

## Boğaların Potansiyel Fertilitelerinin Belirlenmesinde Yeni Bir Servikal Mukus Penetrasyon Test Tekniği (Payet Yöntemi)

Muzaffer TAŞ<sup>1</sup>  
Ümit CİRİT<sup>2</sup>  
Süleyman BACINOĞLU<sup>2</sup>  
Kemal AK<sup>2</sup>  
İrfan Kamuran İLERİ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dicle Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Doğum ve Reprodüksiyon  
Anabilim Dalı  
Diyarbakır-TÜRKİYE

<sup>2</sup> İstanbul Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Dölerme ve Sun'i  
Tohumlama Anabilim Dalı  
İstanbul-TÜRKİYE

Bu çalışmada boğaların potansiyel fertilitelerinin belirlenmesinde kullanılabilecek yeni bir servikal mukus penetrasyon test (CMPT) tekniği geliştirildi.

Araştırmanın ilk aşamasında 10 Holstein boğanın dondurulmuş spermaları ile suni tohumlamalar yapıldı. Ortalama non return rate (NRR) değerleri arasında istatistiksel farklılık bulunan ilk 3 ve son 3 sıradaki boğalar sırasıyla yüksek ve düşük fertilitite gruplarını oluşturdu ve dondurulmuş spermaları çalışmanın 2. aşamasında (CMPT) kullanıldı. Yaygın olarak kullanılan CMPT yöntemlerinden farklı olarak servikal mukus 0.25 ml'lik şeffaf payetlere çekildi. Daha sonra eritilmiş sperma ile 3 farklı ısı (37, 39 ve 41°C) ve iki farklı sürede (15 ve 45 dakika) inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyonlardan sonra payetler, sıvı azot buharında dondurularak -20°C'de saklandı. İnceleme gününde payetlerin uç kısmından itibaren ölçülerek 15-17.5 mm (1. penetrasyon aralığı; PA1), 32.5-35 mm (PA2) ve 50-52.5 mm'ler (PA3) arasındaki 2.5'er mm'lik parçalar kesilerek ayrıldı. Daha sonra kesilen parçalar içerisindeki mukus bir tel vasıtasıyla itilerek donmuş halde lamalar üzerine aktarıldı ve lamel kapatılarak faz-kontrast mikroskop (200x) spermatozoonlar sayıldı.

Boğaların bireysel NRR skorları ile PA 3'te saptanan spermatozoon sayıları (P<0.05) ve motilite (P<0.01) arasında önemli derecede pozitif, akrozomal bozukluk (P<0.01), diğer morfolojik bozukluk (P<0.01) ve toplam morfolojik bozukluk oranları (P<0.01) arasında negatif korelasyon bulundu. Ayrıca 41°C ısı ve 15 dakika sürede yapılan inkübasyonda düşük fertilitite grubuna oranla yüksek fertilitite grubunda PA 3'te önemli derecede daha fazla sayıda spermatozoon saptandı (P<0.01).

Bu çalışmadan, (a) rutin spermatolojik testlerle kombine bir şekilde bu yeni CMPT yönteminin boğaların potansiyel fertilitelerinin belirlenmesinde kullanılabileceği ve (b) uzak bölgedeki penetrasyon aralığının (PA3), yüksek inkübasyon ısısının (41°C) ve kısa inkübasyon süresinin (15 dk) test sonuçlarını daha da belirginleştirdiği sonuçları çıkarıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Boğa Spermasi, Fertilitite, Servikal Mukus, Penetrasyon Testi, CMPT.

### A New Cervical Mucus Penetration Test Technique (Straw Method) for Determination of Potential Fertility of Bulls

A new cervical mucus penetration test (CMPT) technique was developed for determination of the potential fertility of bulls in this study.

In the first stage of the experiment artificial inseminations were conducted by using the frozen semen of 10 Holstein bulls. The first and last 3 bulls whose mean non-return rates (NRR) scores had significantly difference formed the high and low fertility groups respectively, and their frozen semen were used at the 2nd stage (CMPT) of the study. Differently from the current CMPT methods the cervical mucus was drawn into transparent straws of 0.25 ml. Than incubated with thawed semen at 3 various temperature (37, 39 and 41°C) and for 2 various periods (15 and 45 min). Following incubations, the straws were frozen at liquid nitrogen vapour and stored at -20°C. On the examination day, the straws were cut into pieces by measuring the lengths from the open end as following; 15-15.5 mm (1st penetration interval; PA1), 32.5-35 mm (PA2) and 50-52.5 mm (PA3) 2.5 mm each. Frozen mucus portion in each cut straw part is then pushed out on slight glasses by means of a piece of wire and cover glass was placed for spermatozoon count under a phase-contrast microscope (200x).

A significant positive correlation was found between the individual NRR scores of bulls and spermatozoon numbers at PA3 (P<0.05) and motility (P<0.01), and a negative correlation between the individual NRR scores and acrosomal defect rate (P<0.01), other morphological defect rate (P<0.01) and total morphological defect rate (P<0.01). Also, in the 41°C for 15 min incubation period, when compared with the low fertility group, bulls from the high fertility group had a higher number of spermatozoa at PA3.

We have concluded from this study that, (a) this new CMPT method can be used for determination of fertility in bulls in combination with routine spermatological tests, and that (b) the further penetration distance (PA3), the high incubation temperature (41°C), and the short incubation period (15 min) allow yielding of clearer test results.

**Key Words:** Bull semen, Fertility, Cervical mucus, Penetration test, CMPT.

#### Yazışma Adresi

Muzaffer TAŞ  
Dicle Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Doğum ve Reprodüksiyon  
Anabilim Dalı  
21280  
Diyarbakır-TÜRKİYE  
mtas@dicle.edu.tr

## Giriş

Suni tohumlama endüstrisinin en önemli sorunlarından biri eritme sonrası spermanın değerlendirilmesidir (1). Boğaların potansiyel fertilitelerinin belirlenmesi ve/veya düşük ısılarda saklanması sonrası spermaların değerlendirilmesi büyük önem taşır. Spermanın değerlendirilmesinde kullanılan testlerin pek çoğu spermatozoonların canlılık oranı, motilitesi ve morfolojisi ile ilgilidir (2). Günümüzde bu analizlerin tek başına yeterli olmadıkları bildirilmekte ve fertilitenin belirlenmesine yönelik yeni yöntemlerin geliştirilmesine çalışılmaktadır (3, 4, 5).

Ejaküle olmuş spermanın, vaginadan tuba uterina'ya doğru olan yolculuğunda karşılaştığı ilk fiziksel engel servikstir (6). Servikal mukusun (CM) anormal morfolojiye sahip spermatozoonları elimine eden bir bariyer gibi görev yaptığı ve mukusa nüfuz edemeyen (penetre olamayan) spermatozoonların ovumu döleme yeteneğinden de yoksun oldukları gösterilmiştir (6, 7). Bu nedenle sperma ile CM arasındaki ilişki 35 yılı aşkın bir süredir araştırmacıların ilgisini çekmiş ve bu ilişkiyi değerlendirmek amacıyla içi CM ile dolu cam kapillar tüpler sperma ile belirli ısı ve sürelerde inkübasyona tabi tutulmuştur (8, 9, 10, 11). Kapillar tüp yöntemi olarak adlandırılan bu tekniğin temeli, inkübasyon sonrasında tüplerin doğrudan mikroskop altına yerleştirilerek mukusa penetre olan spermatozoonların değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır. Zamanla, kapillar tüp yöntemi ile ilgili farklı değerlendirme kriterleri ortaya çıkmıştır (12). En çok kullanılan yöntemlerden olan Penetrak testinde 90 dakikalık inkübasyon sonucunda kapillar tüp içerisinde en uzağa giden spermatozoonun kat ettiği mesafe ölçülürken, Kremer testinde 60 dakikalık bir inkübasyon sonrasında 3 cm mesafedeki motil spermatozoa sayısı belirlenmektedir (12). Ne var ki, kapillar tüpler içerisindeki sıvı derinliği değişkendir. Bunun da, spermatozoonların mukusa nüfuz etme (penetrasyon) derecesinin mikroskop altında objektif olarak değerlendirilmesine ve spermatozoon sayılarının tam olarak belirlenememesine sebep olabileceği bildirilmektedir (13). Bu nedenle, kapillar tüp metodlarındaki gelişmelere rağmen, sonuçlar laboratuarlara ve kişilere göre farklılık gösterebilmekte ve yöntemin standardize edilememesi gibi sakıncaları bulunmaktadır.

İnsan hekimliğinde birbirinden bağımsız olarak yapılan pek çok çalışmada, spermatozoonların fertilizasyon kapasitesi ile servikal mukusa nüfuz etme yeteneğinin korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (14, 15). Ne var ki yapılan sınırlı sayıda çalışmada, boğalarda spermatozoonların mukus içerisindeki göç yeteneği ile fertilitenin arasında pozitif bir ilişkinin bulunmadığı ileri sürülmüştür (9, 10, 16). Bu çalışmaların büyük çoğunluğunda spermatozoonların penetrasyon mesafeleri değerlendirmeye alınmıştır (17, 18). Fakat in-vitro servikal mukus penetrasyon testinde (CMPT) yalnızca spermatozoonların penetrasyon mesafelerinin değerlendirilmesinin fertilitenin belirlenmesinde yetersiz kalabileceği bildirilmiştir (6). Eritme sonrasında yüksek ısıya maruz bırakılan spermada, bütün biyolojik

olayların ve spermatozoonların hızı artmaktadır (19). Bu nedenle, spermanın yüksek ısıda kısa süreli inkübasyonu prensibine dayanan Thermal Stress Test (TST) geçmiş yıllarda spermatozoonların dayanıklılığını belirlemek amacıyla kullanılmış ve motiliteyi etkileyerek hücrelerin in vivo ortamdaki yaşam gücünü saptayabileceği ileri sürülmüştür (20, 21). İn-vitro CMPT çalışmalarında ise inkübasyonlar çoğunlukla 37 °C (22) veya oda ısısında (1) yapılmıştır.

Bu çalışmada; boğaların potansiyel fertilitelerinin belirlenmesinde kullanılabilecek, standardize edilmeye uygun ve pratik bir CMPT tekniği geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kapillar tüp metodundan farklı olarak CM 0.25 ml'lik şeffaf payetlere çekilmiş ve önceden belirlenmiş mesafelere (penetrasyon aralıkları, PA) ulaşan toplam spermatozoon sayıları (lam-lamel arasında) değerlendirilmiştir. Böylece CMPT'nin daha kolay uygulanır hale getirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesinde insana bağlı farklılıkların ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Ayrıca farklı inkübasyon sürelerinin (15 ve 45 dk), spermatozoon sayılarının belirlendiği farklı penetrasyon aralıklarının (payetlerin açık uçlarından itibaren PA1: 15.0-17.5, PA2: 32.5-35.0 ve PA3: 50.0-52.5 mm'ler arasındaki bölgeler) ve geleneksel inkübasyon ısılarına nazaran nispeten daha yüksek ısıların (39 ve 41°C) test sonuçları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

**Suni Tohumlama Uygulamaları:** Bu çalışmada, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda aynı bakım ve besleme koşullarında barındırılan ve bir progeny testing çalışmasında "aday boğa" statüsündeki Holstein ırkı 10 boğanın 0.25 ml payetlerde dondurulmuş spermaları kullanıldı. Çalışmanın ilk aşamasını 12 ay boyunca süren suni tohumlama uygulamaları oluşturdu. İnekler östrus belirtilerinden 10-12 saat sonra rekto-vaginal yöntemle intra-uterin olarak bir kez tohumlandı. Bir, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 numaralı boğaların sperması ile sırasıyla 423, 387, 576, 164, 341, 262, 260, 418, 272 ve 434 (toplam 3537) adet inek tohumlandı.

**Fertilitenin Gruplarının Oluşturulması:** Non return rate (NRR) ilk tohumlamadan sonraki 60-90 günde tekrar östrus göstermeyen ineklerin tohumlanan toplan inek sayısına oranı olarak belirlendi. Fertilitenin grupları boğaların NRR sonuçlarına göre oluşturuldu. Non return rate sonuçlarına göre yapılan sıralamaya göre ilk 3 boğanın (%77.6) ve son 3 boğanın (%67.0) ortalama NRR skoru arasında önemli derecede farklılık bulundu ( $P<0.05$ ) ve bu boğalar sırasıyla "yüksek" ve "düşük" fertilitenin gruplarını oluşturdu. Fertilitenin grupları CMPT sonuçlarının daha belirgin açığa çıkarılması amacıyla oluşturulduğundan orta düzeyde NRR skorlarına (%71.4) sahip olan 4 boğa çalışmanın ikinci aşamasına (CMPT bölümüne) dahil edilmedi.

**Servikal Mukusun Toplanması ve Değerlendirilmesi:** İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi çiftliğinde östrustaki sağlıklı düvelerden düzenli olarak mukus alındı. Bu amaçla, vulva ve perianal bölge nemli bir sünger yardımı ile temizlendi. Elli ml'lik enjektöre adapte edilmiş bir kateter aracılığı ile mukus serviksin kaudalinden veya vaginanın kranialinden aspire edilerek steril bir cam küvete aktarıldı (23). Toplanan mukus örnekleri +4°C'lik ortamda 2 saat içinde laboratuara ulaştırıldı. Servikal mukustaki hücresel birikintiler ve lökositler spermatozoonların göçünü engellediğinden, toplanmış olan mukusun enfekte olup olmadığını belirlemek amacıyla çalışmada kullanılmadan önce mukus White-Side testine tabi tutuldu (17).

**Spermatolojik Özelliklerin İncelenmesi:** Her bir inceleme gününde her inkübasyon grubu için her boğaya ait 5 adet payet 37°C'de 30 saniye sürede eritildi. İnkübasyonlardan hemen önce eritilmiş spermadan örnekler alınarak spermatolojik muayeneler yapıldı. Motilite ısıtma tablalı (+38°C) faz-kontrast mikroskop aracılığı ile (400x) aynı araştırmacı tarafından değerlendirildi. Morfolojik değerlendirme için Hancock solüsyonu kullanıldı. Faz-kontrast mikroskop altında (1000x) 200 hücre incelenerek akrozom bozuklukları ve diğer morfolojik bozukluklar kaydedildi.

**Servikal Mukus Penetrasyon Testi:** Test için kullanılacak servikal mukus 0.25 ml hacmindeki şeffaf payetlere çekildi (Şekil 1) ve 37°C'de 5 dakika dik olarak bekletildi. Bekletme sonrasında içinde hava kabarcığı oluşan payetler kullanılmadı. İnkübasyon öncesinde mukusun payetin ucundan 1 mm kadar çıkıntı yapması sağlandı. Payetten taşan mukusun toksik olmayan bir kuvvet içerisinde bulunan 0.4 ml eritilmiş spermaya teması sağlanarak (90 derecelik açı ile dik bir şekilde ve payetin plastik kısmı spermaya değmeksizin) etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı (Şekil 2). On beş ve 45 dakika süren inkübasyonlar, 37, 39 ve 41°C'lik üç farklı ısıda gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında

spermatozoonları buldukları noktada tespit etmek amacıyla örnekler sıvı azot buharında (sıvı azottan 5 cm yükseklikte) donduruldu ve inceleme gününe kadar -20°C'de saklandı. Donmuş haldeki payetlerin uç kısımlarından itibaren milimetrik cetvel yardımıyla ölçülerek 15.0-17.5 mm (PA1), 32.5-35 mm (PA2) ve 50,0-52.5 mm'ler (PA3) arasındaki 2.5'er mm'lik parçalar kesilerek ayrıldı. Daha sonra kesilen parçalar içerisindeki mukus steril bir tel vasıtasıyla itilerek donmuş halde lamlar üzerine aktarıldı. Sıvı hale geldikten sonra örneklerin üzerine lamel kapatılarak faz-kontrast mikroskop altında (200x) spermatozoonlar sayıldı. Her grupta belirtilen tüm işlemler 10 kez tekrarlandı.

**Verilerin Değerlendirilmesi:** Fertilitte gruplarının NRR skorları arasındaki farklılıklar Chi-square ile analiz edildi. Eritme sonrası spermatolojik özelliklerin ve penetrasyon aralıklarındaki spermatozoon sayılarının fertilitte grupları arasında karşılaştırılmasında Independent Samples T-Test kullanıldı. Veriler arasındaki korelasyon Pearson Correlation Test ile değerlendirildi. Bütün istatistiksel analizler SPSS paket programı (versiyon 10.0) kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama ±standart sapma olarak ifade edildi.

### Bulgular

Farklı inkübasyon ısı ve sürelerinde penetrasyon aralıklarında saptanan spermatozoon sayılarının fertilitte gruplarına göre karşılaştırılması Tablo 1'de gösterilmiştir. Bütün inkübasyon ısı ve sürelerinde fertilitte grupları arasında PA1 ve PA2'deki spermatozoon sayıları benzer bulundu ( $P>0.05$ ). Üçüncü penetrasyon aralığında ise, 41°C ısı ve 15 dakika sürede yapılan inkübasyonda düşük fertilitte grubuna oranla yüksek fertilitte grubunda önemli derecede daha fazla sayıda spermatozoon saptandı (sırasıyla  $6.0\pm 1.74$  ve  $15.9\pm 5.73$  adet,  $P<0.01$ ). Ayrıca, 41°C ve 45 dakika haricinde geriye kalan bütün inkübasyon ısı ve sürelerinde, istatistiksel açıdan önemsiz olsa da, yüksek fertilitte grubunda PA3'teki spermatozoon sayıları daha yüksek bulundu ( $P>0.05$ ).

**Tablo 1. Farklı inkübasyon ısı ve sürelerinde 3 değişik penetrasyon aralığında saptanan spermatozoon sayılarının fertilitte grupları arasında karşılaştırılması.**

İnkübasyon grupları	Fertilitte grupları	Penetrasyon aralıkları ve saptanan spermatozoon sayıları (ortalama±standart sapma)		
		PA1	PA2	PA3
37 °C–15 dk.	Yüksek	285.3±89.04	42.3±13.41	21.7±8.44
	Düşük	318.0±87.76	34.9±8.58	9.4±2.61
37 °C–45 dk.	Yüksek	1761.5±225.33	147.5±24.00	81.3±17.11
	Düşük	1685.6±226.43	171.3±21.50	54.5±10.40
39 °C–15 dk.	Yüksek	844.7±196.24	65.4±15.01	15.9±5.73
	Düşük	908.3±207.30	43.6±7.86	6.0±1.74
39 °C–45 dk.	Yüksek	1826.0±225.98	155.6±26.99	52.8±15.16
	Düşük	1535.8±225.70	125.4±23.47	27.7±7.57
41 °C–15 dk.	Yüksek	1012.1±212.31	64.9±18.04	11.5±4.58 <sup>a</sup>
	Düşük	1077.6±220.62	36.5±13.01	1.9±0.78 <sup>b</sup>
41°C–45 dk.	Yüksek	2332.2±173.79	125.6±23.68	14.4±6.10
	Düşük	2015.2±208.66	127.9±24.99	25.3±8.88

<sup>ab</sup> Aynı inkübasyon grubuna ait sütunda ortak harf taşımayan özellikler arasındaki fark önemlidir ( $P<0.01$ ).

PA1: 1. penetrasyon aralığı, PA2: 2. penetrasyon aralığı, PA3: 3. penetrasyon aralığı.

Fertilite gruplarının eritme sonrası motilite ve akrozomal bozukluk oranları benzer bulunurken, yüksek fertilite grubuna nazaran düşük fertilite grubunda 'diğer' ve 'toplam' morfolojik bozukluk oranları önemli derecede daha yüksek bulundu (Tablo 2,  $P<0.05$ ). İnkübasyon ısı ve süreleri göz ardı edilerek yapılan analizde, boğaların bireysel NRR skorları ile 3. penetrasyon aralığındaki spermatozoon sayıları ( $r=+0.117$ ,  $P<0.05$ ) ve motilite ( $r=+0.328$ ,  $P<0.01$ ) arasında önemli derecede pozitif, akrozomal bozukluk

( $r=-0.192$ ,  $P<0.01$ ), diğer morfolojik bozukluk ( $r=-0.407$ ,  $P<0.01$ ) ve toplam morfolojik bozukluk oranları ( $r=-0.426$ ,  $P<0.01$ ) arasında önemli derecede negatif korelasyon bulundu. Her bir inkübasyon ısı ve süre grubu için ayrı ayrı yapılan analizlerde ise sadece  $41^{\circ}\text{C}$  ısı ve 15 dakika sürede yapılan inkübasyonda fertilite grupları ile 3. penetrasyon aralığındaki spermatozoon sayısı arasında önemli derecede pozitif korelasyon bulundu ( $r=+0.262$ ,  $P<0.05$ ).

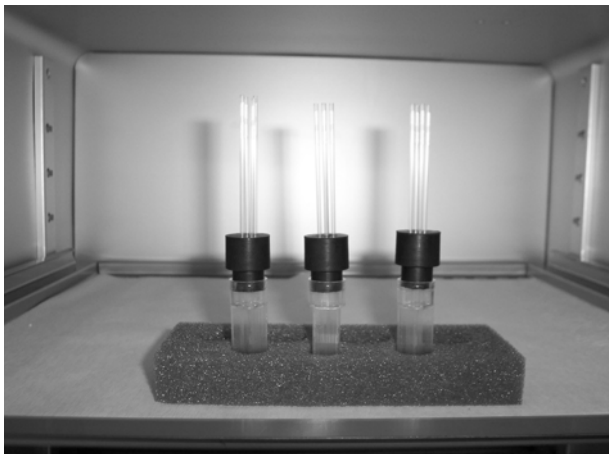
**Tablo 2. Eritme sonrası spermatolojik özelliklerin ve NRR skorlarının fertilite grupları arasında karşılaştırılması.**

Fertilite grupları	Motilite (%)	Morfolojik bozukluklar (%)			NRR (%)
		Akrozom	Diğer	Toplam	
Yüksek	59.5 <sup>a</sup>	2.8 <sup>a</sup>	8.8 <sup>a</sup>	11.7 <sup>a</sup>	77.6 <sup>c</sup>
Düşük	57.0 <sup>a</sup>	3.7 <sup>a</sup>	11.9 <sup>b</sup>	15.6 <sup>b</sup>	68.0 <sup>d</sup>

Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (<sup>ab</sup>:  $P<0.01$ , <sup>cd</sup>:  $P<0.05$ ).



**Şekil 1. Mukusun Payete Çekilmesi**



**Şekil 2. Mukus Penetrasyon Testinde İnkübasyonlar**

## Tartışma

İnsanlarda yapılan çalışmaların aksine (7,14,15), boğa spermatozoonlarının mukusa penetre olma yetenekleri ile fertilite arasında pozitif ilişki bulunamadığı bildirilmektedir (9,10,16). İnsanlardaki CMPT çalışmalarında genellikle fertil ve infertil erkeklerin test sonuçları karşılaştırılmaktadır (7). İnsanların aksine, boğalardaki CMPT çalışmaları çoğunlukla suni tohumlamada kullanılan boğaların spermaları ile yapılmaktadır (9). Ön seçimden geçirildikten sonra spermaları üretildiğinden, ticari boğa istasyonlarındaki boğaların sahadaki fertilite oranları arasındaki fark az olmaktadır (24). Son derece dikkatli planlanan bir çalışmada bile CMPT sonuçlarının, yalnızca fertiliteleri arasında oldukça farklılık bulunan boğalar arasında değişkenlik göstereceği ileri sürülmüştür (16). Sonuçları belirginleştirmek amacıyla çalışmamızda boğalar "yüksek" ve "düşük fertiliteli" olarak gruplandırılmıştır. Fakat gerçekte, bütün boğaların NRR sonuçları yeterli düzeydeydi ve sıralamadaki sonuncu boğa bile %67.1'lik NRR skoruna sahipti. Bu nedenle, diğer araştırmacılar farklı olarak, çalışmamızda boğaların "bireysel NRR değerleri" ile PA3'teki spermatozoon sayıları arasında önemli derecede ( $P<0.05$ ) pozitif ilişki bulunması kıymetli bir veridir. Bu farklılığın nedeni kullanılan test metodlarındaki farklılık ile açıklanabilir. Kapillar tüp yönteminde belirli süreler içerisinde genellikle ya en uzağa giden spermatozoonun kat ettiği mesafe ölçülmekte, ya da 3cm mesafedeki motil spermatozoon sayısı belirlenmektedir. Fakat kapillar tüplerdeki sıvı derinliğinin değişken olması, spermatozoonların mukusa nüfuz etme derecesinin objektif olarak değerlendirilememesine ve spermatozoon sayılarının tam olarak belirlenememesine sebep olabilmektedir. Çalışmamızda ise belirli ısı ve sürelerde, belirli mesafelere kadar ulaşabilen toplam spermatozoon sayısı değerlendirilmiş ve sayım işlemi payet dışında (lam-lamel arasında) yapılmıştır. İnsana bağlı farklılıkları oldukça azaltması ve basit olması gibi nedenlerle, bu yeni CMPT yönteminin standardize edilmeye oldukça yakın olduğu söylenebilir. Metot'taki tek değişken servikal mukustur. Servikal mukus yerine kullanılabilecek içeriği sabit sentetik medyumların kullanılması durumunda bu yöntem

belki daha da standart hale getirilebilir. Fakat bunun ortaya konabilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Donmuş boğa sperması kullanılarak CM içerisinde en uzağa giden spermatozoonun kat ettiği mesafenin ölçüldüğü çalışmalarda, farklı araştırmacılar 14 ile 58.7 mm arasında değişen sonuçlar rapor edilmiştir (9, 10, 11, 18). Ayrıca in-vitro koşullarda boğa spermatozoonlarının CM içerisindeki ortalama hızlarının 48.6–62.6 µm/sn olduğu bildirilmiştir (17). Bu veriler ışığında, PA3'ün oldukça uzak mesafeleri (50–52.5 mm) kapsadığı söylenebilir. Bunun yanında PA3'e en son ulaşan spermatozoonun 50. mm'ye 15 dakikada ulaştığı düşünülürse, PA3'teki spermatozoonların ortalamanın üzerinde bir hız (>55.6 µm/sn) sahip oldukları söylenebilir. Yüksek ısının spermatozoonların hızını ve bütün biyolojik olayların hızını arttırdığı (20, 21) ve inkübasyon esnasında 2°C gibi küçük ısı değişikliklerinin bile spermatozoonların mukusa penetrasyon yeteneklerini önemli derecede etkilediği bildirilmiştir (1). Penetrasyon aralıklarındaki spermatozoon sayıları genel olarak incelendiğinde (Tablo 1), inkübasyon ısı arttıkça PA1'deki spermatozoon sayısının arttığı, PA2'deki spermatozoon sayısının 39°C'de artma, 41°C'de ise azalma eğiliminde olduğu, PA3'te ise her iki fertilité ve inkübasyon süre grubunda ısı arttıkça spermatozoon sayısının azaldığı görülmektedir. Bu da, muhtemelen ısı artışı ve buna bağlı hareket artışı nedeniyle, spermatozoonların büyük çoğunluğunun PA3'e ulaşmadan enerji rezervlerini

tükettiklerini düşündürmektedir. Dolayısıyla, 41°C gibi yüksek sayılabilecek bir ısıda 15 dakikada PA3'e ulaşabilen spermatozoonların doğrusal ve güçlü bir harekete, yüksek hızlara ve yeterli enerji rezervlerine sahip oldukları söylenebilir.

Dişi genital kanalında yapılan eliminasyon neticesinde, sadece yüksek kalitedeki çok az sayıda spermatozoon fertilizasyon bölgesine ulaşabilmektedir (25). Çalışmamızda, 41°C ısı ve 15 dakika sürede yapılan inkübasyonda düşük fertilité grubuna oranla yüksek fertilité grubunda PA3'te önemli derecede daha fazla sayıda spermatozoon saptandı (P<0.01). Bu ve diğer veriler, yüksek ısı ve kısa süreli inkübasyon uygulanarak yapılan CMPT'de uzak mesafelere kadar ulaşabilen spermatozoon oranının, fertilizasyon bölgesine ulaşabilecek kapasitedeki spermatozoon oranını yansıtabileceğini akla getirmektedir. Daha önceki bir çalışmada, in-vitro olarak CM içerisindeki sperm göçünün keçilerde tuba uterina'ya ulaşabilme kapasitesine sahip spermatozoon oranını yansıtabileceği gösterilmiştir (26).

Sonuç olarak bu çalışmadan; geliştirilen bu yeni CMPT yönteminin standardize edilmeye elverişli olduğu ve boğaların potansiyel fertilitelerinin belirlenmesinde rutin testlerle (motilite, morfoloji vb) birlikte kullanılabilirliği kanaatine varılmıştır.

## Kaynaklar

1. Paul G, Stumpf PG., Lloyd T. In vitro penetration of human sperm into bovine cervical mucus: effects of sperm washing and exposure to low temperature. *Obstetrics and Gynecology* 1985; 65(1): 42–45.
2. Correa JR, Pace MM, Zavos PM. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology* 1997; 48: 21–731.
3. Graham EF, Schmehl MKL, Nelson DS. Problems with laboratory assays. *Proc 8th Tech Conf AI Reprod NAAB* 1980; 1–8.
4. Stålhammar EM, Janson L, Philipsson J. The impact of sperm motility on non-return rate in preselected dairy bulls. *Reprod Nutr Dev* 1994; 34: 37–45.
5. Hirano Y, Shibahara H, Obara H, et al. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *J Assist Reprod Genet* 2001;18: 213–8.
6. Eggert-Krause W, Gerhard I, Tilgen W, et al. Clinical Significance of crossed in vitro sperm-cervical mucus penetration test in infertility investigation. *Fertil Steril* 1989; 52 (6): 1032–1040.
7. Keel BA, Schalue TK. Correlation of the bovine cervical mucus penetration test with human sperm characteristics in 1406 ejaculates. *Arch Androl* 2000; 44: 109–115.
8. Kremer J. A simple sperm penetration test. *Int J Fertil* 1965; 10 (3): 209–215.
9. Matousek J, Řiha J, Sršeň V, et al. Penetration of cervical mucus and other body fluids by bull sperm in capillary tubes. *Anim Reprod Sci* 1989; 18: 161–166.
10. Galli A, Basetti M, Balduzzi D, et al. Frozen bovine semen quality and bovine cervical mucus penetration test. *Theriogenology* 1991; 35 (4, abst.): 837–844.
11. Anilkumar R, Devanathan TG, Pattabiraman SR, et al. Correlation between the spermatozoal characteristics and sperm penetration distance in polyacrylamide gel and bovine cervical mucus. *Theriogenology* 2001; 55: 685–691.
12. Yogev L, Gamzu R, Paz G., et al. Improvement in the cervical mucus penetration test by using standart sperm control. *Arch Androl* 1999; 43: 253–257.
13. Pandya IJ, Mortimer D, Sawers RSA. Standardized approach for evaluating the penetration of human spermatozoa into cervical mucus in vitro. *Fertil Steril* 1986; 45 (3): 357-365.
14. Alexander NJ. Evaluation of male infertility with an in vitro cervical mucus penetration test. *Fertil Steril* 1981; 36: 201–208.
15. Hull MGR, McLeod FN, Joyce DN, et al. Human in vitro fertilization, in vivo sperm penetration of cervical mucus and unexplained infertility. *Lancet* 1984; 2: 245–248.
16. Verberckmoes S, Van Soom A, De Pauw I, et al. Migration of bovine spermatozoa in Synthetic medium and its relation to in vivo bull fertility. *Theriogenology* 2002; 58: 1027–1037.

17. Anilkumar R, Devanathan TG. Correlation between white side test for quality of cervical mucus and sperm penetration test. *Indian Vet J* 1996; 73: 1099-1100.
18. Okuda K, Murase S, Sato K, et al. Penetration ability of bull spermatozoa into bovine cervical mucus. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination 1988; 3: 279-280.
19. Herman HA, Madden FW. Evaluation of semen-incubation test. In: *The artificial insemination of dairy and beef cattle (including techniques for goats, sheep, horses and swine)*, Fourth Edition. Sherman, Texas, 1972.
20. Fiser PS, Hansen C, Underhill L, et al. New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 1991; 28: 454-459.
21. Tardif S, Laforest JP, Cormier N, et al. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology* 1999; 52: 447-458.
22. Doğan, İ. Döl Tutmayan inek ve düvelerde penetrasyon testinin kullanım olanakları. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Bursa 1994.
23. Dabas VPS, Maurya SN. A field method of collection of bovine cervical mucus for microbiological studies. *Indian J Anim Reprod* 1988; 9: 138-139.
24. Hallap T, Hård M, Jaakma Ü, et al. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility. *Theriogenology* 2004; 62: 702-713.
25. Saacke RG. Components of semen quality. *J Anim Sci* 1982; 55 (Suppl 2):1-13.
26. Cox JF., Martínez C., Lagos S, et al. Sperm migration in cervical mucus in goats. II relationship with colonization of the oviduct and fertilization efficiency. *Theriogenology*, 1997; 47 (Abst.): 254.