oranını artırabildiğini bildirmiştir. Bu durum HA'nın sperm fonksiyonlarının düzenlenmesinde de biyolojik bir role sahip olabileceğini desteklemektedir.

Awan et al. (2021), Nili-Ravi manda boğalarında spermatozoaların hyalüronana bağlanma kapasitesi ile gerçek fertilite arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Çalışmada düşük, orta ve yüksek fertiliteye sahip boğaların dondurulmuş sperma örnekleri değerlendirilmiştir. Yüksek fertiliteli boğalarda hyalüronana bağlanan sperm oranı yaklaşık %57.2 iken, orta fertiliteli boğalarda %42.5 ve düşük fertiliteli boğalarda yaklaşık %29.7 bulunmuştur.En önemlisi, sperm HBA değeri ile fertilite arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur. Tek başına HBA skoru fertilitedeki varyasyonun yaklaşık %67.9'unu açıklamıştır. HBA, sperm canlılığı, motilitesi, plazma membran bütünlüğü, normal akrozom yapısı ve düşük DNA fragmentasyonu gibi başka sperm kalite göstergeleriyle de pozitif ilişkili bulunmuştur.

Bu sonuç veteriner hekimliği açısından oldukça önemlidir. Geleneksel sperma değerlendirmesinde sperm konsantrasyonu, motilite ve morfoloji gibi parametreler kullanılmasına rağmen, bu özellikler tek başına fertiliteyi her zaman yeterince öngörememektedir. HBA'nın bu klasik parametrelere eklenmesi, özellikle suni tohumlama merkezlerinde damızlık boğaların fertilite potansiyelinin değerlendirilmesinde yardımcı bir fonksiyonel test olabilir.

Hyalüronik asit yalnızca fertilitenin değerlendirilmesi için değil, aynı zamanda spermatozoaların fiziksel olarak seçilmesi amacıyla da araştırılmıştır.

Liaudat et al. (2022), boğa spermatozoalarını seçmek amacıyla hyalüronik asit içeren özel hidrojel yüzeyleri geliştirmiştir. Çalışmada dondurulup çözündürülmüş boğa spermatozoaları HA içeren semi-interpenetrating polymer network hidrojeller ile temas

ettirilmiştir. Hareketli spermatozoaların bir kısmı HA içeren yüzeye güçlü şekilde bağlanmış ve daha sonra hyalüronidaz uygulanarak bu hücrelerin bir bölümü yüzeyden ayrılmıştır.

Araştırmada spermatozoaların yaklaşık %59'u HA içeren hidrojele bağlanmış, bunların yaklaşık %31'i daha sonra hyalüronidaz yardımıyla geri kazanılmıştır. Seçilmiş sperm popülasyonu yaklaşık %50 progresif motilite, iyi canlılık ve düşük akrozom reaksiyonu göstermiştir. Araştırmacılar HA içeren hidrojel sisteminin toksik olmadığını ve yardımcı üreme tekniklerinde kullanılabilecek yüksek kaliteli boğa spermatozoalarının seçimi için potansiyel taşıdığını bildirmiştir.

Sperm seçiminde kullanılan kriterlerden biri, sperm plazma membranında hyalüronik asit bağlanma bölgelerinin bulunmasıdır. Hyalüronik aside bağlanma yeteneği sperm olgunlaşması hakkında bilgi verir. Sperm hücreleri, hyalüronik asit içeren bölgenin karşı ucuna doğru oluşturulan düşük hacimli kültür sıvısı kanallarında ilerler. On beş dakikalık inkübasyonun ardından hyalüronik aside bağlanan spermler intrastoplazmik sperm enjeksiyonu pipetiyle toplanır. Kreatin kinaz, heat shock-related protein-2 ve anilin mavisi boyaması gibi olgunluk göstergeleri bu yöntemin olgun spermleri seçebilmesini destekler. Literatürde hyalüronik asit bağlama kapasitesine sahip spermatozoaların yüksek canlılık ve motilite gösterdiği, akrozom reaksiyonu göstermediği ve düşük kaspaz-3 aktivasyonuna sahip olduğu bildirilmiştir (Huszar et al.., 2006; Yagci et al., 2010). Ayrıca hyalüronik asit bağlanma kapasitesine göre seçilen spermlerde, yalnızca yoğunluk gradyan santrifüjü ve yıkama uygulanan spermlere kıyasla daha düşük DNA fragmantasyonu bildirilmiştir (Tarozzi et al., 2009). Hyalüronik asit servikal mukus, kumulus hücreleri ve foliküler sıvının doğal bir bileşeni olduğundan toksisite riski düşüktür.

Manyetik Aktive Hücre Ayırma (MACS) Yöntemi

MACS başlangıçta somatik hücreler için geliştirilmiştir ve çok çeşitli protein belirteçlerine uyarlanabilen ileri bir tekniktir. Günümüzde özellikle apoptotik olmayan spermatozoaların seçilmesinde kullanılmaktadır. MACS, programlanmış hücre ölümünün erken bir belirteci olan ve hücre membranının dış yüzeyine taşınan fosfatidilserin moleküllerine Annexin-V'nin bağlanma afinitesine dayanır. Yıkama sonrasında sperm hücreleri, Annexin-V bağlı manyetik mikroküre lerden oluşan bir süspansiyonda oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilir. Ardından mikroküre-hücre karışımı metal bir plakaya sabitlenmiş manyetik kolondan geçirilir. Fosfatidilserine bağlanmış Annexin-V mikroküre lerini taşıyan apoptotik spermler kolonda tutulurken, apoptotik olmayan spermler kolondan geçer. Manyetik mikroküreler biyolojik olarak parçalanabilir ve hücre canlılığını etkilemez. Bununla birlikte, apoptotik olmayan sperm süspansiyonunda serbest manyetik mikroküre lerin bulunabileceği ve rutin uygulamalarda embriyotoksisite riskinin dikkatle değerlendirilmesi gerektiği belirtilmektedir (Özkavukcu & Aras, 2017).

Manyetik aktive hücre ayırma (Magnetic-Activated Cell Sorting; MACS), yardımcı üreme tekniklerinde apoptotik özellik gösteren spermatozoaların uzaklaştırılması ve daha yüksek fonksiyonel kaliteye sahip sperm popülasyonunun elde edilmesi amacıyla geliştirilen ileri sperm seçim yöntemlerinden biridir. Swim-up ve density gradient centrifugation gibi geleneksel yöntemler spermatozoaları ağırlıklı olarak hareketlilik ve fiziksel özelliklerine göre ayırırken, MACS hücre membranındaki apoptozla ilişkili moleküler değişikliklerden yararlanır (Gil et al., 2013).

ACS ile sperm seçiminin temelinde phosphatidylserine (PS) ve Annexin V arasındaki bağlanma bulunmaktadır. Normal ve canlı spermatozoalarda phosphatidylserine ağırlıklı olarak plazma

membranının iç yaprağında bulunur. Hücrenin apoptotik süreçlere girmesi ve membran bütünlüğünün bozulmasıyla phosphatidylserine dış membran yüzeyine doğru transloke olabilir. Bu durum apoptotik değişikliklerin erken göstergelerinden biri olarak kullanılmaktadır.

Annexin V, phosphatidylserine'e yüksek afiniteyle bağlanan bir proteindir. MACS sisteminde Annexin V, süperparamanyetik mikroboncuklara bağlanarak kullanılır. Annexin V ile kaplanmış manyetik mikroboncuklar dış yüzeyinde phosphatidylserine bulunan spermatozoalara bağlanır. Böylece apoptotik özellik gösteren spermatozoalar manyetik olarak işaretlenmiş olur (Paasch et al., 2003).

Paasch et al. (2003) Annexin V-MACS sonrasında elde edilen Annexin V-negatif fraksiyonda aktive kaspaz taşıyan spermatozoaların oranının azaldığını göstermiştir. Bu sonuç MACS'nin apoptotik özellik gösteren spermatozoaları ayırabilmesinin biyolojik temelini desteklemektedir (Paasch et al., 2003).

Said et al. (2006), kriyoprezervasyon üzerine yaptığı çalışmada Annexin V-negatif spermatozoaların dondurma–çözündürme sonrasında, MACS uygulanmamış spermatozoalara ve Annexin V-pozitif spermatozoalara göre daha yüksek motilite gösterdiği bulunmuştur. Aynı zamanda Annexin V-negatif sperm popülasyonunda cryosurvival rate daha yüksek bulunmuştur (Said et al., 2006).

Bu sonuç, Annexin V-negatif spermatozoaların yalnızca apoptoz göstergeleri açısından değil, bazı fonksiyonel sperm özellikleri bakımından da daha avantajlı olabileceğini düşündürmektedir.

Said et al. (2006), density gradient centrifugation sonrasında MACS uygulanmasının sperm recovery üzerindeki etkisini

incelemiştir. MACS sonrasında Annexin V-negatif fraksiyonun Annexin V-pozitif fraksiyondan daha büyük olduğu ve toplam sperm recovery oranının yaklaşık %73.8 ± 12.1 olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar DGC ile MACS kombinasyonunun belirgin hücre kaybına neden olmadan non-apoptotic spermatozoaları zenginleştirebileceği sonucuna varmıştır.

Bu bulgu özellikle düşük sperm konsantrasyonuna sahip hastalarda önemlidir. Bununla birlikte sperm geri kazanımı başlangıç sperma özelliklerine ve MACS öncesinde uygulanan hazırlama yöntemine bağlı olarak değişebilir.

Sperm Analizinde Akış Sitometrisi

Akış sitometrisi, süspansiyon hâlindeki tek tek hücrelerin özelliklerini hızlı ve çok parametreli olarak analiz edebilen gelişmiş bir laboratuvar yöntemidir. Floresan akış sitometrisinde işaretlenmiş hücreler lazer ışığıyla uyarılır; floresan boyalarla lazer arasındaki etkileşim sonucu oluşan sinyaller ışığa duyarlı dedektörler tarafından algılanır ve elektriksel sinyallere dönüştürülür. Bu sinyallerin şiddeti yayılan ışıkla ilişkilidir ve her bir hücre hakkında ayrıntılı bilgi sağlar (Garner et al., 1996). Yöntem özellikle X ve Y kromozomu taşıyan spermlerin ayrılmasının değerlendirilmesinde etkilidir. Canlılığın değerlendirilmesinde propidyum iyodür ve SYBR-14 gibi floresan boyalar kullanılabilir. Motilite, zaman atlamalı fotomikrografi ile görsel olarak ölçülebilir (Gök, 2021). Otomatik akış sitometri sistemlerinin yüksek maliyeti rutin ticari laboratuvar kullanımını sınırlandırsa da yüksek hassasiyetleri nedeniyle araştırma ve özel uygulamalarda önemli bir yere sahiptir. Hossain et al. (2011), floresan işaretli bileşiklerdeki gelişmelerin ve florokromlara erişimin artmasının sperm canlılığı, mitokondriyal membran potansiyeli, ROS ve kromatin bütünlüğü gibi birçok sperm parametresinin analizinde akış sitometrisinin kullanımını genişlettiğini bildirmiştir. Bilgisayar destekli sperm analiz sistemleri

(CASA) ise morfometrik ve kinetik parametrelerin objektif ve tekrarlanabilir biçimde değerlendirilmesini sağlayarak analizlerin doğruluğunu artırmaktadır (Verstegen et al., 2002).

Akış sitometrisinin avantajları arasında hızlı ve hassas ölçüm yapabilmesi, büyük hücre hacimlerini analiz edebilmesi ve hücre başına birden fazla parametreyi eş zamanlı değerlendirebilmesi yer alır (Azkur & Aslan, 2012). Bununla birlikte, çoğu akış sitometri cihazı başlangıçta yalnızca tek bir hücreden elde edilen toplam veya maksimum floresan sinyalini ölçmek üzere tasarlandığından hücresel yapıların ayrıntılı morfolojik tanımlanması sınırlıdır. Bu sorun, hedef yapılara seçici olarak bağlanan veya hedef dışı elemanları dışlayan optik olarak aktif moleküller kullanılarak kısmen aşılabilir (Dalva & Gulbas, 2005). Ayrıca cihazların küçük örnek hacimleriyle çalışması nedeniyle doğru kalibrasyon ve cihaz ayarları kritik öneme sahiptir (Karaboz et al., 2008).

Yoğunluk Gradyan Santrifüjü (DGC) Tekniği

Bu yöntemde ejakülat, steril konik bir tüp içerisinde farklı yoğunluklara sahip sıvı tabakalarından oluşan bir kolonun üzerine yerleştirilir. Sıvılar tek bir sürekli yoğunluk değişimi oluşturuyorsa sürekli gradyan santrifüjü; birden fazla tabaka üst üste hazırlanıyorsa kesikli gradyan santrifüjü olarak adlandırılır. Tabakalar arasındaki yoğunluk farkı, ticari olarak farklı formlarda bulunan silan kaplı kolloidal silika partikülleri içeren kültür ortamlarıyla oluşturulur. Ayırma, hücrelerin veya diğer partiküllerin yoğunluk farklılıklarına bağlı olarak gradyan sıvılarının santrifüj kuvvetine karşı gösterdiği direnç üzerinden gerçekleşir (Özkavukcu & Aras, 2017). Normal morfolojiye ve hızlı ileri motiliteye sahip sperm hücrelerinin daha olgun sitoplazmaları nedeniyle farklı yoğunluk tabakalarından geçerek konik tüpün tabanına ulaşması beklenir. En kaliteli spermleri elde etmek için tüpün en alt tabakası en yüksek yoğunluğa sahip olacak şekilde hazırlanmalıdır.

DGC'nin özellikle morfoloji ve DNA bütünlüğü açısından swim-up yönteminden üstün olabildiğini gösteren yayınlar bulunmakla birlikte, iki yöntemin genel sperm seçme kapasitelerinin benzer olduğu da belirtilmektedir. DGC'nin mutlak endikasyonlarından biri, intrastoplazmik sperm enjeksiyonu öncesinde testiküler spermin hazırlanmasıdır. Testisten elde edilen örneklerde seminifer tübüllerin parçalanması çok sayıda hücre tipi, hücresel artık ve bağ dokusu bileşeninin açığa çıkmasına neden olur; DGC bu istenmeyen materyalin uzaklaştırılmasında değerlidir (Özkavukcu & Aras, 2017).

Percoll, yoğunluk farkına dayalı sperm ayırma yöntemlerinden biridir (Bolton & Braude, 1984). Normal morfolojiye sahip sağlıklı spermatozoalar ejakülat içerisindeki en yüksek yoğunluğa sahip hücreler olduğundan gradyanın tabanında toplanır. Percoll, 15-30 nm çapında ve polivinilpirolidon (PVP) ile kaplanmış kolloidal silika partikülleri içeren bir çözeltidir (Avery & Greve, 1995). Bu çözeltiden 1,0-1,3 g/mL arasında yoğunluklara sahip gradyanlar oluşturulabilir. Percoll yoğunluk gradyanı yöntemi sperma içerisindeki yabancı partiküllerin, bakterilerin, hücre parçalarının ve ölü spermatozoaların uzaklaştırılmasına yardımcı olur. Ancak bazı endotoksik etkiler nedeniyle Percoll'ün insan tıbbındaki klinik kullanımı bırakılmıştır (Chen & Bongso, 1999).

Percoll yöntemi yoğunluk farklılıklarına, swim-up yöntemi ise motiliteye dayanır. Çeşitli çalışmalar bu yöntemlerin sperm morfolojisi, canlılığı ve motilitesi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Dondurma işlemi soğuk şoku ve ozmotik değişiklikleri başlatmakta; özellikle plazma membranı ve akrozom bütünlüğünde hasara, hücre membranında morfolojik bozulmaya ve lipid bileşiminde değişikliklere neden olmaktadır (Amann & Pickett, 1987). Arias et al. (2017), boğa spermainin swim-up ve Percoll santrifüjüyle ayrılmasının sperm hücrelerinin yapısal ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Plazma membran bütünlüğü

Percoll grubunda %89,8, swim-up grubunda %74,9 ve kontrolde %70,3 olarak bildirilmiştir. Akrozomal membran bütünlüğü ise Percoll grubunda %87,5, swim-up grubunda %63,3 ve kontrol grubunda %62,4 bulunmuştur. Bununla birlikte sıcaklık koşullarına bağlı farklılıklar gözlenmiştir.

Mehmood et al. (2009), beş manda boğasından elde edilen dondurulmuş-çözündürülmüş örneklerde swim-up ve Percoll yöntemlerini karşılaştırmıştır. Swim-up ile ayrılan spermlerde motilite daha yüksekken, Percoll grubunda motil sperm geri kazanım oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Membran bütünlüğü swim-up ile ayrılan spermlerde %77,3, Percoll ile ayrılanlarda %70,5 olarak bulunmuştur. Akrozomal bütünlük açısından ise iki yöntem arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Tek Katmanlı Santrifüj (SLC) Tekniği

Bu teknik, yoğunluk gradyan santrifüjünün (DGC) basitleştirilmiş bir biçimidir. Tek katmanlı santrifüjde (SLC) yalnızca tek bir kolloid tabakası kullanılır; böylece farklı yoğunluklarda birden fazla kolloid tabakası hazırlama gereksinimi ortadan kalkar. Santrifüj sırasında spermatozoalar konik santrifüj tüpünün tabanına doğru ilerlerken seminal plazma kolloid tabakasının üzerinde kalır. Sharma et al.. (1997), insan spermatozoalarının izolasyonunda tek katman Percoll kullanımını ilk bildiren araştırmacılardır. Başlangıçta SLC ile elde edilen sperm kalitesinin geleneksel DGC yöntemlerinden daha düşük olduğu düşünülmüştür. Daha sonra hayvan spermleri için türe özgü yeni kolloid formülasyonlarının geliştirilmesiyle SLC kullanılarak DGC'ye benzer sperm kalitesi elde etmek mümkün olmuştur. Bu durum taze aygır spermai, dondurulmuş-çözündürülmüş boğa spermai ve taze veya saklanmış domuz spermai çalışmalarında gösterilmiştir.

SLC'de seyreltilmiş sperma bir kolloid üzerinden geçirilir ve normal morfolojiye, yüksek motiliteye ve sağlam kromatine sahip spermatozoalar seminal plazma ve düşük kaliteli spermlerden ayrılır. Ayırma tamamen kusursuz değildir; son sperm pelletinde motil olmayan spermatozoalar bulunabilir. Bununla birlikte SLC ile işlenen örnekler genel olarak santrifüj uygulanmamış örneklerden daha yüksek kalitededir ve depolama sırasında daha iyi canlılık gösterebilir (Johannisson et al., 2009; Morrell et al., 2009). SLC ile seçilen spermatozoaların sperma toplandıktan sonra 96 saate kadar fertilizasyon yeteneğini koruyabildiği bildirilmiştir (Lindahl et al., 2012). Ayrıca yöntem daha büyük ejakülat hacimlerine ölçeklenebilir (Rodriguez-Martinez & Morrell, 2009).

Geleneksel DGC ile SLC arasındaki temel fark, kolloid tabakalarının sayısı ve uygulama biçimidir. DGC bir gradyan oluşturmak için iki veya daha fazla kolloid tabakası kullanırken SLC yalnızca tek tabaka kullanır. SLC'de yaygın olarak kullanılan kolloidlerden biri glisidoksipropiltrimetoksisilan kaplı silika yapısındaki Ovicoll'dür; DGC protokollerinde ise Percoll sıklıkla kullanılmıştır. Samardžija et al. (2006), boğa sperminin işlenmesinde BoviPure ve Percoll kullanılan DGC protokollerini değerlendirmiş ve işlem sonrasında motilite, membran aktivitesi, akrozomal bütünlük ve membran bütünlüğünde artış bildirmiştir.

Koçlarda Ovicoll kullanımı henüz kapsamlı biçimde incelenmemiş olmakla birlikte, benzer SLC ürünleri olan Androcoll-E gibi kolloidler farklı türlerde umut verici sonuçlar göstermiştir. Morrell et al. (2014), fertil Warmblood aygırlarından elde edilen spermade Androcoll-E kullanımının kromatin bütünlüğünü iyileştirdiğini, hidrojen peroksit üretimini azalttığını ve sperm motilitesini artırdığını bildirmiştir. Ortiz et al. (2014), Equicoll kullanımının 24 saatlik soğuk depolama ve kriyoprezervasyon sonrasında motilite, morfoloji ve canlılık gibi temel sperm kalite parametrelerini artırdığını göstermiştir. SLC'nin koç

spermatozoalarında sağlam akrozom ve plazma membranı, yüksek mitokondriyal aktivite, progresif motilite ve sağlam DNA seçebildiği ve dondurma öncesinde uygulandığında kriyotoleransı iyileştirebildiği bildirilmiştir.

Bireyler arasında SLC'ye ve kriyoprezervasyona yanıt açısından önemli farklılıklar bulunmaktadır. Genetik açıdan değerli ancak dondurulabilirliği düşük hayvanların genetik materyalinin korunmasında veya çözündürme sonrası kalitesi yetersiz sperm bankalarının iyileştirilmesinde bu teknik yararlı olabilir (Loomis & Graham, 2008). García et al. (2011), çok sayıda taze ve dondurulmuş-çözündürülmüş aygır ejakülatını inceleyerek soğutma ve depolama sırasında sperm kalite parametrelerini izlemiştir. SLC sonrası motil spermatozoa için ortalama geri kazanım oranı %53,4 olarak bildirilmiştir (Morrell et al., 2009). Diğer türlerde gösterilen etkiler göz önüne alındığında Ovicoll'ün SLC ile kullanıldığında koç sperma kalitesini de artırabileceği öne sürülmekte, ancak bu etkinliğin açık biçimde belirlenmesi için daha fazla çalışma önerilmektedir.

Tek Katmanlı Santrifüj (SLC) Tekniğinin Avantajları ve Sınırlılıkları

SLC'nin yüksek kaliteli spermatozoaların seçilmesi ve işlenmesinde çeşitli avantajları vardır. Bunlardan biri esneklik ve pratikliktir. SLC, büyük hacimlerden hasar görmemiş ve fonksiyonel olarak yeterli spermatozoaların hızlı biçimde geri kazanılmasını sağlar; tüm ejakülatların işlenmesine ölçeklenebilir ve geleneksel DGC'de gerekli olan tüp sayısını önemli ölçüde azaltır. Örneğin tam bir aygır veya domuz ejakülatının DGC ile işlenmesi 70'ten fazla tüp gerektirebilirken SLC ile yalnızca 4-8 tüp yeterli olabilir (Morrell et al., 2009).

Bir diğer önemli avantaj patojen yükünün azaltılmasıdır. SLC ile hazırlanmış domuz spermatozoalarının sperma

sulandırıcısına antibiyotik eklenmeden oda sıcaklığında seçilmemiş spermlerden daha uzun süre canlı kaldığı bildirilmiştir. Deneysel olarak porcine circovirus eklenen domuz spermainde SLC işlemi viral yükü anlamlı ölçüde azaltmıştır. Türlere özgü kolloid formülasyonlarının özellikle keçi gibi türlerde çözündürme sonrası sperm kalitesini iyileştirme potansiyeli de bildirilmiştir (Jiménez-Rabadán et al., 2012). SLC, çok katmanlı DGC'ye göre daha kolay uygulanır; çünkü santrifüj tüplerinde birden fazla kolloid çözeltisinin dikkatli biçimde hazırlanıp tabakalanmasını gerektirmez.

SLC, akrozom bütünlüğü, membran bütünlüğü ve kromatin bütünlüğü gibi sperm parametrelerinin iyileştirilmesiyle de ilişkilendirilmiştir. Yalnızca canlı ve fonksiyonel spermatozoaların seçilmesi sayesinde, dondurulmuş pipetlerin birleştirilip işlenmesi durumunda geleneksel vajinal inseminasyon için gereken sperm sayısının azaltılmasına katkı sağlayabilir.

Bununla birlikte SLC'nin sınırlılıkları da vardır. Kriyoprezervasyon sırasında ortaya çıkan ozmotik stres sperm hücrelerinin canlılığını olumsuz etkileyebilir ve özellikle at türlerinde uygun sulandırıcıların, kriyoprotektanların, santrifüj protokollerinin ve soğutma-çözündürme hızlarının optimize edilmesi önemini korumaktadır. Bazı koşullarda cam yünü filtrasyonu, Sephadex kolon ayırma veya iki katmanlı DGC gibi alternatif yöntemler daha etkili olabilir. Morrell et al. (2008), DGC'nin bazı koşullarda SLC'ye kıyasla yüksek motilite, sağlam kromatin ve normal morfolojiye sahip sperm fraksiyonlarını daha etkili biçimde seçebildiğini bildirmiştir.

SLC büyük oranda morfolojik olarak normal spermatozoaları seçer. Morfoloji sperma kalitesinin değerlendirilmesindeki en önemli kriterlerden biridir ve SLC sonrasında morfolojik olarak normal spermatozoa yüzdesinde artış ve akrozomal bütünlüğün

korunması bildirilmiştir. Koç spermainde García-Álvarez et al. (2010), DGC'nin sperm kalitesini belirgin biçimde iyileştirdiğini, ancak seçilen örneklerde DNA fragmantasyon indeksinin arttığını ve bunun bazı durumlarda genetik bütünlük üzerinde olumsuz bir etki olabileceğini bildirmiştir. Gök'un (2021) çalışması ise SLC işleminde Ovicoll kullanımının koç sperm morfolojisini belirgin biçimde iyileştirdiğini göstererek yöntemin küçük ruminantlarda sperma kalitesini artırma potansiyelini desteklemiştir.

Tablo 1: Sperm Hazırlama ve Seçim Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Özellik	**Basit Yıkama**	**Swim-Up**	**DGC**
Temel prensip	Sperma medyumla seyreltilir, santrifüj edilir; seminal plazma uzaklaştırılır ve pellet yeniden süspanse edilir (WHO, 2021).	Motil spermatozoaların kültür medyumuna aktif olarak yüzmesine dayanır (WHO, 2021).	Hücreler farklı yoğunluklardaki gradientlerden santrifüjle geçirilerek ayrılır (WHO, 2021).
Ana seçim kriteri	Spesifik kalite seçimi yoktur.	Progresif motilite (WHO, 2021).	Hücresel yoğunluk ve buna eşlik eden kalite farklılıkları (WHO, 2021).
Seçim düzeyi	Düşük	Motilite açısından yüksek	Yüksek
Santrifüj	Evet (WHO, 2021).	Direct swim-up'ta ön santrifüj gerekmez; pellet swim-up'ta kullanılır (WHO, 2021).	Evet (WHO, 2021).
Gradient kullanımı	Yok	Yok	Genellikle iki katmanlı discontinuous

Özellik	Basit Yıkama	Swim-Up	DGC
			gradient (WHO, 2021).
Motil sperm seçimi	Düşük	Çok yüksek (WHO, 2021).	Yüksek (WHO, 2021).
Sperm geri kazanımı	İyi kaliteli spermalerde yüksek olabilir (WHO, 2021).	Görece düşüktür; yalnızca göç eden sperm toplanır (WHO, 2021).	Orta–yüksek; swim-up'a göre daha yüksek recovery sağlayabilir (WHO, 2021).
Debris uzaklaştırma	Düşük; debris etkili şekilde elimine edilmeyebilir (WHO, 2021).	İyi (WHO, 2021).	Çok iyi; debris'ten büyük ölçüde arındırılmış fraksiyon sağlar (WHO, 2021).
Lökosit uzaklaştırma	Sınırlı; WHO etkili eliminasyon sağlamadığını belirtir (WHO, 2021).	Görece iyi.	Çok iyi; kontamine lökositlerden büyük ölçüde arındırabilir (WHO, 2021).
Morfolojik kalite	Spesifik morfolojik seçim yoktur.	Dolaylı zenginleşme olabilir.	Daha kaliteli/morfolojik açıdan uygun sperm fraksiyonu zenginleşebilir (WHO, 2021).
Apoptotik sperm seçimi	Hayır	Hayır	Doğrudan değil
Sperm olgunluğu	Hayır	Hayır	Doğrudan değil
DNA fragmentasyonu	Doğrudan seçim yapmaz.	Doğrudan DNA seçimi değildir; seçilmiş motil fraksiyonda daha	Doğrudan DNA seçimi değildir; daha düşük DFI'li

Özellik	Basit Yıkama	Swim-Up	DGC
		düşük hasar görülebilir.	fraksiyon zenginleşebilir.
ROS / oksidatif stres	Santrifüj nedeniyle uygun olmayan/uzun işlemlerde risk artabilir.	Direct swim-up ön santrifüjü önlediği için avantajlı olabilir (WHO, 2021).	Santrifüj içerir; kuvvet ve süre kontrol edilmelidir.
Özel ekipman	Düşük	Düşük	Orta; gradient medyumu gerekir
Maliyet	Düşük	Düşük	Orta
İşlem karmaşıklığı	Çok düşük	Düşük	Orta
ICSI ile ilişkisi	Örnek hazırlamada kullanılabilir	ICSI öncesi hazırlamada kullanılabilir	ICSI öncesi yaygın hazırlama yöntemi
Başlıca avantaj	Basitlik, düşük maliyet, yüksek recovery.	Yüksek motiliteli ve temiz sperm fraksiyonu.	Motilite/kalite seçimi ile debris ve lökosit uzaklaştırmayı birlikte sağlar.
Başlıca dezavantaj	Düşük seçicilik.	Düşük sperm recovery.	Santrifüj, sperm kaybı ve daha karmaşık hazırlık.
Genel kullanım mantığı	İyi kaliteli sperma ve temel hazırlama.	Yeterli progresif motil sperm bulunan örnekler.	Heterojen, debris/lökosit içeren veya daha güçlü ayırma gereken örnekler.

Özellik	SLC	MACS	HA/PICSI
Temel prensip	Sperma tek bir yoğunluk katmanı üzerine yerleştirilir ve santrifüj edilir (Zhou et al., 2010).	Apoptotik spermde dış membrana çıkan phosphatidylserine, Annexin V kaplı manyetik mikroboncuklarla bağlanır; apoptotik hücreler tutulur (Gil et al. , 2013).	Olgun spermatozoaların hyalüronik aside bağlanma kapasitesine dayanır; bağlanan sperm ICSI için seçilir (Miller et al., 2019).
Ana seçim kriteri	Tek yoğunluk eşiğini geçebilme; seçicilik kullanılan yoğunluğa bağlıdır (Zhou et al., 2010)	Apoptotik durum / phosphatidylserine ekspresyonu (Gil et al., ., 2013).	Fonksiyonel olgunluk / HA bağlanma kapasitesi (Miller et al., 2019).
Seçim düzeyi	Orta–yüksek	Yüksek; fonksiyonel seçim	Yüksek; bireysel olgun sperm seçimi
Santrifüj	Evet (Zhou et al., 2010).	Genellikle DGC/swim-up gibi bir ön hazırlamadan sonra uygulanır.	Son seçim aşamasında gerekmez; örnek çoğunlukla önceden hazırlanır.
Gradient kullanımı	Tek yoğunluk katmanı (Zhou et al., 2010).	Yok; manyetik kolon kullanılır.	Yok; HA kaplı yüzey/ortam kullanılır.
Motil sperm seçimi	Orta–yüksek; yoğunluğa	Motilite ana kriter değildir.	Motil spermatozoalar arasından ek

Özellik	SLC	MACS	HA/PICSI
	bağlı (Zhou et al., 2010).		fonksiyonel seçim yapılır.
Sperm geri kazanımı	Görece yüksektir; iki katmanlı gradientten daha yüksek recovery bildirilmiştir (Zhou et al., 2010).	Ek seçim aşaması sperm sayısını azaltabilir.	Yüksek hücre recovery'si temel amaç değildir; ICSI için bireysel seçim yapılır.
Debris uzaklaştırma	Basit yıkamadan daha iyi; iki katmanlı DGC kadar kademeli değildir (Zhou et al., 2010).	Temel hedef debris değildir; ön hazırlama belirleyicidir.	Debris uzaklaştırma yöntemi değildir.
Lökosit uzaklaştırma	Round-cell yoğunluğunu azaltabilir (Zhouet al., 2010).	Temel hedef değildir.	Temel hedef değildir.
Morfolojik kalite	DGC'ye benzer fakat tek eşik nedeniyle seçicilik daha düşük olabilir.	Annexin V-negatif fraksiyonda daha iyi sperm kalite parametreleri bildirilebilir (Gil et al., 2013).	HA bağlanan spermatozoalar olgunluk ve morfolojik kalite açısından zenginleşebilir (Miller et al., 2019).
Apoptotik sperm seçimi	Doğrudan değil	Evet; yöntemin temel hedefidir (Gil et al., ., 2013).	Doğrudan apoptotik marker kullanmaz.

Özellik	SLC	MACS	HA/PICSI
Sperm olgunluğu	Doğrudan değil	Dolaylı; apoptotik olmayan hücre seçimi	HA bağlanması fonksiyonel olgunluk göstergesi olarak kullanılır (Miller et al., ., 2019).
DNA fragmentasyonu	Temel seçim kriteri DNA değildir.	DNA fragmentasyonunu azaltabildiğine dair meta-analitik kanıt vardır (Falquet Guillem et al., ., 2026).	HA bağlanan spermde daha iyi DNA bütünlüğü bildirilmiştir; klinik sonuç üstünlüğü kesin değildir (Miller et al., ., 2019).
ROS / oksidatif stres	Santrifüj içerir.	Seçim manyetik bağlanmayla yapılır; fakat çoğu protokol ön hazırlama içerir.	Son seçim aşaması santrifüj gerektirmez; ön hazırlama yöntemi önemlidir.
Özel ekipman	Orta; tek katmanlı yoğunluk medyumu gerekir	Yüksek; manyetik kolon/mıknatıs/Annexin V mikroboncukları	HA kaplı PICSI dish veya özel HA ortamı
Maliyet	Orta; DGC'den daha basit olabilir	Yüksek	Klasik yöntemlerden daha yüksek
İşlem karmaşıklığı	DGC'den daha basit	Yüksek	Orta
ICSI ile ilişkisi	ICSI öncesi alternatif hazırlama yöntemi	Klasik hazırlamadan sonra ileri sperm seçimi için kullanılabilir	Doğrudan ICSI sperm seçimine yöneliktir. (PICSI)
Başlıca avantaj	Daha basit gradient	Apoptotik spermleri dışlayarak DNA	Fonksiyonel olarak olgun,

Özellik	SLC	MACS	HA/PICSI
	sistemi ve yüksek recovery (Zhou et al., ., 2010).	bütünlüğü daha iyi bir fraksiyon seçme potansiyeli (Gil vet al., , 2013; Falquet Guillem et al., ., 2026).	HA bağlayan spermlerin seçimi.
Başlıca dezavantaj	İki katmanlı DGC kadar seçici olmayabilir (Zhou et al., ., 2010).	Özel ekipman/maliyet, sperm kaybı; klinik fayda tüm hastalarda kesin değildir.	Klinik gebelik/canlı doğum açısından standart ICSI'ye üstünlüğü kesin değildir (Miller et al., ., 2019).
Genel kullanım mantığı	Recovery'nin korunması ile kalite seçimi arasında denge gereken durumlar.	Yüksek apoptotik sperm yükü veya yüksek DNA fragmentasyonu gibi seçilmiş durumlarda tamamlayıcı yaklaşım.	ICSI sırasında fonksiyonel olarak olgun sperm seçiminin amaçlandığı durumlar.

Not: Basit yıkama, swim-up, density gradient centrifugation (DGC) ve single-layer centrifugation (SLC) esas olarak sperm hazırlama/ayırma; MACS ve hyalüronik asit bağlanması (HA/PICSI) ise ileri sperm seçim yaklaşımlarıdır.

Sonuç

Sperm seçimi, sağlıklı spermlerde en iyi motilite ve morfolojinin belirlenmesi açısından kritik öneme sahiptir. Yıkama/santrifüj, swim-up, hyalüronik asit bağlanma tekniği, yoğunluk gradyan santrifüjü (DGC), tek katmanlı santrifüj (SLC) ve MACS gibi farklı sperm seçme yöntemleri kullanılmaktadır. Çeşitli çalışmalar, bu yöntemler arasında SLC'nin sperm üzerinde daha az zararlı veya hasar oluşturucu olabileceğini göstermiştir. Patojen yükünün azaltılmasına katkısı sayesinde sperma çözündürme işlemlerinde daha az antibiyotik kullanımına olanak sağlayabilir ve geleneksel vajinal inseminasyonda gereken sperm sayısının

azaltılmasına katkıda bulunabilir. Bununla birlikte tekniğin bazı olumsuz yönleri de vardır. Kriyoprezervasyon sırasında ortaya çıkan ozmotik stres sperm hücrelerini olumsuz etkileyebilir. Özellikle Ovicoll çözeltisinin kullanıldığı çalışmalarda akış sitometrisiyle değerlendirilen mitokondriyal aktivite ve reaktif oksijen kapasitesi gibi bazı parametrelerde olumsuz sonuçlar gözlenmiş olsa da sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi üzerinde olumlu etkiler bildirilmiştir.

Kaynakça

Aitken, R. J., & Clarkson, J. S. (1988). Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology, 9*(6), 367–376. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1988.tb01067.x

Almubarak, A. M., Kim, W., Abdelbagi, N. H., Balla, S. E., Yu, I.-J., & Jeon, Y. (2021). Washing solution and centrifugation affect kinematics of cryopreserved boar semen. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology, 36*(2), 69–75. https://doi.org/10.12750/JARB.36.2.69

Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science, 7*(3), 145–173. https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4

Amano, K., Oigawa, S., Ichizawa, K., Tokuda, Y., Unagami, M., Sekiguchi, M., Furui, M., Nakaoka, K., Ito, A., Hayashi, R., Tamaki, Y., Hayashi, Y., Fukuda, Y., Katagiri, Y., Nakata, M., & Nagao, K. (2024). Swim-up method is superior to density gradient centrifugation for preserving sperm DNA integrity during sperm processing. *Reproductive Medicine and Biology, 23*(1), e12562. https://doi.org/10.1002/rmb2.12562

Amiri, I., Ghorbani, M., & Heshmati, S. (2012). Comparison of the DNA fragmentation and the sperm parameters after processing by the density gradient and the swim up methods. *Journal of Clinical and Diagnostic Research, 6*(9), 1451–1453. https://doi.org/10.7860/JCDR/2012/4198.2530

Arias, M. E., Andara, K., Briones, E., & Felmer, R. (2017). Bovine sperm separation by swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reproductive Biology, 17*(2), 126–132. https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.03.002

Avery, B., & Greve, T. (1995). Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology, 44*(6), 871–878. https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00272-A

Awan, M. A., Arshad, J., Rakha, B. A., Ansari, M. S., Waseem, M., Fouladi-Nashta, A., Miller, D., & Akhter, S. (2021). Sperm binding to hyaluronan is an excellent predictor of Nili-Ravi buffalo bull fertility. *Andrologia, 53*(3), e13991. https://doi.org/10.1111/and.13991

Azkur, A., & Aslan, M. E. (2012). Akış sitometri ve veteriner hekimlikteki uygulamaları. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 7*(1), 59–66.

Bolton, V. N., & Braude, P. R. (1984). Preparation of human spermatozoa for in vitro fertilization by isopycnic centrifugation on self-generating density gradients. *Archives of Andrology, 13*(2–3), 167–176. https://doi.org/10.3109/01485018408987515

Chen, M. J., & Bongso, A. (1999). Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Human Reproduction, 14*(3), 759–764. https://doi.org/10.1093/humrep/14.3.759

Contri, A., Gloria, A., Robbe, D., Sfirro, M. P., & Carluccio, A. (2012). Effect of sperm concentration on characteristics of frozen-thawed semen in donkeys. *Animal Reproduction Science, 136*(1–2), 74–80. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.022

Dalva, K., & Gülbaş, Z. (2005). Akım sitometri uygulamaları. *Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji*, 44–52.

Dorado, J., Gálvez, M. J., Morrell, J. M., Alcaráz, L., & Hidalgo, M. (2013). Use of single-layer centrifugation with Androcoll-C to enhance sperm quality in frozen-thawed dog semen. *Theriogenology, 80*(8), 955–962. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.027

Ďuračka, M., Benko, F., Chňapek, M., & Tvrdá, E. (2023). Strategies for bacterial eradication from human and animal semen samples: Current options and future alternatives. *Sensors, 23*(15), 6978. https://doi.org/10.3390/s23156978

Druart, X., & de Graaf, S. P. (2018). Seminal plasma proteomes and sperm fertility. *Animal Reproduction Science, 194*, 33–40. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.061

Falquet Guillem, M., Pacheco, R., Gisbert-Iranzo, A., Cano-Extremera, M., Gil Juliá, M., Navarro-Gomezlechon, A., Hervas, I., & Garrido, N. (2026). Magnetic-activated cell sorting non-apoptotic sperm selection improves DNA fragmentation and reproductive outcomes: Systematic review and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online, 52*(1), 105152. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2025.105152

Fonseca Junior, A. M., Gaita, V., Argumedo, D. R., de Castro, L. S., Losano, J. D. A., Leite, R. F., Nichi, M., Assumpção, M. E. O. D., de Araújo, D. R., Neves, A. A. R., & Milazzotto, M. P. (2020). Changes in fertilization medium viscosity using hyaluronic acid impact bull sperm motility and acrosome status. *Reproduction in Domestic Animals, 55*(8), 974–983. https://doi.org/10.1111/rda.13739

García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Ramón, M., Del Olmo, E., Montoro, V., Dominguez-Rebolledo, A. E., Bisbal, A., Jiménez-Rabadán, P., Pérez-Guzmán, M. D., & Soler, A. J. (2010). Analysis

of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of in vivo fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology, 74*(6), 979–988. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.027

Garner, D. L., Dobrinsky, J. R., Welch, G. R., & Johnson, L. A. (1996). Porcine sperm viability, oocyte fertilization and embryo development after staining spermatozoa with SYBR-14. *Theriogenology, 45*(6), 1103–1113. https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00067-2

Gil, M., Sar-Shalom, V., Melendez Sivira, Y., Carreras, R., & Checa, M. A. (2013). Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 30*(4), 479–485. https://doi.org/10.1007/s10815-013-9962-8

Gök, A. C. (2021). *Sperm quality is improved in SLC (single layer centrifugation) technique using Ovicoll colloid* [Master's dissertation, Aberystwyth University].

Goodla, L., Morrell, J. M., Yusnizar, Y., Stålhammar, H., & Johannisson, A. (2014). Quality of bull spermatozoa after preparation by single-layer centrifugation. *Journal of Dairy Science, 97*(4), 2204–2212. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7607

Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos* (2nd ed.). CABI Publishing.

Henkel, R. R., & Schill, W. B. (2003). Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology, 1*, 108. https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-108

Hossain, M. S., Johannisson, A., Wallgren, M., Nagy, S., Siqueira, A. P., & Rodriguez-Martinez, H. (2011). Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: State of the

art. *Asian Journal of Andrology, 13*(3), 406–419. https://doi.org/10.1038/aja.2011.15

Huszar, G., Ozkavukcu, S., Jakab, A., Celik-Ozenci, C., Sati, G. L., & Cayli, S. (2006). Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: Selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology, 18*(3), 260–267. https://doi.org/10.1097/01.gco.0000193018.98061.2f

Jiménez-Rabadán, P., Morrell, J. M., Johannisson, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Álvaro-García, P. J., Pérez-Guzmán, M. D., Fernández-Santos, M. R., Garde, J. J., & Soler, A. J. (2012). Single layer centrifugation (SLC) improves sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtibérica buck semen. *Animal Reproduction Science, 136*(1–2), 47–54. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.09.012

Johannisson, A., Morrell, J. M., Thorén, J., Jönsson, M., Dalin, A. M., & Rodriguez-Martinez, H. (2009). Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science, 116*(1–2), 119–128. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.01.008

Karaboz, İ., Kayar, E., & Akar, S. (2008). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, 6*(2), 1–18.

Juyena, N. S., & Stelletta, C. (2012). Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology, 33*(4), 536–551. https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012583

Kirkman-Brown, J., Pavitt, S., Khalaf, Y., Lewis, S., Hooper, R., Bhattacharya, S., Coomarasamy, A., Sharma, V., Brison, D., Forbes, G., West, R., Pacey, A., Brian, K., Cutting, R., Bolton, V., & Miller, D. (2019). *Sperm selection for assisted reproduction by prior*

hyaluronan binding: The HABSelect RCT. Efficacy and Mechanism Evaluation, 6(1), 1–110. https://doi.org/10.3310/eme06010

Liaudat, A. C., Blois, D., Capella, V., Morilla, G., Rivero, R., Barbero, C., Rodríguez, N., Rivarola, C., & Bosch, P. (2022). Bull sperm selection by attachment to hyaluronic acid semi-interpenetrated hydrogels. *Reproduction in Domestic Animals, 57*(2), 227–235. https://doi.org/10.1111/rda.13943

Lindahl, J., Dalin, A. M., Stuhtmann, G., & Morrell, J. M. (2012). Stallion spermatozoa selected by single layer centrifugation are capable of fertilization after storage for up to 96 h at 6°C prior to artificial insemination. *Acta Veterinaria Scandinavica, 54*, 40. https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-40

Loomis, P. R., & Graham, J. K. (2008). Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science, 105*(1–2), 119–128. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.010

Macías García, B., González Fernández, L., Ortega Ferrusola, C., Salazar-Sandoval, C., Morillo Rodríguez, A., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J. A., Morcuende, D., & Peña, F. J. (2011). Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reproduction in Domestic Animals, 46*(1), 141–148. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01609.x

Madrid-Bury, N., Fernández, R., Jiménez, A., Pérez-Garnelo, S., Moreira, P. N., Pintado, B., de la Fuente, J., & Gutiérrez-Adán, A. (2003). Effect of ejaculate, bull, and a double swim-up sperm processing method on sperm sex ratio. *Zygote, 11*(3), 229–235. https://doi.org/10.1017/S0967199403002272

Mehmood, A., Anwar, M., & Naqvi, S. M. S. (2009). Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. *Animal Reproduction Science, 111*(2–4), 141–148. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.02.011

Morrell, J. M. (2006). Update on semen technologies for animal breeding. *Reproduction in Domestic Animals, 41*(1), 63–67. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00621.x

Morrell, J. M. (2011). Biomimetics in action: Practical applications of single layer centrifugation for equine breeding. *Journal of Veterinary Science & Technology, 2*(2), 107. https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000107

Morrell, J. M., Dalin, A. M., & Rodriguez-Martinez, H. (2009). Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: Yield, motility and survival. *Equine Veterinary Journal, 41*(1), 53–58. https://doi.org/10.2746/042516408X322139

Morrell, J. M., & Rodriguez-Martinez, H. (2009). Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: A review. *The Open Andrology Journal, 1*, 1–9. https://doi.org/10.2174/1876827X00901010001

Morrell, J. M., & Rodriguez-Martinez, H. (2011). Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. *Veterinary Medicine International, 2011*, 894767. https://doi.org/10.4061/2011/894767

Morrell, J. M., Rodriguez-Martinez, H., & Johannisson, A. (2010). Single layer centrifugation of stallion spermatozoa improves sperm quality compared with sperm washing. *Reproductive BioMedicine Online, 21*(3), 429–436. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.03.027

Mortimer, D., & Mortimer, S. T. (1992). Methods of sperm preparation for assisted reproduction. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore, 21*(4), 517–524.

Nguyen, V. K., Vu, H. T. T., Nguyen, H. L. T., Nguyen, H. T., Hoang, A. T., Le, D. V., Nguyen, N. T. T., Phan, H. T., Pham, Y. K. T., Le, S. P., Le, Q. A., Pham, L. D., Luu, M. Q., & Nguyen, M. T. (2023). Assessment of the quality of frozen-thawed semen or epididymal sperm in three native Vietnamese pig breeds. *Open Journal of Animal Sciences, 13*(3), 283–297. https://doi.org/10.4236/ojas.2023.133021

Ortiz, I., Dorado, J., Ramírez, L., Morrell, J. M., Acha, D., Urbano, M., Gálvez, M. J., Carrasco, J. J., Gómez-Arrones, V., Calero-Carretero, R., & Hidalgo, M. (2014). Effect of single layer centrifugation using Androcoll-E-Large on the sperm quality parameters of cooled-stored donkey semen doses. *Animal, 8*(2), 308–315. https://doi.org/10.1017/S1751731113002097

Özkavukçu, İ. S., & Aras Tosun, D. (2017). IUI ve IVF için sperm hazırlama yöntemleri [Sperm preparation methods for IUI and IVF]. *Türk Üreme Tıbbı ve Cerrahisi Dergisi, 1*(2), 92–98. https://doi.org/10.24074/tjrms.2016-54251

Paasch, U., Grunewald, S., Agarwal, A., & Glandera, H.-J. (2003). Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *Journal of Andrology, 24*(2), 246–252. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02669.x

Pacheco, A., Blanco, A., Bronet, F., Cruz, M., García-Fernández, J., & García-Velasco, J. A. (2020). Magnetic-activated cell sorting (MACS): A useful sperm-selection technique in cases of high levels of sperm DNA fragmentation. *Journal of Clinical Medicine, 9*(12), 3976. https://doi.org/10.3390/jcm9123976

Parinaud, J., Le Lannou, D., Vieitez, G., Griveau, J. F., Milhet, P., & Richoilley, G. (1997). Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit®) following ejaculation. *Human Reproduction, 12*(11), 2434–2436. https://doi.org/10.1093/humrep/12.11.2434

Ranganathan, S., Ganguly, A. K., & Datta, K. (1994). Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function. *Molecular Reproduction and Development, 38*(1), 69–76. https://doi.org/10.1002/mrd.1080380112

Rappa, K. L., Rodriguez, H. F., Hakkarainen, G. C., Anchan, R. M., Mutter, G. L., & Asghar, W. (2016). Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? *Biotechnology Advances, 34*(5), 578–587. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.01.007

Risopatrón, J., Sánchez, R., Sepúlveda, N., Peña, P., Villagrán, E., & Miska, W. (1996). Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine in vitro fertilization: Comparison with washing/centrifugation. *Theriogenology, 46*(1), 65–73. https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00142-2

Said, T. M., Agarwal, A., Grunewald, S., Rasch, M., Glander, H.-J., & Paasch, U. (2006). Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reproductive BioMedicine Online, 13*(3), 336–339. https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61437-X

Samardžija, M., Karadjole, M., Matković, M., Cergolj, M., Getz, I., Dobranić, T., Tomašković, A., Petrić, J., Šurina, J., Grizelj, J., & Karadjole, T. (2006). A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal Reproduction*

Science, *91*(3–4), 237–247. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.005

Sharma, R. K., Seifarth, K., & Agarwal, A. (1997). Comparison of single- and two-layer Percoll separation for selection of motile spermatozoa. *International Journal of Fertility and Women's Medicine, 42*(6), 412–417.

Shekarriz, M., DeWire, D. M., Thomas, A. J., Jr., & Agarwal, A. (1995). A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *European Urology,* *28*(1), 31–35. https://doi.org/10.1159/000475016

Tarozzi, N., Nadalini, M., Bizzaro, D., Serrao, L., Fava, L., Scaravelli, G., & Borini, A. (2009). Sperm-hyaluronan-binding assay: Clinical value in conventional IVF under Italian law. *Reproductive BioMedicine Online,* *19*(Suppl. 3), 35–43. https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60282-9

Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology,* *57*(1), 149–179. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1

World Health Organization. (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (6th ed.). World Health Organization.

Yagci, A., Murk, W., Stronk, J., & Huszar, G. (2010). Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: An acridine orange fluorescence study. *Journal of Andrology,* *31*(6), 566–572. https://doi.org/10.2164/jandrol.109.008912

Younglai, E. V., Holt, D., Brown, P., Jurisicova, A., & Casper, R. F. (2001). Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Human Reproduction, 16*(9), 1950–1953. https://doi.org/10.1093/humrep/16.9.1950

Zhou, Q. Z., Feng, C. Q., Zou, Y. G., Shu, W., Li, T. Q., Li, F., Liu, C. D., & Mao, X. M. (2010). Single- and two-layer gradient centrifugation in sperm separation: Comparison and appraisal. *Zhonghua Nan Ke Xue, 16*(3), 217–219.

Zimmerman, E. R., Robertson, K. R., Kim, H., Drobnis, E. Z., & Nakajima, S. T. (1994). Semen preparation with the Sperm Select System versus a washing technique. *Fertility and Sterility, 61*(2), 269–275. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)56516-9


BİDGE