



## **BİDGE Yayınları**

Sağlık Bilimlerinde Teorik Bilgiler ve Güncel Akademik Konular

**Editör:** Doç. Dr. EBRU BİLEN

ISBN: 978-625-6645-44-8

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 25.12.2023

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](http://www.bidgeyayinlari.com.tr) - [bidgeyayinlari@gmail.com](mailto:bidgeyayinlari@gmail.com)

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

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



## ÖNSÖZ

“Sağlık Bilimlerinde Teorik Bilgiler ve Güncel Akademik Konular” isimli kitapta yer alan bölümler hayvan sağlığı ve güncel araştırmalar konusundaki çalışmalarını içermektedir. Veteriner hekimliğinin temel prensiplerini, modern uygulamalarını ve sektördeki güncel gelişmeleri kavramak isteyen okuyucular için tasarlanmıştır. Kitabın hazırlanmasında katkı sağlayan tüm akademisyenler, kendi alanlarında uzmanlık ve deneyim sahibi veteriner hekimlerdir. Umuyoruz ki, bu kitap, veteriner hekimlikle ilgili bazı konularda temel bilgiler edinmek isteyen herkes için değerli bir kaynak olacaktır. Kitabın hazırlanmasında emeği geçen akademisyenlere ve yayınlanmasına katkı sağlayan BİDGE yayınevi ve çalışanlarına teşekkür ederiz.

*Aralık 2023*

**Editör**

Doç. Dr. EBRU BİLEN

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	3
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>4</b>
Veteriner Obstetrikte Kullanılan Aletler .....	6
Atilla YILDIZ.....	6
Süt İnekçiliği Mastitinde Tanısal Yaklaşımlar.....	33
Atilla YILDIZ.....	33
Koyun ve Keçilerde Embriyoların Kriyoprezervasyonu .....	78
Ayşe Merve KÖSE.....	78
Sakine Ülküm ÇİZMECİ.....	78

Sperma Sulandırıcıları Üzerine Antioksidanların Etkisi.....	97
GÖKHAN KOÇAK .....	97
Cengiz YILDIZ .....	97
Spermatik Kord ve Hastalıkları.....	115
Volkan KOŞAL .....	115
In Vitro Embryo Production with Ovum Pick-Up (OPU) in Cattle and Factors Affecting Success .....	128
Sakine Ülküm ÇİZMECİ.....	128
Ayşe Merve KÖSE .....	128

# BÖLÜM I

## Veteriner Obstetrikte Kullanılan Aletler

**Atilla YILDIZ<sup>1</sup>**

### Giriş

Obstetrik manevraların çoğunda insan gücü yetersizdir ve araçlara başvurulması gerekmektedir. Günümüzde Veteriner obstetrik hızla genişleyen bir branş haline gelmiş ve bu alana her geçen gün yeni prosedür, cihaz ve aletler eklenmektedir. Veteriner obstetrikte kullanılan aletler, veteriner obstetrixin talepleri ve ihtiyaçları doğrultusunda tasarlanarak üretilen ürünlerden oluşmakla birlikte, doğum uzmanlarının görüşlerinin farklılık gösterebileceği bir alandır. Bir kişinin gereksiz olduğunu düşünebileceği, diğerinin ise onsuz bir obstetrik vakaya yaklaşmayacağı araçlar vardır (Hopper, 2021). Veteriner hekimler koşullara bağlı olarak çeşitli doğum aletleri ve malzemeleri kullanırlar. Veteriner obstetrik aletlerinin tasarımı basit olmalı, pratikte karşılaşılabilecek tüm anormal durumlarda iş görmeli ve daha az deneyimli kişiler tarafından,

---

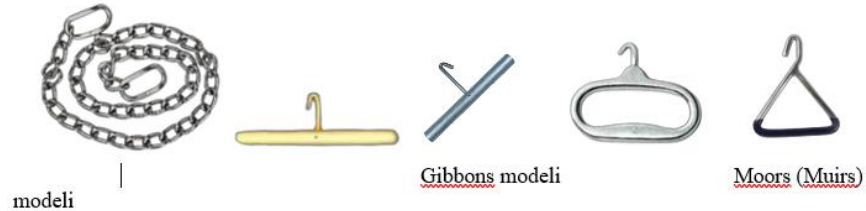
<sup>1</sup> Prof. Dr., Fırat Üniversitesi

anneye zarar verme tehlikesi olmadan kullanılabilir. Genel olarak obstetrik aletler vajinal doğum, ameliyat veya fetotomiye özeldir (Smith, Hostetler & Westphal, 2009) Temel obstetrik kit ihtiyaçları arasında en az iki obstetrik zincir, iki tutacak, bir fetal çıkarıcı, bir Krey çengeli ve temel ameliyat çantası bulunur. Epizyotomi, tek uzantının alınması (kısmi fetotomi), sezaryen gibi işlemler için temel bir ameliyat paketine ihtiyaç vardır (Hopper, 2021). Yukarıda kısaca belirtilen tüm aletler, pek çok uygulayıcı tarafından gerekli görülen obstetrik araçlardır. Bu enstrümanların tamamının, spesifik yönetime uyum sağlayan deneyimli uygulayıcıların elinde kullanılabileceği yaygın kullanımlarıyla kanıtlanmıştır. Bu bölümde, veteriner obstetrikte kullanılan aletler ve onun resimleri ile kullanımlarını tanımlamanın çok açık ve basit bir şekilde sunulması obstetrik operasyonların manevrası için gerekli olan çeşitli obstetrik ekipmanlara aşinalık oluşturacağı düşünülmektedir.

Fetüsün çekilmesi veya çıkarılması için kullanılan aletler, ensizyon veya kesip çıkarmak için fütotomide kullanılan aletler, itme ve döndürme için kullanılan aletler ve çeşitli ekipmanlar olmak üzere obstetrik aletler çeşitli kategorilere ayrılır (Kumar, 2009).

### Çekiş için kullanılan aletler

**Doğum zinciri ve zincir tutucuları (Tutaç/tutucu sap/elcik)**



Buzağının doğumuna yardımcı olmak için kullanılırlar. Bu kısıkaçlara bir alternatiftir. Zincirler, yavrunun bacaklarına travma gelmesini önleyen düz halkalardır. Zincirler sağlam, paslanmaz, tercihen pürüzsüz olmalıdır. Paslanmaz çelikten yapılmış olanlar tercih edilmelidir. Daha ucuz olan krom kaplı zincirlerde krom

zamanla korozyona uğrayarak zincirlerin paslanmasına neden olacağı için bu tür zincirlerden kaçınılmalıdır. Buzağların alt uzuvlarına uyacak şekilde yapılmış kavisli uç halkasına sahip, 75-150 cm uzunlukta ve rahat uygulanabilir olmalıdır. Obstetrik zincirler 53, 76, 114 ve 152 cm uzunluklarda elde edilebilmektedir. Temizlenmesi ve sterilize edilmesi kolay olmalıdır. Tutaçlara kolaylıkla takılıp bağlanabilecek nitelikte olmalıdır (Estill, 2020; Hopper, 2021).

Tutaçlarda, optimum yön ve çekme gücü için herhangi bir bağlantıda zincirlere uyan bir kanca bulunur. OB kulpları - D halkası şeklindeki kulpların (Moore'un/Muir'in OB kulpları) kullanımının acı verici olması ve iki elin aynı anda kullanımını veya tutuşunu kısıtlamadan çok fazla güç uygulamanın imkansızlığı sebebiyle kullanışsızdırlar. Bunun yerine, daha geniş bir tutuş sağlayan ve daha fazla çekiş uygulanmasına olanak tanıyan boru tipi tutaçları (T-bar/Gibbon'un tutacakları) daha kullanışlıdır. Bir tutaç olarak, bir süpürge sapı veya silindirik bir tahta parçası veya metal borudan yapılmış birkaç tutaç iyi sonuç verir. Sadece iki adet 12 inçlik parça kesilir, obstetrik zincire bir kayma düğümü yapılır ve sap kayma düğümünün halkasına sokulur. Kavrama ve çekiş kuvvetini arttırmak için her iki el de kullanılabilir ve operatörün rahatsızlığını azaltır (Estill, 2020).



Anterior presentasyonlarda doğum zincirleri kısırak yavrularında bukağılık çukurluklarına inek yavrularında ise topuk oynacı üst kısmına, uçlarındaki halkalar yardımıyla kolayca tespit olunur. Zincir veya ip uygulanırken yavrunun zarları bunu engelliyorsa kesilebilir, yırtılabilir veya bir tarafa çekilebilir (Akşit, 1975).



Bukağılık çevresine çekiş uygulamasından önce zincir sıkı bir şekilde bağlanmalı veya tırnağın koroner bandı üzerinden aşağı kaydırılmamalıdır. Aksi taktirde tırnak çekilmeye bağlı olarak çıkabilir. Zincirlerin topuğun üst kısmına tatbiki yeğlenmelidir. Nadir durumlarda kemiğin epifiz bölgesinde yoğun çekme ve zincirin sıkışması nedeniyle bacakta kırık meydana gelebilir. Bu sebeple doğum zinciri topuk eklemine yukarısına veya bukağılık çevresine yerleştirilmelidir. Bu sayede zincirin koroner bant üzerinden aşağı kaymasının önüne geçilir ve güç her iki tarafa da dağıtılır. (Alaçam, 2010; MEB, 2017).

Bir sığır fetüsüne obstetrik zincir uygulamanın en yaygın yöntemi, zincirin ilmeğini topuk eklemine üzerine yerleştirmek ve bukağı çevresine yarım bir bağlama yerleştirmektir. Ekstremitenin dorsal yüzüne traksiyon uygulanır (Kılıçoğlu & Alaçam, 1985).

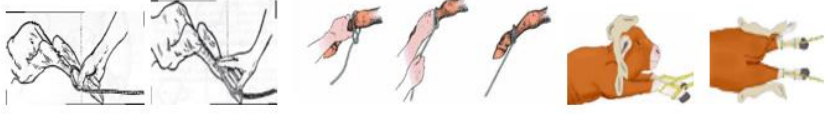
### **Doğum İpleri**



Doğum ipleri alt çeneye, başa, boyuna ve ayaklara kolaylıkla bağlanabildiğinden ve diş ve tırnaklara zarar vermediğinden zincirlere göre daha güvenlidir. (MEB, 2017).

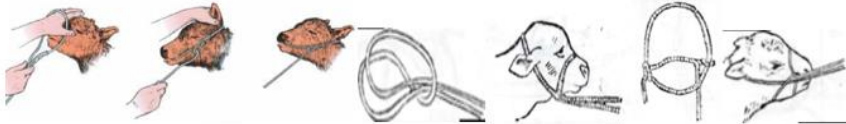
Büyük dişilerde kullanılacak doğum ipleri 1,5 m kadar uzunlukta yarım ile bir cm kalınlıkta kendir veya naylondan yapılmış sağlam ve yumuşak olmalıdır. Kaynatılabilmeli ve dezenfektan solüsyonlar içine konulduğunda sertleşmemelidir. İpin bir ucu halka

teşkil etmeli veya madeni bir halka buraya yerleştirilmiş olmalıdır (Erk, Doğaneli & Akkayan, 1980) .



Bu ipler genellikle yavruyu çekip çıkarmada buzağılarda bukağılık çukurluğunun yukarısına (metatarsus ve metekarpuslar üzerine) veya taylarda bukağılık çukurluğuna yerleştirilir. Bu manipülasyon için ipin ucu diğer uçtaki halkadan geçirilir. Meydana gelen hareketli ilmek sıkıca ekstremitelere yerleştirilir. Başa geçirilecek ipler yular başlık tarzında tatbik edilir. Yavrunun alt çenesine geçirilen ipler ne kadar hafif çekilirse çekilsinler çeneyi ve kesici dişleri parçalayacağından bu pratik bir uygulama değildir. Yavruya bağlanan ipler çıplak elle yeteri kadar çekilemeyeceği gibi elleri de yaralayabileceğinden serbest uçları sopalara bağlama suretiyle çekme kolayca yapılır (Akşit, 1975).

Bu ipler başı çekmek ve düzeltmek için çeşitli ilmek ve yularlar halinde de kullanılabilir.



İpler kullanımdan önce dezenfekte edilmelidir. İplerin genellikle bir ucunda, ipi geçirmek ve bir halka oluşturmak için bir ilmek mevcuttur. İlmek bulunmuyorsa dışarıda bir düğüm yapılır. Çekmek için bir halat ya da zincir tutacı kullanılabilir (MEB, 2017).

Önden gelişlerde iplik alt mandibulaya takılabilir. İpin kaymasını önlemek için sıkı bağlanmalı ve yoğun çekmelerden kaçınılmalıdır. Aksi taktirde kırık şekillenebilir. Çekme tek kişi tarafından orta derecede kuvvet kullanılarak güvenli bir şekilde yapılabilir. Fetüsün ölmüş olduğu durumlarda başın arkasından

boyna zincir geçirilerek çekme nadiren uygulanır. Bu durumda yavrunun başı ve ağızı elle yönlendirilerek çekilmelidir. Bu uygulama canlı yavrularda tehlike arzeder. Oksipital bölgedeki omurlara ve omuriliğe hasar verebilir. Kedi ve köpeklerde fetüsün çekilmesi için 2.5-5 cm uzunluğunda steril gazlı bez kullanılabilir (Erk, 1967; MEB, 2017).

### **Buzağı Kıskaçı/Kapanı**



Buzağının doğumuna yardımcı olmak için kullanılmaktadır. Bu naylon kaplı kablo, bağlı olduğu vücut kısmında sıkılmayan bir kilitleme cihazı ile donatılmıştır. Distosi ile uğraşırken fetüsün farklı bölgelerine kıskaç uygulamak için kullanılır. Bu, bir kafayı uygun hizaya getirmek ve buzağı doğana kadar yerinde tutmak için çok yararlıdır. Buzağıda baş ve ayağa traksiyon (çekiş) uygulamak için kullanılabilir. Buzağı başı kıskaçı, zorla çıkarma sırasında baş ve boyun hizasını korumak için kullanışlıdır. Boyundaki sinirlerin hasar görmesini önlemek için kafaya aşırı kuvvet uygulamaktan kaçınılmalıdır (Estill, 2020).

### **Bovine OB Kıskaçı**



Bovine OB Snare, cerrahi ihtiyaca bağlı olarak daha küçük veya daha büyük hale getirilebilen ayarlanabilir bir kafa halkasına sahiptir. Bu kıskaç, ilmeğin boyutunu ayarlayan kayan bir boyunduruğa sahiptir (Anonim 1, 2023).

## Kuzulama Aleti



Doğum kanalından bir kuzunun doğumuna yardım etmek amacıyla kullanılır. Kuzunun ön bacaklarının çevresine bir halka yerleştirilir ve koyunun kasılması nedeniyle kuzu kolayca dışarı çıkarılır. Kıskaç özellikle annenin leğen kemiğinin dar ve deforme olduğu durumlarda veya kuzunun olağanüstü büyük bir kafası olduğu ve geçitte el, kuzu kafası ve ön ayaklar için yeterli yer olmadığı durumlarda kullanışlıdır. Ayrıca kuzu kafasının rahim içinde geriye bükülü kaldığı durumlarda da faydalıdır (Anonim 1, 2023).

## Domuz Kıskaçı



Büyük domuz yavruları doğum tuzağı kullanılarak doğurtulabilir. Obstetrik kıskaç, kıskaçın üst ucunda bir halka oluşturacak şekilde ikiye katlanmış, paslanmaz çelik, plastik kaplamalı bir tel üzerinde birbirine sabitlenen iki esnek plastik tüpten oluşur. Telin diğer ucunda plastik bir sap bulunur. Halka domuz yavrusunun başının, üst çenesinin veya arka bacaklarının üzerine yerleştirilebilir. Anterior presentasyonlar için halka üst çenenin çevresine (Şekil 1) veya kulak arkasına yerleştirilir. Bu durumda çekme sırasında boynun güçlü fleksiyonunu önlemek için plastik tüpün üst ucu mandibulanın altına yerleştirilmelidir (Şekil 2).

Tel halka her iki tarafta çene kemiğinin ventral kenarı boyunca uzanır ve plastik tüpün üst kısmı domuz yavrusunun çenesinin altına ayarlanır. Posterior presentasyonlar için, kıskaçın halkası dizlerin üzerine sabitlenir (Şekil 3). Bir kişi tuzağın sapını tutar ve diğer kişi (veteriner hekim) halkayı domuz yavrusunun başının veya bacaklarının etrafına sabitler. Daha sonra domuz yavrusunu doğurmak için aşağı doğru bir hareketle çekiş uygulanabilir (Schuh & Kurth, 2005).



Şekil 1. Kıskaçın üst çeneye uygulanması



Şekil 2. Kıskaçın mandibula altına verleştirilmesi



Şekil 3. Kıskaçın dizlerin üzerine sabitlenmesi

### Fötal Ekstraktor (Doğum Krikosu)



HK buzağı çekme makinesi



Vink'in doğum krikosu

Bir buzağının doğumuna yardımcı olmak için kullanılmaktadır. Her iki ucundan uzun bir gövdeye bağlanan ve mekanik olarak kaldırılıp indirilebilen büyük bir metal levhadan oluşur. Kol bölümü üzerindeki kayış, ineğin kalçalarının üzerine yerleştirilmiştir. Obstetrik zincirleri veya kayışları buzağının bacaklarına takılır. Buzağı çekicinin shaftı boyunca, kabloyu bir makaraya saran bir mandala bağlı bir kablo bulunur. Kablo, obstetrik zincirlerine takılır ve kullanıcı, ineğin kasılmaları ile ve doğru açılarda çalışırken, buzağıyı ineğin içinden nazikçe çıkarır. Buzağının hem omuzları hem de başı (üç şey), buzağı krikosu

kullanılmadan önce elle pelvise yerleştirilmelidir (Sonsthagen, 2019).

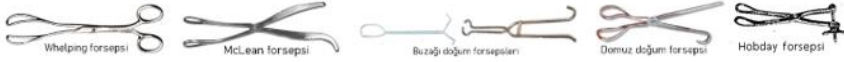
Doğru kullanıldığında çok faydalıdır. Zincir veya ipler fetusa bağlandıktan sonra cihazın kolu sırayla yukarı aşağı kaldırılıp indirilmek suretiyle traksiyon uygulanır. Fetusun yukarı-aşağı, sağa-sola hareket ettirilebilmesi nedeniyle büyük avantaj sağlar.

Doğum krikosu epidural anestezi altında ve dikkatli kullanılmalıdır. Doğum kanalındaki aşırı basınç sebebiyle ana ve yavruda hasar meydana gelebilir. Canlı fötüsta solunum başlamışsa, işlem esnasında solunum kaslarında şiddetli gerginlik nedeniyle oluşabilecek asfeksinin önlenmesi için belirli bir dinlenme süresinden sonra cihaz aralıklı olarak kullanılmalıdır (MEB, 2017).

Buzağı krikosuyla bir buzağıya 2500 lb'ye (1000 kg) kadar germe uygulanabilir, bu da hem buzağıya hem de anaya zarar verir. Bununla birlikte, doğru kullanıldığında, operatörün minimum eforuyla buzağıya kontrollü, yönlendirilmiş, aralıklı kuvvet uygulanmasına yardımcı olabilir. Ön bacakları aynı anda tek omuzdan dışarı doğru hareket ettirebilme özelliğinden dolayı çift etkili tipi tavsiye edilmektedir. Kranial prezentasyonlu bir vakada kullanıldığında, buzağıyı çıkarmak için ön bacaklara dönüşümlü olarak traksiyon uygulanırken, buzağının başını ve boynunu yönlendirmek için bir kafa k kısıkaçı yerleştirilmesi önerilir. Çoğu inek, krikoyla çekiş uygulandığında hemen yatar, bu nedenle krikoyu takmadan önce ineği sağ tarafına yatırmak genellikle iyi bir fikirdir. Çekiş uygulamanın yolu, zincirlerdeki boşluğu almak, ardından krikonun uzak ucuna yavaşça aşağı doğru kuvvet uygulamaktır. Buzağı geriye doğru ilerledikçe zincirlerin gevşekliğı alınıp işlem tekrarlanır. Omuzlar vulvayı geçene kadar bu yapılmaya devam edilir. Bu noktada buzağı döndürölür, boşluk alınır ve krikonun ucu memeye doğru veya ineğin arka bacakları arasına doğru çekilir. Bu, kalça kilitlemesini önleyecek ve buzağının doğum kanalının normal yayını takip ederek doğurmasını sağlayacaktır. Buzağı posterior presentasyondayken, buzağının kalçaları vulvadan çıkana kadar düz bir şekilde geriye doğru

kaldırmaya başlanır, ardından krikonun uzak ucu memeye doğru ve ineğin arka bacaklarının arasına çekilir (Estill, 2020).

## Forseps

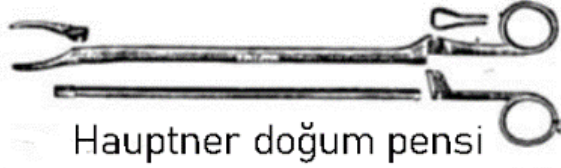


Annenin itici kuvvetlerinin fetüsün güvenli bir şekilde doğumunu sağlamak için yeterli olmadığı durumlarda, fetüsün başının çekilmesini ve dönmesini sağlayan bir alettir. Bir nevi kuvvetli penstir. Kolları bazılarında delikli, bazılarında deliksizdir. Yavrunun başını kavrayacak şekilde çukur veya oyuktur. Veteriner obstetrikte koyun, keçi, domuz, köpek ve kedilerde nabız bulunan göbek kordonunun prolapsusu durumu, anormal geliş ve pozisyonlarda, büyük boyutlu fetal kafa vakalarında ve doğumun uzamış 2. evresi vakaları gibi fetüs için tehlikeleri gidermek amacıyla çok çeşitli forsepsler kullanılmaktadır. Ön kısım yarı kavisli, yuvarlak ve pürüzsüzdür, bu da fetal doku veya genital sistemin yaralanmasını önler; genellikle fetüsün başı forseps ile çekilir (Sonsthagen, 2019).

Güç doğumda hayvan türlerine göre farklı boyutlarda forsepsler kullanılmaktadır. Köpeklerde Roberts'in ipten forseps, çift çeneli forsepsler, Hobday tipi forsepsler veya sponj forsepsler kullanılmaktadır. Küçük hayvanlarda Moller'in doğum forseps, De Bruin'in doğum forseps ve Sewell'in doğum forsepsleri de kullanılmaktadır. Çift çeneli forsepslerin tutulacak kısımlarında küçük bir çıkıntı bulunur bu da gevşemeyi önler ve mukozayı delmez (MEB, 2017). Metal forsepsler canlı fötüslere uygulanırken dikkatli olunmalıdır. Doğum kanalı ve yavruda kolayca hasar oluşabilir. Anada alt uterin segment, serviks, vajina ve perinenin travmatik lezyonları, Simfizinin ayrılması, Sakro-iliak eklem çıkığı, koksiks kırığı veya çıkığı gibi kemik yaralanmaları, doğum sonrası travmatik kanama ve veziko-vajinal fistül; yavruda yanlış yerleştirilmiş forseps çeneleri nedeniyle yumuşak doku sıkışması veya kafatası yaralanması gibi komplikasyonlar şekillenebilir, bu

nedenle çekmeden önce çenelerin kapalı ve kilitli olduğundan emin olmalıdır (Anonim 2, 2023).

### **Doğum Pensi**



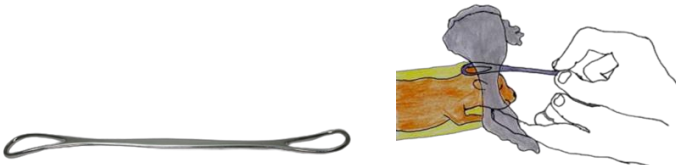
Daha çok kedi ve küçük boy köpeklerin güç doğumlarında işe yarayan doğum pensisi santimetre taksimatlı bir sapın ucunda oynaklı ve pürüzlü bir kısma sahiptir. Parmaklarla pens uçları açılıp kapanabilir. Sol elin parmakları rehberliğinde pensin ucu vaginadan yavruya kadar yöneltilir ve güç doğuma sebep olan bölge üzerine pens yerleştirilerek yavru dışarıya çekilir. Birçok olaylarda bu aletle istenen sonuç sağlanabilir (Erk, 1967).

### **Domuz Doğum Penseti**



Bir domuz yavrusunu doğurtmaya yardımcı olmak için kullanılır. Menteşeli, eğimli alan, rahim içinde değil, bir başı veya kalçayı kavrayabilmesi için açılacak şekilde tasarlanmıştır (Sonsthagen, 2019).

### **Çubuk/Bar(Vectis)**





Uzun saplı ve sap uçları oval delikli bir alettir. İki halkanın yüzü zıt yönlerde olup sap ile 15°'lik bir açı yapar. Sapın uçları yavrunun başına uyum sağlayacak şekilde çukur veya oyuktur. Veteriner obstetrikte genel olarak küçük cüsseli köpekler ve kedilerde kullanılmaktadır. Çubuk oksiput veya fetüsün başka bir belirgin kısmı üzerinden geçirilir ve pelvise veya parmağa sert ve hafif bir baskı uygulayarak fetüs vajinaya doğru çekilir (Sonsthagen, 2019; Purohit, 2022).

### Çengeller

Güç doğumlarda yavrunun çıkarılması için kullanılan çengeller saplı, sapsız, küt veya sivri uçlu, tek veya ikili olabilirler. Çengeller yavruyu yakalamak için en iyi bir vasıttır. Çengeller kullanılırken çok dikkatli olunmalıdır. Bir el daima tesbit edildiği yerden kaymamasını sağlamak için vaginada bulundurulmalıdır. Çengeller orbitalara, mandibulaya, columna vertebralis'e palatinum'a takıldığı gibi kas kitlesi içine de takılabilir (Erk, 1967). Ucu sivri çengellerin genital yol içerisinde taşınması sırasında sivri ucu mantarla kapatılmalıdır. İple birlikte daima kısa çengeller kullanılmalıdır. Ucu sivri çengeller sıklıkla operatörün veya hayvanın yaralanmasına neden olur. Bu nedenle ölü fetüste kullanılmalıdır. Canlı fetüste çoğunlukla küt çengeller kullanılır (Kumar, 2009).

### Göz Çengelleri



Ölü fetüslerde keskin göz çengeli, canlı fetüslerde ise kısa saplı, küt tipi (Ostertag's/Harms) yavrunun canlı olduğu durumlarda kullanılırlar. Göz çengelleri, baş/boyun büküldüğünde ve kafa kısıkcı yerleştirilemediğinde çok işe yarar (Erk, 1967). Göz çengeli canlı ya da ölü yavrularda göze uygulandığında kafayı çekme işlemi kolaylıkla yapılabilir. Çengellerde bir halka ile tutturulmuş bir parça naylon halat kullanılır. Çengel gözün medyan kantusuna 45° açı ile

uygulanır ve dışarıdan bir yardımcı sürekli çekme işlemi uygulayarak halatı gergin tutar, böylece çengel yerinden çıkmaz aksine daha iyi yerleşir (Sonsthagen, 2019).

***Ostertag Küt Göz Çengeli***, sterilize edilebilen ve yeniden kullanılabilen, ısıyla sertleştirilmiş cerrahi sınıf paslanmazdan yapılmıştır. Bu aletler bir kanca ve bir halkaya sahiptir ve hayvan üreme işlemlerinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Anonim 3, 2023).

***Freyberger çengeli (küt göz çengeli)*** Canlı fetüsün gözünün medial kantusa sabitlenerek kafayı çekmek için kullanılır (Basu & ark., 2021).

***Harris Göz Çengeli***: Çengel, ölü fetüsün çekilmesi için kullanılır. Çengel kesğin arkasına veya gözün iç kantusuna yerleştirilir (Kumar, 2009).

***Viyana Çift Obstetrik engeli***, menteşeli küt bir göz çengeline sahiptir. Küt tasarım, atravmatik obstetrik uygulama için idealdir. Bu enstrümanlar aynı zamanda parmak halkalı sap tasarımına da sahiptir (Anonim 4, 2023).

### **Krey Obstetrik Çengeli (Çok Eklemlı Çekiş Çengeli)**



Krey Schottler'in Çengeline, hareketli bir halkaya sahip 4 adet menteşe bağlantısı (hareketli bağlantı) bulunur. Bu, ölü fetüsün kuvvetle çekilmesi için kullanılır. Kafa veya göz küresine yerleştirilir. Çekiş sırasında kancaları fetüsün dokularına girer ve doğum kanalının yırtılmasını önler. Ayrıca embriyotomi yaparken fetüsü tutmak için de kullanılır. Çengeller, fetusu sabit tutmak için onu kavrar. Bu çengel ölü fötüslerde ve fötotomi operasyonu

esnasında yavruların herhangi bir kısmına kolayca tatbik edilebilir. Fetal ekstremite mevcut olmadığında çekim uygulamak için kullanılır. Her zaman bir iple sabitledikten sonra fetal vücudun kemikli kısmına uygulanır (Basu & ark., 2021).

### **Williams Uzun Obstetrik Çengeli**



#### ***William'ın uzun küt çengeli***

Uzun çengeller, çengelin karşısındaki uçta bir tutaça sahiptir. Genel olarak, uzun çengeller vulvanın dışından opere edilebilir (Kumar, 2009).

#### ***William'ın uzun sivri çengeli***

Embriyotomi operasyonu için kullanılır. Elin ulaşamadığı ve yüzeyin kaygan olduğu fötüsün bölgesini tutmak için. Baş, damak kemeri, omurga ve pelvis üzerine uygulanabilir

Çengellerin sabitlenmesi için başta en iyi yer symphysis mandibulae, damak, göz çukuru, kulak kanalı ve alt çenenin dış açısıdır. Fetüs yaşıyorsa damak kemerine uygulanan kancalar doğum sonrası emme gücünü yaratabilir. Çengellerin sabitlenmesi için omurgada en iyi yer omurganın gövdeleri, bunların enine çıkıntıları (prosesus transversus) veya kaburgalardır. Çengellerin sabitlenmesi için pelviste en iyi yer kotiloid boşluklar, pubis, obturator foramen, sakrum tabanı ve posterior sunumda ilium şaftıdır (Kumar, 2009).

### **Obermayer'in Anal Çengeli**



Uzun bir sap ve bir tarafta göz (halka), diğer tarafta kancadan oluşur. Makat gelişi sırasında kullanılır ve fetüsün çıkarılması için anüs yoluyla fetüsün pelvisine uygulanır veya but bölgesine yerleştirilir (Barman, Das & Chakraborty, 2023).

## Vogel (Alman) Çengeli



Posterior prezentasyon distosisinde fetüsün anüsü yoluyla iskiorektal fossaya uygulanarak traksiyon uygulamak için kullanılır (Anonim 5, 2023)

## Fetüsün parçalarını kesmek (fetotomi) için kullanılan aletler

### Deri altı fetotomide kullanılan aletler

Deri altı fetotomi, 18. yüzyılda fetüsü parçalamak için kullanılan aletlerin kullanıldığı, rahmi korumak ve çekiş noktaları sağlamak için fetüsün cildini sağlam bırakmak için geliştirildi. Bu teknik terk edilerek perkütan fetotomi tekniğine geçilmiştir (Hopper, 2015).

### Gizli Bistürisi/ Korumalı embriyotom



Güç doğumlar sırasında yumuşak dokular üzerindeki ve serviks uterinin sklerozunda yapılacak ensizyonlar ile rahim içindeki ölü bir fetüsün uzantılarını kesmek için kullanılır. Asitli, anasarka veya amfizematöz fetüslerde boyutun küçültülmesi ve kolay doğum için rahim içindeki sıvı veya gazın boşaltılması için fetüste kesi yapmak için de kullanılır. Bıçağın bıçağı doğum kanalı içinde kolay kullanım için saklı veya gizlenmiştir. Kapalı olarak iş göreceği bölgeye kadar götürülür, orada düğmesi itilerek keskin ucu dışarıya

çıkarılır. Böylece istenmeyen yaralanmaların önüne geçilmiş olur (Erk, Doğaneli & Akkayan, 1980).

### Fötotomi Bıçağı / Parmak Bistürisi/ Embriotom



Parmak embriyotomi bıçağı yavrunun derisi ve yumuşak dokuları üzerinde ensizyonlar yapmak ve ayrıca ölü fetüsün farklı yerlerini keserek boyutunu küçültmek ve dışarı çıkarmak için kullanılır. Bunları uterusu manipüle etmede sıklıkla zorluk yaşanır, ancak bunlar doğum telinin kesim için yerleştirilmesine yardımcı olmak, doğuma yardımcı olmak için ölü bir fetüsün içini çıkarmak veya amfizematöz bir fetüste gazı çıkarmak için deriyi veya diğer dokuyu kesmek için yapılabilir. Bıçak, doğum için kafanın hacmini azaltmaya yardımcı olmak amacıyla hidrosefali fetüsün ince kafatasını delmek için kullanılabilir (Dascanio & McCue, 2021). Çeşitli şekilleri vardır. Bu alet avuç içine sığacak şekilde tasarlanmıştır. Yüzük gibi parmağa geçirilecek bir veya iki halkaları bulunur. İşaret parmağı halkanın içine kaydırılır ve bıçağın üst kısmında kıvrılır. Bu, bıçağın kesim için uygun alana yönlendirilmesini sağlar. Parmak halkaya geçirildiği zaman aletin keskin ve sivri ucu avuç içinde gizlenmek suretiye genital kanalın yaralanması önlenmiş olur (Sonsthagen, 2019).

### Spatula



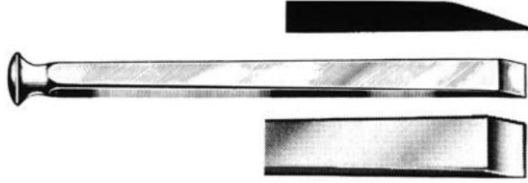
Ufak bir küreğe benzer. Çeşitli biçimleri vardır. Köşeleri yuvarlak ve küt olanlar genital kanalda yaralanmalara sebebiyet vermezler. Deriyi deri altı yumuşak dokulardan ayırmadı kullanılırlar. Deri altı embriyotomi için en yaygın olarak Keller'in yarı keskin spatulası kullanılır. Keller'ın yarı keskin spatulası

özellikle ekstremite dekortikasyonu ve ardından gövdeye bağlı kasların bölünmesi için yararlıdır (Alaçam, 2010).

## **Keski**

Abdominal ve torasik iç çıkarma sırasında cildi ayırmak için kullanılır ve amfizematöz fetüste de kullanılır (Barman, Das & Chakraborty, 2023).

## **Pelvik Keski**

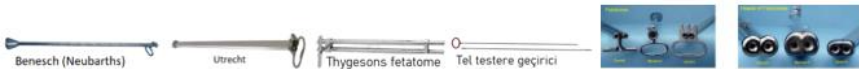


Kalsifiye olmayan pubik simfizi pelvik kanalı genişleterek fetüsün doğmasına izin verecek şekilde ayırmak için kullanılır. Bu, ortopedik osteotomun daha büyük bir versiyonudur. Pelvis tabanındaki vulvanın ventral komissürünün altında küçük bir kesi yapılır. Keski, kasık simfizine yerleştirilir ve bir tokmakla vurulur; bu doğum kanalını genişletir. 26 aylıktan küçük az gelişmiş sığır düvelerinden büyük boy fetüslerin doğurtulmasında kullanılır. Yaşlı hayvanlarda veya sağmal düvelerde endike değildir (Sonsthagen, 2019).

## **Perkütan fetotomide kullanılan aletler**

Perkütan fetotomi, destekli vajinal doğum için fetüsü parçalara ayırmak veya küçük parçalara ayırmak amacıyla deriyi, kasları, kemiği ve bağ dokusunu kesmek için örgülü bir teli testere gibi kullanır.

## **Fötotom**



Ölü bir fetüsü, çıkarılmasına yardımcı olacak şekilde parçalamak amacıyla kullanılır. Fötomun içinden bir obstetrik tel

testere geçirilir; testere ileri geri hareket ederken annenin hassas dokularını korur. Güç doğumlarda yavrunun uterus içinde parçalanarak çıkarılmasını sağlayan bu aletin çeşitli şekilleri vardır. Büyük dişilerin güç doğumlarında çok kullanılan bir fötotomdur (Noakes, Parkinson & England, 2019). Tekniğine uygun olarak kullanılış sırasında genital kanalda hiçbir yaralanma meydana getirmez (Sonsthagen, 2019). Thygessen embriyotomu 70 cm uzunluğunda, birbirine sıkıca sabitlenmiş iki madeni boru ile bu boruların içinden geçen örülmüş paslanmaz çelik telden ibarettir. Her tüpün ön ucu, en sert çelikten yapılmış delikli yuvarlak bir kafa taşır. Başlıklar birbirine ve borulara bağlıdır ve aletin toplam uzunluğu 73 cm'dir (29 ½ inç). Tüpler, alete sağlamlık vermek için üç enine köprü ile birbirine bağlanmıştır ve arkadaki çıkarılabilir bir tutamak taşır. Testere için çelik tel testere kullanılır. Neubarth'ın fetotomu, 75 cm (30 inç) uzunluğunda, iki parça halinde yapılmış ve bir vidalı bağlantı ile bağlanmış tek bir metal borudan oluşur. Kafa mile vidalanmıştır. Aletin baş dahil toplam uzunluğu 80 cm'dir (Kumar, 2009).

Tel testere yavrunun kesilecek kısmına yerleştirildikten sonra elle kontrol edilip keseceği yerden kaymaması sağlanır. Yardımcıya verilen emirle kesme işlemi başlatılır. Kesme işlemi, testerenin sap takılı uçları sırayla kuvvetli olarak geniş kulaçlarla çekilerek yapılır. Böylece yumuşak dokular olduğu gibi kemiklerde kesilir. Uygulaması kolay, çok pratik ve kesin sonuç veren bir alettir (Erk, 1967).

### **Doğum Teli/Tel Testere/Gigli'nin Tel Testeresi**



Ölü bir fetüsün çıkarılmasına yardımcı olmak için eklemelerini parçalamak gayesiyle kullanılır. Paslanmaz çelikten yapılmış, spiral şeklinde üst üste sarılmış, her iki ucunda elle tutmak için tutaçları bulunan ve fetüsü kesmek için kullanılan bir malzemedir. Fetal kısmın amputasyonu için tek seferde yaklaşık 10 fit tel kullanılır. Bu, ileri geri sürüldüğünde kemiği ve siniri kesen, kablo benzeri kaba bir malzemedir. Parçalar çıkarıldığı için buzağı inekten çekilebilir (Sonsthagen, 2019).

### Tel testere geçirici

Montajı için vidalanabilen üç parçadır. Tel testereyi fütotom tüplerinin içinden geçirmek için ucu çentikli ince bir çubuk kullanılır.

### Tel testere sapı



Fetotomi ameliyatı sırasında tel testereyi çekmek için kullanılır. Thygene desenli (düz), Top şeklinde, D şeklinde veya halka şeklinde olmak üzere farklı tipleri mevcuttur.

*Polson'un tel testere sapı:* fetotomi yapılırken tel testereyi sabitlemek için kullanılır. Teli tutmak için kullanıldığı gibi, fetotomi ameliyatı sırasında da sap olarak kullanılabilir.

*T-şekilli tel testere sapı:* Sap, küçük bir deliğe sahip iki metalik yarım küreden ve tel testereyi sabitlemek için metalik bir merkezi vidadan oluşur.

*Top tel testere sapı:* tel testereyi yerine sabitlemek için küçük bir delik ve metalik merkezi vidaya sahip iki metalden oluşur. Sap, normal el manipülasyonlarının imkansız olduğu durumlarda kesilecek fetal kısmın etrafında tel testereyi taşıdığından, testere klavuzu olmalıdır (Anonim 6, 2023).

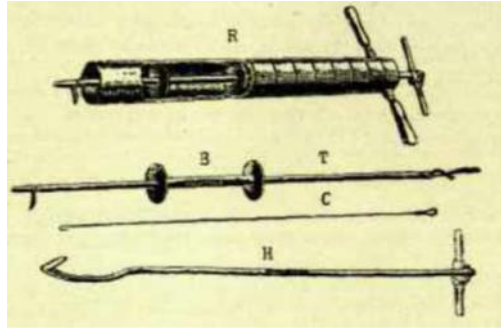


## Obstetrik Tel Kılavuzu/Embriyotom Tel Kılavuzu/Tel Geçirme Aleti/Halat Taşıyıcı



Obstetrik tel kılavuzunun Schrieverers Modeli, Zwick Modeli, Sands Modeli ve Lindhorst Modeli olmak üzere birçok çeşidi mevcuttur (Purohit, 2022). Kavisli bir tutamak, telin geçirildiği ağırlaştırılmış bir ampul yapıyla biter. Obstetrik telini kesim için uygun alana yönlendirmeye yardımcı olmak için kullanılır. Ayrıca bunlar ipleri ya da zincirleri bir organ etrafında dolaştırmada da kullanılırlar. Thygessen'in tel testeresini pelvis etrafında dolaştırırken de bunlardan faydalanılır (Sonsthagen, 2019).

### Vacufat Embritolomu



Berlin'den Profesör Schottler ve Becker'in talimatlarına göre yapılan bu aletin amacı, kötü konumlanmış fetal parçaları çıkarmak değil, çok kalın fetusların hacmini azaltmaktır. Bu tür bir küçültme, vertebral gövdenin ve aynı anda kaburgaların üst ekstremitelerinin çıkarılmasıyla elde edilir; Gövde mimarisinin bu ana parçalarının ortadan kaybolmasının göğüs kafesinin ezilmesine neden olduğu ve enine çapların önemli ölçüde azaldığı anlaşılmaktadır. Ayrıca fetüs çok esnek hale gelir, ön ekstremitelere uygulanan çekiş nedeniyle uzar ve pelvik sırayı kolayca geçer.

Cihazın kullanımı çok karmaşık değildir. Anterior presentasonda fetüsün başı önceden kesiliyor ve bir sapla donatılmış

iletken T sapı açık kalan omurilik kanalına sokuluyor, böylece ucuna giden mafsallı bıçak yukarı doğru çevriliyor. Bu sapın ucu bel omurlarına (kanalın girişinde olması gereken kırmızı çizgi ile gösterilir) ulaştığında keskin bir darbe ile çıkarılır: Bu manevra, iki omur arasına yerleştirilen mafsallı bıçağı kaldırır, böylece trefin tüpü R'yi yönlendirebilmek için gövde sıkıca sabitlenmiş halde bırakılır. Bir bobin B ile donatılmış olan bu, eksenini hizmet veren iletken gövdeye kıvrılır. Bir asistan, ilmeğin takılabileceği metal bir kanca (C) vasıtasıyla şaftı güçlü bir şekilde çekerken, operatör trefin'i bir burğu gibi manevra eder. Alet hızlı bir şekilde nüfuz eder ve beş dakika içinde tırtıklı kenar bel omurlarına ulaşır. Omurga ekseninin kesilen kısmını tamamen ayırmak için tahrik çubuğunun sağına tam bir dönüş yapmak yeterlidir. Aletin çıkarılmasıyla omurlar, kaburgaların komşu uçları ve bunlara uygulanan kas kütlelerinden oluşan bir silindir, boşluğundan çıkarılır.

Posterior presentasyon için teknik biraz daha karmaşıktır. Pelvisin bir kısmının önceden kesilmesi gerekir; Bu amaçla iskiyal tüberozitenin üzerindeki deri ve kaslar yaklaşık 10 santimetre kadar dikey olarak kesilir. Bu yaraya bir zıpkın kancası sokulur ve uygun şekilde tutulduğunda pubis veya iliumun ön kenarına sabitlenir; Bu kanca, daha önce bahsedildiği gibi manevra yaparak femurun üst kısmını, pubisi, iskiyumu ve kotiloid kavite bölgesini kesen trefin tüpü için bir tahrik çubuğu görevi görecek; karşılık gelen üye böylece kolayca çıkarılır. Aynı işlem diğer tarafta da tekrarlanır ve daha sonra önceki sunumda belirtildiği gibi çalışarak lomber bölgedeki vertebral kanalı açığa çıkarmak ve iletken çubuğu buraya yerleştirmek kolaydır.

Transversal presentasyonlara gelince, cihaz, harika hizmetler sunabilecek gibi görünmüyor. Bugün için pratik önemi bulunmamaktadır (Robín, 1927).

## Fetal Yönünü Değiştirmek (Geri İtme ve Döndürme) için Kullanılan Aletler

### Geri İtme için Kullanılan Aletler



Bazen, buzağı kötü pozisyonda olduğunda ve doğum kanalına girdiğinde, annenin dışarı atma çabaları bu hapsolmayı artırır ve ters etki yapar. Daha sonra bu dışarı atma çabalarına karşı mücadele etmek ve doğru yeniden konumlandırılması (uzuvları açmak, uzatmak, başı açmak) için gerekli alana sahip olmak amacıyla buzağıyı kafatasından karın boşluğuna (rahmin iç kısmı) doğru itmek gerekir (Robert, 1986).

İtişin başarısı annenin dışarı atma çabalarıyla dengelendiğinden, bunların önlenmesi ve dolayısıyla karın kasılmalarının azaltılması, hatta ortadan kaldırılması gerekir. Bu, bir üfleyci veya burun bükücü kullanarak ağrının hafifletilmesiyle (endorfin üretimini uyarak), inspirasyonun engellenmesiyle veya lordoz refleksinin aktive edilmesiyle veya son olarak lokal veya loko-bölgesel anestezi ile başlangıç noktası pelvik itme refleksinin bloke edilmesiyle mümkündür (Noakes, Parkinson & England, 2019).

İtmede kullanılan aletler distosi durumunda yavrunun belirli bir bölgesine daynıp pelvik ve karın boşluğunda rahim içindeki fetüsü itmede yardımcı olmak üzere kullanılan sapa takılı aletlerdir. Buzağlarda özellikle kıvrım eklemlerin esneme pozisyonundaki yer değiştirmelerinin düzeltilmesinde vazgeçilmez bir yardımcıdır (Alaçam, 2010). Williams'ın ucu çatallı olan ve uzatılıp kısaltılabilen iticisi, fötüsün pelvis kanalı içinde sıkıştığı durumlarda kullanılabilir. Bu çatallı itici ile fötüs aşağı, ileriye ve yukarı-ileriye ve yana ileriye itilebilir. Khun'un ucu çatallı iticisi de fetüsün kolay manipülasyonu için alan yaratmak amacıyla uterustaki fetüsü itmek için kullanılır. İtici ihtiyaca göre uzatılmış çubuk yardımıyla

uzatılabilir. Bu, saplı ve kancalı basit bir çelik bastondur. Uzunlarını hareket ettirebilecek alan kazanmak amacıyla buzağının geri itilmesine olanak tanır. Veteriner hekim tarafından yerine yerleştirilebilir, daha sonra yetiştirici tarafından itilirken veteriner uzunların konumunu yeniden ayarlar. Sap baldırı itecek şekilde tutulmalı ve karşı ucu baldıra zarar vermeyecek şekilde yerleştirilmelidir. Ayrıca Gunter'in itme çatalı, Binz'in itme çatalı ve Reindl'in iki yada üç çatal uçlu itme çatalı kullanılır. Bazılarının ortasında sivri bir çıkıntı bulunur, böylece yavrunun vücuduna saplanıp kayması önlenmiş olur. Bu sivri uçlu iticileri ölü yavrularda kullanmak gerekir (MEB, 2017).

### Fötüsü Döndürmede Kullanılan Araç Gereçler



Cammerer'in detorsiyon çatalı



Cornell'in detorsiyon çubuğu



GYN-stick detorsiyon çubuğu

Yavrunun döndürülmesi amacıyla kullanılan farklı modellerde döndürme cihazları bulunmaktadır. Bunlar anormal pozisyonları longitudinal presentasyona dönüştürmek için kullanılır. Bu anormal pozisyon uterusun hafif ila orta dereceli, 90° ila 240° torsiyonuna bağlı olabilir. İtmede olduğu gibi, operatörün kolları veya obstetrik zincirler üzerindeki doğru çekiş yönü, büyük tek doğumlu hayvanlarda fetüsün uterusun veya dorso-sakral veya dorso-pubik pozisyonlarının birçok torsiyonunu düzelterek (Robert, 1986). Yavruyu döndürmek için bacaklara takılan manşet ve zincirlere geçirilmek suretiyle kullanılır. Bu işlem için Cornell'in detorsiyon çubuğu rahatlıkla kullanılabilir. Rahim ağzının açık olduğu bir rahim torsiyonu durumunda, Cornell detorsiyon çubuğu kullanılarak rahim düzeltilebilir. İlk önce buzağının 1 bacağına bir zincir ilmeği yerleştirilir, ardından aynı zincirden bir ilmek, detorsiyon çubuğunun 1 ucundaki halkanın içinden geçirilir. Bu halka daha sonra karşı bacağın etrafına yerleştirilir ve detorsiyon çubuğu, halka baldırın bacakları arasına gelinceye kadar ilerletilir.

Son olarak zincirin serbest ucu sıkıca çekilerek çubuğun karşı ucundaki halkanın içinden geçirilen bir sopanın etrafına sarılır. Sopa, buzağıyı ve rahmi normal pozisyona döndürmek için bir sap olarak kullanılır (Estill, 2020).

Cammerer'in detorsiyon çatalı, Uterin torsiyon durumlarında fetüsü uzunlamasına eksenini boyunca döndürmek için kullanılır. Bu operasyonda 1,5 metrelik zincir ve operatörün kolları kullanılmaktadır. Caemmerer'in döndürme çatalının kullanımında iki uzun ve sağlam ipe ihtiyaç vardır.

GYNstick yeni ve basit bir araçtır. GYNstick'i bir torsiyon çatalı buzağının bacaklarını sabitlemek için ön ucunda kapalı bir açıklığa sahiptir. Buzağının bacaklarına buzağılama ipleri uygulandıktan sonra ipler ön açıklıktan çapraz olarak geçirilir. Daha sonra halatlar, çubuğun arka ucundaki aynı zamanda detorsiyon çubuğu için de kullanılan açıklığa sıkıca bağlanır. Artık asistan döndürme çubuğuna kuvvet uygulayabilir ve bir torsiyon momenti oluşturabilir. Ciddi yapısal gerilim altında plastik GYNstick stabildir ancak aynı zamanda iyi bir esneklik gösterir. Bu özelliği, uygulanan dönme kuvvetinin doğru şekilde kontrol edilmesini sağlayarak buzağının bacaklarının kırılmasını önler (Pourcel, 2023).

Fötüsü rahim içinde döndürmek için hemen hemen tüm uzun saplı aletler kullanılabilir. Özellikle elle tutulabilen parçalar cihaza bağlanıp el yardımıyla kullanıldığında fetus arzulanan yöne rahatlıkla döndürülebilmektedir.

**Sezeryan Cerrahi Kiti:** bistüri, sıçan dişli forseps, makas, altı adet hemostat, iğne tutucular, dikiş makası, yuvarlak gövdeli ve kesici dikiş iğnelerini kapsar. Rahmin karın içerisinde derin bir şekilde açılmasının gerekmesi durumunda Robert embriyotomi bıçağı da dahil edilmelidir (Jackson, P. G. (2004).

## KAYNAKÇA

Akşit, A. (1975) *Evcil hayvanlarda pratik doğum doğum hastalıkları ve ayak hastalıkları*, Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü Deneme Çiftliği Md. Basım Servisi.

Alaşam, E. (2010). *Evcil Hayvanlarda Doğum ve Infertilite* 7. Baskı. Medisan Yayınevi, Ankara.

Anonim 1. (2023) *Veterinary instruments* (19.12.2023 tarihinde <http://dynamic-surgical.com/catalogue/Veterinary.pdf>. adresinden ulaşılmıştır).

Anonim 2. (2023) *OB-GYN OSCE (Instruments & Physical examination)* (19.12.2023 tarihinde [http://ksumsc.com/download\\_center/Archive/4th/432/432%20Teams/OB-GYN/OSCE/OSCE%20instruments%20%26%20PE%20Updated%20word.pdf](http://ksumsc.com/download_center/Archive/4th/432/432%20Teams/OB-GYN/OSCE/OSCE%20instruments%20%26%20PE%20Updated%20word.pdf) adresinden ulaşılmıştır).

Anonim 3. (2023) *Eye Hook Blunt – Ostertag* (19.12.2023 tarihinde <https://www.gervetusa.com/eye-hook-blunt-ostertag.html> adresinden ulaşılmıştır).

Anonim 4. (2023) *Obstetrical Hook Double Vienna* (19.12.2023 tarihinde <https://www.gervetusa.com/obstetrical-hook-double-vienna.html> adresinden ulaşılmıştır).

Anonim 5. (2023) *Reproduction tools for farm animals Flashcards*, (19.12.2023 tarihinde <https://quizlet.com/pl/748022524/reproduction-tools-for-farm-animals-flash-cards/> adresinden ulaşılmıştır).

Anonim 6. (2023) *Obstetrical insruments and equipments* (19.12.2023 tarihinde <https://www.slideshare.net/TapanKumarMishra5/obstetrical-instrumentspptx> adresinden ulaşılmıştır).

Barman, P., Das, P.Kr. & Chakraborty, D. (2023) *Practical manual on veterinary obstetrics (VGO- UNIT II)* Social Research Foundation.

Basu, S., Ray, K., Nandi, P.R., Sarkar, P., Mandal, D. & Saren, A.K. (2021) *Practical manual on veterinary gynaecology and obstetrics (Paper-II)*, M/S USP, 3/2 Siddheswar Chandra Lane, Kolkata

Dascanio, J., & McCue, P. (Eds.). (2021). *Equine reproductive procedures*. John Wiley & Sons.

Erk, H. (1967) *Evcil hayvanlarda doğum bilgisi* Ankara Üniversitesi Basımevi.

Erk, H., Doğaneli, M., & Akkayan, C. (1980). *Veteriner doğum bilgisi (obstetrik) ve jinekoloji*. Ankara Veteriner Fakültesi Yayınları, 275.

Estill, C. T. (2020). Tips and tricks for managing bovine dystocia. In *American Association of Bovine Practitioners Conference Proceedings* (2020, September) (pp. 317-321.)

Hopper, R. M. (Ed.). (2015). *Bovine reproduction* John Wiley & Sons.

Hopper, R.M. (Ed.). (2021). *Bovine reproduction* John Wiley & Sons.

Jackson, P. G. (2004). *Handbook of veterinary obstetrics* Elsevier Limited.

Kılıçoğlu, Ç., & Alaçam, E. (1985). *Veteriner doğum bilgisi ve üreme organlarının hastalıkları* Ankara Üniversitesi Basımevi, 282, 284.

Kumar, P. (2009). *Applied Veterinary Gynaecology and Obstetrics*, International Book Distributing Co.

MEB (T.C Millî Eğitim Bakanlığı) (2017) *Doğuma yardım* Hayvan Yetiştiriciliği ve Sağlığı Alanı, Ankara.

Noakes, D. E., Parkinson, T. J., & England, G. C. (Eds.). (2019). *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*. Elsevier Health Sciences.

Pourcel, V. (2023). Le GYN-stick: état des lieux de l'utilisation en obstétrique bovine par les vétérinaires praticiens en France et réalisation d'un guide pratique à destination des étudiants vétérinaire.

Purohit, Govind Narayan. (2022). *Instruments in Veterinary Obstetrics Pratical* DOI:10.13140/RG.2.2.20863.48807)

Robert, S. J.(1986). *Veterinary Obstetrics and genital diseases. Theriogenology* 3rd ed. Edwards' Brothers. Inc., Michigan.

Robín, V. (1927) Embryotom e vacufact (embriotomo vacufact). *Recueil de Medecine Vétérinaire* CIII, 650-652.

Schuh, H.H., & Kurth, E.T. (2005). A new obstetrical instrument and advanced method of veterinary obstetrics for sows. *Journal of Swine Health and Production*, 13(2), 99.

Smith, D.R., Hostetler, D., & Westphal, S. (2009). Assisting with Calvings: the Role of the Veterinary Technician. In *American Association of Bovine Practitioners Conference Proceedings* (2009, September) (pp. 148-155.)

Sonsthagen, T.F. (2019) *Veterinary instruments and equipment* A Pocket Guide, 4th Edition, Elsevier.



## BÖLÜM II

### Süt İnekçiliği Mastitinde Tanısal Yaklaşımlar

**Atilla YILDIZ<sup>1</sup>**

#### **Giriş**

Son yıllarda sütçülükte dünya çapında belirgin bir evrimi yansıtan büyük değişiklikler yaşanmaktadır. Neredeyse tüm sanayileşmiş ülkelerde, süt hayvancılığındaki mevcut eğilimler, bir yanda inek ve sürü sayısının azalması, diğer yanda ise sürü büyüklüğü ve inek başına laktasyon veriminin artmasıyla karakterize edilebilir. Sürü sayısında ve inek sayısındaki azalmaya karşın, iyi yönetilen çiftliklerde yıllık yaklaşık %2 artışla inek ve laktasyon başına ortalama verim 10.000 kg'a yükselerek istikrarlı bir şekilde arttığı görülmektedir. Süt hayvancılığının bu yeni koşullarda, klinik vakalarla bağlantılı olarak uygulanan teşhis prosedürlerine ek olarak meme sağlığı durumunun rutin olarak incelenmesi için birçok yöntemler, prosedürler, stratejiler ve kavramlar geliştirilmektedir.

---

<sup>1</sup> Prof. Dr., Fırat Üniversitesi

Bu yöntemlerin çiftlikte kolay, hızlı ve doğru bir şekilde gerçekleştirilebilmesi, çiftçiler ve veteriner hekimler tarafından mastit tedavisi için hızlı bir şekilde harekete geçilebileceği anlamına gelir. Laboratuvar düzeyinde değerlendirilen ve kullanıma sunulan pek çok teşhis vardır, oysa sahada uygulanabilirlik pek çoğunu işe yaramaz hale getirmektedir. Ayrıca, tüm sağmal ineklerden numune alınmasıyla ilgili lojistik ve mali hususlar, birçok tekniğin geniş çapta benimsenmesine engel olmuştur. Mastit tanısına yönelik tedbirlerin dengeli bir maliyet-fayda ilişkisine odaklanması gerekmektedir. Farklı yangısal parametreleri ölçmek için otomatik çevrimiçi meme sağlığı izleme sistemlerinde daha fazla gelişmeler, ideal olarak meme lobları arası değerlendirme puanı içeren çok etkili ve ucuz bir teşhis aracıyla sonuçlandırılabilir. Böyle bir sisteme sadece büyük sürülerde değil aynı zamanda ortalama büyüklükteki sürülerde de ekonomik nedenlerden dolayı ihtiyaç duyulmaktadır (Hogeveen, 2005). Başlıca tanısal testler, bir enfeksiyonun mevcut olup olmadığına ve mevcut bir enfeksiyon varsa buna spesifik olarak neyin sebep olduğuna karar vermek için yapılır. Genel olarak mastit tespit yöntemlerinin mevcut durumun değerlendirilmesi, mastitin etkili bir şekilde kontrol edilmesi ve iyi süt kalitesinin sağlanması için uygun teşhis olanaklarını da ortaya çıkaracaktır.

## **Mastit**

Mastit terimi, sütte çeşitli fiziksel ve kimyasal değişiklikler ve hastalığın türüne bağlı olarak meme dokusunda buna karşılık gelen patolojik değişiklikler ile karakterize edilen meme bezinin yangısını tanımlar (Shahid, & ark., 2011). İneklerde mastit, süt inekçiliğinde süt üretiminin azalması, ineklerin elden çıkarılması veya hayvanların üretken ömrünün azalması, ilaç masrafları, tedaviden kaynaklanan antibiyotik kalıntılarıyla kontamine olmuş pazarlanamayan süt veya süt ürünleri ve süt ürünlerinin kalitesinin düşmesinden kaynaklanan kayıpları kapsayan ve optimum çiftlik verimliliğini, süt kalitesini ve süt ürünleri arzının gerçekleştirilmesini engelleyen yaygın, kontrolü zor, kompleks ve multifaktöriyel bir hastalıktır (Yıldız, 2001; Smith, 2015; Semenov, & ark., 2021).

Mastit, enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz (kimyasal, termal ve mekanik uyarımlar) ajanlar tarafından oluşturulmakla birlikte etyolojisinde çoğunlukla birçok enfeksiyöz ajanlar rol oynamaktadır. Epidemiyolojileri ve patofizyolojileri temel alınarak bu patojenler, genellikle enfekte bölgelerden diğer bölgelere ve ineklere yayılan bulaşıcı (kontagiyöz) mastite neden olanlar, normal meme derisi sakinleri olup fırsatçı mastite neden olanlar, genellikle ineğin çevresinde bulunan ve o kaynaktan memeye ulaşan çevresel mastite neden olanlar ve sporadik olup genellikle sürüdeki yalnızca bir ineği veya birkaç ineği etkileyen bakteri ile mantar, küf, alg ve virüs gibi birçok mikroorganizmaları kapsar (Williamson & Di Menna, 2007; Constable & ark., 2016; Morales-Ubaldo & ark., 2023). Sığırlarda mastite neden olan patojenler ayrıca majör patojenler (klinik mastite neden olanlar), minör patojenler (normalde subklinik mastite neden olan ve daha az sıklıkla klinik mastite neden olanlar) ve yaygın olmayan mastit patojenleri olarak da ayrılır (Constable & ark., 2016).

*Streptococcus agalactia*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis* ve *Mycoplasma bovis* mastitlere sebep olan kontagiyöz mikroorganizmalardır (Constable & ark., 2016; Peek & Divers, 2018; Li & ark., 2023). Bulaşıcı patojenlerin rezervuarları, enfekte ineklerin meme bezi ve sütüdür (Tarazona-Manrique & ark., 2019). Sürü içinde sağım hijyenine dikkat edilmemesi durumunda sağımcinin eli, meme temizliğinde kullanılan bez, süngerler ve kirli sağım başlıkları ile inekler arasında yayılmaktadır. Bu grup bakteriler meme içerisinde fazlaca çoğalarak uzun süre devam eden subklinik mastitlere yol açar. Sütte çok sayıda bakteri bulunur (Tiwari & ark., 2013; Kılıçarslan, 2021).

Çevresel mastit, normalde çevrede bulunan mastitin hafif ve orta dereceli formlarına sebep olan *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp ve *Serratia* spp gibi Gram negatif mikroplar ve *Streptococcus disgalactiae* ve *Streptococcus uberis* gibi bazı Gram pozitif bakterilerden kaynaklanır. Ayrıca mastit maya ve küflerden de kaynaklanabilir ancak sütü sürülerde bu durum düşüktür (Tarazona-Manrique &

ark., 2019). Çevresel mastit, genellikle sığırların sindirim kanalında ("koliformlar" olarak anılır) veya dışkı, toprak, yataklık materyali ve gübre gibi çevrelerinde bulunan potansiyel patojenlerden kaynaklanır (Tiwari & ark., 2013). Islak ahır zemini risklidir ve kış aylarında daha çok görülür. Somatik hücre sayısında pek artış görülmez (Kılıçarslan, 2021).

Fırsatçı mikroorganizmalar: Staphylococcus aureus dışında yaklaşık olarak 50 Stafilokok türü bulunmaktadır. Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), meme başı derisi fırsatçı mastit patojenlerinin en yaygın olanıdır. Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus simulans, Staphylococcus warneri, Staphylococcus hyicus, Staphylococcus xylosus, Staphylococcus scrimi ve Staphylococcus chromogenes sığır mastitinde yaygın olarak karşılaşılan KNS türleridir (Tiwari & ark., 2013). Klinik bozukluk oluşturmazlar. Somatik hücre sayısında çok az artışa neden olurlar ve sublinik enfekte memelerde 1.000.000 civarı sayıya ulaşır. Nadiren sütte pıhtı ve flakon görülür. Normalde sağlıklı meme derisinde bulunur, fırsat bulursa meme kanalına girer (Kılıçarslan, 2021).

İnek mastitleri inflamasyonun derecesine göre klinik, subklinik ve kronik mastit olmak üzere 3 sınıfa ayrılabilir (Cheng & Han, 2020). Mastitin klinik formu; meme dokusunda ve sütte meydana gelen makroskobik değişikliklerle karakterizedir. Klinik mastit, görsel incelemeyle tanımlanan, sütte gözle görülür değişikliklerin yanı sıra enfeksiyon ve inflamasyonun klinik belirtileriyle kendini gösterir (Tomanić, Samardžija & Kovačević, 2023). Klinik inek mastiti, kırmızı ve şişmiş meme ve süt ineklerinde ateş gibi gözle görülür anormallikler ile belirgindir ve kolayca tespit edilir. İneğin sütü flakon ve pıhtıların varlığıyla sulu görünür. Sütteki yüksek somatik hücre sayısı (SHS) yanı sıra patojen mikroorganizmalar da mevcuttur. Klinik mastit süresine göre perakut, akut ve subakut ve inflamasyonun derecesine bağlı olarak ta hafif, orta veya şiddetli olarak alt bölümlere ayrılabilir (Haxhiaj, Wishart & Ametaj, 2022). Şiddetli klinik vakalarda enfekte loblar şişer ve sıcak, sert ve dokunmaya duyarlı hale gelir. Ayrıca hasta

ineklerde depresyon, sınırlı davranışlar ve iştahsızlık gibi hastalık belirtileri de görülür (Atasever & Erdem, 2008). Şiddetli klinik mastit vakaları ölümcül olabilir. Klinik mastitin aksine, subklinik (latent) mastit memede veya sütte gözle görülür bir anormallik göstermez. Diğer ifadeyle, subklinik mastit, memede veya sütte dış değişiklikler gibi fark edilebilir herhangi bir semptom veya bulguyla ortaya çıkmaz, ancak subklinik mastitlerde sütün miktarı, bileşimi ve içeriğinde önemli değişiklikler şekillenmektedir (Khasanah & ark., 2021; Semenov & ark., 2021). Kronik mastit ise, birkaç ay süren, düzensiz aralıklarla klinik alevlenmelerin meydana geldiği inflamatuvar bir süreçtir (Cheng & Han, 2020). Uzun süreli subkronik ve kronik mastitte, meme bezinin etkilenen lobunun parankiminin kaybı (atrofi) olabilir (Martins & ark., 2019; Semenov & ark., 2021).

### **Mastite Tanısal Yaklaşımlardaki Gelişmeler**

Mastitin erken tanısı, üretim kayıplarını azaltmak ve iyileşme şansını arttırmak açısından önemlidir. Yetiştiriciler tarafından mastitin tespitinde kullanılan en yaygın yöntem sütte pıhtı, flakon ve memede görsel yangısal değişikliklerin gözlemlenmesidir. Tespit sırasında hastalığın tahribatı çok fazladır ve hayvan enfeksiyonun ileri bir aşamasında olduğu için bu yöntemler son derece yetersizdir. Bazen mastit kronik hale gelir ve bu da bireysel bölgelerin fibrozuna yol açarak süt üretimini büyük ölçüde düşürmekte ve sonunda hayvanın elden çıkarılmasına yol açmaktadır (Srivastava & ark., 2015). Bu nedenle mastitin önlenmesi veya mastitin yönetim veya tedavi amaçlı erken tespiti için teşhisin erken, hızlı ve doğru olması gerekir. Bu, geleneksel ve gelişmiş tanı testlerinin uygulanmasını kapsar. Geleneksel yöntemler nispeten ucuz, kolay, hızlı bir şekilde elde edilebilir ve sahada uygulanabilir, ancak genellikle spesifik değildir. Gelişmiş testler maliyetlidir, teknik beceri ve karmaşık altyapı ve tesisler gerektirir, ancak genellikle doğru ve farklı mastit türleri için spesifiktir (Sharun & ark., 2021).

Klinik mastit tanısı sütteki lokal ve sistemik reaksiyonlara ve değişikliklere (örneğin renginin bozulması, sulu, kanlı görünüm ve

flakon, pıhtı ve irin varlığı) dayanmaktadır (Sharma, Pandey & Sudhan, 2010). Klinik mastitin saha bazında tanısı genellikle anormal süt sekresyonlarının tespitine, meme başlarının ve meme simetrisinin görünümüne ve memenin palpasyonuna dayanır; bu durum bezin normal ya da anormal kıvamını gösterir ve akut veya kronik bir duruma işaret eder (Kour & ark., 2023).

### **n Sütün Kontrol Edilmesi**

Hafif klinik mastit, sağım rutininin bir parçası olarak dahil edilmesi gereken n sağımla tespit edilebilir. Klinik mastitte sütün fiziki görünümü strip kap adlı (n sağım kontrol kupası) bir aletle sütün fiziksel görünümü incelenmektedir. Strip kabı siyah plastik veya ebonit bir malzemededen üretilmektedir. Strip kap (Sağım kupası) testi için siyah arka plan amacına göre özel olarak üretilmiş siyah arka plan oluşturacak şekilde bir kapağı mevcut olan maşrapalar, beyaz bardaklar da kullanılabilir (Anonim, 2016). Bunlardan başka herhangi bir siyah yüzeyden de faydalanılabilir. Bu yöntem, sağım öncesi sütün siyah bir yüzey üzerine alınıp patolojik görünüm açısından incelenmesiyle gerçekleştirilir (Alaçam & şahal, 1997). Strip kap kontrolü, sütün doğal rengi olan beyaz ile siyah renk arasındaki karşıtlık sebebiyle sütteki fiziksel değişikliklerin kolaylıkla tespit edilmesini sağlar. Normal sağlıklı bir meme lobundan sağılan süt, strip kabta ince bir tabaka oluştururken, grimsi beyaz bir süt halkası, kronik mastit veya memenin tahrişi sebebiyle sütün sulandığının bir emaresidir (Baştan, 2010). n sütü kontrol etmenin birçok avantajı olmasına rağmen bazı potansiyel dezavantajları da vardır. Yılda 100 inek başına yalnızca 35 klinik mastit vakasının bulunduğu ortalama bir sürüde, bakıcının bir mastit vakasını tespit etmek için neredeyse 8000 meme ucunu kontrol etmesi gerekir. Bu hızda, meme uçlarının tekrar tekrar kullanılmasıyla meme başi derisinden ve subklinik taşıyıcılardan mastit bakterisinin bulaşma riski, bir vakanın yeterince hızlı tespit edilememesi nedeniyle mastitin yayılma riskine yakın olmalıdır. Giderek artan sayıda insanın artık n süt uygulaması yapmamasının bir nedeni de budur. Ancak sürüde hücre sayısı ve bulaşıcı mastit

vakaları yüksekse o zaman kesinlikle ön sağım yapılmalıdır (Blowey, 1999).

Sağım için hazırlık sırasında ön sütün anormallik açısından incelenmesine bir alternatif olarak, sütteki pıhtıları tespit etmek için Ambic hat içi süt filtreleri [ Ambic in-line milk filters (hat içi pıhtı filtresi; Vision Mastitis Detector)] de kullanılabilir. Sağım sonunda süt filtresinin kontrol edilmesi geriye dönük bir önlemdir. Üretilen toplam sütü taramak için uzun süt tüpüne yerleştirilen sıralı filtreler kullanılabilir. Tüm klinik mastit vakaları, filtrelerde sıkışıp kalan pıhtıların oluşmasıyla sonuçlanmaması; etkilenen meme lobu ya da loblarının, sağım sütü üzerinde ilave bir inceleme yapılarak belirlenmesinin gerekmesi; anormal süt, özellikle doğrudan boru hattına sağım sistemlerinde, tespit edilmeden önce toplu tedarik sistemine geçmiş olabilmesi ve birçok sağımcının filtreleri kontrol edemiyor olması bu yaklaşımın dezavantajlarıdır (Andrews & ark., 2004).

Orta dereceli klinik mastit sırasında memenin palpasyonu, klinik olarak etkilenen bölgelerdeki ısıyı, ağrıyı ve şişliği tespit etmek için faydalıdır. İneğin davranışındaki değişiklikler (örneğin, sağımhaneye girerken pozisyonun değişmesi, makine bağlıyken tekme atması) da hastalığın erken belirtileri olabilir (Scott, Penny & Macrae, 2011). Sütte ufak pıhtı parçaları görülmesi, sütün çıktığı meme lobunun yangılı olduğunun belirtisidir. Sağım sonu görülen flakonların sebebi çoğunlukla meme tüberkülozudur. Sütteki sulanma enfeksiyöz olmayan mastitlere, memedeki irritasyonlarına veya oluşacak mastite, sütün rengi sarı ise bu memelerde suppurasyona yol açan bir enfeksiyon varlığına, sütteki koku, kısmen A. pyogenes'e bağlı olabilir (Kılıçarslan, 2021).

Bir ineğin memesi yangılandığında, sütteki değişikliklerin bir sonucu olarak serbest kalan ve/veya etkilenen birçok işaret veya biyolojik imza vardır. Bu göstergeler mastit için test göstergeleri olarak düzenlenmiştir. Subklinik mastitin teşhisinde kullanılan teknikler sütün fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişikliklerini tespit

eder veya mastit ile ilgili biyobelirteçlerin miktarını belirler (Ajose & ark., 2022).

## **GELENEKSEL YÖNTEMLER**

### **Sütün Elektriksel İletkenliğin Ölçülmesi**

Elektriksel İletkenlik Testi mastitin bir göstergesi olarak sütün özellikle sodyum ve klor iyonları başta olmak üzere yüksek elektrolit içeriği nedeniyle artan elektriksel iletkenliğini baz alan inekteki mastitin durumunu izlemek için geliştirilmiş bir yöntemdir. Sağım salonlarındaki bazı bilgisayarlı sağım ekipmanlarının bir parçası olarak ve aynı zamanda meme loblarını dönemlik bireysel izlemeye olanak sağlayan portatif ölçüm cihazları şeklinde bulunur (Medina & Montaldo, 2003).

### ***Hat İçi Elektriksel İletkenlik Testleri***

Elektriksel iletkenlik ölçümü, bilgisayarda okunabilen bir sinyale dönüştürülebilir ve bu nedenle bu yöntem, meme sağlığının çevrimiçi otomatik izlenmesinde kolaylıkla uygulanabilir ve sağım makinelerine kurulabilir (Pyörälä, 2023). Sağım salonlarındaki bazı bilgisayarlı sağım ekipmanlarının bir parçası olarak sütün elektriksel iletkenliği, çeşitli sağım sistemleri kullanılarak otomatik olarak kaydedilebilmektedir (Fernández Bolaños & ark., 2012). Elektriksel iletkenliğin kullanımı, otomatik sağım sistemlerinde anormal sütün tespitinin temelini oluşturur. Çevrimiçi (On-line) elektriksel iletkenlik, meme lobu veya meme loblarının tümüne ait süt numuneleri üzerinde ölçülür ve meme lobları arasındaki Elektriksel iletkenliğin mutlak bir değeri veya karşılaştırması (genellikle oran olarak ifade edilir) olarak rapor edilebilir. Elektriksel iletkenlik sütün elektrik akımına karşı direncinin bir skalasıdır; iletkenlik direncin tersidir. Elektriksel iletkenliğin ölçüm birimi santimetre başına milisiemens'tir (mS/cm). Sütte elektriksel iletkenlik, başta Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> kapsayan katyon ve anyonların konsantrasyonuyla saptanır. Enfekte olmamış bir inekten elde edilen sütün tipik elektriksel iletkenliği, 25°C'de (77°F) 4,0 ila 5,5 mS/cm arasında değişir (Ruegg & Reinemann, 2002). Mastitli enfeksiyonlar



sırasında, kılcal kan geçirgenliğinin artması, sıkı bağlantıların tahrip olması ve etkili iyon pompalama sistemlerinin tahrip olması nedeniyle sütteki laktoz ve K<sup>+</sup> konsantrasyonu azalır ve Na<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> konsantrasyonları artar (Johri & ark., 2023). Mastit, sütün iyon içeriğinin değişmesine neden olan tek durum değildir ve elektriksel iletkenlikteki mastitle ilişkili olmayan varyasyon, elektriksel iletkenliğin tanısal değeri açısından büyük bir dezavantajdır (Ruegg & Reinemann, 2002; Pyörälä, 2023). Elektriksel iletkenliği etkileyen mastit dışı faktörler arasında süt sıcaklığı (süt örneğinin sıcaklığı arttıkça elektriksel iletkenlik, derece başına 0,1 ila 13 mS artar), laktasyon dönemi, laktasyon sayısı, yağ yüzdesi (yağ iletken değildir), sağım aralığı, sütün bileşimi, örneklerin alınma zamanı ve bakteri florası, hastalıklar, östrüs, beslenme düzeyi, günlük değişimler ve işletmeye ait etmenler, ineğin yaşı ve ırk yer alır (Sharma & ark., 2018).

Mastit tanısı koymak için elektriksel iletkenliğin hem mutlak (absolute) eşikleri (Elektriksel iletkenlik eşiği aştığında hayvanın dörtte birinde mastit vardır) hem de ineğin kendi meme loblarının karşılaştırmaları (en düşük çeyreğin ~%16 üzerinde elektriksel iletkenliğe sahip bir meme lobunda mastit vardır; aynı zamanda "diferansiyel elektriksel iletkenlik " olarak da anılır) kullanılmıştır (Ruegg & Reinemann, 2002).

Mutlak eşikler kullanılarak, elektriksel iletkenlik değerinin eşiğin üzerindeki bir ineğin gerçekten enfekte olma olasılığı (pozitif öngörü değeri) veya eşiğin altındaki bir ineğin gerçekte enfekte olmaması olasılığı (negatif öngörü değeri) değerlendirildiğinde elektriksel iletkenlik, klinik veya subklinik mastit için bir tarama testi olarak iyi performans göstermemektedir (Hamann & Zecconi, 1998). Elektriksel iletkenlikteki mastit dışındaki varyasyon kaynaklarının dört meme loblarının tümü için aynı olması sebebiyle elektriksel iletkenlik değerlerinin ineğin kendi meme lobları arasında karşılaştırılması dışsal varyasyonu azaltmaktadır. Bu da diferansiyel elektriksel iletkenlik kullanımının elektriksel iletkenliğin hem duyarlılığını hem de özgüllüğünü arttırmaktadır. Mutlak bir eşik yerine ineğin kendi meme loblarının numune

elektriksel iletkenlik değerlerinin kullanılması en uygun kullanım şeklidir (Ruegg & Reinemann, 2002).

### ***Elde Taşınabilir Elektriksel İletkenlik Testleri***

Sütün elektriksel iletkenliğinin ölçülmesine dayanan, içine sütün sağıldığı girintili bir bardağa sahip, bireysel izlemeye olanak sağlayan el tipi (portatif ölçüm) cihazları (Draminski Mastitis Test Cihazı, Dijital Mastitis Dedektörü, Mas-D-Tec®) mevcuttur (Radostits & ark., 2002). Cihazlar, süt numunelerinin iletkenliğini doğru bir şekilde ölçer ve meme loblarının süt numunelerinde kullanılmak üzere tasarlanmışlardır (Fernández & ark., 2012). Elde taşınan elektriksel iletkenlik ölçüm cihazlarının kullanılmasıyla elde edilen subklinik mastitin tespitindeki tahmin değeri genel olarak zayıftır (Ruegg & Reinemann, 2002).

### **Kaliforniya Mastit Testi (California Mastitis Testi)**

California Mastitis Testi (CMT), sütteki somatik hücre sayısının (SHS) dolaylı olarak belirlendiği, çiftlikte yapılabilecek basit, düşük maliyetli, hızlı bir değerlendirmedir. Sayısal bir sonuç vermezler, sadece sayımın yüksek mi yoksa düşük mü olduğuna dair bir göstergedir. Sağım sırasında subklinik mastitin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılır (Janik, 2013; Tommasoni & Fiore, 2023). Bu test, sığıra özgü test olarak kullanılabilecek bugüne kadarki en güvenilir testtir (Srivastava & ark., 2015).

CMT ayıracı; 900 ml distile suya 100 ml anyonik deterjan (Teepol, By-prox gibi), 1/300'lük bromkresol purpur solüsyonundan 50 ml konularak hazırlanmaktadır (Kılıçarslan, 2021). CMT ayıracı; 1000 ml distile suya % 2'lik alkil aril sülfat, % 0,01 bromkresol purpur, 15 ml NaOH konmak suretiyle de hazırlanabilir (İşcan, 1993). Hazırlanan test ayıracının pH'sının 6.8 olması gerekmektedir. Sodyum alkil aril sülfonat, yüzey gerilimini azaltan, hücre zarı ve çekirdeğin yapısını ve iletkenliğini değiştiren, ozmotik dengeye müdahale eden, oksitlenmeyi bloke eden, proteolitik enzimleri uyaran ve sütün viskozitesini artıran anyonik bir yüzey aktif maddedir (Tommasoni & ark., 2023).

Test mekanizması; Sütteki somatik hücrelerin CMT reaktifindeki anyonik deterjanla parçalanması ve açığa çıkan nükleer madde (Deoksiribonükleik asit-DNA ve Ribonükleik asit-RNA) ile jelatinimsi bir çökelti oluşması esasına dayanır. Ayrıca CMT reaktifindeki bromokrezol purpur ile sütün pH'ındaki değişiklikler de saptanabilir. Testte gözlenen mor rengin nedeni, bu tür sütlerin bazik veya alkalın pH'a sahip olmasıdır.

Her meme lobunun sütünün birbirine karışmasını önlemek amacıyla prensip olarak test için ineğin sağ tarafından yaklaşılarak süt numuneleri alınır. Bu esnada test kabının sapı sağ tarafta olacak şekilde tutulur. Her meme lobundan bir miktar süt, her meme lobu için sırayla harflendirilmiş ayrı bir bölmeye sahip olan dört gözlü bir kaba sağılır ve klinik mastit açısından incelenir. Burada A sağ ön, B sağ arka, C sol ön ve D sol arka olarak sıralanmaktadır. İncelenecek memelerin her bir lobundan ayrı ayrı test kabının bölümüne yaklaşık 2 ml süt sağılır. Her bölmedeki süt miktarınca CMT ayracı eklenir (Anonim, 2016).

Test kabını yatay dairevi hareketlerle yaklaşık 10 saniye süreyle döndürerek ayıraçla sütün karışması sağlanır. Süt-reaktif karışımı beyaz plastik test küreğinin sığ kaplarında döndürülürken çökelti miktarı ve koyulaşma miktarı hakkında görsel bir yargıya varılarak skor belirlenir (Rasheed, Usman & Niaz, 2020). Normal sütte karışımın rengi açık gri (güvercin grisi) olup herhangi bir pıhtılaşma, koyulaşma ve yapışma gözlenmez. Mastitli sütte ise karışımın rengi, enfeksiyonun derecesine bağlı olarak açık gri-mordan koyu menekşe moruna (BCP testinde olduğu gibi) kadar değişir (Deveci & ark., 1994). CMT reaktifi nötrofillerle reaksiyona girer ve karışım, mevcut hücre miktarıyla orantılı olarak kalınlaşır veya jelleşir. Karışımın kıvamı enfeksiyonun derecesine göre eseri pıhtılaşmadan, koyu kremaya kadar değişen katılaşma ve jelleşme gösterir (Deveci & ark., 1994). Jel oluşumu, meme içi enfeksiyonun göstergesi olan 200.000 ila 5.000.000 lökosit sayısını yansıtır. Dolaylı olarak bu aynı zamanda toplam somatik hücre sayısının ölçümüdür çünkü reaksiyonun derecesi sütteki somatik hücre sayısına bağlıdır. Reaksiyon, O'dan (karışımın değişmeden kaldığı

yer) 3'e (katı jel formları) kadar bir ölçekte puanlanır ve 0 (negatif), T (şüpheli), 1+, 2++ veya 3+++ olarak değerlendirilir. Her bir CMT puanına (negatif, şüpheli, 1, 2, 3) karşılık gelen SHS sırasıyla; 0-100.000, 100.000- 300.000, 300.000- 900.000, 900.000- 2.700.000 ve 2.700.000- 8.100.000 çok büyük ve kapsamlı bir aralığına sahiptir (Philpot & Nickerson, 2000).

Test kabındaki karışım uygun bir yerde elimine edilerek test kabı içme suyu ile yıkanıp bir sonraki testte tekrar kullanılabilir. CMT testi yeni sağılan süte uygulanabileceği gibi sağımdan sonra 36 saate kadar soğukta muhafaza edilen sütlere de uygulanabilmektedir (Kibebew, 2017).

Bu test laktasyonun başlangıcında, ilk 7-9 günde, laktasyonun sonunda, laktasyon dışı olanlarda, apse, peritonit, RPT gibi vücudun herhangi bir yerinde enfeksiyon odağı oluştuğunda pozitif sonuç verir veya en azından sonuç şüphelidir (Deveci & ark., 1994).

Test ilk bakışta mastitin göstergesi olsa da, özgülüğü ve duyarlılığı zayıftır. CMT'nin ölçülen duyarlılığı, patojene göre değişmekte olup Streptococcus enfeksiyonunda en iyi (%84)'dir. Sonucun yorumlanması oldukça subjektiftir (Srivastava & ark., 2015). Ayrıca mastit kontrolü için doğru verileri sağlayan hızlı ve otomatik ölçüm teknikleri gerektiren otomatik sağım sistemlerinde bu yöntemler kullanılamaz (Janik, 2013).

### **Wisconsin Mastit Testi**

Wisconsin Mastit Testi (WMT), CMT prensibi sürü sütü numuneleri için kantitatif bir laboratuvar tarama prosedürüne uyarlanmış bir testtir ve taze karıştırılmış süt veya soğutma tanklarından alınan süt numunelerindeki somatik hücrelerin sayılmasının yanı sıra bireysel ineklerden numune alınması için kullanılır. Daha kesin kantitatif ölçümlere izin verir ve test süt ve reaktif karışımının standart bir delikten akış hızıyla belirlenen viskozite ölçümüne dayanır (Fernández & ark., 2012). Wisconsin Mastit Testinde; test için milimetre cinsinden derecelendirilmiş özel

plastik tp kullanılır. Tüpe iki ml süt ve iki ml 1/1'lik CMT reaktifi konulur. Süt ve reaktif daha sonra 8 ila 10 saniye karıştırılır. Karışım 18 saniye süreyle boşaltılır. Normal süt 15 saniye içinde akarken, jel kıvamına gelen süt bu süre içinde akamaz ve tp yeniden dik pozisyona getirilir. Sütün kapaktaki delikten akışı kronometre ile ölçülür (Thompson & Postle, 1964). Bir dakika bekleddikten sonra tüpte kalan sıvı miktarı (ykseklėđi) llr. WMT puanları genellikle milimetre (mm) cinsinden hesaplanır ve sütte bulunan ortalama somatik hücre sayısını tahmin etmek için kullanılır. Sonuçlar, yorumlama testi için özel bir tablo kullanılarak tüpün mililitre cinsinden dereceli leği ve somatik hücre değeriyle ilişkilidir (Shoukat & ark., 2018). WMT, basitliği ve objektifliği nedeniyle genellikle üretici sütü üzerinde bir tarama testi olarak kullanılır ve aynı zamanda sürü bazında meme sağlığının izlenmesi için uygun bir yöntem sağlar (Duarte, Freitas & Bexiga, 2015). Aktif SHS 100.000-1.3 milyon hücre/ml aralığıyla kullanılmaktadır (Milne & Smyth, 1976). Srlerden 3 ila 12 arasında düşük puana sahip olanlar iyi ila orta durumdayken, 12'nin üzerinde puana sahip olanların acil müdahaleye ihtiyaı vardır (Bedolla, Castaeda & Wolter, 2007).

### **Brabant Mastitis Testi**

Brabant Mastit Testinde 1 ila 3 mm genişliğinde ve 2 cm uzunluğunda bir kılcal tüpün üst kısmına huni yerleştirilerek kılcal tüpten gelen akış hızına göre sütün mastitli olup olmadığı belirlenir. Beş saniyeden kısa sürede boşalan sütün ortalama 250.000 hücre/ml, beş saniyede boşalan sütün ortalama 800.000 hücre/ml, beş ila on saniyeden fazla sürede boşalan sütün ise ortalama 1.000.000 hücre/ml içerdiği kabul edilir (Demet, 1993).

### **White Side (sodyum hidrokfit) Testi**

Bu test sütte beyaz kan hücrelerinde artış olup olmadığını gösterir. 1 ml normal sütte 150.000-250.000 beyaz kan hresi bulunur. Oriğinal teknikte 10 ml süt, 2 ml %4'lk sodyum hidrokfit zltisi ile bir test tüpü içerisinde karıştırılırken, modifiye teknikte elli mikrolitre (beş damla) süt, mavi arka plana sahip bir cam slayt,

mikroskop lamı ya da petri kutusu üzerine yerleştirilmektedir. Reaksiyonu daha görünür hale getirmek için, her meme lobu için bir tane olmak üzere üzerine 3cm x 3cm boyutunda 4 kare çizilebilen siyah akrilik bir plaka kullanımı da uygundur (Bedolla, Castañeda & Wolter, 2007). Daha sonra süt numunesine 20 µL (iki damla) %4'lük sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ilave edilir ve karışım kürdan ya da cam bir çubuk yardımıyla 20-25 saniye hızla karıştırılır. Süt normal ve 20-30 saniye içinde homojen bulanıklığa sahipse negatif olarak algılanır. Sütte pıhtı oluşmuşsa ve ipliksi parçalar şekillenmişse pozitif olarak değerlendirilir (Tanni, Islam, Kabir, Parvin, Ehsan & Islam, 2021). Whiteside testi sonuçları, çökeltinin tamamen görülmemesi ve şekillenen elyaf benzeri malzeme veya pıhtı veya küçük parça, viskoz kütle (jel) miktarı ve farklılık derecesi ile reaksiyonun süresine (ani, orta veya yavaş reaksiyon ya da herhangi bir reaksiyonun olmaması) göre güçlü (+++), belirgin (++) , eseri (+), şüpheli (±) ve negatif (normal) olarak derecelendirilir (Rahman & ark., 2010). Mastitli sütte nükleik asit NaOH ile birleştiğinde Na<sup>+</sup> tuzu ve jelatinimsi olmayan kütle oluşur. Bu kütle yağ ve katı kısmı ile birleşerek sütteki lökositlerin derecesine bağlı olarak çökelti oluşturur. Akut ve subakut mastitli memelerin sütü, NaOH ile kalın yapışkan hale gelirken, hafif seyirli kronik ve subklinik mastitlerde sadece birkaç tane beyaz süt pıhtıcağı gözlenir. Laktasyonun ilk ve son haftalarında, süttten kesilen normal memeden alınan süt, östrus, sağım yöntemleri, bazı diyet değişiklikleri, süttün ısıtılması ve günlük değişikliklerde NaOH testi ile pozitif reaksiyon verebilir (Giesecke, den Heever & Wepener, 1974).

### **Surf Field Mastitis Testi**

Bu test kolay, ucuz ve tüm subklinik mastit vakalarını tespit edebilecek kadar hassastır. Bu testin avantajı, reaktif olarak kolaylıkla bulunabilen evde tutulan sörfün (surf/deterjan) kullanılmasıdır. Bu testin prensibi somatik hücre DNA'sının deterjan ile reaksiyona girmesi ve sütteki somatik hücre sayısına bağlı olarak değişen derecelerde jel oluşumuna yol açmasıdır. %3'lük Sörf solüsyonu, 3 g sörf 100 ml distile suda veya 6 çay kaşığı ev tipi

deterjan sörfü 500 ml distile suda çözülerek hazırlanır. Test zeltisi oda sıcaklığında 6 ay bozulmadan kalabilir. Bir hayvanın ilgili meme lobları için dört yuvaya sahip plastik bir küreğe veya kaba eēit miktarda %3'lk reaktif ve süt alınır. Karıēım yaklaēık 1 dakika boyunca dndrlr ve daha sonra kk topakların ve jelin varlığı açısından görsel olarak incelenir. Topaklar veya jel oluēmuēsa bu, meme içi enfeksiyonun pozitif olduğunu gösterir. Herhangi bir topak veya jelin yokluğunda numune negatiftir (Sharma, Pandey & Upadhyay, 2009).

### **BLRI mastitis testi (BMT)**

BMT, Bangladeē Hayvancılık Araētırma Enstitüsü Bölge İstasyonu Sirajganj'da geliētirilmiētir. BMT'nin bileēimi: %1 sodyum karbonat, %0,7 sodyum lauril etil sülfat ve %0,01 bromkresol purpur içerir (Kabir & ark., 2018).

BMT bileēeni mastit sırasında yükselen lökositlerle (Somatik hücreler) reaksiyona girer. Jel oluēumunun derecesi, meme bezi iltihabı sırasında mevcut lökositlerin artan sayısıyla orantılıdır. Daha fazla jel oluēumu daha yüksek bir BMT puanına karēılık gelir. Karıēım koyulaēmadan sıvı kaldığında BMT sonuçları Negatif olarak kaydedilmektedir; T (İz): dolgulama hareketi ile hafif bir kalınlaēmanın bulunduğu yer; 1 (Zayıf): belirgin bir kalınlaēmanın bulunduğu yer, 2 (Belirgin): karıēımın kabın merkezi hareket ettirildiğinde hemen kalınlaētıęı yer ve 3 (Güçlü): belirgin jelin bulunduğu yer kütle oluēturma eğiliminde olan bir formasyon olarak değerlendirilir. BMT kiti (solüsyonu) normal ortam sıcaklığı ve nem koēullarında 2 yıl boyunca deęiēmeden kalabilmektedir. BMT kiti ucuz, kolaydır ve ifti dostudur ve reaktifleri yerel olarak mevcuttur. Kit, CMT gibi beē sonuç kategorisine sahiptir (negatif, iz, zayıf, orta ve güçlü). Test kiti çiftçiye memede artan SHS'nin tespiti için basit ve hızlı bir yöntem sağlar. Bu ucuz çiftlik bazlı test, hiçbir karmaēık ekipmana ihtiyaç duymaz ve kısmen hastalığı kontrol etmek için iyi mastit yönetimi uygulamalarıyla birlikte kullanılmak üzere tasarlanmıētır (Kabir & ark., 2019).

## **Sütün pH'sının Ölçülmesi**

Mastit sütün alkalinitesini artırır. Normal inek sütünün pH'ı 6,5 ila 6,8 aralığındadır ve bu da onun hafif asidik olduğunu gösterir. Ancak hücre sayısı yüksek sütlerde 7,0'ı aşabilir. Meme bezinin yangısı sırasında kan kılcal damarlarının geçirgenliği artar, bu da alkali kan bileşenlerinin (sodyum ve bikarbonat iyonları) süte girmesine ve dolayısıyla sütün pH'sının yükselmesine izin verir. Laktasyonun sonlarında ve kuru dönemde ortaya çıkan mastitte sütteki laktoz ve kazein konsantrasyonu azalırken izotonikliği korumak için plazmadan sodyum klorür ve sodyum bikarbonat alveollere geçer. Dolayısıyla bu gibi durumlarda süt, daha fazla miktarda klorür içeren alkali hale gelir (Shoukat & ark., 2018). Bromkresol purpur (BCP) ve Bromotimol blue (BTB) gibi indikatör boyalar uzun yıllardır mastit tanısında sütteki pH değişikliklerini tespit etmek amacıyla kolorimetrik metodlar olarak kullanılmaktadır.

### ***Bromotimol blue testi***

Sütün pH'ının değişmesine dayanır. BTB ile pH tayini ancak akut ve subakut mastitlerde yapılabilir. Çünkü kronik durumlarda, çok az aktif yangının bulunması ve pH değişikliğine neden olacak miktarda eksüdatın üretilmemesi sebebiyle yeterli pH değişikliği tespit edilemeyebilir (Anonim, 2018). Reaksiyon pH şeritleri (pHmetre kâğıdı) kullanılarak ya da test tüpüne konan süte araç eklenerek veya Dijital pH metre ile belirlenebilir (Shahid & ark., 2011; Anonim, 2018).

Bromotimol blue çözeltisi (1 g) bromtimol mavisi, (160 ml) N/100 sodyum hidroksit, (590 ml) damıtılmış sudan oluşur.

pH test kağıtları laboratuvarında 10 x 12 cm'lik şeritler halinde kesilmiş kurutma kağıdından (kalınlık 1,5 mm, ağırlık 0,7 kg/m<sup>2</sup>) (Rising Paper Co., MA) hazırlanmakta olup meme lobunu tanımlamaya yardımcı olmak için bir ucu sivriltilmektedir. Bu test için BTB kartı test kâğıtları Whatman filtre kâğıdı No. 1'den hazırlanabilir. BTB göstergesinin dört turuncu noktası (çapı 3 cm)



(etanol içinde 0,4 ml %0,2 ağırlık/hacim) her bir test kağıdı üzerine kare şeklinde emdirilir (Marschke & Kitchen, 1985). BTB testi, meme başları iyice yıkanıp kağıt havlularla kurutulduktan sonra meme loblarına ait ön sütte yapılmaktadır. Test şeridinin sivri ucu ineğin kafasına doğru tutularak ilk ön süt çekimi (sıkımı) atıldıktan sonra, karşılık gelen gösterge noktalarına (sol ön, sol arka, sağ ön ve sağ arka) az miktarda süt sağılır. Numune almadan önce test şeridi uzunlamasına eksen boyunca yukarı doğru bükülürse fazla süttten kaynaklanan çapraz akış sorunları azaltılabilir. BTB testi için örneklemeden sonraki 1 ila 2 dakika içinde, her gösterge noktasının rengi, renk standartlarına göre 1'den 4'e kadar bir ölçekte puanlanır. Skor 1 (soluk yeşil) normal bir meme lobu olarak değerlendirilir ve 2, 3 ve 4 puanları (orta yeşilden koyu mavi-yeşile doğru artan) anormal meme lobları olarak değerlendirilir (Marschke & Kitchen, 1985). Bu yöntemlerin uygulanması kolay ve uygun maliyetli olmasına rağmen, pH'ın belirlenmesi mastitin tespitinde oldukça dolaylı bir yöntemdir. Mastit dışında başka nedenlerle de (metabolik bozukluklar, dehidrasyon vb.) sütte pH değişiklikleri meydana gelebilir (Srivastava & Kumaresan, 2015).

pH metre cihazı, otomatik tampon tanıma özelliğiyle iki pH noktasında ve beş tampon değerine göre kalibre edilir. pH elektrodu maksimum daldırma seviyesini geçmeyecek şekilde süt numunesine batırılarak okuma stabil hale geldikten sonra pH kaydedilmektedir. Subklinik mastiti tanımlamak için 6,6'lık optimal değer noktası kullanılmaktadır (Alkhouly & ark., 2023).

1 ml bromtimol blue çözeltisi 15 ml kapasiteli bir test tüpüne pipetle konup üzerine pipetle 5 ml süt eklenir. BTB normal süte eklendiğinde sarı renk ortaya çıkar. Alkali süt, BTB eklendiğinde alkalilik miktarına bağlı olarak yeşil ila yeşilimsi mavi renk gösterir (Anonim, 2018).

### ***Bromkresol purpur Testi***

Süt pH'nın belirlenmesinde kullanılır. 5,2'nin altındaki pH aralığında sarıya dönüşme avantajına sahiptir ve bu nedenle anormal derecede asitli süt tespit edilebilir. Bromkresol purpur çözeltisi, 0,9

g bromkresol purpur tozu, 100 ml damıtılmış sudan oluşur. 3ml sũte 2-3 damla % 0.9 bromkresol purpur solũsyonu eklenir ya da 9,5 ml sũte 0,5 ml bromkresol purpur solũsyonu eklenir. Çözelti eklendikten sonra normal sũte ilave edilen solũsyon sarı ya da soluk grimsi mor renkte, mastit sũtũ ise mavi veya mor renkte gũrũnecektir. Bu test, en iyi sonuçları taze sũtte verir ve genellikle kronik mastitlerde pH değişikliği bu testle tespit edilemez (Sharma, Pandey & Upadhyay, 2009; Diwakar & Yadav, 2016).

### **Metilen Mavisı (Methylene Blue) İndirgeme Testi**

Metilen mavisı indirgeme testi, sũtteki bakterilerin kimyasal aktivitelerini, özellikle de solunum aktivitelerini ler. Sũtteki mikroorganizmalar öncelikle solunum yoluyla oksijeni tũketer ve sũtũn tũm oksijeni ve diğer bazı indirgenebilir bileşenleri tũkendięinde veya azaltıldığında metilen mavisinin rengi metilen beyazına dnũřũr (S. Shoukat & ark., 2018).

## **BİYOBELİRTEÇ TESTLERİ**

### **Somatik Hũcre Sayımı**

#### ***Mikroskopla Somatik Hũcre Sayım Yöntemleri***

#### ***Doğrudan mikroskopi ile somatik hũcre sayımı***

Somatik hũcreleri saymanın geleneksel yöntemi, 500x bũyũtme kullanılarak mikroskopla "doğrudan sayma"dır. Test sũtũnũn boyalı yaymalarının mikroskop altında incelendiği ve somatik hũcrelerin sayısının sayıldığı kantitatif bir laboratuvar testidir (Bedolla, Castañeda, & Wolter, 2007). Somatik hũcreleri saymanın geleneksel yöntemi, 500 ya da 1000 bũyũtme kullanılarak mikroskopla "doğrudan sayma"dır. Her ineğin meme lobundan 50 cc karışık sũt şeklinde sũt örnekleri alınır ve tankta toplanan sũt alınarak tanktaki toplam somatik hũcre sayısı da belirlenebilir. Grũř sahası sayma (Breed Sayım) yöntemi ve şerit sayma yöntemi, lam ũzerindeki 5x20 mm<sup>2</sup> boyutundaki iki alana (şerit) sũtũ yaydıktan sonra etũvde 37°C'de sabitlenen sũtũn ũzerine, metilen mavisı içeren boya zeltisinin damlatılması ile çekirdeği bariz

olarak boyanabilen lökositler ve epitel hücreleri gibi somatik hücrelerin sayımı temeline dayanır (Doğan, Çimen & Karakök. 2007; Anonim, 2016). Her ne kadar bir referans olsa da, araştırma çalışmaları için kullanılabilirliğini korumakla birlikte, optik yöntem olarak da bilinen sütteki somatik hücrelerin doğrudan mikroskopik sayım prosedürleri, çok sayıda numuneyle çalışıldığında, günümüzde çok sayıda numuneyi kısa sürede ve yüksek hassasiyetle analiz etmek için kullanılmadığından, güncelliğini yitirmiş sayılmalıdır (Bedolla, Castañeda & Wolter, 2007). Ayrıca bu yöntemler zaman alıcı olmasının yanı sıra, yüksek kaliteli ekipman ve vasıflı personel gerektirir (Martins & ark., 2019). Ek olarak enstrümantasyonun uygulama aralığı sınırlıdır. Operatörün beceri düzeyine bağlı olarak sonuçların değişmesi bu yöntemin diğer bir dezavantajı olabilir. Bu değişkenliğe neden olan faktörler arasında, 0,01 ml numune ölçümünde yanlışlık, lamaların hatalı hazırlanması ve boyanması, bazı somatik hücrelerin boyanmaması, sayımda incelenen sütün miktarındaki azlık, somatik hücrelerin filmlerdeki dağılımındaki düzensizlik, yeterli hücre sayısının sayılamaması, mikroskopun yetersiz veya aşırı aydınlatılması nedeniyle zayıf odaklanma veya renkli filtrelerin yanlış kullanımı, filmi kurutmama, bir yerde yüzeysel göz yorgunluğu, analist deneyimsizliği ve gözlem ve hesaplama hataları sayılabilir. Sonuçlar arasındaki tutarsızlık aynı zamanda hücreler ve sitoplazmik parçacıklar arasındaki özgüllük eksikliğinden de kaynaklanmaktadır (Bedolla, Castañeda & Wolter, 2007; Zajác, Čapla, & Golian, 2019).

Alternatif olarak somatik hücrelerin sayısı, hemasitometre adı verilen mikroskop altında bir sayma lamı kullanılarak belirlenebilir. Lam, ızgaralı bir alanı (900 µL hacim) içerdiğinden, hücre sayımı, bir süspansiyondaki hücrelerin konsantrasyonunun veya yoğunluğunun doğru şekilde hesaplanmasını sağlar. Bununla birlikte, sayma işlemi tipik olarak pahalı ve taşınabilir olmayan bir optik mikroskopla laboratuvar ortamında gerçekleştirilir, bu nedenle kaynakların sınırlı olduğu ortamlarda kullanım için uygun değildir (Kim & ark., 2017).

## **Otomatik Hücre Sayacı**

Dijital görüntü teknolojisinin gelişmesiyle birlikte standart mikroskopî yöntemi temel alan bir yöntem olan bilgisayarlı görme tabanlı yöntem geliştirilmiştir. Tespit prensibi, somatik hücrelerin çiğ sütte floresan olarak boyanması, ardından elde edilen dikkat çekici floresansın bir dizi mercekle ve filtre altında işlenerek merceğe yansıtılması, ardından numunenin fotoğraflanması, okunması, analiz edilmesi ve sonuçların görüntülenmesidir. Bu tür cihazların kullanımı basit ve tespit edilmesi hızlıdır, ancak genellikle daha pahalıdır (Sun & ark., 2023).

### ***Floro-opto-elektronik yöntem (Fossomatik hücre sayacı)***

Temel olarak Fossomatik sayacı bir floresans mikroskopüdür. Fossomatik cihazı ile somatik hücre sayımında temel prensip, hücre çekirdeğinin DNA'sı ile etidyum bromid arasına bağlanan bir boyadan oluşan floresansın emisyonu ve yayılan ışığın belirlenmesine dayanmaktadır (Viguiet & ark., 2009). Hücreler etidyum bromid ile boyanır ve belirli bir dalga boyunda ışık yaymalarına neden olan yüksek enerjili lambalarla ortaya çıkmaktadırlar. Açığa çıkan yüksek enerji elektronik olarak belirlenmektedir ve sonuç bilgisayar ekranına aktarılır.

Cihaz, sıvılardaki hücreleri saymak için kullanılan otomatik bir mikroskoptur. Hücreler etidyum bromür ile boyanır ve daha sonra yüksek enerjili bir lamba ile uyarılarak karakteristik bir dalga boyunda ışık yaymalarına neden olur. Yayılan ışık enerjisi elektronik olarak algılanır, sonuç her ardışık örnek için görüntülenir ve yazdırılır.

Hücre sayımı için süt numuneleri ölçümden 24 saat önce laboratuvara getirilir. Analiz öncesi süt numuneleri, numunelerin yağlarının eritilmesi ve homojen hale getirilmesi için 40 °C'lik su banyosuna yerleştirilir (Aydın & İşcan, 1995). Numuneden 0,2 ml alınır ve döner tabla üzerindeki bir cam kaba aktarılır, burada önceden ısıtılmış tampon ve boya eklenerek iyice karıştırılır. Karışımın bir kısmı daha sonra mikroskop için bir nesne düzlemi

görevi gören dönen bir diskin çevresine aktarılır. Film, bir Xenon ark lambası, merceklere geçen ışık ve mavi bir filtre ile aydınlatılır. Hücrelerden yayılan kırmızı ışık, farklı bir filtreden geçirilerek bir yarığa ve fotoçoğaltıcıya yönlendirilir. Her hücre, bir amplifikatöre beslenen bir elektrik dalgası üretir ve belirli bir dalga boyunda ışık yaymaya başlarlar. Yayılan bu ışık enerjisi elektronik olarak tespit edilir ve her numune için bir değer saptanır. Sayım çıktısının hücre/ml olması için 1000 ile çarpılması gerekir. Bir osiloskop arka plan gürültüsünü, ayırım seviyesini ve sayılan dalgaları gösterir. Transfer hatalarını önlemek için dönen disk sıcak su ve hava püskürtmeleri ile sürekli olarak temizlenir. Elektronik ayırım seviyesi, arka planın toplam sayımı etkilemesini önler. Sayma kapasitesi 180/saattir (Zajác, Čapla, & Golian, 2019).

Somatik hücreler Fossomatik'te floresan boya ile boyanıp yalnızca hücrelerin DNA'sı ile reaksiyon elde edildiği için somatik hücrelerin sayısı kirli parçacıklar ve yağ kürecikleri ile artırmaz. Cihaz, bir numuneden diğerine taşınma etkisini engellemek için her numune arasında akış sistemini otomatik olarak temizler.

Uygulayan kişiye bağımlı olmaması, oldukça yüksek duyarlılık ve doğrulukla ölçüm yapması, numune işleme maliyetinin düşük olması ve girdileri otomatik olarak kaydedebilmesi bu ekipmanın avantajlarıdır. Ancak dezavantajı ise süt somatik hücrelerinin hızlı yerinde tespiti için uygun olmaması, cihazın başlangıç maliyetinin yüksek olması, uzmanlık gerektirmesi ve hücrelerin boyanması için standart bir yöntemin bulunmamasıdır (Rudolph, 1983; Bedolla, Castañeda & Wolter, 2007; Pelvan & Unluturk, 2015; Sun & ark., 2023).

### ***Coulter Counter (Elektriksel Empedans Parçacık Boyutu Yöntemi)***

Coulter Sayacı, elektronik parçacık sayacı prensibiyle çalışan, sıvı akışı sırasında küçük bir açıklığın elektrik iletkenliğindeki değişiklikleri ölçerek parçacıkları ve hücreleri saymak ve boyutlandırmak için tasarlanmış bir cihazdır. Sayaç, çapı yaklaşık 4,4 µm veya daha büyük olan tüm parçacıkları sayacak

şekilde kalibre edilmiştir (Janik, 2013). Hücrelerin sabitlemesi ve tespit edici olarak kullanılan maddelerin bakteriyostatik etkisi nedeniyle süte çeşitli tespit ediciler eklenir. Tespit edici olarak Somafix veya %25 formalin kullanılır. 10 ml süte 3 damla formalin ilave edilerek oda sıcaklığında 24-48 saat bekletilir.

Sütteki yağ parçacıklarının ayrıştırılması için numuneler 100 hacim somatonla seyreltilir. 20 dakika  $85 \pm 1$  ° C'lik su banyosunda tutulup sonra 10 dakika  $80 \pm 1$  ° C'da tutulur, böylece sütteki yağ partikülleri çözünür.  $20 \pm 2$  °C'de 5 dakika soğutulur ve Coulter Sayacı'na yerleştirilerek 0,5 ml'lik numuneler sayılır. Bir elektrolit içinde aslı kalan parçacıklar, kalibre edilmiş bir kılcal açıklıktan (iki elektrot arasında 100 mikron boşluk) güçlü bir vakum altında emilir. Bu geçiş sırasında güç hareket eden parçacıklar geçiş hızını etkiler ve geçiş sırasında dalgalanmalar meydana gelir. Bu dalgalanmalar elektrotlarla güçlendirilir ve bir sayaç cihazıyla değerlendirilir. Dalgalanmaların sayısı delikten geçen partikül sayısını verir. Impulsun yüksekliği parçacıkların volümüne bağlıdır. Sayıcı  $54 \mu^3$ 'den büyük hücre hacimlerindeki parçacıkları sayacak şekilde kalibre edilmiştir. Mastitli, sağlıklı ve kolostrumlu memelerden alınan sütlerin hücre hacimleri farklıdır. Mastitli lobların hücre hacimleri  $89-178 \mu^3$  arasında iken ağız sütündeki hücre hacmi  $44-714 \mu^3$  olabilir. Kullanılan sabitleyicinin türü ve yoğunluğu, sayım öncesi ısı ve yapılan diğer işlemler sayımı etki eden etmenlerdir (IDF, 1981; Saler & Karakök, 2006). Coulter counter ile somatik hücrelerin büyüklüğündeki tüm partikülleri sayma dezavantajı bulunmaktadır (Alaçam & Şahal, 1997).

### ***DeLaval Hücre Sayacı***

DeLaval Hücre Sayacı (DCC), somatik hücreleri optik ve otomatik olarak saymaya yönelik analitik, taşınabilir, pille çalışan bir cihazdır. Bu, ineğin memesinin sağlık durumunu incelemeyi mümkün kıldığı gibi, tanktaki sütün hijyen standartlarını da incelemeyi mümkün kılar (Kawai & ark., 2013). Cihazda az miktarda süt konulan kasetler kullanılmaktadır. Kasetin içinde süt, somatik hücrelerin çekirdeğine ulaşan reaktiflerle karıştırılarak

floresans sensörü kullanılıp sayılmasına olanak sağlanmaktadır. DCC yöntemi sıgır sütü için 4°C ve 37°C'de geçerlidir (Kandeel & ark., 2019).

DCC, somatik hücreleri optik olarak otomatik olarak sayar ve yerleşik bir dijital kamera, kasette DNA'ya özgü bir floresan reaktifle (propidyum iyodür) boyanan somatik hücrelerin çekirdeklerinin resmini çeker. Somatik hücre çekirdeklerinin bu şekilde boyanmasıyla tek tek hücreler sayılabilir. DCC'nin avantajları düşük başlangıç maliyeti, hızlılığı ve üstün taşınabilirlik ile kompakt olmasıdır. Bu yöntem yüksek varyasyon katsayısı ve düşük tekrarlanabilirlik gibi dezavantajlara sahiptir.

DCC'nin sahada kullanımının yaygınlaşacağı öngörülse de, toplu tanklardan ve bireysel ineklerden alınan sütlerde  $SHS \leq 4 \times 10^6$  hücre/mL ölçümü için özel olarak geliştirildiğinden, bu konsantrasyonu aşan SHS'lı süt numunelerinde güvenilirliği incelenmemiştir (Kawai & ark., 2013).

### ***Viskosimetrik Metodu Somatik Hücre Sayım Cihazı (Viskosimetrik süt analizörü)***

Viskosimetrik süt analizörü, kapilerden kontrollü örnek çıkış süresi ile tahmin edilen viskozite belirleme prosedürüne dayalı olarak süt kontrolü ve somatik hücre sayısının tespiti gayesiyle tasarlanmıştır. Sütte somatik hücre değerlendirmeleri için dizayn edilmiş küçük, uygun fiyatlı, pratik ve uygulanabilir bir servis ve çalışma aygıtıdır. Somatik hücre sayma aletinin tüp kısmına 5 ml mastoprim solüsyonu konularak üzerine 10 ml süt eklenir. Makine iki sıvıyı on kez ters çevirerek karıştırır. Süt, kızılötesi sensörün önünde cihazın haznesine yukarıdan aşağıya 90 derecelik açıyla dökülürken, kızılötesi sensör solüsyon ve süt karışımı bitene kadar analiz yapar. Sonuç cihazın ekranından okunur (Anonim, 2016).

### **Enzimatik Yöntemler**

Bu yöntemler sütteki yüksek enzimlerin tespitine dayanmaktadır. Mastitte, meme bezindeki N-Asetil glukozmainidaz (NAGaz) ve laktat dehidrojenaz (LDH) gibi metabolik enzimlerin

veya lokal bağıışıklıkta rol oynayan enzimlerin çoğu artar. Sütün senteziyle görevli enzimler azalır, yangıyla ilgili enzimler artar. Fagositlerden kaynaklanan enzimler katlanarak artar ve bunlar N-asetil--D-glukozaminidaz (NAGaz), beta-glukuronidaz ve katalazı içerir. Kandan kaynaklanan enzimlerin aktivitesi de artar; örneğin plazminojen, daha sonra lokal olarak fibrin ve kazeini parçalayan bir proteolitik enzim olan plazmine aktive edilir (Pyörälä, 2003). Kolorimetrik ve florometrik analizler bu enzimleri hem niteliksel hem de niceliksel olarak tespit etmek için tasarlanmıştır (Srivastava & ark., 2015). Subklinik olgularda bu enzimler dışında lipaz, plazmin, fosfataz, esteraz gibi enzimler de artış göstermektedir (El Nahas & ark., 2017).

### ***Porta SCC süt testi***

"Portacheck" adı verilen test, esteraz katalizli enzimatik reaksiyon ürününün ölçümüne dayanmaktadır. Bu, toplam SHS'nin dolaylı olarak ölçümüdür. PortaSCC testi (PortaCheck Inc., Moorestown, NJ), esteraz için farklı bir boya substratı olan 3-(N-tosil-l-alaniloksi)-indol kullanan süt esteraz aktivitesini ölçmek için hızlı ve kullanımı basit bir teşhis testi sağlar (Kandeel & ark., 2019). Porta SCC süt testinin 3 versiyonu mevcut olup bunların tümü, birkaç yeni membran katmanı ve bir kuru reaktif sistemi içeren bir test şeridi kullanır. Bu testin prensibi, şerit üzerindeki boya ile sütün somatik hücrelerinde bulunan enzim (esteraz) arasındaki kimyasal reaksiyondur. Test şeridindeki rengin yoğunluğu somatik hücre sayısı ile pozitif ilişkilidir. Mavi rengin yoğunluğu sütteki SHS ile doğru orantılıdır. Sonuçlar, kimyasal reaksiyonu tetikleyen aktivatörün uygulanmasından 45 dakika sonra değerlendirilir (Rowe & ark., 202; Hisira & ark., 2023). PortaSCC testinin bir versiyonu, bir renk şeması kullanılarak niteliksel olarak veya dijital bir okuyucu tarafından niceliksel olarak okunan orijinal PortaSCC renk testidir ve diğeri ise daha yakın zamanda geliştirilen PortaSCC hızlı testidir. Her iki test de aynı teknolojiyi kullanır ancak kullanılan süt ve reaktif miktarı ile inkübasyon süresi açısından farklılık gösterir. Dijital bir okuyucu kullanılarak, renk değişimine dayalı olarak tam SHS belirlenir (Kandeel & ark., 2019).



*PortaSCC renk testi*, test şeridine test kitiyle birlikte verilen pipet kullanılarak numune haznesine 1 damla iyice karıştırılmış süt konulur ve ardından şeride 3 damla aktivatör çözeltilisi eklenerek SHS değeri 45 dakika sonra üretici firma tarafından sağlanan renk skalası kullanılarak ölçülür. Test şeridinin rengi, somatik hücre sayısını (SHS; x 1000 hücre/mL) <100, 250, 500, 750, 1.500 veya >3.000 olarak tahmin etmek için referans tablosuyla görsel olarak karşılaştırılır (Kandeel & ark., 2019).

Renk ayrıca test pedi üzerindeki mavi rengin yoğunluğuna bağlı olarak özel bir algoritma kullanarak SHS'yi hesaplayan bir dijital okuyucu kullanılarak ta ölçülebilir. Okuyucu, ölçülen SHS 50.000 ila 3.500.000 hücre/mL arasında olduğunda bir değer sağlar ancak SHS<50.000 hücre/mL olduğunda "LO" kaydeder (Kandeel & ark., 2019).

*PortaSHS hızlı testi*, test kitiyle birlikte verilen pipetin ucuyla scribe dokunmadan test sribi deliğine 3 damla süt eklenir. Süt emildikten sonra aynı deliğe 4 damla (150 µL) aktive edici solüsyon ilave edilir. 5-6 dakika içinde somatik hücre sayısı, şerit renk skalasıyla karşılaştırılarak değerlendirilir. Alt tabaka rengi değişmediyse (< 100.000) sonuç negatif veya sıfır olarak kabul edilir. Açık mavi renk görülmesi halinde sonuç “bir artı” (1 ml’de 200.000), test alanı deniz yeşili renkte ise sonuç “iki artı” (1 ml’de 200.000–500.000) ve test şeridinin mavi rengi “üç artı” (sırasıyla 1.000.000 hücre/ml) olarak değerlendirilmektedir (Mazurenko & Manchulyak, 2017).

Kullanıcı dostu, yerinde bir laboratuvar kullanılmadan gerçekleştirilebilen, uygun maliyetli ve hızlı bir testtir. Bu testin uygulanması, düşük SHS'deki düşük hassasiyet nedeniyle sınırlıdır (Kandeel & ark., 2019).

### ***UdderCheck™ Testi***

UdderCheck, taze süt numunelerinde laktat dehidrojenazı (LDH) ölçen bir seviye çubuğu (Dipstick) mastit testidir. Bu süt çubuğu testi sadece iki dakika içinde renk şemasıyla karşılaştırılan

yarı niceliksel sonuçlar sağlar. Test şeridi üzerindeki reaktif pedi hareketsizleştirilmiş substrat L-laktatı içerir. Bir dizi birleşik enzimatik reaksiyon yoluyla, bu substrat sütteki laktat dehidrojenaz (LDH) tarafından oksitlenirken aynı anda nitrotetrazolyum mavisi göstergesi mor bir formazana indirgenir. Formazanın son renk yoğunluğu sütteki laktat dehidrojenaz konsantrasyonuyla orantılıdır.

Sütteki laktat dehidrojenaz aktivitesi UdderCheck™ kiti (PortaChek™, ABD) kullanılarak belirlenir. Test şeridi cımbızla çıkarılır. Meme başının birinden süt örneği doğrudan test şeridinin üzerine (pedine) sıkılır veya 10 saniye boyunca önceden memenin loblarının birinden alınmış bir numuneye batırılır. Daha sonra test şeridi süttten çıkarılır ve fazlası silkelendir, 2 dakika sonra test şeridinin rengi, <100, 100–200, 200–500 ve > 500'de LDH konsantrasyonunu (U/L) tahmin etmek için görsel olarak üreticinin kavanozundaki renk skalasıyla karşılaştırılır (Iraguha & ark., 2017; Rowe & ark., 2020).

LDH, somatik hücre sayısı ile ilişkilidir. LDH seviyeleri sıklıkla SHS'den daha erken yükselir, bu da onu mastitin erken tespiti için bir gösterge haline getirir. Basit, ucuz olması ve kabul edilebilir duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması nedeniyle robotlarda sütteki hat içi laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesinin ölçülmesi, subklinik mastitin saptanması için bir gösterge olarak değerlendirilir. Ancak süt ineklerinde meme sağlığının değerlendirilmesinde doğum sayısı ve laktasyon aşamasının genel sonuçlar üzerindeki etkisi dikkate alınmalıdır (Malašauskienė & ark., 2020).

### ***NAGase Testi***

NAGase konsantrasyonu ile patojenlerin ve klinik enfeksiyonların varlığı arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır. Patojenik bakterilerin varlığı ve tipine ve somatik hücre sayımlarına bağlı olarak ön sütün NAGaz seviyesinde değişiklikler gözlenmektedir (Kumar & ark., 2020). NAGaz fagositik hücrelerden, daha kesin olarak nötrofillerden kaynaklanır, dolayısıyla bu lizozomal enzimlerin inflamasyonun güvenilir göstergeleridir. Fagositoz ve hücre lizizi sırasında NAGase yüksek

miktarlarda süte salınır. Bu enzim aynı zamanda hasar görmüş epitel hücrelerinden de salılabilmektedir (Benić & ark., 2018; Novac & Andrei, 2020). Süt NAGase seviyeleri, laktasyonun başında ve sonunda yüksektir (Constable & ark., 2016). Süt NAGase enzim konsantrasyonlarını ölçmek için kolorimetrik ve florimetrik analizler geliştirilmiştir. Ticari olarak mevcut bir test yoktur (Obara, 1985; Kumar & ark., 2020).

NAGaz aktivitesinin kolorimetrik yöntemle de belirlenmesinde, süt numunelerine sitrat tampon çözeltisi (200 mM, pH 4.5) eklenerek 2.5 ila 11 kat seyreltilir. Bu test materyalinin 0,5 ml'sine, substrat olarak 1 ml 0,33 mM p-nitrofenil-N-asetil-,8-D-glukozaminid solüsyonu (sitrat tampon solüsyonu içerisinde) ilave edilir. Nihai karışım, 37°C'de 1 saat süreyle inkübe edilerek inkübasyonun sonunda reaksiyonu durdurmak için 3 ml 1 M glisin (pH 10.5) ilave edilir. Kloroform (3.5 ml) eklendikten sonra karışım çalkalanır ve ardından 3000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüjlenir. Serbest bırakılan p-nitrofenol miktarı, süpernatant tabakasının 410 nm'sinde kolorimetri ile belirlenir. NAGase aktivitesi, 1 dakika boyunca 1 ml süt başına üretilen p-nitrofenol miktarı olarak ifade edilmektedir (Obara, 1985).

Tüm dolaylı teşhis testleri arasında NAGase aktivasyon tahmininin en yüksek doğruluğa sahip olduğu bulunmuştur, ancak testin pahalı olması, gelişmiş ekipman (Fluorimetre) ve özel eğitim gerektirmesi, testin yapılması en az yarım gün sürmesi gibi bazı dezavantajları vardır. Bu nedenle en yüksek doğruluğa sahip olmasına rağmen saha şartlarında gerçekleştirilmesi zordur (Shoukat & ark., 2018).

### **Süt Antitripsin Testi (Maum Testi)**

Süt antitripsin aktivitesi, kan á-1 Proteaz inhibitörünün süte sızmasından kaynaklanır ve artan geçirgenliğin göstergesidir. Normal süt  $\leq 200$  BEN ünitesi/ml tripsin inhibitörü içermektedir. Ancak mastitte bu durum birkaç katına çıkar ve bu da subklinik mastit teşhisinde tripsin inhibitör testini mastitin erken tespiti için kullanışlı hale getirir. Testin kolaylıkla yapılabilir ve ucuz olması,

testi yapmak için özel bir eğitim gerektirmemesi ve sonuçların 15 dakika içinde elde edilmesi bu testin avantajlarından. Bu testin tek dezavantajı etiyolojik ajanların tespit edilememesidir. Ancak bu test arazi şartlarında kolaylıkla uygulanabilmektedir. Kolostrum ve laktasyon dönemi sütteki antitripsin aktivitesini etkiler. Kolostrumda yüksek düzeyde antitripsin görülür ve buzağılamadan sonraki birkaç gün içinde azalır. Laktasyon döneminin etkisi laktasyonun erken ve sonunda belirgindir ve meme bezinin enfekte olmasıyla düzeyi artar (Shoukat & ark., 2018).

### **Mikrobiyolojik Testler**

Mastit durumunda süt mikrobiyolojisinin amacı, mastit kontrolünün ve/veya tedavi önlemlerinin uygulanmasını kolaylaştırmak için geniş patojen gruplarını tanımlamaktır (Middleton & ark., 2017). Mikrobiyolojik yöntemler; geleneksel ve hızlı yöntemler şeklinde ikiye ayrılır. Spesifik olmayan veya spesifik büyüme ortamlarında morfoloji ve fenotip ekspresyonuna dayanan geleneksel mikrobiyolojik yöntemler, bir meme içi enfeksiyonun saptanması için "altın standart" olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, tüm sağmal ineklerden numune alınmasıyla ilgili lojistik ve mali hususlar, bu tekniğin geniş çapta benimsenmesine engel olmuştur. Süt kültürü mastit patojenlerinin varlığını tanımlar ancak enfeksiyonla ilişkili inflamasyonun derecesi hakkında bir ölçüm sağlamaz (Sharma, Pandey & Sudhan, 2010). Bu yöntemler halen veterinerlik uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Middleton & ark., 2017). Hızlı yöntemler terimi, farklı tiplerdeki minyatürize biyokimyasal kitleri, antikor temelli serolojik testleri, nükleik asit hibridizasyon bazlı yöntemleri ve biyosensörleri içermektedir. Bu test yöntemleri manuel, yarı otomatik veya tam otomatik olarak kullanılabilirler (Aras, 2011). Organizmanın üretilmesine olanak sağlayan bir takım özel kültür vasatlarına seçici olarak ekilmesiyle tespit edilir veya Gram boyama gibi fizyolojik vasıflarının göz önünde bulundurulduğu boyama yöntemleri, morfolojik koloni nitelikleri, farklı kültür vasatlarında üreme nitelikleri ve organizma tarafından oluşturulan veya tüketilen

metabolit niteliklerine göre tanımlanmaktadır (Gürsoy & Otlu, 2017).

Direkt yaymada, şüphelenilen mikroorganizmaya göre giemsa, gram, ziehl neelsen, newman boyaları ile boyanır. Genel testler ve vasatlar olarak Gram boyama, KOH, Katalaz ve Oksidaz testleri, özel vasat kültürlerinde sabouraud dekstroz agar (Mycotic), baird parker vasatı (Staph.), Edward'tın medyumunu (Strep.), Macconkey (enterobacteriaceae) ağarı kullanılmaktadır. Streptokoklar için özel testler olarak Karbonhidrat Fermantasyonu, Sodyum Hippurat, Eskülin Hidrolizi, CAMP-eskülin ve S. aureus Beta-hemolizin; Stafilokoklar için özel test olarak Koagülaz Tüp Testi; Gram negatif patojenlere yönelik spesifik testler olarak da MacConkey Agar Reaksiyonu, Üçlü Şeker Demir Agar, Simmons Sitrat Agar ve Hareketlilik testleri geliştirilmiştir (Middleton & ark., 2017).

Mikroorganizmaların tanımlanması için kullanılan konvensiyonel biyokimyasal testler yoğun emek ve fazla miktarda reaktif ve vasat gerektirir. Minyatürleştirilmiş biyokimyasal tekniklerde anhidre reaktifler veya kullanıma hazır vasatlar kullanılır. Rutin laboratuvar uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Minyatür biyokimyasal tekniklerde saf kültürler, pleytler üzerinde bulunan çeşitli sıvı veya katı vasatlara aşılanarak inkübasyona tabi tutulur ve bakteriler, enzim-substrat ilişkisinden kaynaklanan renk değişimi veya gaz formasyonu ile saptanır. Sonuçlar tanı tablolarıyla kıyaslanabilir veya veritabanları kullanılarak tahlil edilebilir. Mikrobiyolojik tekniklerin minyatürleştirilmesi, ticari mikrobiyolojinin malzeme ve zaman tasarrufuyla hızlı ve kolay bir şekilde çalışmasını sağlamıştır. Geliştirilen sistemler ile bilhassa rutin tanı laboratuvarlarında çok sayıda numune kısa zamanda işlenebilmektedir (Fung,2006). Hızlı minyatür test kitleri olarak Vitek Gram pozitif tanımlama kiti ve API Rapid Strep sistem kitleri kullanılmaktadır (Aras, 2011).

## **Moleküler Yöntemler**

Mikrobiyal DNA, RNA, proteinler veya diğer metabolitlerin tespitine dayanan moleküler yöntemler, tarihsel olarak araştırma laboratuvarlarında patojen epidemiyolojisini anlamak için kullanılmıştır. Moleküler temelli teşhis usullerinin ilerleme göstermesiyle birlikte virülans nitelikleri gen bazında tanımlanmaya başlanmıştır. N-terminal aminoasit sekans analizi, DNA sequencing, Southern blot ve hibridizasyon teknikleri ile Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulanan moleküler yöntemler arasında yer almaktadır (Said & ark., 2022). PCR virülans genlerinin hızlı ve doğrudan tespitine olanak sağlar (Babalola, 2003). Son on yılda, moleküler tekniklere dayalı teşhis testleri, günümüzde bir ineğin veya meme lobunun meme içi enfeksiyonu olup olmadığını belirlemek veya mastite neden olan bakterilerin epidemiyolojisini incelemek için kullanılmaktadır. Meme içi enfeksiyonu teşhis etmek için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak mikrobiyal DNA'nın tespiti; ve cins ve tür tanımlaması için moleküler yöntemler kullanılarak veya belirli bir cins ve tür içindeki bakterilerin suş tipi belirlenerek mastit epidemiyolojisinin araştırılması için araştırma laboratuvarlarında çeşitli moleküler yöntemler uygulanmaktadır (Kour & ark., 2023). PCR bazlı yöntemler birçok durumda geleneksel bakteri kültürü yöntemlerinden daha hızlıdır. Ayrıca bu yöntemler, örneğin *Mycoplasma spp* veya anaerobik bakteri cinsleri gibi rutin kültür koşulları altında büyümesi zor olan organizmalardan DNA'nın saptanması için de kullanılabilir. Ancak bu durumda, daha fazla manipülasyon için bir izolatin toplanması amacıyla bakteri kültürüne hâlâ ihtiyaç vardır. Cins ve türlerin tanımlanması için PCR, DNA dizilimi veya proteomik yöntemler dahil olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Belirli bir cins ve tür içindeki patojenlerin suşa göre gruplandırılması, pulsed-field jel elektroforezi (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), rastgele arttırılmış polimorfik DNA tiplemesi (randomly amplified polymorphic DNA typing, RAPD), arttırılmış parça uzunluk polimorfizmi (amplified fragment length polymorphism, AFLP) ve çok lokuslu dizi tiplemesi (multi-locus sequence typing,

MLST) gibi teknikler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. (MLST) (Middleton & ark., 2017).

Günümüzde meme içi enfeksiyon tanısı için pazarlanan ve sütteki bakteriyel DNA'yı tespit etmek için gerçek zamanlı PCR yöntemlerini kullanan ticari test kitleri bulunmaktadır. Thermo-Fisher (Pathoproof™) aracılığıyla sunulan böyle bir test, rutin kültür olmadan doğrudan süte uygulanabilmektedir. Bu test, yaygın olarak görülen 16'ya kadar farklı mastit patojeninin DNA'sını tespit eder ve "benzersiz hassasiyet ve özgüllük" ile 4 saat içinde sonuç verir ve meme lobu ya da tank süt numunelerine uygulanabilir. Kullanılan kültür ortamına bağlı olarak sonsuz sayıda cins ve türü tespit etme potansiyelinin bulunduğu geleneksel kültürden farklı olarak bu test yalnızca PCR primerlerinin dahil olduğu 16 patojeni saptayabilmektedir. Test yalnızca DNA'yı tespit ettiğinden memede "yaşam kanıtı" sunmadığından aktif bir meme içi enfeksiyonun mevcut olup olmadığını algılayamaması sebebiyle ölü mikroorganizmada da gen bölgeleri korunduğu için yanlış pozitif sonuç alınabilmektedir (Middleton & ark., 2017).

MALDI-TOF kütle spektrometrisindeki iyon kaynağı matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyondur ve uçuş süresi (MALDI-TOF) kütle analizörüdür. MALDI-TOF tekniği, mastitli süt örneklerinde bakterilerin tanımlanmasında zemin kazanan proteomik temelli bir yaklaşımdır. Proteomik bazlı matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresini (MALDI-TOF MS) kullanan kütle spektroskopisi bakteriyel tanımlama sistemleri birkaç dakika içinde bakteri türlerini ve bakteri suşlarını belirlemek için yapılabilir. Bu yüksek verimli yöntemler (örneğin Sensititre AP90™), geleneksel fenotipik tanımlamanın yerini alma ve/veya tamamlama potansiyeline sahip, %100 duyarlılık ve özgüllük değerlerine ulaşan güvenilir, kullanımı kolay ve uygun maliyetli bir tekniktir. Bununla birlikte, MALDI-TOF MS'nin tanımlama yeteneği, mevcut bakteriyel protein profillerinin spesifik spektrum veritabanları ile sınırlıdır ve bu teknoloji, teşhis laboratuvarlarında yaygınlaştırılmayacak kadar maliyetlidir (Duarte, Freitas & Bexiga 2015; Kour & ark., 2023).

Hedef bakterileri spesifik olarak yakalayabilen ve çip üzerinde elde edilen desenin okunabildiği bir oligonükleotid prob bazlı biyoçip geliştirilmiştir. Yedi önemli bakteriyel mastit patojeninin saptanmasında özgüllüğü ve etkinliği açısından test edilmiştir. Bu biyoçip, süt çiftçilerinin rutin kullanımı için uygun değildir. İyi donanımlı bir moleküler biyoloji laboratuvarı ve eğitilmiş personel gerektirmesi bu biyoçipin dezavantajıdır (Lee & ark., 2008).

Meme enfeksiyonu sırasındaki inflamatuvar yanıtı gösteren belirteçler son on yılda ELISA ile test edilmiştir. Tümör nekroz faktörleri ve interlökinler gibi sitokinlerin ve haptoglobin gibi akut faz proteinlerinin ELISA ile tespiti, sığırlarda mastitin tanımlanmasında önemli bir belirteç olarak kabul edilmektedir (Kour & ark., 2023). ELISA, yöntemlerinin dezavantajları arasında çapraz reaksiyonlar nedeniyle özgül olmayışı, dolayısıyla daha az doğruluk, yüksek maliyet, altyapı ve teknik açıdan vasıflı kişi gerektirmesi sayılabilir (Duarte, Freitas & Bexiga, 2015; Chakraborty & ark., 2019). Standart kültür teknikleri kullanılarak klinik mastit vakalarından hiçbir bakteriyel patojen izole edilemediğinde, *S. aureus*, *E. coli*, *S. disgalactiae* ve *S. agalactiae*'ye karşı antijenleri tespit etmek için enzime bağlı immünosorbent analizleri (ELISA'lar) kullanılabilir. Bu patojenlere karşı antijenler, hiçbir patojenin izole edilmediği ancak SHS'nin 500.000 hücre/mL'den fazla olduğu klinik mastitli ineklerden alınan meme lobu numunelerin %50'ye kadarında bir ELISA kullanılarak tespit edilebilir. Bu umut verici bulgulara rağmen ELISA'lar mastit patojenlerinin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmamaktadır (Constable & ark., 2016).

### **Kızılötesi Termografi (IRT)**

Kızılötesi termografi, klinik ve subklinik mastiti ayırt edebilmesi açısından CMT ile neredeyse aynıdır. Kızılötesi termografi etkili, taşınabilir ve mastiti erken teşhis etmek için yerinde kullanılacak yeni bir yaklaşımdır. Enfekte ve sağlıklı memeler arasındaki sıcaklık farkına dayanır. Termal kameralar ısı



resimleri üretir ve bunlar daha sonra meme enfeksiyonunun derecesini belirlemek için analiz edilir. Meme yüzeyinin sıcaklığındaki en küçük değişiklikleri bile tespit edebilir, bu da onu erken evre mastit teşhisinde faydalı kılar (Said & ark., 2022).

## KAYNAKÇA

Ajose, D. J., Oluwarinde, B. O., Abolarinwa, T. O., Fri, J., Montso, K. P., Fayemi, O. E., Aremu A.O. & Ateba, C. N. (2022). Combating bovine mastitis in the dairy sector in an era of antimicrobial resistance: ethno-veterinary medicinal option as a viable alternative approach. *Frontiers in veterinary science*, 9, 800322. doi: 10.3389/fvets.2022.800322

Alaçam, E. & Şahal, M. (Ed). (1997) Sığıır Hastalıkları. Ankara: Medisan.

Alkhouly, I.N., Moustafa, A.A., Abou El Roos, N.A., & Kandeel, S.A. (2023). Evaluation and Comparison of Four Screening Tests against Milk Culture for Detection of Subclinical Mastitis in Lactating Cattle and Buffalo in Egypt. *Journal of Applied Veterinary Sciences*, 8 (3): 54-66). Doi:10.21608/javs.2023.211272.1234

Andrews A.H., Blowey R.W., Boyd H. & Eddy R.G. (2004). *Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle*. (2nd Edit). Blackwell Science, Oxford.

Anonim (2016). Türkiye Cumhuriyeti Milli Eğitim Bakanlığı, Hayvan Yetiştiriciliği ve Sağlığı Meme Hastalıklarıyla Mücadele. Ankara. (09/12/2023 tarihinde [https://megep.meb.gov.tr/mte\\_program\\_modul/moduller/Meme%20Hastal%C4%B1klar%C4%B1yla%20M%C3%BCcadele.pdf](https://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller/Meme%20Hastal%C4%B1klar%C4%B1yla%20M%C3%BCcadele.pdf) adresinden ulaşılmıştır).

Anonim (2018) Examination of milk. (09/12/2023 tarihinde [https://cvet.tu.edu.iq/images/lectures/2017-2018/CP4/Examination\\_of\\_milk.pdf](https://cvet.tu.edu.iq/images/lectures/2017-2018/CP4/Examination_of_milk.pdf) adresinden ulaşılmıştır).

Aras, Z. (2011). Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(2), 97-104. Doi: 10.5505/TurkHijyen.2011.96530

Atasever, S., & Erdem, H. (2008) Süt sığırlarında mastitis ile sütün elektriksel iletkenliği arasındaki ilişkiler. *Anadolu Tarım*

Bilimleri Dergisi, 23 (2), 131-136.  
<https://doi.org/10.7161/anajas.2008.23.2.131-136>

Aydın, N., & İşcan, D. (1995). Ankara Yöresindeki Kamu ve Özel Kurumlarda Bulunan Süt İneklerinden Alınan Sütlerdeki Somatik Hücre Sayısında Fossomatik Uygulamasının Önemi. *Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 8 (1), 147-162.

Babalola, O. O. (2003). Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. *African journal of biotechnology*, 2(12), 710-713. Doi: 10.5897/AJB2003.000-1127

Baştan, A. (2010) İneklerde Meme Sağlığı ve Sorunları. Ankara: Kardelen Ofset Matbaacılık.

Bedolla, C. C., Castañeda, V. H., & Wolter, W. (2007). Métodos de detección de la mastitis bovina (Methods of detection of the bovine mastitis). *REDVET. Revista Electrónica de veterinaria*. 8 (9)

Blowey, R.W. (1999). *Veterinary Book For Dairy Farmers*. (Third edit). Farming Press Ltd. 2 Wharfedale Road, Ipswich, UK.

Garcia-Cordero ve ark. 2010; Duarte ve ark. 2015, 2017). (Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population—a review).

Chakraborty, S., Dhama, K., Tiwari, R., Iqbal Yattoo, M., Khurana, S. K., Khandia, R., Munjal, A., Munuswamy, P., Kumar, M.A., Singh, M., Singh, R., Kumar Gupta V. & Chaicumpa, W. (2019). Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population—a review. *Veterinary Quarterly*, 39(1), 76-94. Doi:10.1080/01652176.2019.1642546

Cheng, W. N., & Han, S. G. (2020) Bovine mastitis: Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments—A review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 33 (11), 1699–1713. Doi: 10.5713/ajas.20.0156

Constable, P.D., Hinchcliff, K.W., Done, S.H. & Grünberg, W. (2016) Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. (11th edit) Elsevier Health Sciences.

Demet, İ. (1993). Mastitiste somatik hücre sayımı yöntemleri ve somatik hücre sayısının önemi. Veterinarium, 4(2), 47-56.

Deveci, H., Apaydın, A. M., Kalkan, C., & Öcal, H. (1994). Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları. 1. Baskı, Fırat Üniversitesi Basımevi, Elazığ.

Diwakar, R., & Yadav, V. (2016). Current trends in diagnosis of mastitis: In Field Veterinary Practices, International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences, 4 (8), 95-100

Doğan, B.H., Çimen, Ö., & Karakök., S.G. (2007) Süt Sığırcılığında Kaliteli Süt Üretiminde Somatik Hücre Sayısının Kullanımı, 3. Ulusal Zootekni Öğrenci Kongresi, 17-18 Mayıs 2007, Kahramanmaraş).

Duarte, C.M., Freitas, P.P., & Bexiga, R. (2015). Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. Journal of veterinary diagnostic investigation, 27 (6), 665-672. Doi:10.1177/1040638715603087

El Nahas, S.M., Abou Mossallem, A.A., Abdelhamid, M.I., & Warda, M. (2017). A study on IL8RB gene polymorphism as a potential immuno-compromised adherent in exaggeration of parenteral and mammo-crine oxidative stress during mastitis in buffalo. Journal of advanced research, 8(6), 617-625. Doi: 10.1016/j.jare.2017.07.002

Fernández Bolaños, O. F., Trujillo Graffe, J. E., Peña Cabrera, J. J., Cerquera Gallego, J., & Granja Salcedo, Y. (2012). Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. Revista electrónica de Veterinaria, 13(11), 1-11.

Fung, D.Y.C. (2006) Rapid methods and automation in microbiology: 25 years of development and predictions. Bull Tech U Ist, 54 (4), 45-55.

Giesecke, W. H., den Heever, V., & Wepener, L. (1974). The diagnosis of bovine mastitis with particular reference to subclinical mastitis: a critical review of relevant literature. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 41 (4), 169-712).

Gürsoy, N.C., & Otlu, B. (2017). Mikrobiyota çalışmalarında moleküler tanı yöntemleri. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 1, 56-67.

Hamann, J., & Zecconi, A. (1998). Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator. *International Dairy Federation, Bulletin* 334, 5–22.

Haxhiaj, K., Wishart, D. S., & Ametaj, B. N. (2022) Mastitis: What it is, current diagnostics, and the potential of metabolomics to identify new predictive biomarkers. *Dairy*, 3 (4), 722-746. <https://doi.org/10.3390/dairy3040050>.

Hisira, V., Zigo, F., Kadaši, M., Klein, R., Farkašová, Z., Vargová, M., & Mudroň, P. (2023). Comparative Analysis of Methods for Somatic Cell Counting in Cow's Milk and Relationship between Somatic Cell Count and Occurrence of Intramammary Bacteria. *Veterinary Sciences*, 10 (7), 468. Doi:10.3390/vetsci10070468

Hogeveen, H. (Ed). (2005) Mastitis in Dairy Production: Current knowledge and future solutions. Wageningen Academic Publishers.

IDF (International Dairy Federation) (1981). Laboratory methods for use in mastitis work. *International Dairy Federation Bulletin*, 132.

Iraguha, B., Hamudikuwanda, H., Mushonga, B., Kandiwa, E. & Mpatswenumugabo, J.P., (2017) Comparison of cow-side diagnostic tests for subclinical mastitis of dairy cows in Musanze district, Rwanda. *Journal of the South African Veterinary Association* 88(0):e1-e6. Doi:10.4102/jsava.v88i0.1464

Janik, I. A. (2013). The detection and prediction of mastitis in dairy cows by particle analysis (Doctoral dissertation, Coventry University).

Johri, A., Arora, N., Maansi, M. M., Singh, S. P., & Singh, J. L. (2023). Milk electrical conductivity: An early tool to detect mastitis in buffaloes. *The Pharma Innovation Journal* 12(4), 578-580.

Kabir, M.H., Ershaduzzaman, M., Giasuddin, M., Nazir, M.N.I., Yousuf, M.A., Khatun, R. & Ali, M.Y. (2018) Development and validation of a low-cost mastitis detection kit. Proceedings of the Annual Research Review Workshop, BLRI, Savar, Dhaka 1341, October 09-10, 16-17.

Kabir, M.H., Ershaduzzaman, M., Nazir, K.H.M.N.H., Islam, M.S., Khatun, R., Sarker, M.S.A., Yousuf, M.A., Ali, Y., Sarker, N.R. & Giasuddin, M. (2019). Development and validation of BLRI Mastitis Test Kit at Bangladesh Livestock Research Institute Regional Station, Sirajganj. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6 (3), 425-430. doi: 10.5455/javar.2019.f363

Kandeel, S.A., Megahed, A. A., Ebeid, M.H., & Constable, P.D. (2019). Evaluation of 3 esterase tests for the diagnosis of subclinical mastitis at dry-off and freshening in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 102 (2), 1402-1416. Doi: 10.3168/jds.2017-14345

Kawai, K.; Hayashi, T.; Kiku, Y.; Chiba, T.; Nagahata, H.; Higuchi, H.; Obayashi, T.; Itoh, S.; Onda, K.; Arai, S.; Sato, R. & Oshida T. (2013). Reliability in somatic cell count measurement of clinical mastitis milk using D e L aval cell counter. *Animal Science Journal*, 84(12), 805-807. Doi: 10.1111/asj.12136

Khasanah, H., Setyawan, H.B., Yulianto, R., & Widianingrum, D.C. (2021) Subclinical mastitis: Prevalence and risk factors in dairy cows in East Java, Indonesia, *Veterinary World*, 14 (8), 2102-2108. doi: 10.14202/vetworld.2021.2102-2108

Kılıçarslan, M.R. (2021) Sağlık Hijyeni ve Mastitis Profilaksisi, İstanbul Üniversitesi, Açık ve Uzaktan Eğitim Fakültesi Yayını.

Kibebew, K. (2017). Bovine mastitis: A review of causes and epidemiological point of view. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 7(2), 1-14.

Kim, B., Lee, Y. J., Park, J. G., Yoo, D., Hahn, Y. K., & Choi, S. (2017). A portable somatic cell counter based on a multi-functional counting chamber and a miniaturized fluorescence microscope. *Talanta*, 170, 238-243. Doi: 10.1016/j.talanta.2017.04.014

Kour, S., Sharma, N., N.B., Kumar, P., Soodan, J.S., Santos, M. V. D., & Son, Y.O. (2023). Advances in Diagnostic Approaches and Therapeutic Management in Bovine Mastitis. *Veterinary Sciences*, 10 (7), 449. <https://doi.org/10.3390/vetsci10070449>.

Kumar, P., Ojasvita, Deora, A., Sharma, H., Sharma, S., Mittal, D., Bhanot, V., Prakash, A., Yadav R., and Diwakar, R.P. 2020. Bovine Mastitis: A Review, *Middle-East Journal of Scientific Research* 28 (6), 497-507, Doi: 10.5829/idosi.mejsr.2020.497.507

Lee, K.H., Lee, J.W., Wang, S.W., Liu, L.Y., Lee, M.F., Chuang, S.T., Shy, Y.M., Chang, C.L., Wu, M.C. & Chi, C.H. (2008). Development of a novel biochip for rapid multiplex detection of seven mastitis-causing pathogens in bovine milk samples. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 20(4), 463-471. Doi:10.1177/104063870802000408

Li, X., Xu, C., Han, B., Liang, B., Tong, X., & Gao, J. (2023) Alternatives to antibiotics for treatment of mastitis in dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1160350. doi: 10.3389/fvets.2023.1160350

Malašauskienė, D., Juozaitienė, V., Televičius, M., Rutkauskas, A., Urbutis, M., Kanapė, V., Gerbutavičiūtė, J. & Antanaitis, R. (2020). Changes in the inline lactate dehydrogenase

according to the cow's production and reproduction status. *Acta Veterinaria Brno*, 88(4), 369-375. Doi:10.2754/avb201988040369

Marschke, R. J., & Kitchen, B. J. (1985). Detection of bovine mastitis by bromothymol blue pH indicator test. *Journal of Dairy Science*, 68 (5), 1263-1269.

Martins, S.A.M., Martins, V.C., Cardoso, F.A., Germano, J., Rodrigues, M., Duarte, C., Bexiga, R., Cardoso, S. & Freitas, P. P. (2019). Biosensors for on-farm diagnosis of mastitis. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 186. Doi: 10.3389/fbioe.2019.00186

Mazurenko, V.R., & Manchulyak, O.V. (2017). Biomarkers of subclinical mastitis in the mammary gland of cows. *Biotechnologia Acta*, 10 (4), 53-58. Doi: 10.15407/biotech10.04.053

Medina, C.M., & Montaldo, V.H. (2003). El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis. In CNM. V Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, Ags., México (pp. 29-31).

Middleton, J.R., Fox, L.K., Pighetti, G. & Petersson-Wolfe, C. (2017). *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. (Third Edit). National Mastitis Council, Inc., USA

Milne, J. R., & Smyth, R. (1976). Rapid determination of somatic cells in milk. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*. 11, 21–23.

Morales-Ubaldo, A. L., Rivero-Perez, N., Valladares-Carranza, B., Velázquez-Ordoñez, V., Delgadillo-Ruiz, L., & Zaragoza-Bastida, A. (2023) Bovine mastitis, a worldwide impact disease: prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. *Veterinary and Animal Science*, 24; 21: 100306. doi: 10.1016/j.vas.2023.100306.

Novac, C.S., & Andrei, S. (2020). The Impact of mastitis on the biochemical parameters, oxidative and nitrosative stress markers



in goat's milk: A review. *Pathogens*, 9 (11), 882. Doi:10.3390/pathogens9110882).

Obara, Y. (1985). Diagnosis of bovine mastitis by determination of lysosomal enzyme activity in milk. *JARQ.*, 18(4), 298-304.;

Peek, S. F., & Divers, T. J. (Ed.). (2018) *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle-E-Book*. (Third edit). Elsevier Health Sciences.

Pelvan, M., & Unluturk, S. (2015). Application of flow cytometry and fluorescence techniques in somatic cell analysis of raw milk. *International Journal of Food Processing Technology*, 2(1), 11-16. Doi:10.15379/2408-9826.2015.02.01.2

Philpot, W. N., & Nickerson, S. C. (2000). *Winning the fight against mastitis*. Canada: Westfalia Surge.

Pyörälä, S. (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary research*, 34 (5), 565-578. Doi: 10.1051/vetres:2003026

Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., & Hinchcliff, K. W. (2002). *Medicina Veterinaria. Mastitis Bovina*. Edit. Mcgraw-hill. 9o Edición. Vol 1. Madrid, España. pp728-810.

Rahman, M.M., Islam, M.R., Uddin, M.B., & Aktaruzzaman, M. (2010). Prevalence of subclinical mastitis in dairy cows reared in Sylhet district of Bangladesh. *International Journal of Bio Research*, 1, 23-28.

Rasheed, A., Usman, T., & Niaz, K. (2020). A Review on Bovine Mastitis with Special Focus on as a Potential Candidate Gene for Mastitis Resistance–A Review. *Annals of Animal Science*, 20(3), 735-755. Doi: 10.2478/aoas-2020-0024

Rowe, S., Godden, S., Nydam, D. V., Gorden, P., Lago, A., Vasquez, A., Roystera, E., Timmermana, J. & Thomas, M. (2020). Evaluation of rapid culture, a predictive algorithm, esterase somatic cell count and lactate dehydrogenase to detect intramammary

infection in quarters of dairy cows at dry-off. Preventive veterinary medicine, 179, 104982. Doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.104982

Rudolph, W.W. (1983, September). Yield as a function of somatic levels: Rapid milk quality screening using the new fossomatic 90. In Proceedings from the 20th Annual Marschall Invitational Italian Cheese Seminar 1983 (p. 70).

Ruegg, P. L., & Reinemann, D. J. (2002). Milk quality and mastitis tests. The Bovine Practitioner, 41-54. <https://doi.org/10.21423/bovine-vol36no1p41-54>

Said, M., Mirani, A. H., Kabir, A., Farhan, M. H. R., Bhutto, A. L., Barham, G. S., Bhutto, K.R., Uzair, M & Khan, M. (2022). The window of diagnostic techniques for bovine mastitis. Research Journal of Veterinary Practitioners, 10(3), 24-32. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.rjvp/2022/10.3.24.32>

Saler, M. & Karakök, S.G. (2006). AB ülkelerinde ve türkiyede inek sütü somatik hücre sayım sonuçları kullanımı ve sayım metotları, II. Ulusal Zootečni Öğrenci Kongresi 25-26 Mayıs 2006, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van.

Scott, P., Penny, C. D., & Macrae, A. (2011). Cattle medicine. CRC press.

Semenov, V.G., Stepanova, A.V., Kondruchina, S.G., Ivanova, T.N., Lukina, N.M., Tolstova, S.L., Semenov, A.A.,Biryukova, D.E., Matveeva E.S., & Aldyakov, (2021). The use of biopreparations in the therapy of mastitis in cows. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 935 (1) 012038, IOP Publishing. Doi: 10.1088/1755-1315/935/1/012038

Shahid, M., Sabir, N., Ahmed, I., Khan, R. W., Irshad, M., Rizwan, M., & Ahmed, S. (2011) Diagnosis of subclinical mastitis in bovine using conventional methods and electronic detector. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science, 6 (11), 18-22.

Sharma, N., Pandey, V., & Upadhyay S. R. (2009). Recent trends in the diagnosis of bovine mastitis under field conditions. *Indian Dairyman*, 61(4), 21-27.

Sharma, N., Pandey, V., & Sudhan, N.A. (2010). Comparison of some indirect screening tests for detection of subclinical mastitis in dairy cows. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 13 (2), 98-103.

Sharma, R., Ashutosh, M., Pandita, S., Yadav, P. S., & Parkunan, T. (2018) Quarter-wise prevalence of subclinical mastitis in crossbred cows. *Indian Journal of Animal Research* 52(1), 116-120. Doi:10.18805/ijar.v0iOF.7604

Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M.B., Iqbal Yattoo, M., Patel, S.K., Pathak, M., Karthik, K., Khurana, S.K., Singh, R., Puvvala, B., Amarpal, Singh, R., Singh, K.P., & Chaicumpa, W. (2021) Advances in therapeutic and managerial approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 41 (1), 107-136. doi: 10.1080/01652176.2021.1882713

Shoukat, S., Wani, H., Ali, U., Ali, M., Para, P.A., & Singh, C. (2018). Mastitis and its diagnosis: a review. Recent research trends in veterinary sciences and animal husbandry. AkiNik Publications, New Delhi, India, 69-86. doi: 10.22271/ed.book01.a06.

Smith, B.P. (Ed.). (2015) Large animal internal medicine-E-Book. (Five edit). Elsevier Health Sciences.

Srivastava, A.K., Kumaresan, A., Manimaran, A., & Prasad, S. (2015) Mastitis in dairy animals: an update. Satish Serial Publishing House.

Sun, X., Zhao, R., Wang, N., Zhang, J., Xiao, B., Huang, F., & Chen, A. (2023). Milk somatic cell count: From conventional microscope method to new biosensor-based method. *Trends in Food Science & Technology*. 135, 102-114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.03.020>

Tanni, N. S., Islam, M. S., Kabir, M., Parvin, M. S., Ehsan, M. A., & Islam, M. T. (2021). Evaluation of sodium lauryl sulfate for the development of cow-side mastitis screening test. *Veterinary World*, 14 (8), 2290-2295.

Tarazona-Manrique, L. E., Villate-Hernández, J. R., & Andrade-Becerra, R. J. (2019) Bacterial and fungal infectious etiology causing mastitis in dairy cows in the highlands of Boyacá (Colombia). *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 66 (3) 208-218. Doi: 10.15446/rfmvz.v66n3.84258.

Thompson, D.I., & Postle, D.S. (1964). The Wisconsin mastitis test—An indirect estimation of leucocytes in milk. *Journal of Food Protection*, 27 (9), 271-275.

Tiwari, J., Babra, C., Tiwari, H., Williams, V., De Wet, S., Gibson, J., Paxman, A., Morgan, E., Costantino, P., Sunagar, R., Isloor, S., Hegde N.R., & Mukkur, T. (2013) Trends in therapeutic and prevention strategies for management of bovine mastitis: an overview. *Journal of Vaccines & Vaccination*, 4 (1) 1-11. Doi:10.4172/2157-7560.1000176

Tomanić, D., Samardžija, M., & Kovačević, Z. (2023) Alternatives to Antimicrobial Treatment in Bovine Mastitis Therapy: A Review. *Antibiotics*, 12 (4), 683. Doi: 10.3390/antibiotics12040683

Tommasoni, C., Fiore, E., Lisuzzo, A., & Giancesella, M. (2023). Mastitis in Dairy Cattle: On-Farm Diagnostics and Future Perspectives. *Animals*, 13(15), 2538. <https://doi.org/10.3390/ani13152538>

Viguiet, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., & O’Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in biotechnology*, 27 (8), 486-493. Doi:10.1016/j.tibtech.2009.05.004

Williamson, J. H., & Di Menna, M. E. (2007) Fungi isolated from bovine udders, and their possible sources. *New Zealand*

Veterinary Journal, 55 (4) 188-190. Doi: 10.1080/00480169.2007.36766.

Yıldız, A. (2001) Laktasyondaki subklinik ve klinik mastitisli sütçü ineklerde lincomycin - neomycin kombinasyonu ile meme içi tedavinin etkinliği, F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi, 17 (1) 65-69.

Zajác, P., Čapla, J. & Golian J. (2019). Direct Microscopic Somatic Cell Count. KEY Publishing s.r.o., Ostrava-Prívov Czech Republic.

## BÖLÜM III

### Koyun ve Keçilerde Embriyoların Kriyoprezervasyonu

Ayşe Merve KÖSE<sup>1</sup>  
Sakine Ülküm ÇİZMECİ<sup>2</sup>

#### Giriş

Küçükbaş hayvanların önemli birkaç özelliği; diğer hayvan türlerine göre çeşitli tarım ürünleri için elverişsiz olan arazilerde yaşayabilmeleri, kötü çevre koşullarında kolaylıkla yetiştirilebilmesi ve üretim yapabilmeleri ile adaptasyon yeteneklerinin yüksek olmasıdır (Köse & Tekeli, 2014; Naitana & Ledda, 2020). Son yıllarda küçükbaş hayvanların önemi giderek artmaktadır. Küçükbaş hayvan yetiştiriciliğindeki artış, son zamanlarda yardımcı üreme

---

<sup>1</sup> Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye ORCID: 0000-0003-1863-5955

<sup>2</sup> Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

ORCID: 0000-0003-2939-8019

teknolojilerinin geliştirilmesi ve iyileştirilmesiyle desteklenmektedir. Hayvanların mevcut gen kaynaklarının korunması, yüksek verimli yavrular elde edilebilmesinin yanı sıra birim hayvan başına düşen verimin artırılabilmesi için biyoteknolojik yöntemlerden faydalanılmaktadır. Östrüs indüksiyonu ve senkronizasyonu, suni tohumlama gibi bazı yardımcı üreme teknolojileri daha yaygın uygulanırken; süperovulasyon ve embriyo transferi, in vitro embriyo üretimi ve embriyonun dondurularak (kriyoprezervasyon) saklanması gibi diğer teknikler sığırlarla karşılaştırıldığında daha az sıklıkla kullanılmaktadır (Ledda & Gonzalez-Bulnes, 2018). Ancak embriyo kriyoprezervasyonu embriyo transferi endüstrisinin önemli bir bileşenidir (Ledda & Gonzalez-Bulnes, 2018; Ferré & ark., 2020).

Embriyoların kriyoprezervasyonu embriyo transferi ve gen kaynaklarının korunmasında büyük öneme sahiptir. Bu teknikle dişi ve erkek gametlerinden en yüksek fayda sağlanarak, döl veriminin artırılır, gen kaynaklarının saklanması ile nesli tükenmekte olan tür ve ırklar korunabilmektedir. Dondurulmuş embriyoların taşınması, genetik materyalin ülke dışına taşınabilmesi için düşük maliyetli bir seçenek olması, farklı ırk ve türlerin genetik kaynaklarının değişiminin sağlanması ile üstün verim özelliklerine sahip sürülerin oluşturulması ve hastalıkların kontrolünün sağlanması da embriyoların kriyoprezervasyonun diğer önemli katkılarıdır (Köse & Tekeli 2014; Ferreira-Silva & ark., 2021; Falchi & ark., 2022). Başarılı bir çoklu ovulasyon ve embriyo transfer (MOET) programı genellikle senkronize alıcılara transfer edilmeden önce embriyoların dondurulması olasılığını da içermektedir. Kriyoprezervasyon, ticari embriyo transferi endüstrisinin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir ancak küçükbaş hayvanlarda uygulanması nispeten az sayıda çalışmaya dayanmaktadır (Boundy & ark., 1985; Ishwar & Menon, 1996; Köse & Tekeli 2016; Çizmeci & ark., 2018) ve dondurma işleminin sürekli olarak geliştirilmesi gerekmektedir (Vajta, 2000; Ledda & Gonzalez-Bulnes, 2018).

Pratik açıdan embriyo dondurmanın birçok avantajı vardır:  
(1) genetik değeri yüksek dişilerden elde edilen embriyoların

dondurulması; üstün genetiğe sahip annelerden daha çok yavru alınmasını kolaylaştırır, bu da genetik gelişme oranını hızlandırır; (2) embriyonun dondurularak saklanması; canlı hayvan taşımacılığına mali açıdan uygun ve güvenli bir alternatif olan değerli genetik stoğun uluslararası ticaretini kolaylaştırır. Küçükbaş hayvanlarda embriyo dondurma protokollerinin başarı oranlarına ilişkin veriler sığırlarla karşılaştırıldığında nispeten daha azdır (Ledda & Gonzalez-Bulnes, 2018). Bugüne kadar elde edilen gelişmelere rağmen bu tekniğin geniş ölçekte uygulanması hala nispeten düşüktür (Baril & ark., 2001; Falchi & ark., 2022).

### **Embriyoların kriyoprezervasyonu**

Embriyoların kriyoprezervasyonunda amaç; embriyoları buldukları andaki halleriyle korumak ve çözdürüldüğünde yaşamlarına ve gelişimlerine kaldığı yerden devam etmelerini sağlamaktır. Embriyoların dondurulduğunda; metabolizma, hücre içi enzim aktivitesi, gelişim ve bölünme gibi fonksiyonlar durmakta ve genetik hasar oluşmadan yaşama fonksiyonlarına zarar vermeden saklanabilmektedir (Kaymaz, 2019). Kriyoprezervasyon, hücrelerin veya dokuların sıfırın altındaki derecelerde (-196°C) uzun sürelerde metabolik aktivitelerini bozmadan dondurularak saklanması işlemi olarak tanımlanmaktadır (Kaymaz & ark., 2022). Koyun ve keçilerde embriyoların dondurularak saklanması ilk olarak 1970'lerde *in vivo* türetilmiş embriyolar için yavaş dondurma yöntemiyle rapor edilmektedir (Menchaca & ark., 2018). Dondurulmuş/çözülmüş embriyolardan ilk kuzuların 1976'da doğduğu (Willadsen ve ark. 1976), vitrifiye embriyolardan kuzuların ise 1989 ve 1990'da doğduğu belirtilmektedir (Gajda & ark., 1989; Széll ve ark. 1990).

Dondurma işleminin etkinliği; hayvan türlerine, embriyonun üretilme tekniğine (*in vitro* veya *in vivo*), embriyonun gelişim aşaması ve kalitesine bağlı olarak değişebilmektedir (Vajta ve Kuwayama 2006, Gajda ve Smorag 2009). Dondurma sonrası embriyo canlılıklarının *in vitro* embriyolarda *in vivo* embriyolara göre daha düşük olduğu (Gajda & Smorag, 2009; Prentice & Anzar,



2011) yüksek lipid konsantrasyonları nedeniyle soğuga ve dondurmaya karşı in vitro embriyoların daha dayanıksız olduğu bildirilmektedir. Embriyonik gelişim aşamalarında ise blastosistlerin diğerklerine göre dondurma işleminden sonra daha iyi yaşam oranlarına sahip olduğu ifade edilmektedir (Gajda & Smorag, 2009). Küçükbaş hayvanlarda embriyonun kriyoprezervasyonu ve in vitro embriyo üretimi (IVEP) transferinde başarı büyük ölçüde kullanılan tekniklerin etkinliğine bağlıdır. Dondurularak saklanan ilk koyun embriyosu, yavaş dondurma tekniğı ile elde edilmiştir; ancak bu teknik in vitro üretilen embriyolar açısından yerini yavaş yavaş vitrifikasyon yöntemine bırakmaktadır (Falchi & ark., 2022). Koyunlarda vitrifiye edilmiş in vitro üretilmiş morula ve blastosistlerin canlılık oranı, yavaş dondurma teknikleriyle dondurularak saklanan embriyolarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksektir (Martínez & ark., 2006; Shirazi & ark., 2010).

Embriyo kriyoprezervasyonunun adımları: (1) embriyolara kriyoprotektan maddeler ile muamele; (2) soğuma ile buz oluşumu uyarımı ve embriyonun sıvı azot içinde dondurulması; (3) çözdüme, (4) kriyoprotektanların uzaklaştırılması, olarak ifade edilmektedir (Fahning & ark., Garcia 1992).

### **Kriyoprotektanlar**

Embriyoların kriyoprezervasyonu oldukça hassas bir işlemdir ve kriyoprotektanların kimyasal toksisitesi, intra ve ekstrasellüler buz oluşumu, soğuk, kırılma, ozmotik şişme ve ozmotik büzüşme gibi olaylar nedeniyle embriyolar hasar görebilmektedir. Lipitten zengin hücre zarında soğuk hasarına bağlı değışiklikler olabilmektedir ve bu da hücre yapısının bozulmasına neden olmaktadır (Kaymaz & ark. 2022). Donma sırasında solüsyonların donma noktasını düşürürken ve aynı zamanda hücre zarını ve hücre içi protein yapısını koruyarak embriyoda oluşabilecek zararları engellemek için kriyoprezervasyon ve çözdüme esnasında kullanılan kimyasal maddelere kriyoprotektan adı verilmektedir (Pereira & Marques, 2008, Gibbons & Cueto, 2011; Kaymaz & ark., 2022).

Hücrede meydana gelen soğuk şoku zararlarına, hücre içi kristal oluşumuna ve çözdürme sırasında dekrizalizasyona karşı korunmak için kriyoprotektanlar kullanılmaktadır (Palasz & Mapletoft, 1996; Noakes & ark., 2001). Kriyoprezervasyondan önce embriyolar kriyoprotektanlarla inkubasyona bırakılmaktadır. Bu sayede embriyonun dehidrasyonu sağlanıp, buz kristallerinin soğuma esnasında sitoplazmik yapılar üzerine oluşturacağı hasarın önlenmesi sağlanmaktadır (Dobrinsky, 2002; Gibbons & Cueto, 2011). Kullanılan tampon medyumları ile pH'sı 7,2-7,4 arasında solüsyonlar hazırlanmaktadır. Bu amaçla TCM-199 (embriyo kültür medyumunu), D-PBS, serum fizyolojik içeren medyumlar kullanılabilir (Palasz & Mapletoft, 1996; Prentice & Anzar, 2011). Hücre membranından geçemeyen kriyoprotektanlar ekstrasellüler kriyoprotektanlar, hücre membranından geçerek intrasellüler yapıya nüfuz edenler ise intrasellüler kriyoprotektanlar olarak adlandırılır (Pereira & Marques, 2008; Gibbons & Cueto, 2011).

İntrasellüler kriyoprotektanlar hücre içine girerek hücreden sıvı çıkışı sağlayarak sitoplazmanın korunmasına yardımcı olan düşük molekül ağırlığına sahip kimyasallardır. Dimetilsülfoksit (DMSO), etilen glikol (EG), gliserol (G), propilen glikol (PG), polietilen glikol (PEG) gibi kriyoprotektanlar bunlara örnektir (Pereira & Marques, 2008; Kaymaz, 2019). Bu maddeler kriyoprezervasyondan önce, embriyo hücreleri içerisindeki sıvı ile ozmotik basınç farkı nedeniyle yer değiştirmektedir. Bu şekilde hücre hacmindeki değişiklik azalarak, embriyo hücreleri içinde buz kristalleri oluşumu minimuma inmektedir (Noakes & ark., 2001; Gibbons ve Cueto, 2011; Verma & ark., 2012). Etilen glikolün permeabilite özelliği yüksektir ve bu sayede hücre içinde bulunan yapıların ve tüm hücre membranının korunmasını sağlamaktadır. Etilen glikol, toksisitesinin diğerler kriyoprotektanlara nazaran daha düşük olması, dondurma çözdürme sırasında hücrelerde osmotik basınç değişikliklerine neden olmaması sebebiyle de oldukça güvenli bir intrasellüler kriyoprotektan olarak ifade edilmektedir (Massip, 2001; Holtz, 2005; Aminoor-Rahman & ark., 2008;

Gibbons & Cueto, 2011; Saragusty & Arav, 2011). Çizmeçi & ark. (2018) yavaş dondurulan in vivo Saanen keçi si embriyolarında farklı kriyoprotektanların etkisini araştırdıkları çalışmalarında çözdürme sonrası in vitro kültürde embriyoların 24, 48 ve 72. saatlerdeki canlılık oranlarını DMSO da %46.88; %40.63; %28.13, gliserolde %54.55; %45.45; %36.36, EG'de ise %64.86; %56.76; %54.05 olarak belirlediklerini, EG ile dondurulan embriyolarda 72. saatteki canlılık oranlarının diğer kriyoprotektanlardan daha yüksek olduğunu ifade etmektedirler.

Yüksek molekül ağırlığına sahip sığır serum albümini, mannitol, sorbitol (makromoleküller), laktoz, sukroz, glukoz, fruktoz, trehaloz ve rafinoz (sakkaritler) gibi kimyasallar ekstrasellüler kriyoprotekta nara örnektir (Pereira & Marques, 2008). Makromoleküller, oluşan buz kristallerinin şekil ve büyüklüklerini değiştirerek, sakkaritler ise hücreleri dehidre ederek buz kristallerinin azalmasını sağlamaktadır (Köse & Tekeli, 2014). Sakkaritler, dondurma ve çözdürme esnasında hücre içine nüfuz etmeden intraselüler sıvıyı çekerek hücre zarı ve sitoplazmasını korumaktadır (Kaymaz, 2019). Hücre zarındaki fosfolipitlerle etkileşime girip yüzey artışı gerçekleştirerek koruma sağlamaktadır. Bu sayede çözdürme esnasında hücreler üzerinde meydana gelebilecek ozmotik şokun önüne geçilebilmektedir (Kaymaz & ark., 2022).

### **Embriyo kriyoprezervasyon yöntemleri**

Embriyoların dondurulması için kullanılan yöntemler; geleneksel yavaş dondurma (slow-freezing) ve vitrifikasyon'dan oluşmaktadır (Fahning & Garcia ,1992; Amiridis & Cseh, 2012).

Yavaş dondurma protokolleri biyolojik bir dondurucu gerektirmektedir ve tamamlanması için daha fazla zamana ihtiyaç duyulmaktadır. Vitrifikasyon olduğua hızlı bir tekniktir ve herhangi bir özel ekipman gerektirmediğinden zaman ve maliyet açısından daha etkindir ve bu nedenle rutin saha kullanımına iyi bir şekilde uyarlanmıştır (Baril & ark., 2001; Vajta & Kuwayama, 2006). Koyun ve keçi embriyoları hem yavaş dondurma hem de

vitrifikasyon işlemlerinde canlılıklarını koruyabilmektedir (Martinez & ark., 1998). Farklı teknikler arasındaki karşılaştırmalar esas olarak embriyo transferi sonrası kuzulama oranlarına dayanmaktadır. Ancak transfer için embriyoların seçimi, Uluslararası Embriyo Transfer Derneği'nin yönergelerine uygun olarak çözdürüldükten sonra embriyo morfolojisinin stereomikroskopik değerlendirmesine dayanmaktadır (Abe & ark., 2002). Vitrifiye in vitro ve in vivo olarak üretilen sığır blastosistleri (Vajta, 2000) ve kontrollü yavaş dondurulmuş in vivo olarak üretilen koyun morulaları ve blastosistleri (Cocero & ark., 2002) üzerinde yapılan çalışmalarda bu değerlendirmelerin subjektif olabileceği ifade edilmektedir.

IVEP ile elde edilen embriyolarının vitrifikasyonunun etkinliği embriyonik gelişim aşaması, kullanılan cihazlar, hacim ve soğutma hızı gibi birçok faktöre bağlıdır (Dos Santos-Neto & ark., 2017). Koyunlarda erken kompakt ve kompakt morula gibi erken embriyonik gelişim aşamalarındaki embriyolar, vitrifikasyon prosedürlerine blastosistlerden daha duyarlıdır (Naitana & ark., 1997). Benzer farklılıklar erken ve ekspanded IVP blastosistleri arasında da gözlenmektedir (Ledda & ark., 2019). Embriyo vitrifikasyonunun etkinliğinin, çözdürme sonrası kültüre edilen embriyoların morfokinetiğinin kaydedilmesiyle in vitro olarak takip edilebilmektedir. Vitrifikasyon ve çözdürme sonrası blastocoel'in yeniden genişmesi ve hatching oluşumunun, sonraki gelişimin öncü göstergeleri olarak düşünülebileceği ifade edilmektedir (Leoni & ark., 2008). Köse & Tekeli (2016) vitrifiye in vivo Saanen keçisi embriyolarının çözdürülmesi sonrasında kültürde hayatta kalma oranlarını araştırdıkları çalışmalarında 24. 48. ve 72. saatlerde sırasıyla morula aşamasındaki embriyolarda %51,3, %20,5 ve %15,4, blastosist aşamasındaki embriyolarda ise %64,5, %41,9 ve %32,3 olarak tespit ettiklerini belirtmektedir. In vitro üretilen koyun blastosistlerinin vitrifikasyon yöntemleri sonrası transferini takiben gebelik oranlarının %30-%55 arasında değiştiği ifade edilmektedir (Dos Santos-Neto & ark., 2017).

## Yavaş dondurma

Standart, geleneksel ya da kontrollü dondurma yöntemi olarak da isimlendirilmektedir (Kaymaz, 2019). Embriyolar, geleneksel kriyoprezervasyonda daha düşük konsantrasyondaki (~1,5M=%10) kriyoprotektanlar kullanılmaktadır. Yavaş dondurmada programlanabilir dondurma cihazı kullanılmakta ve cihaz içinde bir protokol ile dondurulmaktadır (Köse & Tekeli, 2014; Çizmeçi & ark., 2018, Luo & ark., 2019). Bu yöntem kullanıldığında, tam olarak donma işlemi gerçekleşene kadar, embriyolar uzun süre kriyoprotektanlara ve bu maddelerin toksik etkisine maruz kalmaktadır. Dondurma esnasında embriyonun hücre içinde buz kristalleri meydana gelmekte ve hücre membranlarında hasar ve zona pellusidada çatlama ve ya kırılma istenmeyen sonuçlar meydana gelebilmektedir (Köse & Tekeli, 2014). Bu yöntemde; (1) embriyolar farklı molar konsantrasyonlarda hazırlanmış düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar ile 24-25 °C' 10'ar dakika bekletilir, (2) payete alınan embriyo, dondurma cihazına alınır ve -5/-7°C'de buz kristali oluşumu başlatılır (ice-seeding), (3) ice-seeding aşamasından sonra, dakikada ortalama 0,3-0,6°C ile -30/-35°C'ye arasında kontrollü bir şekilde düşürülerek dondurulur (4), payet -196°C' deki sıvı azot içerisine alınarak çözdürülene kadar muhafaza edilir (Gibbons & Cueto, 2011; Saragusty & Arav, 2011; Köse & Tekeli, 2014).

Yavaş dondurma, dünya çapında birçok uygulayıcı tarafından kullanılan, in vivo türetilmiş embriyolar için varsayılan bir yöntemdir ve kabul edilebilir embriyo kriyotoleransı ve gebelik oranıyla sonuçlanmaktadır. Ancak in vitro üretilen embriyolara yavaş dondurma uygulandığında daha düşük sonuçlar elde edilebilmektedir (Massip, 2001; Dos Santos-Neto & ark., 2017; Luo & ark., 2019). Geleneksel yöntemle dondurulmuş in vivo keçi embriyolardan %60-70 oranında gebelik beklenirken, in vitro üretilen keçi embriyolarından ise %30-40 oranında gebelik beklenmektedir (Youngs, 2011). Keçi embriyolarının koyun embriyolarına göre daha yüksek yaşam oranına sahip olduğu, gliserol-etilen glikol karışımı ile vitrifiye edilmiş koyun ve keçi

embriyolarının gebelik oranlarının in vitro üretilmiş keçi embriyolarında %60, koyunlarda %41, in vivo üretilmiş embriyoların ise keçilerde %45 koyunlarda ise %15 olduğu belirtilmektedir (Kaymaz & ark., 2022). Ferreira-Silva & ark. (2021) in-vitro keçi blastosistlerinde geleneksel dondurma ve dimetil sülfoksit ile vitrifikasyonda, gebelik oranlarını sırasıyla %60, %50 hücre canlılık oranlarını ise sırasıyla %68, %60 olarak bildirmektedir ve DMSO kullanılarak yapılan geleneksel dondurma ve vitrifikasyonun, keçi IVP embriyolarının kriyoprezervasyonu için benzer etkinliğe sahip olduğunu ifade etmektedir.

Yavaş dondurmaya tabi tutulan in vitro üretilen embriyoların hayatta kalma oranını artırmak için çeşitli startejiler önerilmektedir (Sudano & ark., 2013; Sanches & ark., 2016). Soğutma hızının, ısıtma hızının ve farklı kriyoprotektif ajanların kullanımının etkisi üzerine sistematik karşılaştırmaların yapıldığı çalışmada yavaş soğutma hızının, suyun hücrelerden ozmotik olarak çıkması için yeterli zaman sağladığı, böylece hücre içi buz kristallerine zarar verilmediği ve kriyoprotektanın çözülme sonrasında hücrelerden çıkarılması sırasında ozmotik şişmenin en aza indirildiği belirtilmektedir (Seidel, 2015). Ancak yavaş dondurmanın IVEP programlarına uygulanması tartışmalıdır. Aşırı sitoplazmik lipit içeriği, embriyo yapısal, fiziksel ve kimyasal özelliklerindeki değişiklikler, embriyo gelişim aşaması, ortam bileşimi ve protokoller gibi in vivo üretilen embriyolarla karşılaştırıldığında in vitro üretilen embriyoların daha düşük kriyotoleransı ile ilişkili birçok faktörün olduğu belirtilmektedir (Menchaca & ark., 2018; Luo & ark., 2019).

### **Vitrifikasyon**

Vitrifikasyon; hücrelerin düşük sıcaklıklarda, hücre içerisinde tamamen camı ya da vitröz bir yapı oluşturularak dondurulmasıdır (Vajta ve Kuwayama, 2006). Bu kriyoprezervasyon yönteminde; yüksek oranda kryoprotektanlarla (~6-8 M = >%40) viskozitesi artırılmış kryoprotektan solüsyonları kullanılmaktadır. Embriyoların cam benzeri bir yapıda buz

kristallerinin oluşumunun önlenmesi için hızla soğutulmuş olarak dondurulması ifade edilmektedir (Massip, 2001; Aminoor-Rahman & ark., 2008; Köse & Tekeli, 2014). Kriyoprotektanların zararlı etkilerinin minimuma indirilebilmesi için ekilibrasyon zamanının kısaltılması gereklidir. Kullanılan çift aşamalı ekilibrasyonun ortadan kaldırılması ve kriyoprotektan toksisitesinin azaltılması amacıyla formamid, trehaloz, sukroz ve farinoz gibi medyumların kullanılması avantaj sağlayabilmektedir (Köse & Tekeli, 2014). Embriyolar farklı konsantrasyondaki vitrifikasyon solüsyonlarıyla ekilibre edilmektedir. Ekilibrasyonda kullanılan solüsyonlarda her bir aşamada etken madde konsantrasyonu artmaktadır. Embriyo üzerinde oluşabilecek toksik etkilerin minimize edilebilmesi amacıyla da ekilibrasyon süreleri konsantrasyon arttıkça azalmaktadır (Kaymaz, 2019).

1990'lı yıllardan bu yana, hem in vivo olarak elde edilen hem de in vitro olarak üretilen embriyolar için yavaş dondurmaya alternatif olarak küçükbaş hayvanlarda çeşitli vitrifikasyon yöntemleri önerilmektedir. Farklı türdeki kriyoprotektanları ve bu kimyasallarla maruz kalma sürelerini, kriyo cihazlarını ve protokollerini karşılaştıran çalışmalarda, bu türlerde farklı başarı oranlarıyla vitrifikasyon sonuçları rapor edilmektedir (Traldi & ark., 1999; Dattena & ark., 2000; Papadopoulos & ark., 2002; Cognié & ark., 2003; Martínez & ark., 2006; Gibbons & ark., 2011; Ferreira-Silva & ark., 2017). Vitrifikasyon, yüksek donma hızında (2500°C/dakika) 0,25 ml'lik payetlerin sıvı azot içerisine direkt olarak bırakılmasıyla sağlanmaktadır. Ayrıca bu tekniğe alternatif olarak geliştirilen "open pulled straw" (OPS) tekniği ile dondurma hızı daha da artmaktadır (Noakes ve ark. 2001, Amiridis ve Cseh 2012). 0,25 ml'lik payet (Naitana ve ark. 1997) veya OPS yöntemi in vivo üretilen (Baril & ark., 2001; Dattena & ark., 2004; Martinez & ark., 2006) veya in vitro (Dattena & ark., 2004) üretilen koyun morulalarının ve blastosistlerin başarılı bir şekilde dondurulduğu çalışmalar bulunmaktadır. İn vivo üretilen koyun embriyolarında gebelik ve embriyo yaşama oranlarının sırasıyla slow freezing de %68,4 ve %44,7, vitrifikasyonda %50,0 ve %33,3 ve OPS

vitrifikasyonda %54,5 ve %36 olduğu aralarında önemli bir fark olmadığı ifade edilmektedir (Bettencourt & ark., 2009).

Baril & ark. (2001), vitrifiye koyun embriyolarının doğrudan transferinden sonra %50'lik bir embriyo hayatta kalma oranı ve doğuma kadar yüksek bir gebelik oranı (%72) bildirmektedir. Kriyoprotektanın uzaklaştırılmasından sonra veya doğrudan çözüldükten sonra transfer edilen vitrifiye embriyolar arasında kuzulama (sırasıyla %67 ve %75) ve embriyo hayatta kalma oranları (embriyo transferinden doğmuş kuzular sırasıyla %49 ve %53) açısından da herhangi bir fark bulunmadığı ifade edilmektedir. Canlılığın embriyoların kökenine bağlı olduğu ve in vivo olarak üretilen embriyolar ile IVEP teknikleriyle elde edilen embriyolar arasında hayatta kalma oranlarında farklılıkların bulunduğu, in vivo olarak üretilen embriyoların dondurulmasından sonra canlılığın önemli ölçüde azalmadığı (%70-90), dondurularak saklanan IVEP embriyolarında önemli ölçüde daha düşük (%30-40) olduğu belirtilmektedir (Ledda & Gonzalez-Bulnes, 2018).

Vitrifikasyonun yavaş dondurmaya göre özel ekipmana ihtiyaç duymaması, işçilik süresini kısaltması, uygun maliyetli olması ve dolayısıyla sahada rutin kullanıma daha uygun olması, dondurma esnasında embriyoda buz kristallerinin meydana gelmesinin önlenmesi gibi bazı avantajları bulunmaktadır (Vajta & Kuwayama, 2006; Köse & Tekeli 2014). Buna karşın çözdürme esnasında stereo mikroskop kullanımına ihtiyaç duyulması, kriyoprotektanların uzaklaştırılması için farklı sulandırmalardaki medyumlarda yıkanmasına ihtiyaç duyulması ve yüksek konsantrasyonda kriyoprotektan kullanılması sebebiyle embriyolarda hasara neden olması gibi de avantajları da bulunmaktadır (Köse & Tekeli 2014).

Öte yandan, minimum hacim yöntemleriyle vitrifikasyonla ilgili, esas olarak in vitro üretilen embriyoların kriyotoleransına odaklanan yeni bilgilerin yayınlandığı belirtilmektedir (Arav, 2014; Menchaca & ark., 2018). Keçi (Morató & ark., 2011) ve koyun embriyolarında (Dos Santos-Neto & ark., 2017) ümit verici sonuçlar



elde edildiği belirtilmektedir (Menchaca & ark., 2018). Minimum hacimli vitrifikasyon yöntemleri Cryotop ve Spatula MVD'yi kullanarak koyun embriyoları üzerine yapılan bir çalışmada (Dos Santos-Neto & ark., 2017) in vivo embriyolar için, Cryotop ile vitrifikasyonda %67,1'lik gebelik oranına ulaşırken, yavaş dondurma için bu oran %45,6; in vitro üretilen embriyolar için gebelik oranı Cryotop ve yavaş dondurma için sırasıyla %55,1 ve %7,3 olarak bildirilmektedir. Minimum hacim yöntemleriyle vitrifikasyonun koyunlarda IVEP programlarının gelecekteki uygulamaları için bir kriyoprezervasyon aracı gibi görüldüğü ve geleneksel MOET programlarındaki yavaş dondurma teknolojisinin yerine bir alternatif olabileceği belirtilmektedir (Menchaca & ark., 2018).

Son zamanlarda embriyo vitrifikasyonu, özdürme ve seyreltilmesinin pipet içerisinde yapılabileceği yeni bir sistem olan 'E.Vit'in kullanılmasını önerilmektedir. özdürmeden sonraki sonuçlar, daha sonraki gelişimin öngörüsü olabilecek embriyo kalitesi ve yüksek hayatta kalma oranlarını göstermektedir (Ledda & ark., 2019). Bu yöntem ile ekipman, teknik beceri ve embriyo taşıma ihtiyacını azaltıp ve embriyonun doğrudan uterusu transferini kolaylaştırabileceği ifade edilmektedir (Falchi & ark., 2022). Gelişmiş kriyoprezervasyon tekniği ile embriyolar, tek bir zaman ve yerde toplanıp ihtiyaç duyulan sayıda alıcıyla başka bir zaman ve yerde kullanılabilir. Ancak in vitro üretilen embriyo kriyoprezervasyonu konusunda önemli ilerlemeler sağlanmış olmasına rağmen, bu teknolojinin daha geniş çapta uygulanması için kolay, hızlı, düşük maliyetli ve etkili bir yöntem elde etmek amacıyla daha ileri araştırmalara ve bazı iyileştirmelere hala ihtiyaç olduğu da ifade edilmektedir (Luo & ark., 2019).

### **Kriyoprezervasyon Uygulanan Embriyolarda özdürme**

Embriyonun içinde bulunduğu payetler sıvı azottan çıkartılır, havada yaklaşık 3-5 saniye ve 30-38°C'deki suyun içerisinde 20-30 saniye bekletilerek embriyolar özdürülmektedir (thawing). Kriyoprotektanların embriyo üzerindeki zararlı etkilerinin

önlenmesi amacıyla hızla embriyodan uzaklaştırılması gerekmektedir (Kaymaz & ark., 2022). Beta-merkaptotanol ( $\beta$ ME), Linoleik asit albümin (LAA) veya BSA gibi membran koruyucu maddeler hücre membranını stabilize ederek kriyoprotektan maddenin hücre dışına çıkması sırasında hücreye zarar vermesini engeller. Bu nedenle çözündürme solüsyonunda kullanılması gereken maddelerdir (Köse & Tekeli, 2014; Kaymaz, 2019). Ayrıca galaktoz, sukroz ve trehaloz gibi hücre içine giremeyen şekerler kriyoprotektan maddelerin yoğunluk farkı ile hücre dışına çıkmasını sağlayarak ortamdan uzaklaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Bu uzaklaştırma işlemi tek veya üç kademeli olarak yapılmaktadır (Massip, 2001; Köse & Tekeli, 2014).

Payetleme esnasında payet içinde 1 molar konsantrasyonundaki sukroz bulunmaktadır. Dondurma sırasında sukroz ve embriyo birbirleri ile temas etmezler. Çözündürme esnasında ise payet boşaltıldığında sukroz embriyoya temas ederek toksisite riski oluşturmaktadır. Embriyo farklı konsantrasyonlardaki sukroz çözeltilerinde 10 dakika kadar bekletilerek sukrozdaki arındırılarak tekrar sıvıyla dolar ve transfere hazır hale gelir (Köse & Tekeli, 2014; Kaymaz & ark.,2022). Embriyolar, direkt transfer metotları veya tek aşamalı (one step) yöntem ile dondurulmuşsa çözündürülür çözündürülmez direk transfer edilebilmektedir. Embriyo dondurulurken kriyoprotektan olarak gliserol kullanıldıysa gliserolün uzaklaştırıldıktan sonra transfer edilmesi gerekmektedir. Dondurmada gliserol ile sukroz birlikte yada etilen glikol tek başına kullanılmışsa herhangi bir işleme gerek kalmamaktadır (Köse & Tekeli, 2014).

## **Kaynaklar**

Abe, H., Matsuzaki, S., & Hoshi, H. (2002). Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. *Theriogenology*, 57 (4), 1273-1283.

Arav, A. (2014). Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, 81 (1), 96-102.

Baril, G., Traldi, A. L., Cognié, Y., Leboeuf, B., Beckers, J. F., & Mermillod, P. (2001). Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, 56(2), 299-305.

Bettencourt, E. M., Bettencourt, C. M., e Silva, J. C., Ferreira, P., Matos, C. P., Romão, R. J., & Rocha, A. (2009). Fertility rates following the transfer of ovine embryos cryopreserved using three protocols. *Small Ruminant Research*, 82 (2-3), 112-116.

Boundy, T., Clarkson, M. J., & Winter, A. C. (1985). Embryo transfer in sheep under practice conditions. *Veterinary Record*, 12, 379-381.

Cocero, M. J., Díaz de la Espina, S. M., & Aguilar, B. (2002). Ultrastructural characteristics of fresh and frozen-thawed ovine embryos using two cryoprotectants. *Biology of reproduction*, 66 (5), 1244-1258.

Cognie, Y., Baril, G., Poulin, N., & Mermillod, P. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59 (1), 171-188.

Çizmeçi, S. Ü., Güler, M., & Kaymaz, M. (2018). In vivo elde edilen Saanen keçisi embriyolarının yavaş dondurulması üzerine farklı kriyoprotektanların etkisinin karşılaştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 65 (2), 171-178.

Dattena, M., Ptak, G., Loi, P., & Cappai, P. (2000). Survival viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. *Theriogenology*, 53 (8), 1511-1519.

Dobrinsky, J. R. (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 57 (1), 285-302.

Dos Santos-Neto, P. C., Cuadro, F., Barrera, N., Crispo, M., & Menchaca, A. (2017). Embryo survival and birth rate after minimum volume vitrification or slow freezing of in vivo and in vitro produced ovine embryos. *Cryobiology*, 78, 8–14.

Fahning, M. L., & Garcia, M. A. (1992). Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology*, 29 (1), 1-18.

Falchi, L., Ledda, S., & Zedda, M. T. (2022). Embryo biotechnologies in sheep: Achievements and new improvements. *Reproduction in Domestic Animals*, 57, 22-33.

Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Taiyeb, A. M., Campos-Chillon, F., & Ross, P. J. (2020). Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reproduction in Domestic Animals*, 55 (6), 659-676.

Ferreira-Silva, J. C., Silva, R. L. O., Vieira, J. I. T., Silva, J. B., Tavares, L. S., Silva, F. A. C., ... & Oliveira, M. A. L. (2021). Evaluation of quality and gene expression of goat embryos produced in vivo and in vitro after cryopreservation. *Cryobiology*, 101, 115-124.

Gajda, B., & Smorag, Z. (2009). Oocyte and embryo cryopreservation-state of art and recent developments in domestic animals. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 18, 371-387.

Gajda, B., Smorag, Z., Wierzbowski, S., Jura, J., & Wieczorek, B. (1989). Transfer of vitrified sheep morula. *Zuchthyg*, 24, 97-100.

Gibbons, A., & Cueto, M. (2011). Embryo transfer in sheep and goats. Buenos Aires, Argentina: Bariloche Experimental Station. National Institute for Agricultural Technology, 1-33.

Holtz, W. (2005). Recent developments in assisted reproduction in goats. *Small Ruminant Research*, 60 (1-2), 95-110.

Ishwar, A. K., & Menon, M. A. (1996). Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research*, 19 (1), 35-43.

Kaymaz, M. (2019). Yardımcı üreme teknikleri. Kaymaz, M., Fındık, M., Rışvanlı, A., Köker, A., (Eds.). *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji*, (s. 538-617). Medipres, Malatya.

Kaymaz, M., Esen, A., & Karadağ, Ş. (2022). Küçükbaş hayvanlarda embriyonun dondurulması. Yeni, D., (Ed.). *Küçükbaş hayvanlarda reprodüktif Biyoteknoloji*, (s. 54-61). Türkiye Klinikleri, Ankara.

Köse, A. M., & Tekeli, T. (2014). Saanen keçilerinde embriyoların vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması. *Doktora Tezi*, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Köse, A. M., & Tekeli, T. (2016). In vitro culture of in vivo Saanen goat embryos by vitrification. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 40 (5), 603-608.

Ledda, S., & Gonzalez-Bulnes, A. (2018). ET-Technologies in small ruminants. Niemann, H., Wrenzycki, C. (Ed.), *Animal Biotechnology 1*. (s. 135-166). Springer, Cham.

Leoni, G. G., Berlinguer, F., Succu, S., Bebbere, D., Mossa, F., Madeddu, M., Ledda, S., Bogliolo, L., & Naitana, S. (2008). A new selection criterion to assess good quality ovine blastocysts after vitrification and to predict their transfer into recipients. *Molecular Reproduction and Development*, 75(2), 373-382.

Luo, J., Wang, W., & Sun, S. (2019). Research advances in reproduction for dairy goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32 (8), 1284-1295.

Martinez, A. G., & Matkovic, M. (1998). Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology*, 49 (5), 1039-1049.

Martínez, A. G., Valcárcel, A., Furnus, C. C., de Matos, D. G., Iorio, G., & de las Heras, M. A. (2006). Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. *Small Ruminant Research*, 63(3), 288–296.

Martínez, A. G., Valcárcel, A., Furnus, C. C., De Matos, D. G., Iorio, G., & De Las Heras, M. A. (2006). Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. *Small Ruminant Research*, 63 (3), 288-296.

Massip, A. (2001). Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reproduction in Domestic Animals*, 36 (2), 49-55.

Menchaca, A., dos Santos-Neto, P. C., Cuadro, F., Souza-Neves, M., & Crispo, M. (2018). From reproductive technologies to genome editing in small ruminants: An embryo's journey. *Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS 2018)*, 16-20 September 2016, Foz do Iguaçu, PR, Brazil, (pp. 984).

Morató, R., Romaguera, R., Izquierdo, D., Paramio, M. T., & Mogas, T. (2011). Vitrification of in vitro produced goat blastocysts: effects of oocyte donor age and development stage. *Cryobiology*, 63 (3), 240-244.

Naitana, S., & Ledda, S. (2020). Reproductive technologies in sheep. Giorgio A. Presicce (Ed.), *Reproductive technologies in animals*, (s. 31-54). Academic Press.

Naitana, S., Ledda, S., Loi, P., Leoni, G., Bogliolo, L., Dattena, M., & Cappai, P. (1997). Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Animal Reproduction Science*, 48 (2-4), 247-256.

Noakes, E. D., Parkinson, T. J., England, G. C. W., Arthur, G. H. (2001). Embryo transfer in large domestic animals. Noakes, E. D., Parkinson, T. J., England, G. C. W., Arthur, G. H. (Eds.) *Arthur's*

Veterinary Reproduction and Obstetrics. (s. 819-836), W.B. Saunders, Oxford.

Palasz, A. T., & Mapletoft, R. J. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, 14 (2), 127-149.

Papadopoulos, S., Rizos, D., Duffy, P., Wade, M., Quinn, K., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. *Animal reproduction science*, 74 (1-2), 35-44.

Pereira, R. M., & Marques, C. C. (2008). Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and tissue banking*, 9, 267-277.

Prentice, J. R., & Anzar, M. (2011). Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics. *Veterinary medicine international*, 1-11.

Rahman, A. N. M. A., Ramli, A., & Wan Embong, W. K. (2008). A review of reproductive biotechnologies and their application in goat. *Biotechnology*, 7 (2), 371-384.

Sanches, B. V., Lunardelli, P. A., Tannura, J. H., Cardoso, B. L., Pereira, M. H. C., Gaitkoski, D., ... & Seneda, M. M. (2016). A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology*, 85 (6), 1147-1151.

Saragusty, J., & Arav, A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141 (1), 1-19.

Seidel Jr, G. E. (2015). Lessons from reproductive technology research. *Annual Review of Animal Biosciences*, 3 (1), 467-487.

Shirazi, A., Soleimani, M., Karimi, M., Nazari, H., Ahmadi, E., & Heidari, B. (2010). Vitrification of in vitro produced ovine embryos at various developmental stages using two methods. *Cryobiology*, 60 (2), 204-210.

Sudano, M. J., Paschoal, D. M., Maziero, R. R. D., Rascado, T. S., Guastali, M. D., Crocomo, L. F., ... & Landim-Alvarenga, F. D. C. (2013). Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. *Animal Reproduction*, 160-167.

Széli, A., Zhang, J., & Hudson, R. (1990). Rapid cryopreservation of sheep embryos by direct transfer into liquid nitrogen vapour at  $-180^{\circ}\text{C}$ . *Reproduction, Fertility and Development*, 2, 613-618.

Traldi, A. S., Leboeuf, B., Cognié, Y., Poulin, N., & Mermillod, P. (1999). Comparative results of in vitro and in vivo survival of vitrified in vitro produced goat and sheep embryos. *Theriogenology*, 51, 175.

Vajta, G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 357-364.

Vajta, G., & Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65 (1), 236-244.

Verma, O. P., Kumar, R., Kumar, A., & Chand, S. (2012). Assisted Reproductive Techniques in Farm Animal-From Artificial Insemination to Nanobiotechnology. *Veterinary World*, 5 (5), 301-310.

Willadsen, S. M., Polge, C., Rowson, L. E., & Moor, R. M. (1976). Deep freezing of sheep embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 46 (1), 151-154.

Youngs, C. R. (2011). Cryopreservation of preimplantation embryos of cattle, sheep, and goats. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (54), e2764.



## **BÖLÜM IV**

### **Sperma Sulandırıcıları Üzerine Antioksidanların Etkisi**

**GÖKHAN KOÇAK**  
**Cengiz YILDIZ**

#### **GİRİŞ**

Günümüzde gamet hücrelerinin saklanması için 5°C de kısa süre de saklama, dondurma veya liyolifizasyon ile uzun süreli saklama yöntemlerinden faydalanılmaktadır. Memeli canlılardan elde edilen sperma kısımlara ayrılarak, hacim olarak artırılması, metabolizmalarının sonucunda meydana gelen atıkların ortamdan uzaklaştırılması, enerji ihtiyaçlarının karşılanması gibi ihtiyaçları için sulandırma işlemine ihtiyaç duyulmaktadır. Ek olarak spermanın soğutulması kısa süreli saklanması ya da dondurulması içinde sulandırılması zorunludur. Spermanın sulandırma ve soğutulması anındaki ısı, sulandırıcı içerisine eklenen kimyasal madde içeriği ve kriyoprotektif ajanların da başarıyı etkilediği bildirilmektedir (Kaneko & ark., 2014; Sönmez, 2013).

Spermanın sulandırılma, soğutulma, dondurma ve eritilme süreçlerindeki farklı ozmotik basınç, sıcaklık, mekanik ve kimyasal etkenlere maruz kalmaları sonucunda fonksiyonel olarak morfolojik ve nükleer hasarlarda ortaya çıkabilmektedir. Ortaya çıkan hasar nedenleri kullanılmakta olan kimyasalların yapıya ve hayvan türlerine (spermatozoonlarının plazma membran yapıları ile permabilitelerinin özellikleri) bağlı olarak da değişmektedir. Ortaya çıkan hasarların etkilerinin azalması için ve daha güncel protokoller geliştirilerek kriyoprotektif ajanlarla, sıcaklık farklarıyla alakalı çalışmaların ele alınmasına ağırlık verilmiştir (Vajta & Kuwayama, 2006).

### **Antioksidan Maddeler**

Yapısında ortaklanmamış bir veya birden fazla sayıda elektron bulunduran moleküller ‘serbest radikaller’ olarak adlandırılmaktadır. (Zhong & Zhou, 2013). Bu yapıdaki radikaller, yapılarında bulunan elektronları hücre içerisinde bulundurduğu iyon transferi kanalları aracılığı ile hücrelerden geçirip membran yapılarındaki protein ve lipit bölümlerinin etkilemesine neden olmaktadır (Bucak & ark., 2007). Serbest radikallerin yapılarında reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri bulunmaktadır. Reaktif oksijen türlerinde üç büyük tip olarak süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil şeklindedir (Zhong & Zhou, 2013).

Serbest radikallerin oluşturduğu zarar veren etkilere karşı organizma koruyucu mekanizmalar oluşturur. Bu mekanizmalar serbest radikal oluşumu ve oluşmuş serbest radikal zararlarının etkilerini önler. Bu işlevlerin yerine getirilmesinde görevli maddeler antioksidanlar olarak isimlendirilmektedir (Akkuş, 1995).

Antioksidanlar yapıları itibariyle endojen ve ekzojen olarak iki ana grupta incelenir. Yapı ve işleyişlerindeki mekanizmalara bakıldığında antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak sınıflandırılmaktadır (Gutteridge, 1995). Serbest oksijen radikallerinin meydana getirdiği zararlı etkilere karşı engel olmak için, spermatozoon ve seminal plazma ortaya çıkabilecek lipit peroksidasyonu kaynaklı zararlara karşı

antioksidanları yapılarında içerirler (Alvarez & Storey, 1983). Ancak mevcut antioksidan sistem, reaktif oksijen türleri kaynaklı oluşabilecek toksik etkilere ve oksidatif hasarın engellenmesine karşı koymak için yeterli gelmemektedir (Taylor, 2001). Antioksidan ilavesinin spermatozoonların saklanması işleminde oksidatif stresin azaltılması amaçlı soğutulmuş ya da dondurulmuş spermatozoonun kalitesini arttırmış olduğu belirtilmektedir (Bilodeau ve ark. 2001).

### **Enzimatik Yapıdaki Antioksidanlar**

Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPx) ve Glutasyon redüktaz (GR) enzimatik savunma hattının oluşumunda rol oynayan enzim yapısındaki antioksidanlardır (Sen, & ark., 2010; Pham-Huy, He & Pham-Huy, 2008; Valko & ark., 2007).

### **Süperoksit Dismutaz**

Süperoksit dismutazlar (SOD), süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite dismutasyonunu kataliz eden metalloenzim grubudur. Hücrelerin mitokondrilerinde, sitosolünde ve plazmalarında bulunurlar (Poul & ark., 1993). Reaktif oksijen türleri tarafından meydana gelebilecek zararlara karşı ilk olan savunma hattı oluşumuna katılırlar (Sen & ark., 2010; Sen & ark., 2011). Süperoksit dismutazın görevi, süperoksit radikalinin ( $O_2^-$ ) hidrojen peroksite ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) katalizinin sağlayan enzimatik yapıda olan bir antioksidandır. Hidrojen peroksite uzaklaştırılması GPx ya da CAT sayesinde olmaktadır (Young & Woodside, 2011). İnsanlardaki SOD üç formda bulunmaktadır. Bunlardan çinko (Zn) ve bakır (Cu) bulunduran süperoksit dismutaz (Cu/Zn SOD) sitozolde iken, manganezi (Mn) içeren süperoksit dismutaz ise (Mn SOD) mitokondri içerisinde ve ekstrasellüler süperoksit dismutaz ise (EC SOD) hücre dışındaki sıvılarda bulunur (Sen & ark., 2011; Young & Woodside, 2011).

## **Katalaz**

Katalaz bütün hücre tiplerinin yapısında farklı konsantrasyonlarda bulunup, dört hem grubunda bir hemoprotein yapısında olup molekül ağırlığı ise 248,000 Dalton olarak bilinir. Hidrojen peroksidin moleküler oksijene ve suya katalizini sağlar (Akkuş, 1995). Katalazın kimyasal yapısını dört protein alt birimi oluşturur. Her alt birim, hem grubu ve NADPH molekülü içermektedir (Cheung & ark., 2001; Kirkman, Galiano & Gaetani, 1987). Birçok katalazda ki NADPH molekülü konumu yüzeye yakındır ve sıkı olarak bağlıdır (Zamocky & Koller, 1999). Katalaz, peroksizomlarda olduğu gibi hücre iç organellerinde ve az miktarda endoplazmik retikulumda ve mitokondride bulunmaktadır. Hidrojen peroksitin,  $H_2O$  ve  $O_2$  'ye dönüşümünde etkilidir (Limon-Pacheco & Gonsebatt, 2009). Süperoksit radikalinin ise SOD tarafından  $H_2O_2$  dönüştürülür. Hidrojen peroksit radikal yapıda olmayıp, biyolojik öneme sahip olan moleküller ile reaksiyona girmez, fakat Cu ve Fe iyonların katalizörlüğünde Fenton reaksiyonu hidroksil radikali (OH) oluşumunun ön maddesi olarak bilinmektedir (Cheung & ark., 2001; Larson & ark., 1988).

## **Glutatyon Peroksidaz**

İlk olarak 1957 de Mills tarafından keşfedilen olan enzim indirgenmiş glutatyon (GSH) ile lipit peroksitleri ve hidrojen peroksitin parçalanmasında görev alır. Membranda bulunan lipidlerin lipid peroksidasyonu zararlı etkilerine karşı korur (Poul & ark., 1993).

Glutatyon peroksidaz, hücre sitoplazmasında bulunur ve  $H_2O_2$  kaynaklı oksidatif hasar etkisine karşı hücreleri korumaktadır. Bu sayede  $H_2O_2$ 'den  $O_2$  .- 'nin oluşmasını engellemiş olur. Glutatyon peroksidaz yapı olarak dört protein alt biriminden oluşmaktadır. Her ayrı bir alt birim ise bir selenyum atomunu içermektedir (Sen & Chakraborty, 2011). Elektron kaynağını glutatyonu (GSH) kullanıp  $H_2O_2$  'yi ve organik hidroperoksitleri (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) metabolize eden enzim yapısına sahiptir. Glutatyon peroksidaz enziminde iki ana tip

enzim saptanmıştır. Aktif bölgesinde selenyum bulunduran selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (Se-GPx)'dır. Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz yapı olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve organik hiperoksitlere karşı etki göstermektedir. Selenyuma bağımlı olmayan glutatyon peroksidaz (GST) organik hidroperoksitleri metabolize etmede faaliyet göstermektedir (Reiter & ark., 1995).

### **Glutatyon Redüktaz**

Glutatyon redüktaz yapısında flavin adenin dinükleotid (FAD) bulunduran flavoprotein oluşunda enzimdir. Lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin önlenmesi için koruyucu etkisi olan tiol bileşiğidir . Antioksidan olarak sistemdeki rolü ise suda çözünen antioksidanları rejenere etme yeteneğinin olmasıdır. Bundan dolayı antioksidanlar ile birlikte kullanılmaktadır (Irvine, 1996; Baumber & ark., 2000).

### **Nonenzimatik Yapıdaki Antioksidanlar**

Sperma sulandırıcılarında katılmakta olan glutatyon, sistein, vit C (askorbik asit), vitamin E, folik asit, , hyaluronik asit, karotenler, alfa lipoik asit, trehaloz, ürik asit, melatonin, albümin, kuenzim Q10,  $\alpha$ -Lipoik asit, seruloplazmin ve transferrin, selenyum ve taurin, enzimatik özelliği bulunmayan moleküler yapıdaki antioksidanlar olarak bilinirler (Carlberg & Mannervik, 1985; Frei, 1994; Akkuş, 1995; Halliwell & Gutteridge, 2000).

### **Glutatyon**

Neredeyse tüm ökaryotik hücrelerde sentezlenmekte olan glutatyon yüksek yoğunluklarda bulunmaktadır. Glutatyon antioksidan özellikte hareket ederek, hücrenin redoks durumunun korunmasında, detoksifikasyon işlevinde, hücre sinyali mekanizması düzenlenmesinde, eikosonoidlerin sentezlenmesi, apoptozis ve gen ekspresyonunda antioksidan görevinde faaliyet göstermektedir (Townsend, Tew & Tapiero, 2003). Glutatyonun %85-90 oranda sitoplazma bulunurken, mitokondri, çekirdek, endoplazmik retikulum ve peroksisomlar da bulunabildiği belirtilmiştir (Green, & ark., 2006; Kalinina, Chernov &

Novichkova,2014 ). Glutasyonun ilk olarak glutamin-sistein ligaz (GCL), glutamin ve sisteinin bağlanmasını sağlayarak  $\gamma$ -glutamilsisteinin oluşumunu sağlarken, İkinci olarakta glutasyon sentetaz (GSS),  $\gamma$ -glutamilsisteine glisinin bağlanmasını neden olarak GSH molekülünün meydana gelmesine neden olur. (Sen & Chakraborty, 2011).

### **Sistein**

Tiol teriminde sülfür içeren bileşiklerin ifade edilmesinde kullanılır, bütün vücut hücrelerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Tiol içeren antioksidanların bazıları ise glutasyon, sistein, taurin, ve metionindir. Tiol yapısındaki bileşikler çeşitli oksidanların indirgeyip ve temizleyerek biyolojik sistemlerinin korumaktadırlar (Parcell, 2002). Yapısında tiol içeren sisteinin, GSH (Glutasyon) sentezlenmesinde ana rolü oynadığı bilinmektedir. Sistein, GSH ve taurinin sentezlenmesi için hız belirleyici aminoasit şeklinde kabul edilmektedir. Ek olarak hücre dışında indirgeyici ajan görevinde rol oynadığıda ifade edilmiştir (Kim ve ark., 2003).

### **Glutasyon**

Redükte glutasyon (GSH) yapısında glutamik asit, glisin ve sistein içeren tripeptit yapısında olup, aktif sülfidril (-SH) grubu içermektedir. Vücutta bulunan GSH'nun büyük bir kısmı karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç duymadan iki aşamalı olarak sentezlenebilen tripeptittir. GSH vücutta enzimatik olmayan antioksidan olup, serbest radikaller ile beraber peroksitlerle reaksiyonu sonucunda hücrelerin oksidatif hasarlara karşı korunmasında görevlidir (Akkuş, 1995).

### **Vitamin C (Askorbik asit)**

Sulu ortamlarda etkili olup serbest radikal üzerinde temizleyici bir işleve sahiptir. indirgeyici özellikte ve okside olmuş olan vitamin E'nin antioksidan özelliğinin restore edilmesinde görevlidir. Suda çözünen diğer antioksidanlarla karşılaştırıldığında ise, vitamin C yapısı itibarıyla plazma lipid peroksidasyonunda en

iyi etkili korumanın sağlamasına olanak sağlamaktadır (Frei ve ark., 1990; Evans, 2000).

### **Vitamin E ( $\alpha$ -Tokoferol)**

Vitamin E, doğada çok yaygın halde bulunan güçlü olan antioksidan yapısında olup serbest oksijen radikal ataklarına karşı membran lipitlerinde bulunan doymamış yağ asitlerinin korumasında ve dolayısı ile lipid peroksidasyonunun önlenmesinde görevlidir (Rıce & Kennedy, 1988; Wefers & Sıes, 1988; Burton & Traber, 1989).

Vitamin E serbest radikallerin sabit hale getirilmesini sağlayarak, peroksidasyon zincirinin kırılmasını gerçekteştirilir. Vitamin E, serbest radikalleri yok etme, zincirlerin kırılmasında, baskılanma, bozulan yapılar da onarım ve endojen savunmadaki sistemlerin güçlendirilmesi şeklinde mekanizmaları kullanarak antioksidan görevin yerine getirilmesinde etki göstererek geniş bir antioksidan etki göstermektedir. Vitamin E'nin hücre zarındaki antioksidan etkisini, hücre içerisinde genel olarak GPx üzerine almaktadır (Dündar & Aslan, 1999). Glutatyon peroksidaz ile beraber  $\alpha$ -tokoferol birbirlerinin tamamlayıcısı olan antioksidan bir etki göstermektedirler. Peroksitlerin ortaya çıkmasını  $\alpha$ -Tokoferol önlerken, GPx ise ortaya çıkmış peroksitlerin ortadan kaldırılmasını sağlar (Aydın, Sayal & Işımer, 2001).

### **Folik Asit**

Folik asit (vitamin B9) suda çözünen vitamin B üyesinden biridir. DNA sentezinde ve kırmızı kan hücreleri üretiminden de sorumlu olup gereklidir. Erkek ve kadınlar da normal olarak fertilitenin devamı içinde önemlidir. Ek olarak, gebelikte ve çocuk süeeci gibi büyüme periyotlarındaki hücresel bölünmeler sırasında görevlidir. Erkeklerde spermatogenezisin devamlılığında gereklidir (Hussein, Elnaggar & Al-Zahrani, 2012). Ayrıca, ROS'un temizlesi için oldukça güçlü antioksidan olarak bilinir (Ebaid & ark., 2013). Tek başına ya da diğer B vitaminler ile beraber plazmada homosistein seviyesinin düşürülmesinde etkilidir. Vitamin E ve

Vitamin C benzeri antioksidan vitaminler homosistein aracılı oksidatif vasküler hasarın engellenmesinde yardımcı rol olarak görev yapabilir (Title & ark., 2000).

### **Hyaluronik asit (Hyaluran)**

Hyaluronik asit glikozaminoglikan bir grup olup, antioksidan özelliğindedir. Radikal oluşumunda görev yapan bakır ve demir gibi ağır metaller ile şelat oluşturur (Balogh & ark., 2003).

### **Karotenler**

Doğa genelinde yaygın şekilde bulunan ve hücrelerin koruması gibi önemli görevlerde bulunan pigmentlerdir. A vitamini metabolik ön maddesi  $\beta$ -karotenin, süperoksit radikalının temizlenmesinde ve peroksit radikalleri ile doğrudan etkileşip antioksidan madde olarak etki ettiği tespit edilmiştir (Frei, 1994; Akkuş, 1995).  $\beta$ -karoten yapı olarak karotenoidlerin yağda çözünen üyesi olup, A vitamini halini alabildikleri için provitamin olarak bilinirler. Retinada retinole dönüşerek karanlıktaki görüşler içinde oldukça gereklidir (Pham-Huy, He & Pham-Huy, 2008).

### **Alfa Lipoik Asit**

Alfa lipoik asit hücre içinde koenzim Q10 ve glutatyon miktarının artmasında etkili olan vitamin benzeri antioksidan olup, hücre içinde ve dışında etki gösteren serbest oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı hücrenin korumasında görevlidir (Suzuki & ark., 1991).

### **Trehaloz**

Trehaloz suda çözünebilme özelliğinde ve osmotik profil olarak maltoza benzeyen bir disakkarit yapısında olup, spermatozoonun plazma membranının yapısına penetre olup soğuk şoku zararlarına karşı koruyucu etki gösteren antioksidan özelliğinde moleküldür (McWilliams & ark., 1995; Aboagla & Terada, 2003; Purdy, 2006).



## **Ürik asit**

Suda çözünebilir antioksidan olup metal iyonları ile şelat yaparak, oksidasyonlara karşı askorbik asidin korunmasını sağlar (Nııkı, 1987). Lipit peroksidasyonun engellenmesini sağlayarak koruyucu görev yapabilir. Serbest radikallerin ortamdan uzaklaştırılmasında etkili olup, Cu ve Fe gibi metal iyonlarında şelat yaparak koruyu bir mekanizmaya sahiptir (Kumar & ark., 2015; Waring, 2002).

## **Melatonin**

Hidroksil radikalinin yakalanmasını sağlayarak ortadan kaldırılmasında etkili güçlü bir lipofilik yapıda antioksidandır (Okotanı & ark., 2000). Melatonin, pineal bezlerden ve birçok yerde sentezlenerek endojen olarak üretilip dolaşıma katılır. Karanlıkta ise triptofandan sentezlenmektedir (Hevia & ark., 2014). Serbest radikallerin meydana getirdiği zararlı etkileri azaltarak hücre içi bölümlerde ise makromoleküllerin oksidatif hasarlardan korunmasını sağlar. Proteinler ve lipitlere ek olarak çekirdek DNA'sını ve mitokondriyel DNA'nın da korunmasında görevlidir. Melatonin hidrojen peroksit, hidroksil radikali, singlet oksijen, peroksinitrit anyonu, nitrik oksit ve peroksinitrik asit bulunduran reaktif türlerinin ve serbest radikallerinde farklı formlarının temizlenmesinde etkilidir. Elektron taşıma sisteminde görev alıp serbest radikallerin üretilmesini ve elektron kaçaklarının azaltılmasında etki gösterir (Reiter & ark., 2006).

## **Albumin**

Albumin yapısında 585 aminoasit bulundurur ve 66 kDa'luk molekül ağırlığında bir proteindir. Yüksek derecelerde çözünebilmekte ve insan plazması içerisinde 35-50 mg/ml arasında bulunmaktadır. Fizyolojik ve farmakolojik olarak bir çok öneme sahiptir. Vücut içerisinde farklı bölümler arasında bulunan sıvı dağılımı ve ozmotik basınç düzenlenmesinde rol oynayan proteindir. Genel anlamda, albümin plazmada önemli ve etkili antioksidan olarak bilinir. (Roche & ark., 2008).

## **Koenzim Q10**

Koenzim Q10, insanın vücudunda doğal bir şekilde sentezlenen vitamin benzeri benzokinin yapısında bileşiktir. İnsan hücrelerinde bulunan tirozin sayesinde koenzim Q10 sentezi yapılabilmektedir. Koenzim Q10, lipitlerde çözünürlüğü fazla olan, neredeyse tüm hücre membranlarının yapısında bulunduğu gibi lipoproteinlerde de mevcut olarak bulunur. Ek olarak Koenzim Q10 antioksidan etki göstererek serbest radikallerin ortamdan uzaklaştırılmasında rol oynayarak, protein ve lipit peroksidasyonunun baskılanmasında görevlidir. İndirgenmiş formu olarak ubikinol ( $\text{CoQH}_2$ ), lipofilik antioksidan şeklinde hareket ederek elektron taşıma sistemi ile proton ve elektron taşınmasına da eşlik eder. Ubikinol, oksidanların nötralize edilmesi için elektron vererek güçlü antioksidan aktivitesini gösterir. Buna bağlı olarak koenzim Q10,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $\text{O}_2$  gibi toksik olan ROS'lara karşı etkin bir korumanın sağlanmasına imkan verir. Koenzim Q10 aynı vitamin E şeklinde lipid peroksidasyonunun önlenmesinde rol alır.  $\alpha$ -tokoferol ile beraber sinerjik etkili çalışarak aktif formlarının yeniden oluşumunu sağlayıp, vitamin C benzeri mekanizmayla etki gösterir (Gürkan & Bozdağ-Dündar, 2005).

## **$\alpha$ -Lipoik asit**

$\alpha$ -Lipoik asit ile beraber  $\alpha$ -lipoik asitin indirgenmiş olan formu dihidrolipoik asit (DHLA) güçlü antioksidanlar olarak bilinirler.  $\alpha$ -Lipoik asit (LA), hidroksil, peroksinitrit anyonu, hipokloröz asit ve singlet oksijenin uzaklaştırılmasında görevlidir. Dihidrolipoik asit ek olarak süperoksit radikalleri ve peroksil radikallerinin temizlenmesine olanak sağlamaktadır. (Packer, Kraemer & Rimbach, 2001).

## **Seruloplazmin ve Transferrin**

Seruloplazmin ve transferrin beyin de dâhil birden fazla dokuda sentezlenebilen önemli bir antioksidan yapısında proteinlerdir. Seruloplazmin kanda bulunan Cu'nun % 95'inin taşınmasında bir  $\alpha_2$  serum glikoproteini şeklinde iken, transferin ise

hücreye  $Fe^{+3}$  taşınmasından sorumlu olan taşıyıcı bir proteindir. Seruloplazmin, geri dönüşümlü olarak Cu'ya bağlanarak, Cu metabolizması aşamasında önemli role sahiptir. Ek olarak, SOD ve ferrokسيداز benzeri hareket ederek eritrositlerin zarında mevcut olan çoklu doymamış haldeki yağ asitlerinin aktif oksijen türler zararlarından korumaktadır. Transferin, serumda bulunduğu gibi diğer vücut sıvıları içerisinde de düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Transferinin asıl fonksiyonu hücreye  $Fe^{+3}$  taşınması ve büyüme faktörü görevi görmesidir. Transferinin serbest ferröz iyonunun konsantrasyonunun azaltılmasında önemli bir antioksidan olarak da hareket etmektedir (Chauhan & ark., 2004).

### **Selenyum**

Selenyum, bağışıklık düzenleyici ve antioksidan etkisine sahip temel elementtir. Selenyum aminoasit sentezinde kullanılır, selenosistein şeklinde ifade edilerek selenoprotein fonksiyonunda çok önemli fonksiyonu vardır. İnsan vücuduna bakıldığında en az 25 selenoprotein bulunduğu ve bunlar antioksidanlar enzimler (glutasyon peroksidaz), antioksidan olan proteinler (selenoprotein P ve W) ve diğer metabolik enzimlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırılmışlardır. Selenyum, GPx aktivitesinin artırılmasını sağlayarak ROS'un oluşumunun baskılanmasını sağlarlar (Kim & ark., 2014).

### **Taurin**

Dişi genital sıvısı ve seminal plazma içeriğinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Taurin, glutamat, glutamin ve glisin gibi aminoasitleri yapısında içererek olup penetrasyon, akrozom reaksiyonu, kapasitasyon ve embriyo gelişiminde preimplantasyonda sürecinde etkili olmaktadır (Barna & ark., 1998). Antioksidan özellikte olup, koruyucu ve destekleyici etkileri bakımından önemli bir etkiye sahiptir (Parcell, 2002).

## **Kaynaklar**

Aboagla, E. M. and Terada, T. (2003). Trehalose enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction*, 69(4):1245-1250.

Akkuş, İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları*, Konya, 1, 57-63.

Alvarez, J. G. and Storey, B. T. (1983). Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod*, 29 (3): 548–555.

Aydın, A., Sayal, A., and Işimer, A. (2001). Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi. *Gülhane Askeri Tıp Akademisi. Ayın Kitabı*.

Balogh, G. T., Illes, J., Szekely, Z., Forrai, E., and Gere, A. (2003). Effect of different metal ions on the oxidative damage and antioxidant capacity of hyaluronic acid. *Arch. Biochem. Biophys*, 410: 76-82.

Barna, J., Ashizawa, K., Boldizsar, H., and Inoue, M. (1998). Effects of taurine on the motility and intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration of fowl spermatozoa in vitro. *Journal of reproduction and fertility*, 114(2): 225-229.

Baumber, J., Ball, B. A., Gravance, C. G., Medina, V., and Davies-Morelú M. C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of andrology*, 21(6): 895-902.

Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C., and Sirard, M. A. (2001). Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56(2): 275-286.

Burtis, C. A., and Ashwood, E. R. (2005). *Klinik kimyada temel ilkeler*. Palme Yayınları, 5th Ed. Ankara, 450-2.

Burton, G. and Traber, M. (1989). Antioxidant actions of caretenoids. *J. Nutr.*, 119:109-11.

Carlberg, I. and Mannervik, B. Glutathione reductase assay. *Methods in Enzymol.* Academic Press, Orlando FL. 1985, 113, 484–495.

Chauhan, A., Chauhan, V., Brown, W. T. and Cohen, I. (2004). Oxidative stress in autism: Increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin-the antioxidant proteins. *Life sciences*, 75(21), 2539-2549.

Cheung, C. C. C., Zheng, G. J., Li, A. M. Y., Richardson, B. J., and Lam, P. K.S. (2001). Relationship Between Tissue Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Antioxidative Responses of Marine Mussels, *Perna viridis*. *Aquat Toxicol.* 52(3-4): 189-203.

Dündar, Y. and Aslan, R. (1999). Oksidan-Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü. *Hayvancılık Araştırma Dergisi.* 9(1- 2): 32-39.

Ebaid, H., Bashandy, S. A. E., Alhazza, I. M., Rady, A., and El-Shehry, S. (2013). Folic acid and melatonin ameliorate carbon tetrachlorideinduced hepatic injury, oxidative stress and inflammation in rats. *Nutr Metab.* 10(20) doi:10.1186/1743-7075-10-20.

Evans, W. J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr.* 72: 647-52.

Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins mechanisms of action. *Am. J. Med.* 97: 5-13.

Frei, B. R., Stocker, L., Englund, A., and Ames, B. N. (1990). Ascorbate: the most effective antioxidant in human plasma. *Adv. Expl. Med. Biol.* 264: 155-163.

Green, R. M., Graham, M., O'Donovan, M. R., Chipman, J. K., and Hodges, N. J. (2006). Subcellular compartmentalization of

glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity. *Mutagenesis*. 21(6): 383-390.

Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*, 41(12): 1819-1828.

Gürkan, A. S. and Bozdağ-Dündar, O. (2005). Coenzyme Q10. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara*. 34(2): 129-154.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (2000). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press New York USA. 107-208.

Hevia, D., Mayo, J. C., Tan, D. X., Rodriguez-Garcia, A., and Sainz, R. M. (2014). Melatonin Enhances Photo-Oxidation of 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein by an Antioxidant Reaction That Renders N1-Acetyl-N2-Formyl-5-Methoxykynuramine (AFMK). *PLoS ONE*. 9(10): e109257.

Hussein, H. K., Elnaggar, M. H., and Al-Zahrani, N. K. (2012). Antioxidant role of folic acid against reproductive toxicity of cyhalothrin in male mice. *Glo Adv Res J Environ Sci Toxicol*. 1(4): 66-71.

Irvine, D. S. (1996). Glutathione as a treatment for male infertility. *Reviews of Reproduction*, 1(1): 6- 12.

Kalinina, E. V., Chernov, N. N., and Novichkova, M. D. (2014). Role of Glutathione, Glutathione Transferase, and Glutaredoxin in Regulation of Redox-Dependent Processes. Published in *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*. 54: 299-348.

Kaneko, T., Ito, H., Sakamoto, H., Onuma, M., and Inoue-Murayama, M. (2014). Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. *PloSone*, 9(11), e113381.

Kim, Y. G., Kim, S. G., Kwon, J. W., Park, O. J., and Kim, S. K. (2003). Effect of cysteine on amino acid concentration and transsulfuration enzyme activities in rat liver with protein-calorie malnutrition. *Life Sci*, 72: 1171-1181.

Kirkman, H. N., Galiano, S., and Gaetani, G.F. (1987). The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem.* 262(2): 660–666.

Kumar, A. N., Aruna, P., Naidu, J. N., Kumar, R., and Srivastava, A. K. (2015). Review of Concepts and Controversies of Uric Acid as Antioxidant and Pro-Oxidant. *Archives Medical Review Journal.* 24(1): 19-40.

Larson, R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry.* 27(4): 969-978.

Li, Y. and Schellhorn, H. E. (2007). New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr.* 137(10): 2171-2184.

Limon-Pacheco, J. and Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidantrelated enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res.* 674(1-2): 137-147.

McWilliams, R. B., Gibbons, W. E., and Leibo, S. P. (1995). Osmotic and physiological responses of Mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. *Human Reproduction,* 10(5):1163-1171.

Niki, E. (1987). Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lip,* 44: 227-253.

Okotani, Y., Wakatsuki, A., and Kaneda, C. (2000). Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *J. Pineal. Res,* 28: 89-96.

Packer, L., Kraemer, K., and Rimbach, G. (2001). Molecular Aspects of Lipoic Acid in the Prevention of Diabetes Complications. *Nutrition.* 17: 888-895.

Parcell, S. (2002). Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med Rev,* 7: 22-24.

Pham-Huy, L. A, He, H., and Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci.* 4(2): 89-96.

Poul, J. L., Sall, N. D., and Soni, T. (1993). Lipit peroxidation abnormalites. *Nephron*, 64: 106-109.

Purdy, P. H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rum. Res*, 63, 215-225.

Reiter, R. J., Acuna-Castroviejo, D., DunXian, T., and Burkhardt, S. (2006). Free Radical-Mediated Molecular Damage. Mechanisms for the Protective Actions of Melatonin in the Central Nervous System. *Ann N Y Acad Sci.* 939(1), 200-215.

Reiter, R. J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G. G., and Acuna-Castroviejo, D. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res.* 18(1): 1-11.

Rice, D. and Kennedy, S. (1988). Vitamin E: function and effects of deficiency. *Br. Vet. J*, 144: 482-492.

Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E., and Bourdon, E. (2008). The antioxidant properties of serum albümin. *FEBS Lett.* 582(13): 1783-1787.

Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R., and De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 3(1): 91-100.

Sen, S. and Chakraborty, R. (2011). The Role of Antioxidants in Human Health. American Chemical Society, *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy.* Chapter 1: 1-37.

Sönmez, M. (2013). Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Elazığ, 237-287.



Suzuki, Y. J., Masahiko, T., and Lester, P. (1991). Thiocetic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free radical research communications*, 15(5): 255-263.

Taylor, C. T. (2001). Antioxidants and reactive oxygen species in human infertility. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, 10: 189-198.

Title, L. M., Cummings, P. M., Giddens, K., Genest, J. J., and Nassar, B. A. (2000). Effect of Folic Acid and Antioxidant Vitamins on Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol*. 36(3): 758-765.

Townsend, D. M., Tew, K. D., and Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*. 57(3-4): 145- 155.

Vajta, G. and Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65(1), 236- 244.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D., Mazura, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39: 44-84.10.

Waring, W. S. (2002). Uric acid: an important antioxidant in acute ischaemic stroke. *QJM*. 95(10): 691-693.

Wefers, H. and Sies, H. (1988). The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur. J. Biochem*, 174: 353-357.

Young, I. S. and Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in Health and Disease. *J Clin Pathol*. 54(3): 176-186.

Zamocky, M. and Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog Biophys Mol Biol*. 72(1): 19-66.

Zhong, R. Z. and Zhou, D.W. (2013). Oxidative stress and role of natural plant derived antioxidants in animal reproduction. *Journal of integrative agriculture*, 12(10), 1826-1838.

# BÖLÜM V

## Spermatik Kord ve Hastalıkları

**Volkan KOŞAL<sup>1</sup>**

### Giriş

Erkeklerde spermatik kordon (funnikulus spermatikus) bir konnektif doku matriksi içerir ve bu preperitoneal konnektif dokunun devamıdır. Spermatik kordonun işlevi testisi skrotumda asılı tutmak ve testise giden ve testisten gelen yapıları içermektir. Bu yapılar arasında spermi epididimisten ejakülatör kanala taşıyan vas deferens, testise kan sağlayan testiküler arter, testisten kanı boşaltan ve sıcaklığını düzenlemeye yardımcı olan pleksus phampiniformis, lenf sıvısını testisten lenf düğümlerine taşıyan lenfatik damarlar, testis ile kremaster kasına ve innervasyon sağlayan sinirler bulunur. Spermatik kord, karın duvarından türeyen üç doku katmanıyla sarılıdır: dış spermatik fasya, kremasterik fasya, ve iç spermatik

---

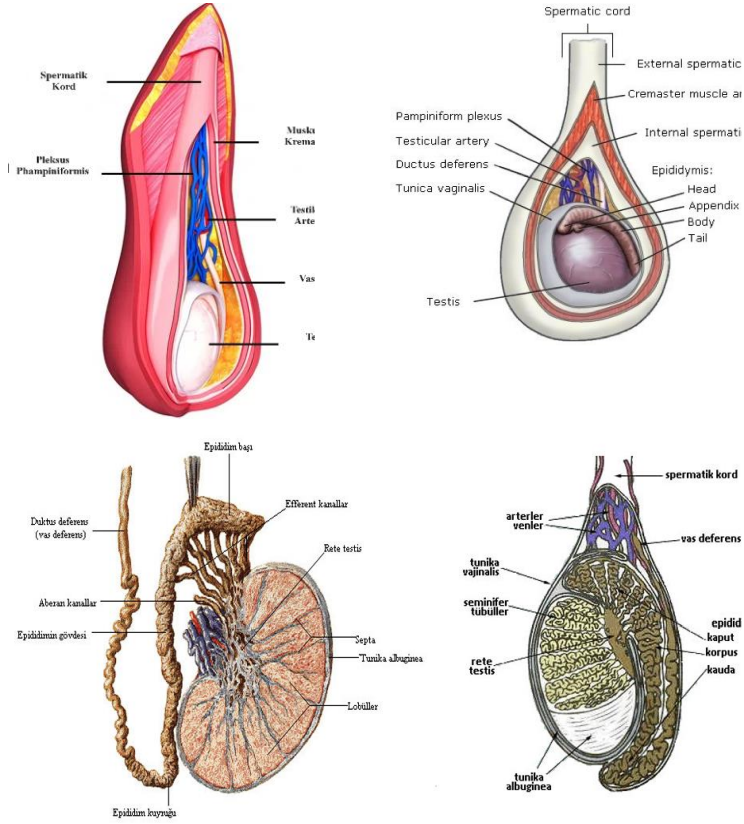
<sup>1</sup> Dr. Öğr. Üyesi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama ABD.

fasya. Bunlar testis ve epididimisinin işlevi için kritik yapılardır (Ergün ve ark., 1997; Uzzo ve ark., 1999; Skandalakis ve ark., 2004).

*Tablo1. Spermatik Kord İçerisinde Yer Alan Yapılar*

Duktus Deferens	
Arterler	İnternal Spermatik Arter Deferensiyel Arter Eksternal Spermatik Arter
Pleksus Phampiniformis	
Sinirler	Genitofemoral Sinir İlioinguinal Sinir Hipogastrik pleksusun sempatik lifleri
Fasya Tabakası	Eksternal Fasya Kremaster kası İnternal Fasya

(Rutkow ve ark., 1996; Seymour ve ark.,1999; Skandalakis ve ark., 2004).



(Sobotta, 2001; Martini ve ark., 2006)

*Şekil 1. Spermatic Kord ve Testis Anatomisi.*

## **Spermatic Kord Hastalıkları**

Spermatic kord; torsiyon, enfeksiyon, varikosel ve skrotal herni gibi çeşitli durumlara karşı hassastır ve bu durum işlevini etkileyerek ağrı, şişme veya infertiliteye neden olabilir. Spermatic kord hastalığı, testisi karına bağlayan ve vas deferens, kan damarları, sinirler ve lenfatik damarları içeren yapı olan spermatic kordonu etkileyen herhangi bir durumu ifade eden bir terimdir (Gooding, 1988; Wilhelm Filho ve ark., 2004).

## ***Epididimitis***

Epididimitis, testisin arkasında sperm depolayan ve taşıyan sarmal tüp olan cauda epididimisin yangısıdır. Epididimitis genellikle cinsel yolla bulaşan bir enfeksiyon (CYBE) veya idrar yolu enfeksiyonu gibi bakteriyel bir enfeksiyondan kaynaklanır. Epididimitis belirtileri arasında skrotumda şişme, ağrı ve hassasiyet, penisten akıntı, idrar yaparken ağrı ve ateş yer alır. Epididimitis antibiyotik ve ağrı kesicilerle tedavi edilebilmektedir (Robles, 1988; McConaghy & Panchal, 2016; Çek ve ark., 2017).

## ***Testis Torsiyonu***

Testis skrotum içinde kendi etrafında dönmesiyle veya bükülmesi sonucu kan akışını kesilmesine bağlı ortaya çıkan tıbbi bir acil durumdur. Testis torsiyonu derhal tedavi edilmezse testiste kalıcı hasara neden olabilir. Testis torsiyonunun belirtileri arasında skrotumda ani, şiddetli ağrı, şişme, bulantı, kusma ve testisin yüksek veya anormal pozisyonu yer alır. Testis torsiyonu, testisin çözülmesi ve kan akışının yeniden sağlanması için acil ameliyat gerektirir (Sharp ve ark., 2013).

Testis torsiyonunun klasik prezentasyonu, bulantı ve kusma ile ani başlayan şiddetli tek taraflı testis ağrısıdır. Hastalarda ateş veya idrar sorunları gibi spesifik olmayan semptomlar da görülebilir. Açık bir tetikleyici faktör olmamasına rağmen, birçok hasta yakın zamanda travma veya yorucu fiziksel aktivite öyküsü tanımlamaktadır. İpsilateral skrotal cilt endurasyonlu, eritemli ve sıcak olabilir, ancak üstteki ciltteki değişiklikler iltihaplanma derecesini yansıtır ve zamanla değişebilir (Srinivasan ve ark., 2011; Bettcher ve ark., 2012).

Apendiks testis ve apendiks epididimis sırasıyla Müllerian ve Wolffian sistemlerinin embriyolojik kalıntılarıdır. Bu körelmiş yapılar, daha sonra enfarktüsle birlikte torsiyona uğrayabilir. Klinik olarak, akut skrotal ağrısı olan bir hastada apendiksin torsiyonunu spermatik kordun torsiyonundan ayırt etmek zor olabilir; ağrının

başlangıcı benzer şekilde ani olabilir ve sistemik semptomlar mevcut olabilir (Rakha ve ark., 2006).

### **Varikosel**

Varikosel, spermatik korddaki damarların genişlediği ve bükülerek varisli bir damar oluşturduğu bir durumdur. Varikosel testisin kan akışını ve sıcaklığını etkileyebilir, bu da sperm üretimini ve kalitesini bozabilir. Varikosel skrotumun sol tarafında daha yaygındır ve donuk bir ağrıya, ağırlık hissine veya görünür bir yumruya neden olabilir. Varikosel genellikle fiziki muayene veya ultrason ile teşhis edilir ve ameliyat veya embolizasyon ile tedavi edilebilir (Pryor & Howards 1987; Masson & Brannigan, 2014).

Varikosel, phampiniform pleksus damarlarının genişlemesi ve kıvrımlı hale gelmesidir. Spermatik venlerin varisleri en sık yaşlı koçlarda görülür. Boğa, aygır ve köpek gibi diğer hayvanlarda tesadüfi bir bulgu olarak veya spermatik kord damarlarının daraldığı durumlarda ikincil olarak ortaya çıkarlar (Ezzi ve ark., 1988).

Varikosel tromboze olmadıkça nadiren fark edilir. Küçük varikosellerin zararlı olduğuna dair somut bir kanıt yoktur. Büyük olanlar, boyutları ve hayvanın termoregülasyonu sürdürmek için testisi yükseltme yeteneğinin azalması veya kan akışının değişmesi ve testiküler oksidan/antioksidan dengenin değişmesi nedeniyle zararlıdır. Varikoselin patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır (Agarwal ve ark., 2006).

Varikoseller, testisin proksimalinde spermatik kordun fasyası içinde koyu kırmızı, 3 cm çapa kadar nodüller şeklinde görülür. Varikosellerde tipik venöz trombüsler gibi büyük organize lamine trombüsler bulunabilir. Varikoselin ayırıcı tanıları arasında neoplazi (mezotelyoma), skrotal herni, skrotal lenfadenit, epididimisin baş kısmı veya deferent kanalın spermatik granülomu ve kistik retansiyonlu mezonefrik veya paramesonefrik kanallar yer alır (Jarow, 2001).

Varikosel; iki taraflı ya da tek taraflı olabilir. Büyük varikoseller genellikle tromboze olur ve testis dejenerasyon gözlenir.

Buna bağlı olarak testis ve vücut ağırlığında azalma gözlenir (Gat ve ark., 2004).

### **Skleroz**

Testiküler venlerin intimal sklerozu yaşı erkeklerde yaygındır. Bilateral olma eğiliminde olan arteriyel değişiklikler intimal katmanda gözlenen fibroplazisinden oluşur. İntimal veya medial mineralizasyon testiküler arter dallarında da görülür. Koç ve tekelerde gözleendiği bildirilmiştir (Markey ve ark., 1994; Ahmad & Noakes, 1995).

### **Vaskülit**

Vaskülit kan damarlarının enflamasyonu demektir. Enflamasyon, kan damarlarının duvarlarının kalınlaşmasına neden olabilir, bu da damardan geçiş yolunun genişliğini azaltır. Kan akışı kısıtlanırsa, organ ve doku hasarına neden olabilmektedir (Zhang ve ark., 2023).

Testis, deferens ve kremaster arterlerinin vaskülit, malign kataral ateş ve boğaların bovine viral diyare virüs enfeksiyonunda bulunabilir. Beagle cinsi köpeklerde jüvenil sistemik vaskülitin bulunması spermatik kord vaskülitini görölme olasılığını artırmaktadır. Vaskülit sonucu testiküler arterin kalınlaşması ve dejenerasyonu gözlenen boğalarda spermatik kord damarlarının belirgin hipoplazisi bildirilmiştir (Ellis ve ark., 1992; Sato ve ark., 2012).

### **Vasküler Anastomoz**

Pleksus phampiniformisin venöz ve arteriyel kan damarları arasında doğrudan bir bağlantı olmamasına rağmen boğalarda, domuzlarda ve koçlarda küçük damarlar yoluyla fonksiyonel arteriyovenöz anastomozlar olduğu bilinmektedir (Pepe ve ark., 2021; Benzi ve ark., 2022).

### **Skrotoral Hernia**

İnguinal fitik, karın içeriğinin kasık kanalına doğru şişmesiyle oluşur. Skrotal fitik, karın içeriğinin vajinal tunikler



(vajinal kese) arasındaki boşlukta kalmasıyla oluşur. Tüm türlerde doğuştan ya da sonradan gerçekleşen bir hastalık olarak ortaya çıkar. Skrotal fitiklar, iç kasık halkasının kapanmaması, vajinal sürecin tam olarak yok olmaması, kasık bölgesi üçgeninin zayıflığı, fitik duvarındaki düz kaslarda bir anormallik veya karın içi basıncın artması durumunda gelişir (Tran ve ark., 2023; Foladi ve ark., 2023).

Domuzlarda, 3 veya 4 aday gen skrotal herni ile bağlantılıdır. Kriptorşidizm ile ilgili genlerle olası bir bağlantı vardır. Aygırlarda bu bozukluk ya doğuştandır ve genellikle 3-6 aylıkken düzelir ya da edinseldir. Bağırsak boğulması nedeniyle potansiyel olarak hayatı tehdit eder. Konjenital formda, jejenumun bir kısmı vajinal keseye girer; doğum sırasında vajinal tuniklerin yırtılması bağırsak halkasının deri altı bir yerde yatmasına neden olabilir. Sol ve sağ taraf fitikları eşit sıklıkta görülür. Bağırsak fitığı genellikle testisin vasküler beslenmesini engeller ve cerrahi onarım sırasında kastrasyonu gerektirir (Xu ve ark., 2019; Marzok ve ark., 2022).

### **Fünikülitis**

Spermatik kordun iltihaplanması fünikülitis denir. Genellikle kastrasyon sonrası oluşan komplikasyondur. Çevresel bakteriyel kontaminasyonun yüksek olduğu domuzlarda ve diğer türlerde nekrotik fünikülit gelişir. Fünikülit, kısırlaştırma sırasında kordonun kesildiği yerde tüyleri sıkışan kedilerde de görülür. Kastrasyon sonrasında dikiş materyaline karşı oluşan reaksiyon veya enfeksiyon sonucu karşılaşılabilmektedir (Swalec & Smeak 1989; Nador, 1990; Bengtsdotter ve ar., 2019; Claeys & Schockaert, 2021).

### **Neoplazmlar**

Neoplazmlar spermatik kordda ortaya çıkar veya başka yerlerden metastaz yaparak bu bölgeye gelir. Neoplazmların çeşitliliği skrotum ve testistekilere benzerdir. Fibröz doku, iskelet ve düz kas, endotelyum veya mezotelyum dahil olmak üzere herhangi bir yapının primer neoplazmaları oluşabilir. Kısırlaştırılmış köpek ve kedilerde spermatik kordun ekstratestiküler Sertoli ve interstisyel

hücre tümörleri gelişebilir (Quartuccio ve ark., 2012; Dagur ve ark., 2017).

### **Parazit Granülomları**

Göç eden *Strongylus* spp. larvalarının neden olduğu parazit granülomları atların spermatik kord ve testislerinde görüldüğü bildirilmiştir (Card & Haas, 1997).

### **Deferent Kanalın Spermatik Granülomu**

Deferent kanalın spermatik granülomu, vazektomi sonrası karşılaşılabilen bir durumdur. Nadir de olsa vazektomi sonrası ve bazen spontan bir hastalık olarak görülür (Ma ve ark., 2016).

## KAYNAKÇA

Agarwal, A., Prabakaran, S., & Allamaneni, S. S. (2006). Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 12(5), 630-633.

Ahmad, N., & Noakes, D. E. (1995). A clinical and ultrasonographic study of induced testicular and epididymal lesions in goats and a ram. *Animal Reproduction Science*, 39(1), 35-48.

Bengtsson, E. A., Ekman, S., & Andersen, P. H. (2019). Neuromas at the castration site in geldings. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 61(1), 1-9.

Benzi, T. C., Logsdon, N. T., Sampaio, F. J., & Favorito, L. A. (2022). Testicular arteries anatomy applied to fowler-stephens surgery in high undescended testis—a narrative review. *International braz j urol*, 48, 8-17.

Boettcher, M., Bergholz, R., Krebs, T. F., Wenke, K., & Aronson, D. C. (2012). Clinical predictors of testicular torsion in children. *Urology*, 79(3), 670-674.

Card, C. E., & Haas, S. D. (1997). Pseudocyst of the spermatic cord of a gelding. *The Canadian Veterinary Journal*, 38(9), 567.

Claeys, E., & Schockaert, O. (2021). A funny case of Funiculitis. *Acta Clinica Belgica*, 76(3), 232-235.

Çek, M., Sturdza, L., & Pilatz, A. (2017). Acute and chronic epididymitis. *European Urology Supplements*, 16(4), 124-131.

Dagur, G., Gandhi, J., Kapadia, K., Inam, R., Smith, N. L., Joshi, G., & Khan, S. A. (2017). Neoplastic diseases of the spermatic cord: an overview of pathological features, evaluation, and management. *Translational Andrology and Urology*, 6(1), 101.

Ellis, J. A., O'Toole, D. T., Haven, T. R., & Davis, W. C. (1992). Predominance of BoCD8-positive T lymphocytes in vascular lesions in a 1-year-old cow with concurrent malignant catarrhal fever

and bovine viral diarrhea virus infection. *Veterinary pathology*, 29(6), 545-547.

Ergün, S., Bruns, T., Soyka, A., & Tauber, R. (1997). Angioarchitecture of the human spermatic cord. *Cell and tissue research*, 288, 391-398.

Ezzi, A., Ladds, P. W., Hoffmann, D., Foster, R. A., & Briggs, G. D. (1988). Pathology of varicocele in the ram. *Australian Veterinary Journal*, 65(1), 11-15.

Foladi, N., Farzam, F., & Aien, M. T. (2020). Massive inguino-scrotal herniation of urinary bladder in an infant (scrotal cystocele)—case report. *Radiology Case Reports*, 15(5), 607-609.

Gat, Y., Bachar, G. N., Zukerman, Z., Belenky, A., & Gornish, M. (2004). Varicocele: a bilateral disease. *Fertility and sterility*, 81(2), 424-429.

Gooding, G. A. (1988). Sonography of the spermatic cord. *American Journal of Roentgenology*, 151(4), 721-724.

Jarow, J. P. (2001). Effects of varicocele on male fertility. *Human reproduction update*, 7(1), 59-64.

Ma, L., Guo, Y., Yuan, Y., Li, Y. G., Deng, X. Z., & Yang, Z. W. (2016). Morphometric study of the testis and reproductive tract (including sperm granuloma) after vasectomy in mature rats. *Asian Journal of Andrology*, 18(1), 66.

Markey, C. M., Jequier, A. M., Meyer, G. T., & Martin, G. B. (1994). Testicular morphology and androgen profiles following testicular ischaemia in rams. *Reproduction*, 101(3), 643-650.

Martini, F., Timmons, M. J., Tallitsch, R. B., Ober, W. C., Garrison, C. W., Welch, K. B., & Hutchings, R. T. (2006). *Human anatomy* (p. 904). San Francisco, CA: Pearson/Benjamin Cummings.

Marzok, M. A., Almubarak, A. I., Kandeel, M., & Badawy, A. A. (2022). Acquired indirect unilateral chronic reducible scrotal

hernia in an Arabian stallion. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 52(3), 621-626.

Masson, P., & Brannigan, R. E. (2014). The varicocele. *Urologic Clinics*, 41(1), 129-144.

McConaghy, J. R., & Panchal, B. (2016). Epididymitis: an overview. *American family physician*, 94(9), 723-726.

Nádor, A. (1990). Meat inspection importance of abscesses observed in pigs. I. Abscess after castration (purulent funiculitis). *Magyar Állatorvosok Lapja*, 45(3), 153-155.

Pepe, P., Panella, P., Savoca, F., & Pennisi, M. (2021). Bilateral abdominal spermatic cord section following peno-scrotal injury. *Urology Case Reports*, 39, 101754.

Pryor, J. L., & Howards, S. S. (1987). Varicocele. *Urologic Clinics of North America*, 14(3), 499-513.

Quartuccio, M., Marino, G., Garufi, G., Cristarella, S., & Zanghì, A. (2012). Sertoli cell tumors associated with feminizing syndrome and spermatic cord torsion in two cryptorchid dogs. *Journal of Veterinary Science*, 13(2), 207-209.

Rakha, E., Puls, F., Saidul, I., & Furness, P. (2006). Torsion of the testicular appendix: importance of associated acute inflammation. *Journal of clinical pathology*, 59(8), 831-834.

Robles, C. A. (1998). Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*. *Revista de Medicina Veterinaria*, 79(1), 67-71.

Rutkow IM, Robins PH, Alan W. Testicular atrofi and chronic residual neuralgia as risk of inguinal hernioplasty. *Surg. Clin. N. A.* 573-574, 1996.

Sato, J., Doi, T., Wako, Y., Hamamura, M., Kanno, T., Tsuchitani, M., & Narama, I. (2012). Histopathology of incidental findings in beagles used in toxicity studies. *Journal of toxicologic pathology*, 25(1), 103-134.

Seymour S, Shires T, Spencer F, Daly J, Fischer J, Galloway A. Principles of Surgery. Seventh Edition. 34: 1613-1639, 1999.

Sharp, V. J., Kieran, K., & Arlen, A. M. (2013). Testicular torsion: diagnosis, evaluation, and management. *American family physician*, 88(12), 835-840.

Skandalakis PN, Skandalakis JE, Colborn GL, Kingsnorth AN, Weidman TA, Skandalakis LJ. Abdominal wall and hernias. Surgical Anatomy (Skandalakis JE, ed). 14th ed. Athens, PMP Co. Vol 1, 9: 395-491, 2004.

Sobotta, J. (2001). *Sobotta atlas of human anatomy I*. Williams & Wilkins.

Srinivasan, A., Cinman, N., Feber, K. M., Gitlin, J., & Palmer, L. S. (2011). History and physical examination findings predictive of testicular torsion: an attempt to promote clinical diagnosis by house staff. *Journal of pediatric urology*, 7(4), 470-474.

Swalec, K. M., & Smeak, D. D. (1989). Priapism after castration in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 195(7), 963-964.

Tran, H. M., MacQueen, I., Chen, D., & Simons, M. (2023). Systematic Review and Guidelines for Management of Scrotal Inguinal Hernias. *Journal of Abdominal Wall Surgery*, 2, 11195.

Uzzo, R. G., Lemack, G. E., Morrissey, K. P., & Goldstein, M. (1999). The effects of mesh bioprosthesis on the spermatic cord structures: a preliminary report in a canine model. *The Journal of urology*, 161(4), 1344-1349.

Wilhelm Filho, D., Torres, M. A., Bordin, A. L., Crezcynski-Pasa, T. B., & Boveris, A. (2004). Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Molecular aspects of medicine*, 25(1-2), 199-210.

Xu, W., Chen, D., Yan, G., Xiao, S., Huang, T., Zhang, Z., & Huang, L. (2019). Rediscover and refine QTLs for pig scrotal

hernia by increasing a specially designed F3 population and using whole-genome sequence imputation technology. *Frontiers in Genetics*, *10*, 890.

Zhang, S., Wang, Q., Li, Z., & Guo, Q. (2023). Testicular ischemia associated with IgA vasculitis in a child: a case report and literature review. *Frontiers in Pediatrics*, *11*, 1219878.

## BÖLÜM VI

### **In Vitro Embryo Production with Ovum Pick-Up (OPU) in Cattle and Factors Affecting Success**

**Sakine Ülküm ÇİZMECİ<sup>1</sup>  
Ayşe Merve KÖSE<sup>2</sup>**

#### **Introduction**

Biotechnology has been used in the livestock sector for many years and new techniques are being developed day by day in order to increase high-yielding fertility, expand genotypes and obtain high-yielding offspring (Yan et al., 2015). Artificial insemination, superovulation, in vitro embryo production, embryo transfer, genomic selection, transgenic animal production, cloning, etc. are the main assisted reproductive techniques (ART). In today's modern livestock sector, in vivo and in vitro embryo production are two very

---

<sup>1</sup> Associate Professor, Selcuk University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology

<sup>2</sup> Associate Professor, Hatay Mustafa Kemal University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology



important techniques in ART and are used to reproduce a gene source with superior genetic characteristics in a short time (Viana, 2020).

The increase in embryo production and transfer in the world continues to accelerate. The rate of increase in the number of embryos produced in vitro is higher than the number of embryos produced in vivo. IVEP accounted for 76.15% (1,521,018) of all embryo production (1,997,392) in cattle breeding in 2021. Of these embryos, 98.56% (1,499,136) were produced from oocytes collected by OPU and 1.44% (21,882) were produced from oocytes obtained from slaughterhouses. In the same year, 78.96% of the embryos transferred (1,479,814) were produced in vitro. The number of embryos produced in vitro increases by at least 12% each year (Ferre et al., 2019). It is also reported that in 2021, 5,494,918 oocytes were collected from 297,998 donors and 1449,136 transferable embryos were produced, of which 677,348 embryos were transferred fresh and 481,191 were transferred frozen (Viana, 2022).

### **Ovum pick up (OPU)**

OPU is the process of collecting immature oocytes from follicles in the ovaries of donors of any age and period with genetically superior characteristics and transferring them to in vitro embryo production under laboratory conditions (Viana, 2022). OPU is a reproducible non-invasive method. It has been developed to produce a large number of offspring with superior genetic characteristics and to shorten the production interval. OPU and in vitro embryo production is a technological method that allows the reproduction of a highly productive gene source in a shorter time and with less risk. In vitro embryo production is used to shorten the generation interval, increase selection intensity, and disseminate genetic material (Choudhary et al., 2016).

OPU involves puncture and aspiration of follicles by laparoscopic and transcuteaneous methods to collect oocytes from a living donor (Hansen, 2014). However, due to the difficulty of application and side effects such as adhesion, it was thought that it

should be applied in a different way and the transvaginal technique was developed by modifying the probe and technique used in OPU application in women in human medicine (Meiyu et al., 2013).

OPU, which can be repeated at short intervals, can be applied in healthy heifers and cows as well as prepubertal calves (2 weeks-6 months), pregnant donors up to day 100-120, donors who do not respond to superovulation, and clinically sick animals (Choudhary et al., 2016). In addition, the stress and side effects on the animal are very low (Purohit et al., 2003, Boni, 2012, Choudhary et al., 2016). In addition to these advantages, a donor can undergo OPU twice a week and thus more transferable embryos can be obtained from one donor monthly (Blondin, 2015). With the superovulation and embryo transfer method, 10 times the number of offspring that can be obtained from a donor during normal life can be reached, and 30-40 times with OPU and in vitro embryo production (Meiyu et al., 2013). The amount of embryo production from oocytes collected with OPU varies according to age, season, FSH use and at least 1-3 transplantable embryos can be obtained in each application (Verma et al., 2012, Guerrero-Gallego et al., 2021).

OPU is a cost-effective method as it can be performed on a random day of the cycle and does not require the routine use of hormones. In addition, it does not alter or disrupt the normal reproductive cycle of the donor and can be successfully applied in any period regardless of the reproductive status of the donors (pregnant, acyclic, animals with infection in genital organs or ducts) (Purohit et al., 2003, Boni, 2012, Choudhary et al., 2016). In addition, oocytes collected from different donors can be fertilized with one straw of semen. With this method, oocytes collected from one mother can be fertilized with semen from different bulls and can be used in advanced biotechnological methods and molecular studies (Machado et al., 2006, van Wagendonk, 2006, Abd El-Aziz et al., 2016).

Experience and skill are very important for collecting oocytes in OPU practice. In addition, experience and experience are

needed for the evaluation of the collected oocytes and the execution of in vitro embryo production stages (Kimble, 2020). The technique to be used in embryo production stages should be well known, consumables and machinery and equipment should be carefully selected, appropriate laboratory conditions should be provided and carried out with care (Galli et al., 2001).

The main disadvantage of OPU and in vitro embryo production is the lower embryo and pregnancy rates achieved per donor compared to in vivo embryo production (Stewart et al., 2011, Ferraz et al., 2016). This is due to the lower viability and implantation rates of embryos produced in vitro (Ferraz et al., 2016). Superovulation protocols require a waiting period of 45-60 days between two treatments. During this period, OPU can be performed 12 times (when applied twice a week) and embryos can be produced much more than the number of embryos produced in vivo (Stewart et al., 2011, Ferraz et al., 2016).

### **OPU Technique**

OPU requires an ultrasound with a vaginal probe, a tube to collect the follicular fluid and the oocyte, and a needle connected to a vacuum pump. If a high-resolution ultrasound is used, even follicles under 2-3 mm in diameter can be easily visualized and collected. The main advantage of the transvaginal procedure is that the ovary can be manipulated with the hand in the rectum, which allows the follicles in the ovary to be moved to the position where the ultrasound probe and needle are located and thus the optimal position for puncture can be set. The probe and puncture needle are usually guided by a single operator to ensure correct manipulation of the needle during the approach of the probe and ovaries. The puncture needle attached to the side of the probe, when advanced to aspirate a follicle, only enters the ultrasonographic field and can be displayed on the screen. To facilitate visualization, it is useful to have a guide on the ultrasound screen showing the route of the needle entry. The puncture needle is connected to the aspirator by a silicone or preferably Teflon tube to allow the follicular fluid to be aspirated.

Follicular fluid and oocytes are collected through this tube into tubes that are suitable for the aspirator and can be kept at temperature. An afferent tube is used to collect follicular fluid and an efferent tube is connected to a plug to maintain the aspirator pressure (Bols and Stout, 2018).

Although not mandatory, donors may be sedated before OPU. For rectal examination, feces are emptied, and epidural anesthesia is administered using 2% lidocaine to prevent straining during transrectal manipulation. After the tail is fixed to one side, the vulva and perineal area are thoroughly cleaned. The OPU probe is manipulated with one hand and placed craniodorsally on the ovarian side of the cervix to be punctured. With the other hand, the operator fixes the ovary rectally and guides the probe. Thus, the ovary and follicles can be seen on the ultrasound screen. The follicles on the ovary are counted and noted. The operator slowly advances the needle until the vaginal wall is punctured and the needle is visible on the ultrasound screen and guides the needle into the follicle. Once the needle enters the follicle, the aspiration pump is activated using the foot pedal and the follicular fluid and COCs are collected in the tube containing the oocyte collection medium. After all follicles are collected, the follicular fluid in the tube is sent to the laboratory (Nanda et al., 2021).

### **In Vitro Embryo Production**

Assisted reproductive technologies (ART) are used to overcome infertility in many species, including humans. In farm animals, oocytes can be harvested from females of high genetic value through OPU or postmortem. Techniques such as IVEP, embryo transfer and cryopreservation can increase the rate of genetic gain and protect endangered species. IVEP results in in vitro nuclear maturation in approximately 80-90% of immature bovine oocytes and fertilization in approximately 80%. Between 25-40% of these oocytes reach the blastocyst stage. Approximately 40-50% of transferred embryos result in pregnancy, but 5-10% of these are lost before birth.

There are morphologic and molecular differences between embryos produced in vivo and those produced by IVEP. These differences are due to many factors such as race, oocyte quality, follicular fluid content, IVEP procedure, etc. Embryos produced in vitro may have excess dark areas in their cytoplasm, non-compact cell mass, early formation of the blastocyst cavity, disruption in the ratio of inner cell mass to trophoblast cells, myxoploidy, gene expression and cell metabolism (Wrenzycki, 2018).

### **Oocyte Source and Preparation**

In in vitro embryo production, oocytes are collected either from live animals by OPU or from postmortem ovaries by aspiration, follicle dissection, slicing or tissue thawing. Ovaries collected postmortem for embryo production from slaughterhouse material should be brought to the laboratory within 4 hours in a thermos containing physiological saline (0.9%), fetal calf serum (FCS) and antibiotic-containing transport medium between 25-35°C. Follicles with a diameter of 3-8 mm in ovaries are aspirated manually with a syringe using 18-20 G needles. The collected follicle fluids should be kept at 37°C until analyzed (Wrenzycki, 2018). If the oocyte to be used in in vitro embryo production will be collected by OPU method, it should be collected and delivered to the laboratory as specified in the OPU section. The oocyte complexes (COC) can be directly examined from the collected follicle fluids, or they can be screened by filtering with filters with a pore width of 70 µm and produced for this purpose and washing with OPU or holding mediums (Çizmeçi, 2022).

All materials required for IVEP procedures (filters, petri dishes, pipettes, and media) should be pre-warmed at 37°C. Maturation, fertilization and culture media should be prepared overnight in mineral oil (minimum 4 hours without mineral oil) and equilibrated in the incubator. HEPES-containing media, such as washing and holding, should not be gassed but heated on a heating tray at 37°C. IVEP procedures can be carried out by coating 100-200 µl drops of mineral oil on 35 mm petri dishes or by using so-called

well plates (4-well, 5-well). It is important to note that all materials to be used must be tested and approved (embryo tested) (Çizmecı, 2022).

Oocyte complexes collected and examined under stereo microscope and COC should be transferred to washing or holding medium and classified according to their structure (I, II, III and IV quality COC). I and II quality oocytes should be taken to the maturation stage (Fair et al., 1995).

### **In Vitro Maturation**

In all mammals, oogenesis begins in the early fetal period and can be divided into two stages: prenatal and postnatal maturation. In the prenatal maturation stage, it undergoes a series of mitotic divisions and waits in the prophase I stage of the first meiosis (primary oocyte). At puberty, primordial follicles develop under the influence of gonadotropins and reach primary, secondary, tertiary and antral follicle stages. The primary oocyte matures through meiosis, which involves two consecutive mitoses. In the first division, which occurs a few hours before ovulation, the secondary oocyte and the first polar body are formed. During the second mitosis, the oocyte reaches the metaphase stage. This stage is completed by fertilization and the second polar body is expelled. In this way, the oocyte containing haploid chromosomes ( $n$ ) is formed from the secondary oocyte containing diploid chromosomes ( $2n$ ). Due to the high lipid content in the cytoplasm of bovine oocytes, nuclear maturation is very difficult to follow. At the end of the maturation period, the maturity of the oocyte can be determined by the expansion of the zona cells formed by hyaluronic acid secreted from the extracellular matrix of the COC, which causes an increase in the intracellular space, or by seeing the first polar body (Wrenzycki, 2018).

The mediums to be used in the maturation stage can be TCM-199, Ham's F-10, Menezo-B2, Ham's F-12 etc. or undefined commercial mediums. Hormones, amino acids, vitamins and antioxidants etc. can be added to increase maturation success. In

environments where CO<sub>2</sub> incubators are not available, maturation media containing HEPES can be used. Oocytes to be taken to the in vitro maturation stage should be transferred to the equilibrated maturation medium at the rate of one oocyte per 5-10 µl and left to maturation for 22-24 hours in an in air (21% O<sub>2</sub>) incubator with high humidity at 38.5-39°C and 5-5.5% CO<sub>2</sub> (Camargo et al., 2006).

Maturation success is affected by factors such as donor age, physiological status, cycle period, follicle and oocyte size, structure and quality of COC, maturation time and gas composition temperature and humidity of the incubator, ambient temperature and light exposure, composition, pH and osmotic pressure of the maturation medium, oocyte collection method and aspiration pressure (Wrenzycki, 2018).

The competence of the oocyte for embryo development (continued meiosis, maturation, fertilization and embryo development) is acquired gradually as follicle diameter and oocyte size increase. It is known that oocytes that mature in vivo have higher developmental competence and blastocyst rates than oocytes that mature in vitro (Duranton and Renard, 2001). Although significant advances have been made to improve IVM success, in vitro maturation success has still not caught up with in vivo maturation. There are some reasons for the lower in vitro maturation rates and oocyte quality. One of the important reasons may be oxidative stress (OS). The production of prooxidants such as reactive oxygen species (ROS) is an important phenomenon in in vitro production (Khazaei and Aghaz, 2017).

### **In Vitro Fertilization**

For sperm to cross the zona pellucida and fertilize the oocyte, it must pass through a series of physiological stages called capacitation. Capacitation has three important functions: to increase the motility of spermatozoa, to allow spermatozoa to penetrate the cumulus oophorus and to prepare spermatozoa for the acrosome reaction. In IVF applications, the capacitation process is performed

in the laboratory with techniques using different swim-up, percoll gradient and nondefined mediums (Wrenzycki, 2018).

IVF is the process of keeping the mature oocyte and capacitated fertilization together under appropriate conditions and in appropriate mediums. The thawed and motile semen must be reconstituted so that the fertilization medium is  $1 \times 10^6$  sperm/ml (Hunter, 1996). The fertilization stage takes 18-22 hours in an incubator (Parrish, 2014).

Although sperm is essential for successful fertilization and embryo development, many of the cellular and molecular mechanisms required for fertilization and early embryo development are inherent in the oocyte. Therefore, inadequate oocyte growth and maturation negatively affects fertilization and subsequent embryo development. Fertilization success is affected by sperm selection, suitability of thawing and capacitation processes (Camargo et al., 2006). The semen of a bull whose fertilization rate is very high in vivo may not achieve the same success in in vitro conditions. In in vivo fertilization, spermatozoa that can reach the oocyte are motile spermatozoa with the best fertilization ability. However, considering the number of spermatozoon per oocyte in the in vitro environment and the volume of the area where oocytes and spermatozoon encounter, the first spermatozoon that encounters the oocyte may not always be the best. Another thing to consider is the genetic information that spermatozoa transfer to the embryo. Genetic code from spermatozoa can reduce embryo quality and affect IVEP success (Gordon, 1994).

### **In Vitro Culture**

In vitro embryo culture of bovine embryos is the last step in embryo production and takes approximately 6-7 days after the zygote is formed. Several important developmental events occur in the embryo, including cleavage, activation of the embryonic genome, compaction of the morula, and formation of the blastocyst (Wrenzycki, 2018).



Cultural mediums are divided into three groups: undefined, semidefined and fully defined. In culture systems, also known as defined media, culture media are prepared under laboratory conditions. It should be used by making pH and osmotic pressure adjustments. These mediums are more likely to contain toxic substances, cause contamination and oxidative stress. Examples of defined media are SOF (Synthetic Oviduct fluid), KSOM (K modified simplex optimized medium), CR1aa and CR2aa (Charles Ronsenkran medium + amino acids) (Camargo et al., 2006, Wrenzycki, 2018). Semi-defined mediums are mediums that have been improved by adding albumin instead of serum due to doubts about the harmful effects of serum on embryonic and fetal development. Albumin is one of the most common proteins of the mammalian reproductive system. Bovine serum albumin (BSA) added to the culture medium increases blastocyst development rates. Undefined mediums are commercially available mediums whose contents are not fully known, and serum is one of the main components. They may contain many factors that stimulate embryo development, such as amino acids, vitamins, growth factors and energetic substrates. Undefined media are balanced in terms of pH and osmotic pressure and do not require any additions (Camargo et al., 2006).

## **Factors Affecting OPU and In Vitro Embryo Success**

### **Factors Affecting OPU Results**

#### **Technical Factors**

Oocyte recovery rate (RR) is determined by the number of COCs per 100 aspirated follicles. It is reported that RR values vary between 7-70% in different OPU studies. Factors such as needle diameter, aspiration pressure, and operator experience are the biggest reasons why a standard has not been achieved in RR over the years. It is reported that technical factors are mostly related to vacuum pressure and needle diameter. The most problematic point in the OPU system; In other words, the weakest link is the needle. Because a sharp needle tip is a prerequisite for a successful OPU.

While previously 50-60 cm long sterilizable needles were used, in recent years alternative OPU systems using disposable 18 G epidural needles or cheaper hypodermic injection needles have been developed. Other advantages of these needles are that they are of different diameters and lengths, sterile and interchangeable (Galli et al., 2001, van Wagtendonk-de Leeuw, 2006, Boni, 2012).

Aspiration pressure: The aspiration device is affected by many factors such as the length and diameter of the tube used, the size and type of the tube and the needle diameter (Ward et al., 2000). Aspiration pressure should be expressed in terms of the amount of fluid that can be aspirated per minute (in ml) rather than mmHg applied from the vacuum pump. It has been reported that a small change in needle diameter while the aspiration pressure is constant can triple the aspiration amount (Wrenzczyki, 2018). Considering the importance of intact cumulus cells for oocyte maturation and developmental capacity, the damage caused by the aspiration procedure should be evaluated within the specific system and preventive measures should be taken. Another important factor that determines the OPU result is the experience of the operator or team applying the OPU. Another technical factor is the probe and image quality of the ultrasound device used. Success rates are increasing thanks to advances in ultrasound technology (Boni, 2012).

## **Biological Factors**

### **a. Follicle Aspiration Frequency**

With the follicle aspiration process, an average of four or eight oocytes can be obtained from donor animals per OPU session. The OPU session applied twice a week can be applied for a long time without harmful effects on the reproduction and fertility of the donor animal. OPU application twice a week allows the production of more embryos per session from the donor animal. OPU can also be used for follicle ablation to initiate the follicular wave. The presence of the dominant follicle reduces the in vitro developmental competence of other subordinate follicles. Therefore, the dominant follicle is aspirated 48 hours before OPU application. When the developing

dominant follicle is aspirated twice a week, it stimulates a new follicular wave and thus encourages smaller follicles to grow (van Wagtendonk-de Leeuw, 2006).

### **b. Race and Age of The Donor**

European breeds have larger follicles than Zebu or crossbred cattle, but this has no effect on the proportion of oocytes collected. With a single OPU session without applying hormonal stimulation, 50-60 oocytes can be collected from an average Nelore (*Bas indicus*) donor and approximately 30 embryos can be produced from them. However, in Belgian Blue donors, these numbers appear to be an average of 3 oocytes and 0.5 embryos. The number of oocytes collected in Holsteins at different ages (cows, pre-pubertal, post-pubertal and pregnant) is reported as: in pregnant, post-pubertal, pre-pubertal and cows. After IVF, the number of embryos per OPU is in cows, post-pubertal heifers, pre-pubertal animals and pregnant women (Nanda et al., 2021).

### **c. Stimulation**

Long-term and repeated OPU use of a single donor without any hormonal stimulation is possible. The increase in the number of follicles, oocytes, and embryos produced with stimulation is generally inconsistent and varies depending on the period of the cycle at which treatment is initiated. In unstimulated donors, by applying OPU twice a week and FSH, more quality COC is collected, and more transferable embryos are obtained than by applying OPU every two weeks. Administration of estrogen and progesterone or removal of the dominant follicle equally affects the synchronization of follicular wave formation for the OPU. Synchronization and superovulation before OPU increase the number and quality of COCs and therefore the number of blastocysts in the *Bas taurus* breed, but it does not have such an effect in the *Bas indicus* breed (Boni, 2012, van Wagtendonk-de Leeuw, 2006, Nanda et al., 2021).

#### **d. Repeated OPU Application**

OPU application is most efficiently applied twice a week, and by regulating the cycle in this way, a new follicular wave can start after each application. Additionally, when follicles are aspirated, some follicular cells may luteinize and produce progesterone. Repeated application does not have a negative effect on the number and quality of oocytes collected (Merton et al., 2003). After repeated OPU applications for a long time, there is a possibility of various physical damages such as bleeding, infiltration of immune cells and fibrosis in the ovaries. Due to the thickening and hardening of the connective tissue around the ovaries, the ovaries may also stick to the surrounding tissues and organs. These effects may not impair the functionality of the ovaries, but the extent of damage is related to the number and continuity of OPU application (van Wagtenonk-de Leeuw, 2006). Adhesions increased connective tissue and thickening in the ovaries generally do not affect the number of collected oocytes, their quality and embryo development rates. However, it should not be ignored that in intensively applied OPU programs, disadvantages such as general health problems in donors, decreased effectiveness of the anesthetic agent as a result of repeated epidural anesthesia, infection or inflammation in the injection area, deterioration of the integrity of the ovarian stroma, and adhesion of the ovary to surrounding tissues and organs may occur (Boni et al., 1997, Petyim et al., 2001).

#### **Factors Affecting in Vitro Embryo Development**

##### **a. Follicle Diameter and Condition**

Follicles in the ovaries are classified as primordial, primary, secondary and tertiary (antral) follicles. As the follicle develops, the diameter of the follicle and the number of granulosa cell layers also increase. The zona pellucida of oocytes begins to form in the secondary follicle stage and completes its development in the antral follicle stage. The most important factor determining oocyte sufficiency is follicle diameter. In order for an oocyte to have developmental competence, the follicle must be over 3 mm. Embryo

production rates are higher in oocytes collected from follicles between 6-10 mm. The reasons for this are the presence of higher electrolytes, glucose, reactive oxygen species, glutathione, superoxide dismutase activity, lipids, cholesterol, pyruvate and estradiol in the follicle fluid (Armstrong et al., 1994, Nanda et al., 2021).

Follicles with the same diameter on the ovary may be present in various periods of the estrous cycle and may be undergoing growth or atresia. The low developmental competence of oocytes coming from small follicles may be due to the fact that they have not reached full meiotic and/or cytoplasmic competence or that they are collected from follicles that have suffered atresia. Additionally, embryo production rates from oocytes from follicles in the advanced stage of atresia are much lower than from oocytes from follicles in the early stage of atresia (Camargo et al., 2006).

#### **b. Morphology of Cumulus-Oocyte Complexes Oocyte Diameter**

*Factors affecting the quality of COC are divided into internal and external factors.*

Internal Factors: Race, age, reproductive status, metabolic and nutritional status, hormone! profile and period of the estrous cycle, External factors: Aspiration pressure, needle diameter, ambient temperature, light, experience of the laboratory team, suitability of laboratory equipment. COC are classified according to cytoplasmic characteristics such as the number and appearance of cumulus layers and the texture or brightness of the cytoplasm of the oocyte. Quality I oocytes; It has 2-5 compact cell layers and homogeneous cytoplasm. II. quality oocyte/er; It has few inhomogeneous areas in the cytoplasm and 3-5 layers of compact cells, or 2-5 layers of compact cells and dense inhomogeneous areas. III. quality oocytes; It has several cell layers (>3) and a small amount of inhomogeneous area in the cytoplasm or regional loss of cumulus and a small amount of homogeneous area. IV quality oocytes; The

cumulus layer has completely disappeared, small, granular, non-homogeneous cytoplasm (Petyim et al., 2001).

During the growth phase, the diameter of the oocyte increases to over 120  $\mu\text{m}$ . Oocytes with a diameter of less than 10  $\mu\text{m}$  are still in the growth phase and may be less capable of development after fertilization. For an oocyte to gain developmental competence, it must reach a diameter of 110  $\mu\text{m}$ , which corresponds to oocytes collected from follicles with a diameter of 3 mm. The oocyte is the gamete that contributes not only half of the genetic material but also the entire cytoplasm in the zygote, providing transcripts and proteins essential for early embryonic development. This cytoplasmic environment provides the necessary conditions for the embryonic genome to be activated and the embryo to continue its development (Wrenzycki, 2018).

### **c. Environment**

The negative effects of heat stress on reproduction in the short term include problems such as the small diameter of the dominant follicle in the first and second follicular wave, the dominance not being fully formed, and the increase in the number of large-diameter follicles. Oocytes are very sensitive to the negative effects of heat stress throughout the developmental stage. Bovine oocytes are negatively affected by high environmental temperatures during the germinal vesicle and maturation stages. Sensitivity to heat stress also occurs in the early embryonic period, but the sensitivity phase is short-lived. It has been reported that oocytes collected in the summer months have lower fertilization and blastocyst rates than oocytes collected in the winter months. It is reported that at least 2-3 cycles must pass in order to collect oocytes that are capable of development at a level that can form a good embryo in animals subjected to heat stress. It has been reported that housing donors in a cold environment for 42 days after heat stress is not sufficient to improve IVEP success, which provides evidence of the long-term effect of temperature on oocyte competence (Çizmeçi et al., 2022).

## References

Abd El-Aziz ,A.H., Usama, E., Mahrous, U.E., Sherief Z., Kamel S.Z. & Sabek A.A. (2016). Factors Influencing in vitro Production of Bovine Embryos: A Review, *Asian J Anim Vet Adv*, 11(12), 737-56.

Armstrong, D.T., Irvine, B.J., Earl, C.R., McLean, D. & Seamark, R.F. (1994). Gonadotrophin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. *Theriogenology*, 42, 1227-1 236.

Blondin, P. (2015). Status of embryo production in the World, *Anim Reprod*, 12(3), 356-8.

Bols, P.E.J. & Stout, T.A.E. (2018). Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval (OPU: ovum pick-up) in cows and mares. *Animal Biotechnology 1 Reproductive Biotechnologies*. ed: Niemann, H., Wrenzycki, C., Cham: Springer International Publishing, 209–33.

Boni, R., (2012). Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis, *Anim Reprod*, 9(3), 362-9.

Boni, R., Roelofsen, M.W.M., Pieterse, M.C., Kogut J. & Kruip, A. M. (1997) Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology* ,48, 277±289.

Camargo, L.S.A., Viana, J.H.M., Sa, W.F., Ferreira, A.M., Ramos, A.A. & Vale Filho, V.R. (2006). Factors influencing in vitro embryo production. *Anim Reprod*, 3 (1), 19-28.

Choudhary, K.K., Kavya, K.M., Jerome, A. & Sharma, R.K. (2016). Advances in reproductive biotechnologies, *Veterinary World*, 9(4), 388-95.

Çizmecı, S.Ü. (2022). Ovum Pick Up (OPU) ve İn vitro Embriyo Üretimi (IVEP), Türk Veteriner Jinokoloji Derneği IX. Ulusal & III. Uluslararası Kongresi, 79-86.

Çizmeçi, S.Ü., Dinç, D.A., Yeşilkaya, Ö.F., Çiftçi, M.F., Takcı, A. & Bucak, M.N. (2022). Effects of Heat-Stress on Oocyte Number and Quality and In Vitro Embryo Production in Holstein Heifers. *Acta Sci Vet*, 50(1870), 1-7.

Duranthon, V. & Renard, J.P. (2001). The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology*, 55(6), 1277–1289

Fair, T., Hyttel, P. & Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity, *Mol Reprod Dev*, 42, 437–42.

Ferraz, P.A., Burnley, C., Karanja, J., Viera-Neto, A., Santos, J.E., Chebel, R.C. & Galvão, K.N. (2016). Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States, *Theriogenology*, 86(7), 1834-1.

Ferre, L.B., Kjelland, M.E., Strøbech, L.B., Hyttel, P., Mermillod, P. & Ross, P.J. (2019). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods, *Animal*, 14(5), 991-1004.

Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R. & Lazzari G. (2001). Embryo production by ovum pick up from live donors, *Theriogenology*, 55(6), 1341-57.

Gordan, I. (1994). *Laboratory Production of Cattle Embryo*, CAB International, Wallingford, UK, Pp: 25-42.

Guerrero-Gallego, H.Z., Calderon-Leyva, G., Angel-Garcia, O., Guillen-Muñoz, J.M., Leyva, C., Mellado, M., Pedroso, R., Pessoa, L.G., Esparza, C. & Morales, J.L. (2021). Effect of Season on Quantity and Competence of Oocytes Recovered Transvaginally from Holstein Cows for In vitro Fertilization. *Indian Journal of Animal Research*, 1423 (1-4), Doi:10.18805/IJAR.BF-1423.

Hansen, P.J. (2014). Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals, *Current and Future*



Reproductive Technologies and World Food Production, ed: Lamb G.C., DiLorenzo N., Vol: 752, Springer, New York, Pp: 1-22.

Hunter, R.H.F. (1996). Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilisation to avoid polyspermy. *Mol Reprod Dev*, 44(3), 417–422

Kimble, L. (2020). Reproductive strategies for dairy herd improvement – MOET or OPU-IVF? Select Sir Inc. <https://www.progressivedairy.com/topics/a-i-breeding/reproductive-strategies-for-dairy-herd-improvement-moet-or-opu-ivf>

MACHADO, S.A., Reichenbach, H.D., Weppert, M., Wolf, E. & Gonçalves P.B. (2006). The variability of ovum pick-up response and in vitro embryo production from monozygotic twin cows, *Theriogenology*, 65(3), 573-83.

Meiyu, Q., Yuchang, Y., Hong, M., Jiabo, W., Xiaochuan, Z., Li, L., Xiaodong, T., Lili, Z., Shengli, Z. & Fang, S. (2013). Transvaginal Ultrasound-guided Ovum Pick-up (OPU) in Cattle, *J Biomim Biomater Tissue Eng*, 18(2), 1-3.

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), 651-74.

Nanda, R., Anjali, Senthamilian, S., Doneriya, G., Punetha, M., Singh, G. & Chouhan, V.S. (2021). Ovum Pick-Up in Ruminants. *Animal Reproduction Update*, 1(1), 46-50.

Parrish, J.J. (2014). Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>

Petyim, S., Båge, R., Forsberg, M., Rodríguez-Martínez, H. & Larsson, B., (2001). Effects of repeated follicular punctures on

ovarian morphology and endocrine parameters in dairy heifers, *J Vet Med*, 48, 449-63.

Purohit, G.N., Duggal, G.P., Dadarwal, D., Kumar, D., Yadav, R.C. & Vyas, S. (2003). Reproductive biotechnologies for improvement of buffalo: The current status, *Asian Aust J Anim Sci*, 16(7), 1071-86.

Stewart, B.M., Block, J., Morelli, P., Navarette, A.E., Amstalden, M., Bonilla, L., Hansen, P.J. & Bilby, T.R. (2011). Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen, *J Dairy Sci*, 94(7), 3437-45.

Van Wagtenonk, V. & de Leeuw, A.M. (2006). Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: A 2005 status, *Theriogenology*, 65(5), 914-25.

Verma, O.P., Kumar, R., Kumar, A. & Chand, S. (2012). Assisted reproductive techniques in farm animal - From artificial insemination to nanobiotechnology, *Vet World*, 5(5), 301-10.

Viana, J. (2020). Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals divergent trends for IVD and IVP embryos, *Embryo Technol Newsl*, 38(4), 1-15.

Viana, J. (2022). 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals, *Embryo Technol Newsl*, 40, 1-4.

Ward, F.A., Lonergan, P., Enright, B.P. & Boland, M.P. (2000). Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology, *Theriogenology*, 54, 433-46.

Wrenzycki, C. (2018). In vitro production of (farm) Animal Embryos. *Animal Biotechnology 1 Reproductive Biotechnologies*. ed:Niemann, H., Wrenzycki, C., Cham, Switzerland:Springers, pp:209-235.

Yan, L., Li, H. & Shi, Z. (2015). Immunization against inhibin improves in vivo and in vitro embryo production, *Anim Reprod Sci*, 163, 1–9.