



## Evaluation of Some Sperm Parameters with Contaminated *Escherichia coli* of Bull Semen

Akın GÜLYÜZ<sup>1</sup> Barış Atalay USLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Van, Turkey

<sup>2</sup> Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Sivas, Turkey

Received: 21.01.2016

Accepted: 22.04.2016

### SUMMARY

One of the common reasons disrupting spermatogenesis is infections directly affecting testes. *Escherichia coli* is the most abundant bacteria found in bovine faeces. This study was performed in order to evaluate changes in motility, dead-alive spermatozoa ratio and fertility in commercially used semen in the veterinary field which are contaminated by *E. coli*. For this purpose, 40 straws of bull semen were thawed in 37 °C and separated into 4 groups. Each group had 10 straws of thawed semen. Placebo, 10.00 *E. coli* /ml, 100.00 *E. coli*/ml and 1.000.000 *E. coli* /ml were added to 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> group, respectively. The initial motility was determined as 80%. Later, motility examination was performed in the first 2 hour with 10 minutes intervals and after the next 1 hour with 15 minutes intervals and finally in every hour. While dead-alive ratio was determined as 8-10% initially, all of the data were recorded in order to support motility from the outset of the study every hour. In group II, the motility was abolished faster than all test groups. The highest increase determined in dead spermatozoon rate is also group II. As a result, the importance of antimicrobial agents used against bacterial contamination and in semen production stages become prominent. Moreover, practitioners should show maximum attention towards asepsis while performing artificial insemination.

**Key Words:** Semen, *E. coli*, Contamination, Motility, Fertility

### ÖZET

## *Escherichia coli* ile Kontamine Edilen Boğa Spermalarında Bazı Spermatolojik Parametrelerinin Değerlendirilmesi\*

Spermatogenezisi etkileyen en önemli nedenlerden birisi, testisleri direkt etkileyen enfeksiyonlardır. Bu çalışma, sığır dışkıсында en fazla bulunan bakteri olan *Escherichia coli*'nin; ticari olarak satılan ve rutinde Veteriner Hekimler'in suni tohumlamada kullandıkları spermaların, motilite ve ölü-canlı spermatozoon oranı, dolayısı ile fertilitenin, kontaminasyon sonucunu nasıl etkilediğinin ortaya konulmasını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla 40 payet boğa sperması 37 °C'de çözdürülerek 4 gruba ayrılmıştır. Her bir gruba 10 payet olacak şekilde çözdürülen spermaların üzerine 1. Grupta placebo, 2. Grupta 1 ml'de 10.000 *E. coli*, 3. Grupta 1 ml'de 100.000 *E. coli* ve 4. Grupta 1 ml'de 1.000.000 *E. coli* olacak şekilde bakteriler eklenmiştir. Başlangıç motilitesi %80 olarak belirlenmiş, daha sonra motilite muayenesi ilk 2 saat içerisinde 10'ar dakika aralıklarla, sonraki 1 saatte 15 dakika aralıklarla ve sonrasında her saat başı yapılmıştır. Ölü-canlı oranı başlangıçta %8-10 olarak belirlenirken, motiliteyi desteklemek için çalışma başından itibaren her saat başı yapılarak tüm veriler kaydedilmiştir. Deneme grupları içerisinde motilite en çabuk Grup II'de sonlanmıştır. Ölü spermatozoon oranındaki en hızlı artış da Grup II'de gerçekleşmiştir. Sonuç olarak bakteriyel kontaminasyonun ve sperma üretim aşamalarında katılan antimikrobiyel maddelerin önemi bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Dahası suni tohumlama uygulayıcılarının asepsiye azami dikkat etmelerinin gerekliliği de ortaya çıkmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Sperma, *E. coli*, Kontaminasyon, Motilite, Fertilitite

### GİRİŞ

Spermatogenezis üzerine olumsuz etki yapan birçok iç ve dış etkenin spermatozoon motilitesini ve yaşama kabiliyetini etkilediği bilinmektedir. Hatta bazı etkenler; spermatogenezis bittikten sonra da spermatozoonların

erkek ya da dişi genital kanalında taşınması sırasında etkili olabilmektedir. Spermatogenezisi etkileyen en önemli nedenlerden biri testisleri direkt etkileyen enfeksiyonlardır (Hales ve ark. 1999; Diemer ve ark. 2000a). Bu enfeksiyonlar, spermatogenezisin devamlılığını etkileyebileceği gibi oluşan spermatozoonların defektli

olmasına da sebep olabilmektedir. İnsanlarda, erkek infertilitesinin %15'inde genital sistem enfeksiyonlarının sorumlu olduğu ileri sürülmesine rağmen, klinik bulgu oluşmayan genital sistem enfeksiyonlarının etkisi hakkında fikir birliği bulunmamaktadır (Diemer ve Desjardins 1999; Weidner ve ark. 1999). Spermatozoonların çeşitli bakteriler veya immün sistem hücreleri ile direkt teması sonucunda olumsuz etkilenmesi bir olasılık olarak ileri sürülmektedir (Huwe ve ark. 1998). Genital ve üriner sistem enfeksiyonlarında rol alan mikroorganizmalar, seminal plazmada biyolojik ve kimyasal değişikliklere yol açarak spermatozoonun işlevi üzerine etkili olabilmektedir (Aydın ve ark. 1997; Weidner ve ark. 1999; Diemer ve ark. 2000a). Genital ve üriner sistem enfeksiyonlarında, sitokin ve serbest oksijen radikallerinin spermatozoon fonksiyonlarına etkili olduğu da bildirilmektedir (Depuydt ve ark. 1998; Trum ve ark. 1998).

Ürogenital sistemde infertiliteye sebep olan enfeksiyöz etkenlerin direkt ve indirekt etkilerinin olup olmadığı tartışma konusudur. Bu konuda yapılan çalışmalarda, infertil insanlardan alınan spermalarda, eklenti üreme bezlerinin enfeksiyonuna bağlı olarak yüksek oranda bakteri saptanmasına rağmen, izole edilen bakterilerin hangisinin gerçekten infertilitede etkili olduğu hakkında çok az araştırma bulunmaktadır. Spermatozoonların bakteriler veya toksinleri ile etkileşime girmelerinin yanı sıra seminal plazmadaki savunma hücreleri olan lökositlerin ve bakterilerin, ciddi bir sorun oluşturmayacağı bildirilen araştırıcılar bulunmaktadır. Bu bakteri ve toksinlerinin *in vitro* fertilizasyon uygulamalarında oosit dejenerasyonuna yol açtığı da bir gerçektir (Henkel ve Schill 1998; Seidman ve ark. 1999). Bu bilgilerin aksine, bilinen bazı patojen mikroorganizmaların spermatozoonla direkt etkileşime girebildiği, hatta aglütinasyona veya morfolojik değişikliklere yol açtığı da bildirilmektedir (Huwe ve ark. 1998; Schiefer 1998). Ancak bütün çalışmalar bu görüşleri desteklemediği gibi, bu bulguların *in vivo* enfeksiyonlarda da görülüp görülmeyeceği şüphelidir (Kohn ve ark. 1998). Bazı araştırmacılar (Paulson ve Polakowski 1997) bakterilerin spermisit etki taşıdığı görüşünü savunurken, kimileri de (Makler ve ark. 1981) bakterilerin fertiliteye bir etkisinin olmadığını ileri sürmektedir.

Bu çalışmanın amacı, siğir dışkısında en çok bulunan bakteri olan *Escherichia (E.) coli*'nin ticari olarak satılan ve rutinde veteriner hekimlerin suni tohumlamada kullandıkları spermaların, motilite ve ölü-canlı spermatozoon oranının, buna bağlı olarak da fertilitenin, kontaminasyon sonucu nasıl etkilendiğinin ortaya konulmasıdır.

## MATERYAL ve METOT

Çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı Laboratuvarında ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalında çalışılmış, Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü (LHMAE)'nde üretilen TR47-1490529 kulak numaralı Pakoil isimli boğanın 0.25 ml'lik 40 payeti kullanılmıştır.

### *E. coli* Test Dilüsyonunun Belirlenmesi

Bu amaçla *E. coli* (ATCC 25922) derin dondurucudan alınarak oda sıcaklığında çözdürüldü. Saklama kültüründen 5 ml hacmindeki Brain Heart Infusion Broth'a (1.10498, Merck, KgaA, Darmstadt, Germany) pasajlanarak, 37 °C'de 18 saat inkübe edildi. Üreyen bakteri kültürünün steril fizyolojik tuzlu suda (FTS,

pH=7.2) 10 katlı sulandırılmaları yapılarak, her sulandırmadan 2 adet MacConkey Agar'a (1.05465, Merck, KgaA, Darmstadt, Germany) ekilip, 37 °C'de 18 saat inkübe edildi. Koloniler sayılarak, McFarland tüpleri de dikkate alınarak, sulandırmalardaki bakteri sayıları belirlendi (Arda 2011). Buzdolabında +4 °C'de bekletilen ve bakteri sayıları (cfu/ml) belirlenen sulandırmalar en kısa sürede sperma örneklerine katılarak denemeye geçildi.

### Grupların Oluşturulması

LHMAE'de dondurulmuş boğa spermaları saha konteyneri ile laboratuvara getirildi. Çalışmaya başlanmadan önce 5 adet payet su banyosunda 37 °C'de çözdürülerek başlangıç motilite (20x10<sup>6</sup> spermatozoon/payet %80 motilite, ml'de 500 IU penisilin, 500 mcg streptomisin) saptanmış ve payetler arasında büyük fark olup olmadığına bakılmıştır. Kullanılan bütün malzemelere önce sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Çalışma esnasında sıcaklıkları 37 °C'de olacak şekilde ayarlanmış, sonra yine önceden sıcaklığı 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde deney tüplerinde muhafaza edilmiştir.

Azot tankından çıkartılan payetler 37 °C'de 30 saniye çözdürüldükten sonra, mikrobiyoloji laboratuvarında üretilen *E. coli*'nin farklı konsantrasyonlarda eklenmesi ile muayenelere başlanmıştır. Başlangıç motilitesi %80 olarak belirlenmiştir. Motilite muayenesi ilk 2 saatte 10'ar dakika aralıklarla, sonraki 1 saatte 15 dakika aralıklarla ve sonrasında her saat başı yapılmıştır. Ölü-canlı oranı başlangıçta %8-10 olarak belirlenirken, motiliteyi desteklemek için çalışma başından itibaren her saat başı yapılarak tüm veriler kaydedilmiştir.

**1. Grupta; (Kontrol grubu)** Deney tüpü içerisine 37 °C'de çözdürülerek konulan 10 adet 0.25 ml'lik boğa sperması üzerine 1ml placebo (%0.9 NaCl pH:7.2) eklendi ve 37 °C'ye ayarlanan %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi. Toplamda 2.5 ml sperma, 1 ml placebo ve 8000 motil spermatozoon olacak şekilde başlandı.

**2. Grupta; (Bir ml'de 10.000 adet *E. coli* grubu)** aynı şekilde çözdürülen spermalar deney tüpüne boşaltılarak üzerine ml sinde 10.000 adet *E. coli* olacak şekilde ayarlanmış karışım eklendi ve 37 °C de %5 CO<sub>2</sub> olarak ayarlanan etüve konuldu. Burada da 8000 motil spermatozoon başına yaklaşık 1 adet *E. coli* düşecek şekilde başlandı.

**3. Grupta; (Bir ml'de 100.000 adet *E. coli* grubu)** 37 °C de su banyosunda çözdürülen ve deney tüpüne boşaltılan spermaların üzerine ml sinde 100.000 adet *E. coli* olacak şekilde ayarlanmış materyal katıldı, yine 37 °C de, %5 CO<sub>2</sub> olarak ayarlanan etüve kondu. Bu grupta 8000 motil spermatozoon başına yaklaşık 10 adet *E. coli* olacak şekilde planlandı.

**4. Grupta; (Bir ml'de 1.000.000 adet *E. coli* grubu)** çözdürülerek deney tüpüne boşaltılan spermaların üzerine ml sinde 1.000.000 adet *E. coli* olacak şekilde ayarlanmış karışım katıldı ve yine 37 °C de %5 CO<sub>2</sub> olarak ayarlanan etüve kondu. Son grupta da 8000 motil spermatozoon başına yaklaşık 100 adet *E. coli* olacak şekilde çalışma dizayn edildi.

### Spermatozoon Motilitesi

Motilite muayenesi Alaçam (1994)'ün bildirdiği gibi yapılmıştır.

### Ölü -Canlı Muayenesi

Ölü-canlı muayenesi Alaçam (1994)'ün bildirdiği gibi yapılmıştır.

## BULGULAR

Gerçekleştirilen çalışma sonunda motilite muayeneleri ile Grup I'de, (kontrol grubunda), 20. saate kadar motilitenin %50'lerde kaldığı, 25. saate kadar hareketli oldukları ve 26. saatte yapılan motilite muayenesinde hareketli spermatozoon kalmadığı görülmüştür. Ölü - canlı muayenesi ile 24. saatte oranın %50'ye çıktığı ve 29. saatte bu oranın %85'i bulunduğu saptandı (Şekil 1).

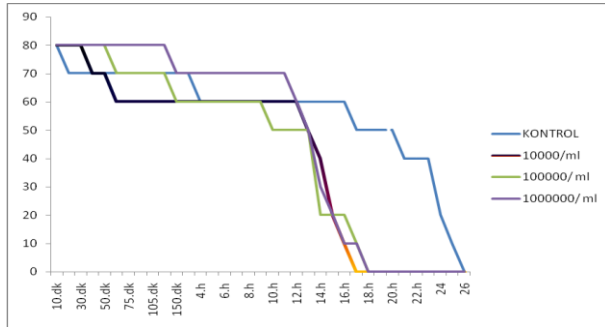
Grup II'de (10.000 adet/ml *E. coli* konulan grupta) motilitenin 13. saatte %50'lerde olduğu sonraki 4 saat içerisinde giderek azaldığını ve 17. saatte, hareketli spermatozoon kalmadığı izlendi. Ölü-canlı oranı açısından ise 15. saatte %50 iken, 17. saatte %90 olduğu belirlendi (Şekil 2).

Grup III'te (100.000 adet/ml *E. coli* konulan grupta) motilitenin 13. saatte %50 olduğu izlenirken aniden motilitenin düştüğü ve 18. saatte hiçbir hareketli spermatozoonun kalmadığı belirlendi. Ölü-canlı oranı açısından ise 13. saatte %45 iken, 18. saatte %90 olduğu saptandı.

Grup IV'te (1.000.000 adet/ml *E. coli* konulan grupta) en son 14. saatte motilite %50 iken 18. saatte hiçbir hareketli spermatozoonun kalmadığı görüldü. Ölü-canlı oranı açısından ise 14. saatte oran %55'lerde iken, 19. saatte ölü-canlı oranının %90 olduğu belirlendi.

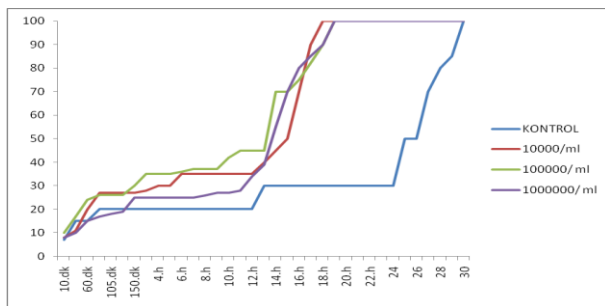
Tüm deneme grupları arasında motilite, en çabuk II. Grupta ortadan kaybolmuştur.

En hızlı ölü spermatozoon oranının artışı yine II. Grupta meydana gelmiştir.



Şekil 1. Motilite muayenesinin zamana göre değişimi

Figure 1. Changes according to the time of the motility examination



Şekil 2. Ölü-canlı sperm oranı muayenesinin zamana göre değişimi.

Figure 2. According to the exchange rate the dead-live sperm examination

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamız suni tohumlama uygulama esnasında spermanın dışkı ile kontaminasyonu üzerine kurgulanmış bir çalışmadır. Laboratuvar ortamında sperma *E. coli* ile kontamine edilmiş, motilite ve ölü-canlı sperma muayeneleri yapılmıştır.

Spermatogenezin aksadığı, testisin hasarlı olduğu ve immün sistemin de aktive olarak lökosperrinin (spermaya lökosit karışması) olduğu vakalarda spermatolojik parametrelerin etkilendiği gözlenmiştir. Bu etkiler, sperm yoğunluğunda ve motilitesinde düşüş veya anormal sperm oranında artış şeklinde olabilmektedir. Enfeksiyonda özellikle spermatozoon fonksiyonunu etkileyen bazı spesifik moleküler olaylardan sorumlu medyatörlerin varlığı son zamanlardaki çalışmalarda gösterilmiştir (Diemer ve Desjardins 1999; Diemer ve ark. 2000a).

Ürogenital sistem enfeksiyonuna bağlı olarak kan-testis bariyerinin bozulması, antisperm antikor oluşumuna ve dolayısıyla immünolojik infertilitenin gelişmesine neden olabilir (Conihare ve ark. 1988). Rastgele seçilmiş 137 infertil erkekte alınan numunelerde seminal plazmada interlökin 8 (IL-8) konsantrasyonunun spermatolojik parametreler ile ters orantılı olduğu görülmüştür (Eggert-Kruse ve ark. 2001).

Oshsendorf (1999) yaptığı çalışmada erkek genital enfeksiyonun etkisini, spermatozoon ve lökositler tarafından üretilen serbest oksijen radikalleri üzerinden açıklamaya çalışmaktadırlar. Serbest oksijen radikallerinin genital sistemi enfeksiyonu sırasında ne gibi işlevinin olduğu, kaynaklandıkları odak belirsizdir fakat etkileri oldukça kısa sürmektedir (Aydın 2003).

Comhaire ve ark. (1999) spermatozoon fonksiyon bozukluklarının çoğunu normal sperma muayenesinde belirlenemediğini bildirmektedir. Bu da, bir çok araştırmacının enfeksiyon ile infertilite ilişkisine karşı çıkmasına neden olmaktadır. Spermatozoon yoğunluğu, motilitesi ve anormal spermatozoon oranı gibi klasik spermatolojik parametrelerinin genital enfeksiyonlu hastalarla sağlıklı kontrollerin verileri ile karşılaştırıldığında çelişkili sonuçların elde edilmesi, araştırmacıları seminal plazma içindeki biyokimyasal değişikliklerin incelenmesine yönlendirmiştir (Weidner ve ark. 1987; Aydın ve ark. 1997; Depuydt ve ark. 1998; Ludwig ve ark. 1998). Aydın (2003)'ün yaptığı çalışmada bazı kimyasal maddelerin sperm fonksiyonunu etkilediğini göstermekle birlikte, bu durumun direkt enfeksiyonla bağlantısının tartışmalı olduğunu bildirmişlerdir.

İnfertil hastaların seminal sıvısında çok sayıda mikroorganizma izole edilmesine rağmen bakteriosperminin önemi net değildir; zira bu hastaların çoğunda genital sistemin bakteriyel enfeksiyonuna ilişkin semptom bulunmamaktadır. Epididimis ve prostat yangısı gibi klasik ürogenital enfeksiyonların yanısıra subklinik genital sistem enfeksiyonları sıkça görülmektedir. Ürogenital enfeksiyonların fertilité üzerine etkisi hakkındaki literatür bilgileri de çok çelişkilidir (Sigman ve Howards 1998).

İnfertil erkeklerin spermasında bakteriyel kontaminasyonun daha sık olduğu bildirilmektedir. *in vitro* fertilizasyon (IVF) programlarında da bakteriyospermi sık görülen bir problemdir. Buna rağmen, uygulanmakta olan rutin mikrobiyolojik yöntemlerle bakteriyospermi ile karşılaşma oranının tam olarak saptanamadığı bildirilmektedir (Jarvi ve ark. 1996). İnsanlarda, Villanueva-Diaz ve ark. (1999)'nın yaptığı çalışmada 65

hastanın %22'sinde rutin sperma kültürü olumlu çıkarken, aynı spermlerin santrifüj edilmesi sonrası pozitif kültür oranı %52'ye çıkmıştır.

Bakteriosperminin erkek infertilitesine yol açtığı söyleyebilmek ve bunu açıklayabilmek zordur. Saptan bakteriler ile uretrit, uretrit ile epididimitis, orşitis ve epididimoorsitis ile erkek infertilitesi arasında klinik ve patolojik bir bağlantı kurulabilir. Bazı retrospektif epidemiyolojik çalışmalar bakteriyospermi ile infertilite arasında bir ilişkiye işaret etse de, bu çalışmaların çoğu istatistiksel anlamlılık kazanacak düzeyde olmadığı bildirilmektedir (Ness ve ark. 1997). Bu patojen mikroorganizmaların spermatolojik parametreleri bozduğuna ilişkin güvenilir epidemiyolojik veri de söz konusu değildir. Mikroorganizmaların gerçekten infertilite nedeni olup olmadıkları kesinlik kazanmamıştır. Bazı araştırmacılar bakterileri spermisi olarak görürken, bazıları bakterilerin infertilite üzerine bir etkisinin bulunmadığını savunmaktadır (Makler ve ark. 1981; Paulson ve Polakowski 1997).

Bu çalışmada ticari olarak üretilen ve önceden muayenesi yapılan, motilitesi iyi olan ve tüm Türkiye'de suni tohumlamada kullanılan spermalar 37 °C'de çözdürülmüş ve 4 gruba ayrılmıştır. 1. Grup - (kontrol - Placebo grubu), 2. Grup - 10.000 *E. coli*/ml, 3. Grup - 100.000 *E. coli*/ml ve 4. Grup - 1.000.000 *E. coli* / ml ile karıştırılmış, sonra 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon başlangıcında spermatozoon motilitesi %80, ölü canlı oranı da %8-10 olduğu belirlenmiştir. Çalışmada 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüv kullanmanın asıl sebebi inek genital kanalının taklit edilmesidir. Aslında oöstrüsteki bir ineğin genital kanalında bulunan sıvıların spermatozoonun yaşam ömrünü uzattığı, enerji ile bazı besin öğelerini içerdiği bildirilmektedir. Fakat tüm gruplar için aynı ortam sağlanması açısından bu model çalışma planlanmıştır.

Literatür verileri incelendiğinde genital enfeksiyonlarla ilgili çok sayıda çelişkili bulgular görülmektedir. Birçok çalışmada gruplar arasında kontrol grubu bulunmakta fakat placebo verilmemektedir (Winters 1997). Spermada aerobik ve anaerobik bakteriler ile *Mycoplasma* türleri dahil bir çok mikroorganizma izole edildiği bildirilmiştir (Swenson ve ark. 1979; Lewis ve ark. 1981; Busolo ve ark. 1984). Bunlardan *U. urealyticum* (65) ve *C. trachomatis* (Greendale ve ark. 1993), erkek ve dişi genital sistemde sık rastlanılan ajanlar olduğundan, genital enfeksiyonda özel önem kazanmışlardır. *U. urealyticum* ile sperm parametreleri genellikle ilişkisiz bulunmuştur.

*E. coli* ürogenital enfeksiyonlarda en sık görülen patojen olduğundan, mikroorganizmaların spermatozoon hareketi üzerine etkisini araştıran *in vitro* çalışmaların çoğu *E. coli* hakkındadır (Schiefer 1998). Kohn ve ark. (1998) spermatozoonun *E. coli* ile *in vitro* inkübasyonunun spermatozoon hareketini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Bu araştırmacılara göre *E. coli*'nin motiliteye direkt inhibitör etkisi bakteri yoğunluğu ile bağlantılıdır. Elektron mikroskopi incelemeleri *E. coli*'nin spermlerle çok sayıda yapışmalar yaptığı, böylece çeşitli ultrastruktural hasara yol açtığı ve muhtemelen bu yolla sperm hareketini durdurduğu kanısını doğurmuştur (Diemer ve ark. 1996). *E. coli* kültürlerinden düşük molekül ağırlıklı spermatozoal immobilizasyon faktörü izole edilmiştir. Bu faktör spermatozoonları hareketsiz hale getirmekte, fakat öldürmemektedir. Bu immobilizasyon faktörünün etkisi sperm yoğunluğu ile ilişkilidir. Diğer bir deyişle, bakteriyel enfeksiyonların oligospermik sperma üzerine normospermik spermadan daha fazla etkili olduğu bildirilmektedir (Paulson ve Polakowski 1997). Ancak

başka bir çalışmada, spermatozoon üzerinde inhibitör etki sadece *E. coli* serotip 06 da olduğu, diğer serotiplerin böyle bir etki göstermediği anlaşılmıştır (Huwe ve ark. 1998). Bazı araştırmacılar *E. coli*'nin sadece belirli bakteri / sperm oranında inhibitör etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir (Aurox ve ark. 1991; Diemer ve ark. 1996).

Sunulan çalışmada, 10.000 *E. coli* (Spermatozoon/*E. coli* oranı 2000/1) grubunda motilitenin daha erken ve istikrarlı bir şekilde düştüğü görülürken, 100.000 *E. coli* (200/1) grubunda da benzer bir tablo izlenmiştir. 1.000.000 *E. coli* (20/1) grubunda motilitenin özellikle 13. saatten sonra %70'ten %50'ye düştüğü, 14. saatten sonra ise hızlı bir kayıp yaşanmıştır.

Diemer ve ark. (1996) tarafından yürütülen bir çalışmada; 10/1, 100/1, 1000/1, 10000/1 oranında spermatozoon ve *E. coli* karıştırılmış, çalışmanın başlangıcından sonraki 2. saatte kontrol grubu dahil hiç bir grubun sperm motilitesinde herhangi bir değişiklik olmadığı, çalışmanın 4. saatinde ilk 3 grubun motilitesi belirgin bir şekilde düşerken 4. grup ve kontrol grubunda bir değişim tespit edilmediği, 6. saatinde ise 1. ve 2. grupta motilite sınırlanırken 3. ve 4. gruplarda önemli bir düşüş görülmediği bildirmişlerdir.

Bu çalışma ile Diemer ve ark. (1996)'ınca yürütülen çalışmaların bulguları benzerlik göstermektedir. Yürütülen bu çalışmanın deney yapılan grupları ile Diemer ve ark. (Diemer ve ark. 1996)'nın gerçekleştirdiği çalışmanın grupları arasında motil sperm sayısı ilk üç grup için iki katıdır. Diğer yandan sahada kullanılan spermalarla yürütülen bir çalışma olduğu için ml başına 500 IU penisilin 500 mcg streptomisin katılmış olması da antibakteriyel ortam açısından önemlidir. Bazı araştırmacılar (Aurox ve ark. 1991; Diemer ve ark. 1996) inkübasyon süresince bakterilerin çoğalmasından söz etmektedirler.

Motilitenin düşme-sınırlanma süresinin daha uzun olmasının bu gerekçelerden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Ölü sperm oranının değerlendirildiği sürece baktığımız zaman ölü spermatozoon oranındaki artışın motilitenin düşmesi ile paralellik arz ettiği görülmektedir.

Yapılan bir çalışmada (Huwe ve ark. 1998) ileri sürülen *E. coli*'nin hızlı bir şekilde spermatozoonlara yapıştığı ve bu spermatozoonları çökerttiği görüşü bu çalışmada o yönde bir araştırma yapılmadığı için ortaya konulamamıştır. Motilitenin düşmesi ve ölü spermatozoon oranının artması bu nedenlerden kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda *E. coli*'nin spermatozoonlar üzerine olumsuz etki yaptığı net bir şekilde ortaya konmuştur. Özellikle de deneyin 13. saatinde motilitenin %50'nin altına düştüğü bütün gruplarda bir gerçektir. Özel durumlar hariç, %50'nin altında motil spermalar tohumlamada kullanılmamaktadır. Diğer yandan doğal ortamda kontaminasyonun ne oranda ve birden fazla mikroorganizma tarafından gerçekleştirilip gerçekleştirilmeyeceği de başka araştırma konularıdır. Özellikle elektron mikroskopik görüntüler *E. coli*'nin defekt oluşturuca etkilerini net bir şekilde ortaya koyduğu bildirilmektedir (Diemer ve ark. 1996).

Bizim yaptığımız çalışmada 10.000 *E. coli*/ml, 100.000 *E. coli*/ml, 1.000.000 *E. coli*/ml yoğunluğunda karıştırılarak inkübe edilen spermaların muayenesinde, motilitenin en erken 10.000/ml *E. coli* grubunda sonlandığı en uzun Grup I olan kontrol grubunda sürdüğü izlenmiştir. Süreç incelendiğinde ise en ciddi motilite düşüşünün II. grupta olduğu bunu III, IV ve I. Grubun izlediği belirlenmiştir. En ciddi ölü-canlı oran artışı Grup II'de olduğu, sonra 2 saat

içerisinde ölümlerin yoğun olarak arttığı sonra sırasıyla III., IV. ve I. Grupta 3, 4, ve 5 saat içerisinde ise canlı spermatozoon kalmadığı, bu muayene ile ortaya konmuştur.

Tüm deneme gruplarından spermatozoon motilitesinin ilk düşmeye başladığı ve ölü sperm oranının ilk arttığı Grup II'dir.

İnsan sperması ile yapılan bir çalışmada 2 saatlik inkübasyondan sonraki *E. aerogenes* hariç, bütün mikroorganizmalarda motilite ile mikroorganizma yoğunluğu arasında anlamlı bir korrelasyon olmadığı belirlenmiştir. Bu ajanların spermatozoon hareketi üzerine bir şekilde olumsuz etki yaptığı gerçek olmakla birlikte, bu etki ajanın yoğunluğu ile yüzde yüz ilişkili olmasa da belli bir eşik yoğunluktan sonra ortaya çıktığı vurgulanmıştır. Buradan hareketle sperm fonksiyonundaki bozulmanın, direkt bakteri sperm etkileşiminden değil, sperma ortamını değiştirebilecek veya yüksek enerji tüketimine yol açabilecek düzeyde bakteri yoğunluğundan kaynaklandığı bildirilmektedir (Aydın 2003). Benzer şekilde bakteriler ile karşılaşan spermatozoonlardaki hareket azalmasının enerji ile ilgili olduğu, fruktoz tüketiminin hızlı artışından kaynaklandığı bildirmişlerdir (Swenson 1979).

Aynı şekilde; bakteriler ile karşılaşan spermatozoonlarda hareket azalması enerji, dolayısı ile fruktoz tüketimi ile ilgili olduğu bildirilmektedir (Swenson 1979). Yapılan bazı *in vitro* çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmada da, normal ejakülatta bulunamayacak kadar yüksek yoğunlukta mikroorganizma ile sperma örnekleri karıştırılarak inkübe edilmiştir. Bu yoğunluktaki spermaya bakteri karışması, ancak spermanın bir dışkı ile kontamine olması durumunda meydana gelebilir. Bulgular incelendiğinde yüksek yoğunlukta *E. coli* katılan sperma örnekleri yerine en az *E. coli* katılan grupta etkilerin daha net olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebi ise karışımdaki mikroorganizma yoğunluğunun sonucu üremesinin kısıtlanmasından kaynaklanmış olabileceğidir. Benzer şekilde, deneysel *in vitro* çalışmalar ile gerçek *in vivo* genital enfeksiyonların karşılaştırılması için yapılan testlerde de çelişkili sonuçlar görüldüğü bildirilmektedir (Kohn ve ark. 1998). Görülüyor ki, yaptığımız bu deneysel çalışmadan elde edilen sonuçlar ve bunların *in vivo* genital enfeksiyonlar için önemi bir süre daha tartışılmaya devam edecektir.

Sonuç olarak; Veteriner Hekimlik alanında benzer bir çalışmaya rastlanmamış olması bu çalışmayı özgün kılmaktadır. Gerek ithal gerekse ülkemizde üretilen boğa spermaları sahada suni tohumlama amacıyla kullanılmaktadır. İthal spermalarda motil spermatozoon sayısı daha düşüktür. Sunulan literatürlerden de anlaşıldığı gibi esas olan spermatozoon / bakteri oranıdır. Saha şartlarında bu oranı tahmin etmek pek mümkün değildir, ancak asepsiye bağlı kalınarak minimize edilebilir. Boğa spermatozoonunun inek genital kanalında yaşama süresi 48, ovumun ise 24 saattir. Dölleme ve dölleme olaylarında ise bu süre neredeyse yarıya düşmektedir. Spermatozoon kapasitasyonu göz önüne alındığında, doğal ortamda fertilizasyonun ön şartı motilitedir. Önemli bir faktör olarak motiliteyi etkileyen bakteriyel kontaminasyonun hem literatür de hem de sunulan çalışmada belirginleşmiştir.

Araştırmanın özgünlüğü, sperma sulandırıcılarının hazırlanmasında ilave edilen antimikrobiyel maddelerin önemini bir kez daha ortaya çıkarmaktadır. Diğer taraftan ineklerde suni tohumlama uygulaması sırasında Veteriner Hekim ve Teknisyenlerin genital organ enfeksiyonlarına

yol açmaması için (bu enfeksiyonların repeat-breeder ve erken embriyonik ölümlere yol açması sebebiyle) asepsiye azami ölçüde dikkat edilmesinin önemi ortaya konmuştur.

Bu çalışma ile sadece bir bakteri türünün spermatozoonlar üzerine küçük bir etkisi çalışılmıştır. Yaygın bakterilerin benzer bir şekilde, hatta moleküler ya da toksinlerinin *in vitro* daha da önemlisi *in vivo* bazda çalışılmasına ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

- Alaçam, E (1994):** Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Suni Tohumlama Doğum ve İnfertilite. Ed.: Erol Alaçam, 1. Baskı. Dizgivi - Konya.
- Arda M (2011):** Temel Mikrobiyoloji. s: 217-220, MedisanYayıncıları, 4. Baskı, Ankara.
- Auroux MR, Jacques L, Mathieu D, Auer J (1991):** Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an *in vitro* study in man with *Escherichia coli*. *Int J Androl*, 14, 264-270.
- Aydın S (2003):** Farklı üropatojen mikroorganizmaların sperm motilitesi üzerine etkisi: *In vitro* deneysel çalışma. YYÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi.
- Aydın S, Yılmaz Y, Odabaş Ö, Şekeroğlu MR, Tarakçıoğlu M, Atilla MK (1997):** A further study of seminal plasma: Lactate dehidrogenase and Lactate dehidrogenase-X activities and diluted semen absorbence. *Eur J Clin Chem Biochem*, 35, 261-264.
- Balmelli T, Stamm J, Dolina-Giudici M, Peduzzi R, Piffaretti-Yanez A, Balerna M (1994):** Bacteroides ureolyticus in men consulting for infertility. *Andrologia*, 26: 35-38.
- Busolo F, Zanchetta R, Lanzone E, Cusianato R (1984):** Microbial flora in semen of asymptomatic men. *Andrologia*, 16, 269-275.
- Celino FT, Yamaguchi S, Miura C, Ohta T, Tozawa Y, Iwai T, Miura T (2011):** Tolerance of spermatogonia to oxidative stress is due to high levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase. *PLoS One*, 6, 2, e16938.
- Comhaire FH, Mahmoud AM, Depuydt CE, Zalata AA, Christophe AB (1999):** Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update*, 5, 393-398.
- Conihair FH, Hinting A, Vermeulen L, Schoonjans F, Goethals I (1988):** Evaluation of the direct and indirect mixed antiglobulin reaction with latex particles for the diagnosis of immunological infertility. *Int J Androl*, 11, 37-44.
- Çoyan K, Ataman MB, Kaya A, Karaca F (2002):** Evcil Hayvanlarda Dölleme ve Suni Tohumlama. SÜ Vet Fak Yayın Ünitesi, 42031 Kampüs, Konya
- Del Porto GB, Derrick FC, Bannister ER (1975):** Bacterial effect on sperm motility. *Urology*, 5538-639.
- Demirci E (2007):** Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. FÜ Veteriner Fakültesi Ders Teksiri No, 57.
- Depuydt C, Zalata A, Christophe A, Mahmoud A, Comhaire F (1998):** Mechanisms of sperm deficiency in male accessory gland infection. *Andrologia*, 30: 29-33.
- Diemer T, Desjardins C (1999):** Developmental and genetic disorders in spermatogenesis. *Hum Reprod Update*, 5, 120-140.
- Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Hales DB, Weidner W (2000a):** Influence of urogenital infection on sperm function. *Curr Opin Urol*, 10, 39-44.
- Diemer T, Huwe P, Michelmann HW, Maayer F, Schiefer HG, Weidner W (2000b):** *Escherichia coli* induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. *Int J Androl*, 23, 178-186.
- Diemer T, Weidner W, Michelmann HW, Schiefer HG, Rovani E, Mayer F (1996):** Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*. *Int J Androl*, 19: 271-277.
- Eggert-Kruse W, Boit R, Röhr G, Aufenanger J, Hund M, Strowitzki T (2001):** Relationship of seminal plasma interleukin (IL) -8 and IL-6 with semen quality. *Hum Reprod*, 16, 517-528.
- Eggert-Kruse W, Rohr G, Probst S, Rusu R, Hund M, Demirakca T, Aufenanger J, Runnebaum B and Petzoldt D (1998):** Antisperm antibodies and microorganisms in genital secretions: a clinically significant relationship. *Andrologia*, 30, 61- 71.
- Garner DL, Hafez ESE (1993):** Spermatozoa and seminal plasma. In: Hafez ESE (ed.) Reproduction in Farm Animals, Philadelphia,
- Ghebreyesus A (1986):** Studies on acrosome abnormalities of frozen, stored bull spermatozoa. Fachbereich Veterinarmedizin, Justus-Liebig Universität Giessen, German Federal Republic, 19pp; 71/2pp of ref. thesis.

- Gökçen H, Minbay A, Çekgöl E (1985):** Karacabey Harası suni tohumlama boğalarında klinik, spermatozojik araştırmalar. *Uludağ Üniversitesi Vet Fak Derg*, 4, 53-62.
- Greendale GA, Haas ST, Holbrook K, Walsh B, Schachter J, Phillips RS (1993):** The relationship of *Chlamydia trachomatis* infection and male infertility. *Am J Public Health*, 83, 996-1001.
- Gump DW, Gibson M, Ashikaga T (1984):** Lack of association between genital mycoplasmas and infertility. *N Eng J Med*, 310, 937-941.
- Güney HÖ, İleri İK (1990):** Pallet yöntemine göre dondurulmuş boğa spermasının farklı ısı ve sürelerde eritilmesinin ve eritme sonrası düşük ısı uygulamalarının spermatozoitlerin motilite ve morfolojik yapıları üzerine etkisi. *İÜ Vet Fak Derg*, 17, 75-91.
- Hafez ESE (1987):** Reproduction in Farm Animals. Ed: ESE Hafez, 5th edition, Lea&Febiger, Philadelphia.
- Hales DB, Diemer T, Hales KH (1999):** Role of cytokines in testicular function. *Endocrine*, 10, 201-217.
- Henkel R, Schill WB (1998):** Sperm separation in patients with urogenital infections. *Andrologia*, 30, 91-97.
- Huwe P, Diemer T, Ludwig M, Liu J, Schiefer HG, Weidner W (1998):** Influence of different uropathogenic microorganisms on human sperm motility parameters in an *in vitro* experiment. *Andrologia*, 30, 55-59.
- İleri İK, Ak K, Pabuççuoğlu S, Birlir S (2000):** Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İÜ Vet Fak Yayını, Ders Notu No: 112.
- Jarvi K, Lacroix JM, Jain A, Dumitru I, Heritz D, Mittelman MW (1996):** Polymerase chain reaction-based detection of bacteria in semen. *Fertil Steril*, 66, 463-467.
- Kohn FM, Erdmann I, Oeda T, el Mulla KF, Schiefer HG, Schill WB (1998):** Influence of urogenital infections on sperm functions. *Andrologia*, 30, 73- 80.
- Lewis RH, Harrison RM, Domonique GJ (1981):** Culture of seminal fluid in a fertility clinic. *Fertil Steril*, 35, 666-670.
- Liversedge NH, Jenkins JM, Keay SD, McLaughlin EA, Al-Sufyan H, Maile LA, Joels LA, Hull GR (1996):** Antibiotic treatment based on seminal cultures from asymptomatic male partners in *in vitro* fertilization is unnecessary and may be detrimental. *Hum Reprod*, 11, 1227-1231.
- Ludwig M, Kummel C, Schroeder-Printzen I, Ringert RH, Weidner W (1998):** Evaluation of seminal plasma parameters in patients with chronic prostatitis or leukocytospermia. *Andrologia*, 30, 41-47.
- Makler A, Urbach Y, Lefler E, Merzbach D (1981):** Factors affecting sperm motility. VI. Sperm viability under the influence of bacterial growth in human ejaculates. *Fertil Steril*, 35, 666-670.
- Mazzulli T (2002):** Resistance trends in urinary tract pathogens and impact on management. *J Urol*, 168, 1720-1722.
- Mc Donald LE (1980):** Veterinary Endocrinology and Reproduction. Lea-Febriger, Philadelphia.
- Michelmann HW (1998):** Influence of bacteria and leukocytes on the outcome of *in vitro* fertilization (IVF) or *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI). *Andrologia*, 30, 99-101.
- Moreira SG, Lipshultz LI (2000):** Management of male infertility. *Digital Urol J* "www.duj.com/article/Moreira.html". Erişim Tarihi: 10.10.2015
- Munuce MJ, Bregni C, Carizza C, Mendeluk G (1999):** Semen culture, leukocytospermia, and the presence of sperm antibodies in seminal hyperviscosity. *Arch Androl*, 42, 21-28.
- Naessens A, Foulon W, Debrucker P, Devroey P, Lauwers S (1986):** Recovery of micro-organisms in semen and relationship to semen evaluation. *Fertil Steril*, 53, 331-336.
- Ness RB, Markovic N, Carlson CL, Coughlin' MT (1997):** Do men become infertile after having sexually transmitted urethritis? An epidemiologic examination. *Fertil Steril*, 68, 205-213.
- Novy MJ, Eschenbach DA (1998):** Reproductive Endocrinology, Infertility, and Genetics. In: "Gynecology and Obstetrics", Sciarra JJ, Watkins TJ (Eds), Part 12, Vol 5. Lippincott, Williams and Wilkins.
- Ochsendorf FR (1999):** Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*, 5, 399-420.
- Özkoca A (1984):** Çiftlik Hayvanlarında İnfertilite. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, No 4. İstanbul.
- Paulson JD, Polakowski KL (1997):** Isolation of a spermatozoal immobilisation factor from *Escherichia coli* filtrates. *Fertil Steril*, 28, 182-185.
- Petrunkina AM, Waberski D, Gunzel-Apel AR, Topfer-Petersen E (2007):** Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reprod*, 134, 3-17.
- Rodriguez-Martinez H (2007):** State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev*, 19, 91-101.
- Salisbury GW, VanDemark NL, Lodge JR (1978):** Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. 2<sup>nd</sup> ed. WH Freeman Co, San Francisco.
- Schiefer HG (1998):** Microbiology of male urethroadnexitis: diagnostic procedures and criteria for aetiologic classification. *Andrologia*, 30, 7-13.
- Seidman DS, Madjar I, Levron J, Levran D, Mashiach S, Dor J (1999):** Testicular sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection for persistent infection of the ejaculate. *Fertil Steril*, 71, 564-566.
- Sevinç A. (1984):** Dölerme ve Sun'i Tohumlama. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, No: 397 Ankara.
- Shalika S, Dugan K, Smith RD, Padilla SL (1996):** The effect of positive semen bacterial and Ureaplasma cultures on in-vitro fertilization success. *Hum Reprod*, 11, 2789-2792.
- Sigman M, Howards SS (1998):** Male Infertility. In: "Campbell's Urology", Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ (Eds), Vol. 2, Ch. 44. 7th ed. pp. 1287- 1330, WB Saunders Co. Philadelphia.
- Sönmez M (2013):** Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. FÜ Veteriner Fakültesi Yayınları. Elazığ 2013.
- Swenson CE, Toth A, O'Leary WM (1979):** *Ureaplasma urealyticum* and human infertility: The effect of antibiotic therapy on semen quality. *Fertil Steril*, 31, 660-665.
- Trum JW, Mol BW, Pannekoek Y, Spanjaard L, Wertheim P, Bleker OP, van der Veen F (1998):** Value of detecting leukocytospermia in the diagnosis of genital tract infection in subfertile men. *Fertil Steril*, 70, 315-319.
- Villanueva-Diaz CA, Flores-Reyes GA, Beltrán-Zuniga M, Echavarría-Sánchez M, Ortiz-Ibarra FJ, Arredondo-García JL (1999):** Bacteriospermia and male infertility: a method for increasing the sensitivity of semen culture. *Int J Fertil Womens Med*, 44, 198-203.
- Weidner W, Krause W, Ludwig M (1999):** Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum Reprod Update*, 5, 421-432.
- Weidner W, Schiefer HG, Garbe C (1987):** Acute nongonococcal epididymitis. Aetiological and therapeutic aspects. *Drugs*, 34, 111-117.
- Winters SJ (1997):** Pathogenesis and medical management of male infertility. In: "infertility, A Comprehensive Text", Seibel MM (Ed). Ch. 15. pp. 261-275. Appleton and Lange, Stamford.
- Witkin SS, Tot'h A (1983):** Relationship between genital tract infections, sperm antibodies in seminal fluid and infertility. *Fertil Steril*, 40, 805-808.
- Wolin LH (1971):** On the etiology of epididymitis. *J Urol*, 105, 531-533.
- Yanagimachi R (1994):** Mammalian Fertilization. Knobil E, Neill JD (eds), The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York, pp. 189-317.