



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME ve SUNİ
TOHURLAMA ANABİLİM DALI



**SİSTEİN İLE KOMBİNE EDİLEN ALABALIK SEMİNAL PLAZMASININ
KOÇ SPERMASININ DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ**

ELİF GÖKÇE

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2019

ELİF GÖKÇE

DÖLERME ve SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2019



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME ve SUNİ TOHURLAMA
ANABİLİM DALI



**SİSTEİN İLE KOMBİNE EDİLEN ALABALIK SEMİNAL PLAZMASININ KOÇ
SPERMASININ DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ**

ELİF GÖKÇE

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Doç. Dr. Bureu ÜSTÜNER

Proje No- B.U.Ü. BAP DDP 2017/10

BURSA-2019

**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum

“Sistein ile Kombine Edilen Alabalık Seminal Plazmasının Koç Spermasının Dondurulabilirliği Üzerine Etkisi” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

**Adı Soyadı
Tarih ve İmza**

ELİF GÖKÇE

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Elif GÖKÇE tarafından hazırlanan Sistein ile Kombine Edilen Alabalık Seminal Plazmasının Koç Spermalarının Dondurulabilirliği Üzerine Etkisi konulu Doktora Tezi 29/07/2019 günü, 11:00-12:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Doç. Dr. Burcu ÜSTÜNER	
Üye	Prof. Dr. M. Kemal SOYLU	
Üye	Prof. Dr. Murat YALÇIN	
Üye	Prof. Dr. Serhat PABUCCUOĞLU	
Üye	Prof. Dr. P. Barbaros TUNCER	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER

Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

29/07/2019

Adı Soyadı: Elif GÖKÇE
Anabilim Dalı: Dölerme ve Suni Tohumlama
Tez Konusu: Sistein ile Kombine Edilen Alabalık Seminal Plazmasının Koç Spermalarının Dondurulabilirliği Üzerine Etkisi

I. ÖZELLİKLER

II. UYGUNDUR

III. UYGUN DEĞİLDİR

IV. AÇIKLAMA

Tezin Boyutları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dış Kapak Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
İç Kapak Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kabul Onay Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sayfa Düzeni	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
İçindekiler Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yazı Karakteri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Satır Aralıkları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Başlıklar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sayfa Numaraları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eklerin Yerleştirilmesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tabloların Yerleştirilmesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kaynaklar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı:

Doç. Dr. Burcu ÜSTÜNER

İmza:

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	I
ETİK BEYANI	II
KABUL ONAY	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜKÇE ÖZET	VII
İNGİLİZCE ÖZET.....	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Suni Tohumlamanın Tarihçesi	7
2.2. Koyunlarda Suni Tohumlamayı Sınırlandıran Faktörler.....	7
2.3. Koç Spermasının Özellikleri ve Spermanın Değerlendirilmesi	9
2.3.1. Koç Seminal Plazma İçeriği.....	9
2.3.2. Koç Spermatozoon Yapısı	12
2.4. Spermatozoid Muayene	15
2.4.1. Makroskopik Muayene	17
2.4.2. Mikroskopik Muayene	18
2.5. Spermanın Kriyoprezervasyonu.....	25
2.5.1. Kriyoprezervasyonun Sperma Üzerine Zararlı Etkileri	27
2.5.2 Kriyoprezervasyonun Olumsuz Etkilerine Karşın Çözüm Stratejileri.....	30
2.5.3 ASP-Sistein Kombinasyonunun Koç Spermasının Dondurulmasında Kullanımı	43
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	46
3.1. Koçlardan Sperma Alınması	46
3.2. Taze Spermada Spermatozoid Parametrelerin Değerlendirilmesi	47
3.2.1. Sperma Hacmi.....	47
3.2.2. Kitle Hareketi (Mass-aktivite)	47
3.2.3. Spermatozoon Motilitesi	48
3.2.4. Spermatozoon Yoğunluğu.....	48
3.3. Sperma Sulandırıcısının Hazırlanması ve Spermanın Kriyoprezervasyonu	49

3.3.1. Sperma Sulandırıcısının Hazırlanması.....	49
3.3.2. Koç Spermasının Dondurulması	51
3.4. Spermanın Eritilmesi ve İnkübasyonu	52
3.5. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi.....	52
3.5.1. Spermatozoon Motilitesi	52
3.5.2. Hipoozmotik Şişme Testi (HOST) ile Plazma Membran Bütünlüğünün Belirlenmesi	53
3.5.3. FITC-PSA ile Akrozomal Yapının Ortaya Konması	53
3.5.4. Terminal Deoxynucleotidyl Transferasemediatedutp Nick-End Labeling (TUNEL) ile DNA Hasarının Belirlenmesi.....	54
3.6. İstatistiksel Analiz.....	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. Taze Sperma, Sulandırma Sonrası ve Ekilibrasyon Sonrası Saptanan Spermatolojik Bulgular	56
4.2. Eritme Sonrası Saptanan Spermatolojik Bulgular.....	61
4.2.1. Eritme Sonrası 0. Saatte Saptanan Spermatolojik Bulgular.....	61
4.2.2. İnkübasyonun 3. Saatinde Saptanan Spermatolojik Bulgular	63
4.2.3. İnkübasyonun 5. Saatinde Saptanan Spermatolojik Bulgular	65
5. TARTIŞMA	72
6. KAYNAKLAR	94
7. SİMGELER ve KISALTMALAR	106
8. TEŞEKKÜR.....	108
9. ÖZGEÇMİŞ	109

ÖZET

Bu çalışmada tek başına ya da 1 mM sistein ile kombine edilen alabalık seminal plazmasının (ASP) farklı dozlarının (%0, %1, %10, %15) koç spermasının dondurulması ve eritme sonrası inkübasyon direnci üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Sperma, on baş Kıvırcık ırkı koçtan elektro-ejakülatör ile gün aşırı alındı ve birleştirildi (pooling). Pooling sonrası ortalama motilite, plazma membran bütünlüğü, akrozom ve DNA hasarı oranları sırasıyla %83,00; %89,80; %8,20; %3,40 olarak değerlendirildi. Pooling sonrası sekiz eşit hacimde bölünen sperma, %0, %1, %10, %15 oranında ASP içeren sisteinli ve sisteinsiz sulandırıcılarla final hacim 1:5 (sperma/sulandırıcı) olacak şekilde sulandırıldı ve sıcaklığı bir saat içinde 5 °C'a indirildi. Ardından spermaya %0, %1, %10, %15 ASP ilave edilen sisteinli ve sisteinsiz sulandırıcı B (%6 gliserol) eklenerek iki saat boyunca ekilibrasyona bırakıldı. Ekilibrasyon sonrası sperma 0,25 mL hacimli payetlere çekilerek programlanabilir dondurma cihazıyla donduruldu ve sıvı azot tankında saklandı.

Eritme sonrası ve inkübasyonun 3 ila 5. saatlerinde motilite, HOST, akrozomal hasar ve DNA hasarı oranları saptandı. Eritme sonrası ve inkübasyonun 3. saatinde motilite ve plazma membran bütünlüğünün %10 ASP-sistein içeren sulandırıcı ile daha yüksek oranda korunduğu saptandı ($P<0,05$). En düşük akrozom hasarı %10 ASP-sistein içeren gruptan elde edilirken; en düşük DNA hasarı yalnızca %10 ASP içeren gruptan elde edildi. İnkübasyonun son saatinde ise %10 ASP'nin sistein ile kombine edilmesinin tüm spermatolojik parametreler ile beraber DNA hasarı oranının korumasında da daha etkili olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, koç sperma sulandırıcısına çeşitli dozlarda eklenen ASP ve sisteinin eritme sonrası incelenen spermatolojik parametreler üzerine koruyucu etkilerde bulunduğu kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Koç sperması, Dondurma, Alabalık Seminal Plazması, Sistein

SUMMARY

The aim of the current study was to evaluate the effect of unaccompanied or cysteine (1 mM) combined Rainbow Trout's Seminal Plasma's (RTSP) doses (0%, 1%, 10%, 15%) on cryopreservation and incubation resilience of ram semen. Ram semen was collected from ten Kivircik rams via electroejaculator every other day and then collected semen was pooled. After pooling process the mean of motility, plasma membrane integrity, acrosome defect and DNA fragmentation rates were detected as 83,00%; 89,80%; 8,20% and 3,40% respectively. After pooling process semen was divided into eight equal volumes and diluted with extenders which containing different doses of RTSP (0%, 15, 10%, 15%) and cysteine (0 mM, 1 mM). Diluted samples were cooled to 5 °C in an hour and rediluted with extender containing 0%, 1%, 10%, 15% RTSP (with or without cysteine) and 6% glycerol before two-hour equilibration. After equilibration, semen were placed into 0,25 mL french straws and frozen with a programmable freezing device and they were stored in liquid nitrogen tanks.

Motility, HOST, defected acrosome and DNA fragmentation rates were assessed after thawing, 3th hour and 5th hour of incubation. It is detected that the extender containing 10% RTSP-cysteine was more protective on motility and plasma membrane integrity after thawing and 3rd hour of incubation ($P < 0,05$). Although the least defected acrosome rates were detected with 10% RTSP-cysteine containing group, the least DNA fragmentation rates were observed with only 10% RTSP group. At the end of incubation, it is observed that the 10% RTSP-cysteine combination is more efficient for protecting all spermatological parameters without excepting DNA integrity.

It was a reached conclusion that, supplementation of RTSP and cysteine have a protective effect on cryosurvival of ram semen and on assessed spermatological parameters.

Key words: Ram semen, Cryopreservation, Rainbow Trout Seminal Plasma, Cysteine

1. GİRİŞ

Türkiye coğrafi şartları ve iklim koşulları bakımından büyükbaş ve küçükbaş hayvancılık için uygun ortama sahiptir. Çiftlik hayvanı yetiştiriciliği; ülkemizin kendi hayvansal gıda gereksinimini ve hayvancılığa dayalı sanayi için ham madde ihtiyacını sağlayabilmesi bakımından önemlidir. Ülkemizde 2018 TUİK verilerine göre 35 milyon 195 bin baş koyun bulunmakta ve bu koyunların 2.681.679'i et, süt verimi yüksek ve bir batında daha fazla yavru veren kültür ırkı koyunlardan oluşurken; 32.513.293'i ise çevre koşullarına dirençli ancak verim miktarı düşük olan yerli koyun ırklarından oluşmaktadır. Mevcut koyunlardan 2018 yılında 100.831 ton et, 1.446.270,5 ton süt ve 66.427,537 ton yün üretilmiştir (TUİK 2018). Tüm bu bilgilerin ışığında, ülkemizde koyun varlığının yeterli ancak koyunculuktan elde edilen ürün miktarının beklenen düzeyin altında olduğu yorumunu yapmak olasıdır. Bu nedenle, koyun başına düşen et, süt, yapağı vb. verimleri artırmak, uygun damızlık koçlar kullanılarak devamlı ve etkin bir ıslah politikası ile olasıdır.

Etkin bir ıslah için, kaliteli dişi damızlıkların kaliteli erkek damızlıklarla çiftleştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, küçükbaş hayvan üretiminde genel olarak tercih edilen doğal aşım ve elde sıfat yönteminin dezavantajlarını şu şekilde sıralayabiliriz:

- Değerli koçların fizyolojik sınırları içerisinde çiftleşebileceği koyun sayısı sınırlı kalmaktadır,
- Koçların bakım ve idaresi ekstra altyapı, işçilik ve yem giderine neden olmaktadır,
- Konvansiyonel çiftleştirme yönteminde, genellikle koçların fertilizasyon yeteneği ile ilgili bir ön fikir edinilememektedir,
- Koçların transferinin külfetli olmasının yanı sıra yaşam ömürleri sınırlı kalmaktadır,
- Konvansiyonel çiftleşme sırasında sürü içinde veneral hastalıkların yayılma riski bulunmaktadır.

Yirminci yüzyılın başlarında, yukarıda sözü edilen geleneksel çiftleştirme yönteminin dezavantajlarını elimine etmek amacıyla ilk biyoteknolojik gelişme olarak, suni tohumlama kullanım alanı bulunmuştur (Hafez 1993; Moore ve Hasler 2017). Suni tohumlama yönteminin kullanılmaya başlandığı ilk yıllarda, sperma taze olarak kullanılmakta ve alınan ejakülatın tümü yalnızca bir dişi hayvanın tohumlanmasında kullanılmaktaydı (İleri ve ark., 2000; Moore ve Hasler 2017). Zamanla taze sperma ile birden fazla hayvanın tohumlanması ile de başarılı gebelik sonuçları alındığı görülmüş, ancak, bu yöntemle de tohumlanan dişi hayvan sayısı ancak belli bir düzeyde artırılabilmiştir (Moore ve Hasler 2017). Sperma sulandırıcılarının geliştirilmesi ile ejakülatlar sulandırılarak, hacimce artırılmış ve bir hayvandan alınan sperma ile çok sayıda dişinin tohumlanmasına olanak sağlanmıştır (İleri ve ark., 2000).

İslah çalışmalarının etkin bir şekilde yapılabilmesi için kaliteli damızlık erkek hayvanın genetik materyalinin yaygın bir şekilde sahaya aktarabilmesi gerekmektedir. Ancak bu durum, damızlık bir erkek hayvandan alınan sperma ile fazla sayıda dişinin tohumlanması ve bu genetik materyalin uygun şekilde transportu ile olasıdır. Bu gereksinimlerden yola çıkarak ilk olarak spermanın uygun sulandırıcılar ile hacminin artırılması başarılmış, böylece tek ejakülat ile fazla sayıda koyunun tohumlanmasına olanak sağlanmıştır (Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000). Fakat spermanın yalnızca sulandırılması; söz konusu kaliteli damızlık koçların daha geniş kitlelere ulaştırılması noktasında yetersiz kalmıştır. Koçların transportunun zorluğu ve bu taşınma esnasında oluşacak transport stresine bağlı olarak libido eksikliğini elimine etmek amacıyla, koçların kendisi yerine genetik materyalinin (semen) aktarımı alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Moore ve Hasler 2017). Ancak spermanın hem ejakülasyon sonrası kısa bir yaşam ömrüne sahip olması hem de dış faktörlerden kolaylıkla etkilenmesinden dolayı spermanın transportu sınırlı düzeyde kalmıştır. Bu nedenle spermanın geniş bir alana aktarılabilmesi ve istenilen süre boyunca canlı ve fertil olarak saklanabilmesi için spermatozoon metabolizmasının geri dönüşümlü (reverzible) olarak baskılanması gerekmektedir (Maxwell ve Watson, 1996). Spermanın metabolizmasının baskılanması ve daha uzun süre saklanması sıcaklığının +5°C'a düşürülerek kısa süreli saklama ya da

spermanın dondurularak uzun süreli saklanması (kriyoprezervasyon) ile olasıdır (Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Maxwell ve Watson, 1996; Salamon ve Maxwell, 1995; Salamon ve Maxwell, 2000).

Dondurulup-eritilmiş sperma ile yapılan suni tohumlama uygulaması, hayvancılık üreme biyoteknolojisinde önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle, spermanın dondurulması; elde edilecek fertilitite oranı açısından en az suni tohumlama kadar önem kazanmıştır (Kulaksız ve Daşkın, 2009; Maxwell ve Watson, 1996). Ancak, spermanın dondurularak saklanması; sperm hücresinde yapısal, biyokimyasal ve fonksiyonel bozukluklara neden olmakta, tüm bu bozuklukların sonucu olarak spermatozoonun motilitesi, canlılığı ve fertilizasyon yeteneğinde önemli düşüşler oluşmaktadır (Leboeuf ve ark., 2000). Bu nedenle, dondurulmuş spermanın fertilitésinin taze spermaya göre daha düşük kaldığı söylenebilir (Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Maxwell ve Watson, 1996; Salamon ve Maxwell, 1995; Salamon ve Maxwell, 2000). Ayrıca, günümüzde dondurulup-eritilmiş koç sperması ile yapılan suni tohumlama sonucu elde edilen başarı oranı, diğer çiftlik hayvanlarından elde edilen suni tohumlama başarı oranlarına göre düşüktür (Maxwell ve Watson, 1996). Elde edilen düşük fertilitite sonuçlarının nedenleri şu şekilde sıralanabilir:

- Koç spermasının biyokimyasal yapısı (yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidi içeren plazma membranı, koç spermasını diğer memeli hayvanların spermalarına göre daha duyarlı yapmaktadır),
- Koç spermasının dondurulmasında kullanılan sulandırıcıların, sperma dondurma ve tohumlama tekniklerinin yeterince geliştirilememiş olması,
- Koç spermasının dondurulması ve suni tohumlama uygulamalarında türe özgü yöntemlerin yerine diğer çiftlik hayvanlarında kullanılan yöntemlerin kullanılması.

Günümüzde, koç spermasının dondurulmasında uygun sulandırıcının geliştirilerek yüksek oranda motilite, plazma membran bütünlüğü, akrozomal bütünlük, DNA bütünlük oranları elde edilmesi amaçlanmıştır (Alçay ve ark., 2015; Abdelhakem ve ark., 1991a; Abdelhakem ve ark., 1991b; Arando ve ark., 2019; Banday ve ark., 2017; Uysal ve Bucak,

2007; Nur ve ark., 2010; Toker ve ark., 2016; Üstüner ve ark.,2014; Üstüner ve ark., 2016). Böylelikle optimum *in vivo* ve *in vitro* fertilizasyon sonuçları elde etmek hedeflenmektedir.

Son yıllarda yapılan birçok araştırmada seminal plazma proteinlerinin spermanın dondurulması üzerinde çeşitli etkileri olduğu ortaya konmuştur (Hafez 1993; Perez Pe ve ark., 2001; Üstüner ve ark., 2009; Üstüner ve ark., 2018). Seminal plazmanın, dondurma-eritme işlemleri sırasında, bu koruyucu etkisini içerisindeki protein fraksiyonu, lipoproteinler ve antioksidanlar aracılığıyla sağladığı belirtilmektedir (Lahnsteiner 2007; Muino-Blanco ve ark., 2008; Perez Pe ve ark., 2001). Farklı türlerde yapılan araştırmalarda, kriyoprezervasyon sırasında seminal plazma proteinlerinin spermatozoon membranına penetre olmasıyla, spermayı soğuk şoku ve oksidatif stres gibi *in vitro* koşullara karşı koruduğu bildirilmektedir (Lahnsteiner, 2007; Muino-Blanco ve ark., 2008; Perez Pe ve ark., 2001). Benzer şekilde, seminal plazmanın koç spermasının dondurulması üzerine etkisini inceleyen araştırmalarda, gerek dondurma-eritme sonrası motilitenin korunmasında gerekse spermatozoon üzerindeki lokal membran hasarının onarılmasında önemli bir etkisi olduğunu bildirilmektedir (Perez ve ark., 2001) Ancak, koç seminal plazmasının protein miktar ve kompozisyonu mevsime bağlı olarak değişim göstermektedir (Cardozo ve ark., 2006; Perez Pe ve ark., 2001). Konu ile ilgili yapılan araştırmalarda, üreme mevsimi içerisinde, koç seminal plazma proteininin miktarının 40,4 mg/ml, üreme mevsimi dışında ise 30,7 mg/ml'ye düştüğü bildirilmektedir (Fiser ve Fairfull, 1986; Marti ve ark., 2007). Dolayısıyla, aşım mevsimi dışında koç seminal plazmasındaki protein yoğunluğunun azalmasına bağlı olarak, koç spermasının soğuk şokuna ve kriyoprezervasyonun diğer zararlı etkilerine karşı daha duyarlı duruma gelmesi söz konusu olmaktadır.

Bu nedenle, sunulan tez çalışması iki ana hipotez içermektedir.

1. Sperma sulandırıcısına katılan alabalık seminal plazması (ASP) üreme mevsimi dışında koç spermasının dondurulabilirliği ve dondurma-eritme sonrası inkübasyon direncini artırmaya katkı sağlayacaktır.
2. ASP ile sistein kombine edilerek ASP'nin koç spermasının dondurulabilirliği üzerindeki etkisini daha da artırmak olası olacaktır.

Bu hipotezlerin kurulmasında göz önünde bulunduran teorik bilgiler şöyle sıralanabilir:

- Alabalıklar sıcaklığı 10-15 °C arasında değişen sularda dış döllenme ile üreyen canlılar oldukları için alabalık sperması düşük sıcaklığa karşı daha dayanıklıdır (Nynca ve ark., 2014; Shaliutina-Kolešová ve ark., 2016).
- ASP tür spesifik proteinler de dahil olmak üzere zengin protein içeriğe sahiptir (Nynca ve ark., 2014).
- ASP antioksidan kaynaklı enzim ve aminoasit/proteinlerce zengin bir yapısı vardır (Ciereszko ve Dabrowski, 1995; Lahnsteiner, 2009; Lahnsteiner ve ark., 2010).
- ASP metiyonine zengin olmasına karşın, içerdiği sistein miktarı eser düzeylerde kalmaktadır (Lahnsteiner, 2009; Nynca ve ark., 2014).
- Metiyonin ve sisteinin sinerjik etkisi, antioksidan mekanizma için önemlidir (Karafakıoğlu, 2010).

Konu ile ilgili tüm bu bilgiler kapsamında, söz konusu çalışma, alabalık seminal plazmasının, Tris bazlı sulandırıcıya tek başına ya da 1 mM sistein ile beraber eklenmesi ile ASP-sistein kombinasyonunun koç spermasının dondurma başarısı ve inkübasyon direnci üzerine etkisini belirlemek amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla, kontrol ve deneme grubu sulandırıcıları ile dondurulan koç spermalarının dondurma-eritme ve inkübasyon sonrası motilite, plazma membran fonksiyonel bütünlüğü, akrozom ve DNA hasar oranları belirlenmiştir. Böylelikle, koç spermasının dondurulmasında başarılı olan alabalık seminal plazması konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Koyunlar mevsime bağı olarak östrus gösteren (mevsimsel poliöstrik) hayvanlar olup, östrus siklus uzunlukları ortalama olarak 16-17 gündür. Koyunlarda siklik aktivitenin başlaması, gün ışığının azalmasına bağı olarak, pineal bezden salgılanan melatonin hormonunun hipotalamustan GnRH ve dolayısıyla hipofizden gonadotropik hormonların salınımını uyarması ile ilişkilendirilmektedir (Hafez, 1993; McDonald ve Pineda, 1989). Ülkemizin de içinde bulunduğu kuzey yarım kürede koyunların seksüel aktiviteleri sonbahar ve kış mevsiminde gözlenir. Tropikal bölgelerde ise söz konusu canlılar daha uzun süre ya da mevsime bağı olmaksızın seksüel aktivite gösterebilirler (İleri ve ark., 2000). Koçların seksüel olgunluk olarak da bilinen pubertaya girişi de benzer şekilde mevsim ile ilişkilidir. Kuzulama mevsimi başlangıcında doğan erkek kuzular yaklaşık 4 aylık yaşta cinsel olgunluğa ulaşırken; geç dönemde doğan kuzuların pubertaya ulaşması bir sonraki üreme sezonuna kadar uzamaktadır (McDonald ve Pineda, 1989). Koçlarda mevsim yalnızca pubertaya ulaşma yaşını değil, sperma kalitesini de etkilemektedir (Hafez, 1993).

Her ne kadar koçlar mevsimin etkisine bağı olarak 4 aylık yaşta pubertaya ulaşmış olsalar da; koçların damızlık olarak kullanılması 9-16 aylık döneme karşılık gelmektedir. Damızlık kullanım yaşına erişmiş iyi bir koç, koyunlarla birlikte sürü içersinde bulundurulduğunda bir aşım mevsiminde 25-50, ortalama 30 koyuna aşım yapabilir (Hafez ve Hafez, 2000). Oysa ki spermanın alınması ve suni tohumlama yöntemi ile tek bir koçtan (koçu yormadan ya da ejakülat rezervini tüketmeden) yüzlerce koyun tohumlanabilmektedir (Özkoca, 1984).

2.1. Suni Tohumlamanın Tarihçesi

Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde kullanılan ilk biyoteknolojik faaliyet olan suni tohumlama, ilk kez 20. yy başlarında Rusya’da uygulanmaya başlamıştır (Emsen ve Koşum 2009). Ülkemiz ise suni tohumlama uygulamasının yapıldığı ikinci ülke olarak göze çarpmaktadır. İlk kez 1926 yılında Karacabey Harasında Türk veteriner hekimlere reproduksiyon, infertilite ve suni tohumlama eğitimleri verilmiştir. Yurtiçi ıslah politikalarından biri olan “Merinoslaştırma” çalışmaları kapsamında 1950 yılından itibaren koyunlarda suni tohumlama yaygınlaşmaya başlayıp 1970 yılında 300 suni tohumlama istasyonunda yaklaşık 300,000 suni tohumlama yapılmıştır (Koşum 2006). Ancak, ülkemizde gerçekleştirilen bu suni tohumlama politikası “Merinoslaştırma Projesi” ile sınırlı kalmış ve 1980 yılında proje durdurulmuştur. Diğer ülkelerdeki suni tohumlama etkinliklerine bakıldığında, son yıllarda sığır ve domuz gibi çiftlik hayvanlarında yaygın olarak kullanılmasına karşın koyun yetiştiriciliğinde sınırlı düzeyde kalmıştır. Bu durumun en önemli nedeni olarak; koyunlarda geleneksel suni tohumlama başarısının sığır ve domuzlar kadar yüksek olmaması gösterilmektedir.

2.2. Koyunlarda Suni Tohumlamayı Sınırlandıran Faktörler

Koyunlarda suni tohumlama başarısını sınırlandıran faktörleri koyunların anatomik yapısı ve koç spermasının yapısına bağlı faktörler olarak sınıflandırmak olasıdır.

Spermanın doğal aşım sırasında karşılaştığı ilk engel servikstir (İleri ve ark., 2000). Servikal halkalar yalnızca doğal aşım esnasında değil, suni tohumlama yaparken de engel oluşturmaktadır (İleri ve ark., 2000). Yapılan vajinal ya da servikal tohumlamaların ardından spermanın büyük bir kısmı serviks halkalarına takılarak uterus ve ardından tuba uterinaya ulaşamamakta ve suni tohumlama başarısı beklenen düzeylerin altında kalmaktadır (Ritar ve Salamon, 1983). Eppleston ve Maxwell (1993) suni tohumlama sırasında spermanın bırakıldığı bölgenin derinliğinin her 1 cm artışının tohumlama başarısını %7-12 artırdığını ileri sürmüştür. Bu nedenle, Eppleston ve Maxwell (1992)

sunî tohumlama uygulamasında spermayı korpus uteriye bırakarak fertilité oranını artırmayı önermektedir.

Koyunlarda serviks yaklaşık 9 cm uzunluğunda olup 5 adet serviks halkası içermektedir (İleri ve ark., 2000). Söz konusu serviks halkalarının küçük açıklıkları vardır; açıklıkların ölçüsü östrus döneminde değişiklik göstermemektedir. Koyun serviksini açıklanan anatomik yapısı sunî tohumlama sırasında sunî tohumlama kataterinin serviks halkalarını geçerek ilerlemesini, dolayısıyla sunî tohumlama başarısını sınırlandırmaktadır.

Koyunlarda sunî tohumlama başarısını sınırlandıran bir diğér faktör ise koç spermasının yapısı nedeniyle kriyoprezervasyon işlemine duyarlı olması ve dondurma-eritme işlemleri sonrası, diğér çiftlik hayvanlarına göre, motilité ve diğér fonksiyonel özelliklerinin daha düşük olmasıdır (İleri ve ark., 2000). Koç spermasının dondurma-eritme işlemlerine daha duyarlı olması; membran yapısında yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) bulundurmasından ileri gelmektedir. PUFA oranının yanısıra; plazma membranında bulunan kolesterol/fosfolipit oranı da spermanın dondurma başarısını etkileyen bir diğér faktör olarak göze çarpmaktadır. Membran yapısında bulunan kolesterol, düşük sıcaklıklarda membran sıvı akışkan yapısının korunmasında etkili olarak spermayı düşük sıcaklıkların zararlı etkisinden korumaktadır (White, 1993). Salmon ve ark. (2017), membran kolesterol/fosfolipit oranının artmasının, spermanın soğuk şokuna duyarlılığını azalttığını bildirmişlerdir. İnsan spermasında 0,99 gibi yüksek kolesterol/fosfolipit oranı bulunurken (Drobnis ve ark., 1993); koç spermasında bu oran 0,37 olarak belirtilmektedir (Davis, 1981).

Koç spermasının yapısı bakımından dondurma-eritme işlemleri sonrası düşük fertilité sonuçlarının elde edilmesi, araştırmacıları koç spermasının dondurulmasında sulandırıcı içeriği, spermanın soğutma ve dondurma hızı üzerinde değişiklik yapmaya yönlendirmiştir.

2.3. Koç Spermasının Özellikleri ve Spermanın Değerlendirilmesi

Sperma; testisler tarafından üretilen erkek genetik materyal (spermatozoa) ve bu genetik materyalin içinde bulunduğu sıvı ortamın (seminal plazma [SP]) bileşiminden oluşmaktadır. Bu bileşim içerisinde spermatozoon; genetik özelliklerin bir sonraki jenerasyona aktarımı için gerekli olan hücresel komponent iken; seminal plazma ise spermatozoonun taşınması, beslenmesi, korunması ve yaşamını sürdürebilmesi için gerekli olan özel yaşam ortamı olarak değerlendirilmektedir (Setchell, 2014).

2.3.1. Koç Seminal Plazma İçeriği

Seminal plazma; epididimis, vas deferens, veziküla seminalis, prostat ve bulboüretal bez salgılarının karışımından oluşan, içerisinde spermanın fonksiyonu, yaşaması, korunması, taşınması, beslenmesi için gerekli organik ve inorganik maddeleri içeren sıvı-kolloid bir ortamdır (İleri ve ark., 2000; Setchell, 2014). Somatik hücrenin aksine, sitoplazmasının büyük bir kısmını kaybetmesi nedeniyle spermatozoonun biyosentetik kapasitesi daha sınırlıdır (Hammerstedt ve Parks, 1987). Bu nedenle; spermatozoonun fonksiyonunu sürdürebilmesi için dış faktörler (seminal plazma varlığı vb.) ve dış ortamla etkileşimi büyük önem taşımaktadır (Muino-Blanco ve ark., 2008).

2.3.1.1. Karbonhidrat

Seminal plazmanın karbonhidrat içeriği spermatozoon metabolizmasının sürmesi için gerekli olan enerji gereksinimini karşılamaktadır. Memeli hayvanların kan plazmasında predominant karbonhidrat kaynağı olan glikozun yerini seminal plazmada fruktoz almıştır (Mann, 1946). Domuz spermasında az miktarda glikoz ve bol miktarda inositol bulunmasına karşın, koç spermasının ana enerji kaynağı veziküla seminalis orijinli olduğu bilinen fruktozdur (Mann, 1946; Mann, 1951).

2.3.1.2. Protein ve Aminoasitler

Seminal plazma da diğer tüm vücut sıvıları gibi yüksek miktarda protein içermektedir (Pilch ve Mann, 2006). Bu seminal plazma proteinleri; kapasitasyon, oviduktta sperm rezervuarının sağlanması, uterin immün yanıtın baskılanması, spermanın dişi genital kanalda transportu ve dişi-erkek gamet hücreleri arası etkileşim gibi fertilizasyonun birçok aşamasında önem sergilemektedir (Topfer-Petersen ve ark., 2005). Bu proteinlerin bir bölümü, ejakülasyon sonrası seminal plazmada kalmayı sürdürürken; büyük bir bölümü ejakülattaki spermatozoonlarca absorbe edilerek spermatozoon yüzeyine yerleşirler (Desnoyers ve Manjunath, 1992; Metz ve ark., 1990). Seminal plazma orijinli bu membran proteinleri, dişi genital kanalda kapasitasyon başlayana kadar spermatozoonun membran stabilitesinin korunmasında etkin rol alırlar (Desnoyers ve Manjunath, 1992). Leptin, insülin, büyüme faktörü I (IGF-I), fosfolipit bağlayıcı proteinler gibi kimi spesifik proteinler ise kapasitasyon sırasında membran lipit modifikasyonunda görev alırlar (Lackey ve ark., 2002; Manjunath ve Therien, 2002).

Kimi seminal plazma proteinleri ise spermatozoon membranını soğuk şokuna karşı koruyarak ve dondurma prosedürüne bağlı prekapasitasyonu engelleyerek spermanın dondurma-eritme sonrası canlılığının korunmasına, dolayısıyla spermanın fertilitate yeteneğinin sürmesine yardımcı olurlar (Barrios ve ark., 2000; Barrios ve ark., 2005; Dominguez ve ark., 2007; Fernandez-Juan ve ark., 2006). Bu koruyucu özelliklerinden dolayı, koçlarda özellikle 2 adet veziküla seminalis kökenli seminal plazma proteini göze çarpmaktadır: 14 kDA ağırlıklı ram vesical seminal plasma protein 14 (RSVP14) ve 20 kDA ağırlıklı ram vesical seminal plasma protein 20 (RSVP 20) olduğu bildirilmiştir (Barrios ve ark., 2005). Diğer seminal plazma komponentleri gibi seminal plazma proteinlerinin de kompozisyonu ve niceliği mevsime göre değişiklik göstermektedir. Buna bağlı olarak seminal plazma proteinlerinin, özellikle soğuk şokuna karşı koruyucu etkisinin de mevsime göre değişebileceği öngörülmektedir (Cardozo ve ark., 2006; La Falci ve ark., 2002; Marti ve ark., 2007; Perez Pe ve ark., 2001).

Seminal plazma ayrıca önemli miktarda amino asit de içermektedir (Setchell, 2014). Koç ve boğa seminal plazması oldukça fazla glutamik asit içerirken, domuz seminal plazmasının ise hipotaurin bakımından zengin olduğu bildirilmektedir (Setchell ve ark., 1967; Van der Horst ve Grooten, 1966). Sözü edilen aminoasitlerin spermanın reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerinden korunmasında önemli rolleri vardır (Bucak ve ark., 2009). Koç sperması, aynı zamanda, önemli oranda epididimis orijinli karnitin, gliserofosforilkolin ve gliserilfosforilositol içermektedir (Brooks, 1970; Brooks, 1979; Setchell, 2014). Söz konusu aminoasitler ejakülasyonun hemen ardından fosfotaz enziminin etkisiyle serbest fosforik asit ve koline yıkımlanmaktadır (İleri ve ark., 2000).

2.3.1.3. Lipitler ve Yağ Asitleri

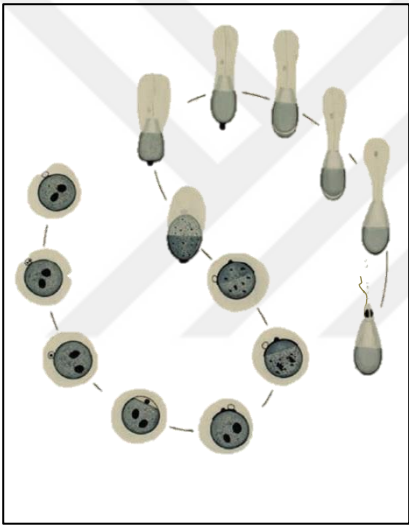
Sperma bol miktarda nötral yağlar ve fosfolipit içermesine karşın, bu maddelerin büyük çoğunluğu spermatozoonun içerisinde yer almaktadır (Hartree ve Mann 1961) Ayrıca, sperma içerisinde bol miktarda progesteron, dihidrotestosteron, androstanadiol, östrojen gibi steroidler de bulunmaktadır (Setchell, 2014). Östrojen, genel olarak prostat kaynaklı iken diğer steroidlerin epididimis kökenli olduğu bildirilmektedir (Ganjam ve Amann, 1976). Seminal plazmadaki testosteron oranı, kan plazmasındaki testosteron oranı ile benzer bulunurken, epididimisinde bulunan yoğunluğundan düşük olarak saptanmıştır (Ganjam ve Amann, 1976). Seminal plazma içerisinde bulunan bir diğer içerik olan prostaglandin ise, 1930 yılında keşfedildiğinde, prostat kaynaklı olduğu düşünülüp bu ismi almasına karşın, koç ve boğalarda büyük oranda veziküla seminalis, az miktarda ise testis ve epididimisten köken aldığı bildirilmiştir (Kelly, 1978; Voglmayr, 1973).

2.3.1.4. Diğer Seminal Plazma Komponentleri

Memeli hayvan seminal plazmasında oldukça fazla fosfor bulunmaktadır (İleri ve ark., 2000). Fertilité ile ilişkili olduğu düşünülen ve antioksidan özelliği ile ön plana çıkan askorbik asitin yanı sıra seminal plazma; tiamin, riboflavin, pentatonik asit ve niasin gibi B kompleks vitaminleri de içermektedir (İleri ve ark., 2000). Fosfataz, glutamik

oksalasetik transaminaz, glutamik piruvik transaminaz ve laktik dehidrogenaz gibi spermatozoon metabolizması için gerekli enzimler de, kimi zaman, spermatozoon içerisinden seminal plazmaya difüzyon yoluyla geçiş yapabildiğinden seminal plazmada saptanmaktadır (İleri ve ark., 2000). Ayrıca amonyak, kreatin ve üre gibi metabolizma ürünleri ile Ca, Cl, Fe, Mg, P, Na, K, SO₂, Zn vb inorganik moleküller de seminal plazma içerisinde bulunmaktadır (Çoyan ve ark., 2002).

2.3.2. Koç Spermatozoon Yapısı



Şekil 1: Spermiyogenezis Berndtson, 2014

Somatik hücrelerden farklı olarak, mayoz bölünme (spermatositogenezis) ile meydana gelen sperma hücresi haploid kromozom yapısına sahiptir. Koçlarda spermatogenezis postpartum 80-90. günlerde başlamakta, ejakülatta ise spermatazoaya 140-150 günlerde rastlanmaktadır (Kaymakçı ve Sönmez, 1992; Yarney ve ark., 1990).

Sperma hücresinin, fertilizasyon yeteneğine sahip olması için bir dizi morfolojik değişim (spermiyogenezis) geçirerek özelleşmesi gerekmektedir (Çoyan ve ark., 2002). Bu morfolojik değişimler, nükleusta meydana gelen değişimler (nükleusun uzaması) ve sitoplazmik değişimler (cep fazı, akrozom fazı, olgunlaşma fazı, sitoplazmanın kaudale gitmesi ve atılımı, lokomotor kompleks oluşumu) olarak sınıflandırılabilir (İleri ve ark., 2000).

Tüm bu değişimler sonrasında, normal vücut hücrelerinden farklı olarak, akrozomal kompleks ve kuyruğu bulunan, sitoplazma miktarı minimuma inmiş, spesifik bir hücre yapısı ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucunda, spermatozoonu morfolojik olarak baş, boyun, orta kısım ve kuyruk olmak üzere 4 bölüme ayırabiliriz.

Koç spermatozoonunun baş bölgesi 8,3 µm, boyun bölgesi 1 µm, orta bölüm 8-10 µm ve kuyruk bölümü 43-53 µm olmak üzere, toplamda yaklaşık olarak 60 µm uzunluktadır. Baş 4 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığındadır. Söz konusu spermatozoonun hacminin 31 µm³, yüzölçümünün ise 142 µm² olduğu bildirilmiştir (Curry ve ark. 2000).

2.3.2.1. Baş

Yassı ve oval yapıda olan spermatozoonun başı ekvatoryal segment ile ayrılmış olup akrozom ve nükleusu içermektedir (Kaya ve ark., 2014).

- Nükleus

Anterior bölümü akrozom tarafından sarılmış olan bu organel, başın büyük bir bölümünü oluşturmaktadır (İleri ve ark., 2000; Kaya ve ark., 2014). Nükleus diğer hücrelerde olduğu gibi genetik materyalin bulunduğu bölümdür, ancak spermatozoon nükleusunun şekli kendine özgüdür (İleri ve ark., 2000). Ayrıca, diğer vücut hücrelerinin tersine, spermatozoon DNA sarmalında histon proteinlerinin yerine protaminler bulunduğu için, spermatozoon DNA'sı çok daha kompakt bir durumdadır (Silva ve Gadella, 2006).

- Akrozom

Akrozom, spermiyogenez sırasında, golgi aygıtının değişiminden oluşan, spermatozoona özgü bir organeldir (İleri ve ark., 2000). Spermatozoonun anterior ve anterio-lateral bölümünde, hücre zarı ile nükleus arasına lokalize olmuş, hidrolitik enzimleri barındıran, vezikül benzeri bir yapı olan akrozom, spermatozoon için özelleşmiş lizozom olarak da değerlendirilebilir (Kaya ve ark., 2014). Spermatozoonun oositi fertilize etmesi (yoğun kumulus hücrelerini aşarak oosite penetre olması ve spermanın oosite füzyonu) ancak akrozomal kap içindeki enzimlerin [hyaluronidaz, corona penetreng enzyme (CPE), tripsin, tripsin like enzyme, proakrozozin, akrozozin, esteraz, neuraminidaz, asit fosfataz, aril fosfataz, β-N-asetilglukozaminidaz, arilamidaz, kollogenaz] fonksiyonu ile olasıdır (Eddy, 2006; İleri ve ark., 2000; Kaya ve ark., 2014; Mann ve Lutwak-Mann, 1981). Akrozomal kapta bulunan tüm enzimlerin işlevi net bir şekilde açıklanamamış olmakla birlikte, kimi spesifik enzimlerin görev ve önemi kapsamlı

bir şekilde açıklanmıştır (Kaya ve ark., 2014). Dış akrozomal membranla ilişkili olan hyalorinidaz, kumulus ooforus hücrelerini birbirine bağlayan hyaloronik asit bağlarını kopartarak dağılmasını ve spermatozoonun bu membranı geçip oosite ulaşmasına katkı sağlarken; CPE spermatozoonun korona radiataya penetrasyonunu sağlamaktadır (İleri ve ark., 2000). İç akrozomal membranla ilişkili enzimlerden olan akrozin ise tripsin benzeri bir enzim olup diğer proteolitik enzimlerle birlikte zona pellusida (ZP) üzerinde fertilizasyon yırtığını oluşturduğu ve fertilizasyon boyunca spermatozoonun zona pellusidaya tutunmasını sağladığı bilinmektedir (Gadella, 2013).

Tüm bu bilgiler ışığında, akrozomun ve akrozomal enzimlerin fertilizasyon için öneminin büyük olduğu ve akrozomal morfolojinin değerlendirilmesinin spermanın fertilite yeteneği hakkında önemli bir parametre olacağı sonucunu doğurmaktadır. Taze ya da dondurulup-eritilmiş sperma ile yüksek fertilite sonuçları elde etmek için, fertilizasyon bölgesine ulaşan spermatozoanın akrozomal bütünlüğünün olması gerekmektedir.

2.3.2.2. İmplantasyon Çukurluğu ve Boyun

Boyun, baş ile kuyruk bölümü arasındaki kısa bölge iken implantasyon çukurluğu ise başın kaudal ucundaki konkav kısım (bazal yumru) ile boynun konveks yüzeyi (kapitulum) arasındaki bağlantı bölgesidir (İleri ve ark., 2000). Boyun ve aksonema bir çift sentriol ve üçlü dairesel mikrotübülleri içermektedir. Bu sentriollerden proksimal olanı kapitulum, distal olanı ise aksonema formülasyonuna katılmaktadır (Fawcett, 1975; Sullivan, 1978).

2.3.2.3. Orta Bölüm ve Kuyruk

Orta bölüm, boyun ile annulus arasında kalan kuyruk bölgesi olmasına karşın, kuyruktan daha kalın olduğu için morfolojik muayenede kolaylıkla fark edilmektedir (İleri ve ark., 2000; Kaya ve ark., 2014). Annulus ise sperma kuyruğunun yapısal bir parçası olup orta bölüm ile esas kuyruk parçasını birbirine bağlamaktadır (Kaya ve ark., 2014).

Spermatozoonun bu bölümleri enerji kaynağı olan mitokondriyi taşıması, dolayısıyla hücrenin metabolik merkezi ve aktif hareket bölgesi olarak önem taşımaktadır (İleri ve ark., 2000; Kaya ve ark., 2014).

2.4. Spermatojik Muayene

Testislerde üretilen sperma, epididimiste olgunlaşarak motilite yeteneği kazanır (Franca ve ark., 2005). Doğal aşımında sperma ejakülasyon ile tür spesifik olarak dişi genital kanalın farklı yerlerine bırakılır (İleri ve ark., 2000). Suni tohumlama uygulamaları için sperma, suni vajina, elektroejakülasyon, elle masaj vb farklı yöntemlerle alınabilmektedir. Sperma alındıktan sonra ya taze olarak dişilere transfer edilir ya da daha sonra kullanılmak üzere saklanır. Bu amaçla sperma, sulandırma, +5°C'a soğutma, gliserilizasyon, ekilibrasyon, azot buharında bekletme, -196°C'a soğutma gibi bir dizi işlemlerden geçtikten sonra depo sıvı azot tanklarında saklanır. Suni tohumlama amacıyla -196°C sıvı azot tanklarından alınan sperma, tekniğine uygun bir şekilde (37°C, 30 sn) suda çözdürüldükten sonra, uygun tohumlama yöntemine göre dişi genital kanalın farklı bölgelerine transfer edilir (İleri ve ark., 2000). Doğal aşım ya da suni tohumlama sonrası spermatozoonun bir sonraki hedef noktası dişi genital kanalın isthmus bölgesi olmakta ve bu bölgeye gelene kadar dişi genital kanalda kapasitasyon adı verilen bir dizi morfolojik ve fonksiyonel değişimler geçirmektedir (İleri ve ark., 2000). Spermatozoon ovidukt kriptlerinde türlere göre 2 ile 6 saat arasında değişen süreçte kapasite olur (Hafez 1993; İleri ve ark., 2000). İstmus bölümüne vardıklarında spermatozoonların hareketleri yavaşlar ve hızları düşer. Ovulasyon sırasında oositin çevresindeki kumulus hücrelerinden salgılanan kemotaktik maddelerin etkisiyle spermatozoonlar yeniden hareketlenerek ampullaya doğru ilerlemeye devam ederler. Akrozom reaksiyonu şekillenen spermatozoon oosit dışındaki kumulus ve korona radyata dış katmanlarını geçer ve zona pellusidaya penetre olur. Bu süreçte hipermotilite yeteneği de kazanan spermatozoa zona pellusidada lokal bir gedik açarak önce oolemmaya penetre olur, ardından füzyon olayı şekillenir (İleri ve ark., 2000). Fertilizasyon denen bu olay ile dişi gamet hücresinin sitoplazmasına girmiş olan erkek pronükleusu, dişi pronükleus ile bir araya gelmekte ve

diploid kromozom yapılı embriyo gelişimi başlamaktadır (İleri ve ark., 2000). Reprodüktif biyoteknolojinin çalışma alanlarından olan *in vitro* fertilizasyon (IVF) ve intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemlerinde füzyon ve pronükleusların bir araya gelmesi laboratuvar koşullarında gerçekleştirilmektedir (İleri ve ark., 2000; Hafez, 1993). IVF yönteminde, oositin maturasyonu çok gazlı inkübatörlerde petri kapları içerisinde gerçekleştirilir. Benzer şekilde çok gazlı inkübatörlerde mature olan oosit ile kapasite edilmiş spermatozoon aynı petri kabı içerisinde fertilize edilir ve *in vitro* kültür medyumlarına aktarılarak embriyoların gelişimi sağlanır (İleri ve ark., 2000; Hafez, 1993). ICSI yönteminde ise erkek genetik materyal mikroenjektör yardımıyla oositin sitoplazmasına bırakılır. Böylelikle pronükleusların bir araya gelmesi ve diploid yapı oluşturması dışındaki tüm basamaklar bu yöntemle elimine edilir (Keskintepe ve ark., 2002). Gerek doğal çiftleşmede gerekse kullanılan suni tohumlama ya da IVF gibi biyoteknolojik yöntemlerde spermanın canlı, motilite yeteneği olan, plazma membran bütünlüğü ve metabolizmasını sürdürebilen, sağlam organel-akrozom ve DNA yapısına sahip olması gerekmektedir (Senger, 2003; Silva ve Gadella, 2006). ICSI yönteminde ise, spermatozoonun motilite, morfolojik ve fonksiyonel bütünlüğünün olmasından çok, embriyo gelişimi için DNA bütünlüğünün olması en önemli konudur (Keskintepe ve ark., 2002). Sperma ile ilgili tüm biyoteknolojik uygulamalar spermanın motilite yeteneğini, canlılığını, plazma membran yapısını, akrozom yapısını, metabolizmasını ve DNA bütünlüğünü az ya da çok etkilemektedir (Silva ve Gadella, 2006). Bu nedenle, reprodüktif biyoteknoloji uygulamalarından önce spermanın muayene edilerek spermatolojik özelliklerin değerlendirilmesi gerekir.

2.4.1. Makroskobik Muayene

2.4.1.1. Hacim

Sperma hacmi, bir ejakülyasyondan elde edilen toplam sperma miktarının mL olarak ölçülmesi; değerlendirilmesidir. Ejakülat ise testislerden üretilen spermatozoa ile testis ve (türler'e göre değişebilen) eklenti üreme bezleri salgılarının kompozisyonundan oluşmaktadır (İleri ve ark., 2000). Elde edilen ejakülat hacmi tür, yaş, ırk, mevsim, çevre koşulları, sperma alma yöntemi ya da sıklığına göre değişebilmektedir (İleri ve ark., 2000). Genel olarak, doğal çiftleşme ile spermasını uterusu bırakan türlerde (aygır, domuz, köpek) sperma hacmi daha fazla olmaktadır (Alçay ve ark., 2016). Ayrıca mevsime bağlı siklik aktivite gösteren hayvan türlerinde (küçük ruminant ve tek tırnaklılar) mevsimin sperma hacmi üzerinde önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir (Çoyan ve ark., 2002).

Ergin bir koçun sperma hacmi 0,5-2 mL arasında değişmekle birlikte, yukarıda belirtilen faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (İleri ve ark., 2000; Setchell, 1991). Çeşitli çalışmalarda, suni vajina ile elde edilen koç spermasının hacmi 0,8-1,31 mL arasında iken (Ak ve ark., 1994; İleri, 1985; Özkoca, 1984); elektroejakulatör yöntemi ile elde edilen koç spermasının hacmi ise 0,89-1,4 mL arasında değişmektedir (Ak ve ark., 1995; Mattner ve Voglmayr 1962).

2.4.1.2. Renk ve Koku

Memeli sperması genel olarak açık-koyu krem arası bir renk skalasında bulunmaktadır. Spermatozoon yoğunluğu arttıkça renk koyulaşmakta, yoğunluğunun azalması ise açık krem renkli sperma görüntüsüne neden olmaktadır (İleri ve ark., 2000). Ayrıca tür ya da beslenmeye bağlı olarak spermada fizyolojik renk değişimleri de gözlemlenmektedir. Örneğin, teke sperması fizyolojik olarak sarımsı-yeşilimsi renk iken; beta-karoten ağırlıklı beslenme sonucu koç ve boğalarda sarı renkli sperma görülebilmektedir (İleri ve ark., 2000).

Sağlıklı ve spermatozoon yoğunluğu normal değerlerde olan koç sperması, koyu krem rengi olarak gözlemlenir; spermatozoon yoğunluğundaki düşüşe bağlı olarak spermanın rengi açık krem rengi ya da bulanık görünümlü olabilir (Sevinç, 1977)

2.4.1.3. Viskozite

Viskozite, spermanın kıvamı olarak değerlendirilmektedir ve bu kıvam akışkanlık ile ölçülmektedir. Sperma içerisindeki spermatozoon sayısı (yoğunluk) arttıkça spermanın viskozitesi artmakta, akışkanlığı ise azalmaktadır (İleri ve ark., 2000). Viskozitenin fizyolojik sınırların altında olması, spermatozoon yoğunluğunun düşük olduğunu göstermekte, dolayısıyla spermanın fertilizasyon yeteneği hakkında soru işareti oluşturmaktadır; çok yüksek viskozite ise spermatozoonun ilerleme hızını düşürmektedir (Alçay ve ark., 2016).

2.4.2. Mikroskopik Muayene

2.4.2.1. Mass Aktivite ve Motilite

Kitle hareketi olarak da bilinen mass aktivite koç, teke, horoz gibi spermatozoon miktarı yoğun olan taze spermalarda ejakülatın motilite, yoğunluk ve fertilitite yeteneği konusunda ön bilgi veren spermatolojik bir parametredir (Hafez, 1993). Bu muayene yönteminde, spermatozoonun bireysel hareketleri ayırt edilememekte, ancak, binlerce spermatozoonun toplu kaynama-dalgalanma hareketi gözlemlenmektedir. Mikroskopik muayenenin ilk adımı olan bu yöntemde, taze spermanın dalgalanma-kaynama hareketi gösterip göstermemesi ve bu hareketin hızına göre (+)'den (++++)'e kadar puanlama yapılmakta, en yüksek kitle hareketi (++++) olarak değerlendirilmektedir. Kimi araştırmacılar ise mass aktiviteyi değerlendirmek için 0-5 veya 0-10 arası skalayı kullanmaktadır (İleri ve ark., 2000). Fizyolojik koşullarda koç spermasının kitle hareketi +++ ile ++++ arasındadır (İleri ve ark., 2000).

Motilite muayenesi ise, spermatozoonun bireysel olarak ileriye doğru hareket etme (başı doğrultusunda ilerleme) yeteneğinin değerlendirilmesidir (İleri ve ark., 2000). Diğer bir deyişle; ejakülat içerisinde ileriye doğru, başı yönünde hareket eden spermatozoa yüzdesi motilite olarak tanımlanmaktadır (Hafez, 1993). Spermatozoonun dişi genital kanalda ilerleyerek fertilizasyon bölgesine ulaşması, oosit yüzeyinde bulunan korona radyata ve zona pellusidaya penetre olması önemli oranda motilite yüzdesi ile doğru orantılıdır (Hafez, 1993). Motilite spermatozoanın içerisinde bulunduğu sıvının (seminal plazma/sulandırıcı) biyokimyasal içeriği, osmotik basıncı, sıcaklığı ve yoğunluğundan etkilenmektedir (Hafez, 1993). Mass aktivitenin tersine bu muayene tüm hayvanların taze ve dondurulmuş-eritilmiş spermasında yapılabilir (İleri ve ark., 2000). Bu nedenle, motilite muayenesi, dondurulmuş-eritilmiş spermada kalite değerlendirmesinde en önemli parametrelerden sayılmaktadır (İleri ve ark., 2000). Önceden 37 °C'a ısıtılmış lam üzerine alınan sperma örneğinin üzeri lamel ile kapatılarak ısıtıcı tablalı faz kontrast mikroskop altında incelenir ve başı yönünde hareket eden spermatozoonların % oranı olarak belirlenir (İleri ve ark., 2000).

Çeşitli araştırmacılar suni vajina ile elde edilen koç spermasında motilite oranının %76-%94 arasında değiştiğini bildirmişlerdir (Ak ve ark., 1994; İleri, 1985; Ledesma ve ark., 2015; Özkoca, 1984). Koçlardan elektroejakülasyon yöntemi ile sperma elde edilen çeşitli çalışmalarda ise motilite oranı %78-%90 arasında değişmektedir (Ak ve ark., 1995; Ledesma ve ark., 2015; Mathur ve ark., 1989; Mattner ve Voglmayr 1962; Pontbriand ve ark., 1989).

Taze sperma bulguları göz önünde bulundurulduğunda, koçlar ortalama %85-%90 ile en yüksek motilite değeri olan hayvanlar arasındadır (İleri ve ark., 2000). Ancak, koç spermasının biyokimyasal yapısı nedeniyle dondurma-eritme sonrası motilite oranı önemli oranda düşmektedir. Bu nedenle, dondurulmuş-eritilmiş koç spermasının motilite oranı genellikle diğer çiftlik hayvanlarının spermasından düşük kalmaktadır (İleri ve ark., 2000; Hafez, 1993). Koç spermasının dondurma-eritme sonrası motilite oranları, sulandırıcının içeriği, sulandırma oranı, dondurma hızı gibi dış faktörlere bağlı olarak %31,13 ile %68,00 oranında değişmektedir (Alcay ve ark.,2017; Alcay ve ark., 2018;

Arando ve ark., 2019; Nur ve ark., 2010; Sharafi ve ark., 2015; Silva ve ark., 2012; Toker ve ark., 2016; Üstüner ve ark., 2016; Zhandi ve Sharafi, 2015).

2.4.2.2. Yoğunluk

Yoğunluk, spermanın 1 ml'sindeki spermatozoon sayısı olarak değerlendirilmektedir. Yoğunluk tayini sperma kalitesi ve fertilizasyon yeteneği hakkında fikir vermekle birlikte, sperma sulandırma oranının belirlenmesi için de önemli bir analiz yöntemidir (Hafez, 1993).

Spermanın yoğunluğu, testislerden üretilen spermatozoon sayısı kadar, eklenti üreme bezlerince salgılanan seminal plazma miktarı ile de ilişkilidir. Bu nedenle, spermatozoon yoğunluğu hayvanın yaşı, hastalıklar, beslenme durumu ve sperma alma yöntemi gibi spermatozoon üretimini etkileyen durumlarla doğrudan ilişkili olduğu kadar, sperma alma yönteminden de etkilenmektedir (Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000). Örneğin elektroejakülatör yöntemi ile sperma alındığında, eklenti üreme bezleri suni vajen yöntemine göre daha fazla uyarıldığı için seminal plazma miktarı yüksek, ancak, spermatozoon yoğunluğu düşük olan ejakülat elde edilmektedir (Sathe ve Shipley 2014). Spermanın suni vajen ile elde edildiği çeşitli çalışmalarda koç sperma yoğunluğu $2,01-2,8 \times 10^9$ spt/mL arasında değişirken (Ak ve ark., 1994; İleri, 1985; Özkoca, 1984); elektroejakülasyon yöntemi sonrası elde edilen sperma yoğunluk değerleri $1,87-3,56 \times /\text{mL}$ arasında değişmektedir (Ak ve ark., 1995; Mathur ve ark., 1989; Mattner ve Voglmayr 1962). Evans ve Maxwell (1987), iyi kaliteli damızlık bir koç spermasının 1 ml'sinde $3,5-6 \times 10^9$ spermatozoon bulundurması gerektiğini vurgularken; Setchell (1991), ortalama koç sperması yoğunluğunu $2-5 \times 10^9$ spt/mL olarak bildirmiştir.

2.4.2.3. Morfolojik Muayene

Spermanın potansiyel fertilitésinin belirlenmesinde bir diğer önemli değerlendirme yöntemi morfolojik muayenedir. Morfolojik bozuklukların sınıflandırılmasında geçmişten günümüze farklı yöntemler kullanılmıştır. Örneğin, majör-minör bozukluklar, primer-sekonder bozukluklar ve morfolojik bozukluğun lokalize olduğu yere göre sınıflandırmak olasıdır (İleri ve ark., 2000).

2.4.2.3.1. Akrozom

Akrozom; spermanın golgi cisimciği ve endoplazmik retikulumundan köken alan asidik yapıda salgılar içeren bir organeldir (Kaya ve ark., 2014). Spermatozoon-zona pellusida etkileşimi ile akrozom reaksiyonunun tetiklenmesi sonucu akrozom içerisindeki hidrolitik enzimler dışarıya salınarak aktive olurlar. Böylelikle, enzimler, spermatozoonun zona pellusidaya penetre olduğu noktada lizis oluşturarak erkek genetik materyalin oosit içerisine füzyonunu sağlar. Bu füzyonun şekillenmesi için ortamda hipermotil (kapasitasyon gerçekleşmiş, akrozom reaksiyonu gösterebilecek) spermatozoon bulunması ve bu spermatozoonun zona pellusidaya penetrasyonu gerekmektedir (Honda ve ark., 2002; Ramalho ve ark., 2002). Spermanın potansiyel fertilitésinin belirlenmesinde, akrozomal bütünlüğün korunması kadar, akrozom reaksiyonunun şekillenebilmesi de önemlidir. Akrozom reaksiyonunun erken ya da geç şekillenmesi de spermanın fertilité yeteneğinde değişimlere neden olmaktadır. Akrozom reaksiyonunun, spermatozoonların oositin zona pellusidasına penetre olduğu zaman diliminde olması beklenmektedir (Silva ve Gadella, 2006).

Akrozomal bütünlüğün saptanmasında, genellikle floresan özellikli konjuge lektin kullanılmaktadır. Memeli hayvalarda akrozom muayenesi için kullanılan lektin, genellikle soya fasulyesinden (*Pisum Sativum* [PSA]) ya da yer fasulyesinden (*Arachis hypogea* [PNA]) elde edilirken; insan sperması akrozom yapısının değerlendirilmesinde genellikle cancanavalin A lektin (conA) kullanılmaktadır (Holden ve ark., 1990; Sathe ve Shipley

2014). Lektin konjugatları, akrozomda lokalize olmuş spesifik glikoproteinlerin karbonhidrat bölümlerine bağlanmaktadır (Silva ve Gadella, 2006). PNA dış akrozomal membrana spesifik iken (Cheng ve ark., 1998; Flesch ve ark., 1998); PSA akrozomal matriks glikoproteinlerini işaretlemekte, ayrıca, az miktarda da olsa plazma membranına da bağlanabilmektedir (Flesch ve ark., 1998).

Çeşitli çalışmalarda taze koç spermasına ait akrozomal hasar değerleri %3,53 ile %42,44 arasında değişmektedir (Alçay ve ark., 2015; Banday ve ark., 2017; Dai ve ark., 2019; Nur ve ark., 2010; Üstüner ve ark., 2016). Taze koç spermasına ait akrozomal hasar oranının %10'u aşmaması istenmektedir (İleri ve ark., 2000). Dondurma-eritme işlemleri sonrası koç spermasına ait akrozomal hasar oranı ise; %23,40 ile %59,70 arasında değişiklik göstermektedir (Alçay ve ark., 2017; Alçay ve ark., 2018; Banday ve ark., 2017; Bittencourt ve ark., 2018; Bucak ve ark., 2013; Nur ve ark., 2010; Toker ve ark., 2016; Üstüner ve ark., 2016)

2.4.2.3.2. Başa Ait Bozukluklar ve Diğer Morfolojik Bozukluklar

Spermatozoonun normal morfolojik yapısının bozulması, fekdasyon ve fertilizasyon yeteneğinde azalmaya neden olmaktadır (Çoyan ve ark., 2002; İleri ve ark., 2000). Taze ya da dondurulup-çözdürülmüş spermada morfolojik muayene yapmak amacıyla gimza, karras, eosin-nigrosin, çini mürekkebi, metilen mavisi gibi boyama yöntemleri kullanılmaktadır (Çoyan ve ark., 2002; İleri ve ark., 2000). Ejakülasyon sonrası koç spermasının fertilitite yeteneğinin yeterli olması için total morfolojik bozukluk oranının %20, akrozoma bağlı morfolojik bozukluk oranının %10, baş bölgesine ait morfolojik bozukluk oranının ise %5'i aşmaması istenmektedir (Çoyan ve ark., 2002; İleri ve ark., 2000).

2.4.2.4. Ölü-Canlı Muayenesi ve Plazma Membran Fonksiyonel Bütünlük Tespiti

Plazma membranı, tüm hücreyi sararak organelleri ve intrasellüler komponentleri bir arada tutmasının yanı sıra, seçici geçirgen zar yapısı ile hücre metabolizması için gerekli maddelerin (kimyasal içerikler, iyonlar ve diğer çözünebilir maddeler) geçişini düzenleyerek canlılığın sürdürülebilirliğini de sağlamaktadır (Silva ve Gadella, 2006). Olgun bir spermatozoonun total yaşamı için gerekli olan ATP'nin yaklaşık %90'ını heksoz şekerlerin (fruktoz, glikoz) anaerobik glikolizisi ile elde edilmektedir. Dolayısıyla, hücrenin canlılığını sürdürebilmesi için ortamda monosakkarit bulunması, bu monosakkaritlerin hücre içine alınabilmesi ve hücre içinde alınan monosakkaritlerin lize edilerek açığa enerji çıkması gerekmektedir (İleri ve ark., 2000; Marin ve ark., 2003). Spesifik plazma membran proteinleri yardımıyla hücre dışındaki glikoz ve fruktoz hücre içine alınmakta ve sperma yaşamını sürdürebilmek için gerekli enerji kaynağını bu şekilde sağlamaktadır (Angulo ve ark., 1998). Eğer bir spermatozoon, membran fonksiyonel bütünlüğünü koruyor ise canlı olarak değerlendirilmektedir. Membran fonksiyonel bütünlüğü olmayan spermatozoonlar hasarlı (ölü) olarak kabul edilmekte ve bu spermatozoonların *in vivo* fertilizasyon yeteneğinin olmadığı belirtilmektedir (Silva ve Gadella, 2006). Suni tohumlama ve IVF ile başarılı sonuçlar elde edilebilmesi için plazma membran fonksiyonel bütünlüğünün sürekliliği son derece önemlidir (Silva ve Gadella, 2006).

Plazma membran bütünlüğünün saptanması için sağlam hücre membranından hücre içine geçemeyen boyalar (Hoescht 33258, YoPro-1, Propidium Iodide [PI], ToPro, TOTO vs.) kullanılır ve boyayı dışarıda tutan spermatozoonlar canlı olarak değerlendirilir (Silva ve Gadella, 2006; Üstüner ve ark., 2016). Plazma membranının kompakt yapısının sürekliliğinin yanı sıra membranın madde alışverişi fonksiyonunun da belirlenmesi amacıyla hipoozmotik şişme testi (HOST) kullanılmaktadır (Hauser ve ark., 1992). Taze koç spermasında ait plazma membran fonksiyonel bütünlük değerleri %50,89 ile %93,79 arasında değişirken (Banday ve ark., 2017; Dai ve ark., 2019; Ledesma ve ark., 2015; Mendoza ve ark., 2012; Üstüner ve ark., 2016); dondurulup-eritilmiş koç spermasında

aynı değerler %19,41 ile %60,57 arasında değişmektedir (Banday ve ark., 2017; Ledesma ve ark., 2015; Motlagh ve ark., 2014; Najafi ve ark., 2014; Sharafi ve ark., 2015).

2.4.2.5. DNA hasarının belirlenmesi

Spermatozoon DNA'sının bütünlüğünü koruması, embriyonun oluşumu ve gelişimi için çok önemlidir. Az miktardaki DNA hasarı, embriyonik gelişim sırasında tolere edilebilecekken, spermada gözlemlenen ciddi DNA hasarları infertiliteye neden olmaktadır (Seli ve ark., 2004). DNA tek/çift zincir kırığı olan bir spermatozoon zona pellusida ile etkileşime geçebilir, oositi fertilize edebilir ve ilk bölünme yarıklanması şekillenmiş embriyo açığa çıkabilir. Ancak, oluşan embriyonun 4-8 blastomerli yapıya ulaşmasının ardından apoptosis mekanizması başlamakta ve embriyo canlılığını sürdürememektedir (Ahmadi ve Ng 1999, Fatehi ve ark., 2006). Minimal düzeydeki spermatozoon DNA kırıklarının embriyonun dört blastomerli döneminine kadar olumsuz etki oluşturmamasının nedeni; spermatozoon DNA'sının protaminasyon denilen bir süreç sonrasında kompakt bir durum almasıdır (Morris ve ark., 2002). Fertilizasyon sonrası spermatozoon DNA'sının maternal DNA ile biraraya gelebilmesi için, spermatozoon DNA'sı aşamalı olarak kompakt yapısını yitirmektedir. İlk bölünme sırasında kompakt yapı göreceli olarak sürdüğü için, minimal paternal DNA hasarı bir sorun oluşturmazken, ilerleyen dönemlerde spermatozoon DNA'sının fragmantasyonu ve oksidasyonu nedeniyle embriyo gelişimi duracak ve erken embriyonik ölüm gerçekleşecektir (Morris ve ark., 2002). Dolayısıyla DNA hasarının fertilite üzerindeki olumsuz etkisi, spermanın fertilizasyonu yeteneğinin düşük olması nedeni değil, embriyonun yaşama yeteneğini düşürmesinden kaynaklı olduğu sonucu çıkarılmaktadır (Silva ve Gadella, 2006). Spermanın DNA hasarı farklı düzeylerde olabilmekte ve bu hasarın düzeyi embriyonun gelişimi ve canlılığını sürdürebilme yeteneğini etkilemektedir.

Sperma DNA hasarları oluş nedenlerine göre 3 kategori altında incelenmektedir:

- Kromatin paketlenmesi sırasında şekillenen hasarlar
- Reaktif oksijen türleri varlığına bağlı hasarlar
- Apoptozise bağlı DNA hasarları

Kromatin kondensasyonunun düzgün şekilde olması ve kromatinin düzgün kompakt yapıda olup olmadığının saptanması için COMET ASSAY; DNA tek veya çift zincir kırıklarının saptanması amacıyla Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) boyama yöntemi kullanılmaktadır (Silva ve Gadella, 2006). Taze koç spermasına ait DNA hasar oranı %1,7 ile %11,3 arasında değişmektedir (Mata-Campuzano ve ark., 2012; Mendoza ve ark., 2012; Nur ve ark., 2010). Çeşitli araştırmacılar dondurulup-eritilmiş koç spermasının DNA kırık oranının %1,5 ile %12,80 arasında değiştiğini bildirmişlerdir (Alcay ve ark., 2018; Bucak ve ark., 2013; Marti ve ark., 2007; Nur ve ark., 2010; Toker ve ark., 2016).

2.5. Spermanın Kriyoprezervasyonu

Kriyoprezervasyon, hücre, doku veya diğer canlıların (bakteri, fungi, bitki vb) tüm biyolojik aktivitelerinin geri dönüşümlü olarak durdurulması ve gelecekte kullanılması amacıyla sıfır derecenin altındaki sıcaklıklarda saklanmasını anlamına gelir (Cryogenetics, 2019). Sperma kriyoprezervasyonu ise, spermanın soğutulması, hücresel dehidrasyon ve dondurma basamaklarını içeren bir süreçtir (Medeiros ve ark., 2002). Spermatozoonlar düşük sıcaklıklara uyum sağlayamayan organik bir materyal olmasına karşın, uygun şekilde gerçekleştirilen kriyoprezervasyon yöntemleri ile canlılık ve diğer fonksiyonlarını yeniden geri kazanmaktadır (Medeiros ve ark., 2002). Ancak, kriyoprezervasyon spermanın uzun süreli saklanmasına olanak sağladığı gibi sperma için zararlı basamaklar da içermektedir. Spermanın dondurma-eritme işlemleri sırasında oluşan sıcaklık değişiminin sulandırıcı, kriyoprotektan ve membranlar arası sıvı transportu üzerine

önemli etkileri vardır. Dondurmanın ilk aşamasında örnekler, hızlı bir şekilde düşük sıcaklığa maruz kaldıklarından dolayı, hücrelerdeki su molekülleri yığınlar (kümeler) oluşturarak peşpeşe süren bir dizi reaksiyon başlatırlar (Holt ve Linda, 2014). Hızlı soğutma sonucu hücreler donma sıcaklığına ulaşırlar. Donma sıcaklığının altındaki daha düşük sıcaklıklarda ise rastgele şekillenen irili ufaklı buz kristalleri oluşur (Holt ve Linda, 2014). Buz kristallerinin oluşumu ekzotermik bir reaksiyon olduğundan, bu süreçte ortamda kristal oluşumunun hemen öncesinde sıcaklık artışı söz konusudur. Dolayısıyla, hücre içi ve hücreler arası sıcaklık ancak dondurma işlemi tamamlanmadan birkaç dakika önce dengeye ulaşır (Holt ve Linda, 2014). Dondurma işlemi sırasında fizyodinamik olarak şekillenen bu ısı değişimleri, payetlere çekilen spermanın azot buharında bekletilmesi sırasında şekillenmektedir. Dolayısıyla bu süreçte gerçekleşen hücre içi ve hücreler arası ısı değişimlerinin tolere edilebilir düzeyde olması gerekmektedir. Ters durumda hücre üzerinde daha fazla zararlı etki oluşturmaktadır (Holt ve Linda, 2014). Buz kristallerinin oluşumu ile hücreler arası ortamda su miktarı azalmasına bağlı olarak ortam, hipertonic özellik almaktadır. Hücrelerin donmamış olan bu konsantre içeriklerle ozmotik olarak etkileşime girmesi sonucunda hücre membranından su çıkışı şekillenmekte ve hücre büzüşmektedir (dehidrasyon) (Holt ve Linda, 2014).

Yukarıda sözü edilen spermanın dondurulma süreci birbiriyle etkileşim içinde olan iki yan etkiye neden olmaktadır;

- Soğutma hızı yavaş ise; hücrelerin hipertonic içerikle uzun süre birarada bulunmasına bağlı reaktif oksijen türleri (ROS) artışı ve yağ, protein ekstraksiyonu gibi zararlı etkiler oluşturmaktadır.
- Soğutma hızı çok yüksek ise; hücreden yeterli miktarda su çıkışı gerçekleşemeyeceği için lethal intrasellüler buz kristali oluşumu şekillenmektedir (Holt ve Linda, 2014).

Sperma, kriyoprezervasyon sırasında hem buz kristali hem de konsantre, donmamış içerik ile ilişkidir. Bu nedenle, kriyoprezervasyon sırasında kullanılacak solüsyonun

içeriği ve dondurma hızı, spermanın istenilen şekilde dondurulabilmesi için büyük önem taşımaktadır.

2.5.1. Kriyoprezervasyonun Sperma Üzerine Zararlı Etkileri

Kriyoprezervasyon esnasında soğutma hızı, ekilibrasyon, hücrede meydana gelen dehidrasyon, dondurma ve eritme aşamaları hücrede oluşan hasarları minimize etmek için dikkat edilmesi gereken kritik noktalardır. Sperma yukarıda bahsi geçen aşamaların her birinde az veya çok miktarda hasara uğrayarak fiziksel, biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklerini kaybetmekte, dolayısıyla spermanın motilite ve fertilizasyon yeteneğini belli düzeyde azalmaktadır (Medeiros ve ark., 2002).

Motilite ile birlikte viabilite ve plazma-akrozom membran bütünlüğünün bahsi geçen süreçler arasında en çok ekilibrasyon ve dondurma esnasında hasar gördüğü bilinmektedir (Ahmad ve ark., 2014). Dolayısıyla spermatozoon fiziksel hasarları; spermatozoonun plazma membranı, akrozomal membranı veya mitokondrial kılıfında meydana gelmekte ve beraberinde fonksiyonel hasara da neden olmaktadır (Salamon ve Maxwell, 1995; Salamon ve Maxwell, 2000). Spermatozoonun periferinde bulunan plazma ve dış akrozomal membran; iç akrozomal membran, çekirdek membranı ve orta kısma göre daha hassas olmakta dolayısıyla daha kolay hasar görmektedir (Salamon ve Maxwell, 2000). Bu olumsuz değişiklikler sonrasında, spermatozoada motilitenin düşüşü, spermanın dışi genital kanalda migrasyon yeteneğinin azalması ve servikal tohumlama sonrası fertilite oranının düşmesi gibi istenmeyen durumlar ortaya çıkmaktadır (Nur ve ark., 2010).

Genel olarak spermatozoonlarda meydana gelen bu hasarlar soğuk şoku, reaktif oksijen türlerinin artışı ve buz kristallerinin oluşumuna bağlı olarak da şekillenmektedir.

2.5.1.1. Soğuk Şoku

Spermanın uygun solüsyonlar ve soğutma hızı ile sıcaklığının 30°C'tan 15°C'a düşürülmesi sperma canlılığı ve fonksiyonu üzerinde önemli düzeyde etki oluşturmaz. Ancak, sıcaklığın daha düşük düzeylere hızlı bir şekilde inmesi, spermatozoonların yaşam faaliyetlerini, motilite ve fertilizasyon yeteneklerini düşürmektedir (Fiser ve Fairfull, 1986; Medeiros ve ark., 2002). Sperma özellikle 17°C'ın altındaki sıcaklık değişimine karşı daha duyarlı olmakta ve membran yapısında hem reversibl hem irreversibl değişiklikler oluşmaktadır. Bu olaya soğuk şoku adı verilmektedir (İleri ve ark., 2000). Spermanın soğuk şokuna duyarlılığı türden türe değişiklik göstermekte ve bu değişimin türler arasındaki spermatozoon membran kolesterol/fosfolipit oranındaki değişimden kaynaklandığı bilinmektedir (Darin-Bennet ve White, 1977; Medeiros ve ark., 2002). Sıcaklık düşüşü spermatozoonun plazma ve akrozomal membranların fosfolipitleri üzerinde termodinamik bir etki yaratarak membran morfolojisinde sıvı fazdan jel fazına doğru değişime neden olmaktadır. (Darin-Bennet ve White, 1977). Soğuk şokunun spermatozoon morfolojik yapısının yanı sıra fonksiyonel yapısı (seçici geçirgen yapı) üzerinde de değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (Medeiros ve ark., 2002). Spermatozoon membranlarında bulunan kolesterol/fosfolipit oranı arttıkça spermanın soğuk şokuna duyarlılığı azalmaktadır (Medeiros ve ark., 2002). Diğer memeli hayvanların sperması ile karşılaştırıldığında, koç spermatozoonunun membran yapısında yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asidi bulunmaktadır (Motamedi-Mojdehi ve ark., 2014). Dolayısıyla, spermatozoon kolestrerol/fosfolipit oranının daha düşük olmasına bağlı olarak, koç spermasının kriyoprezervasyon direnci diğer çiftlik hayvanlarından daha düşüktür (Holt, 2000).

Soğuk şokunun en fazla etkilediği kısımların başında akrozom gelmekte ve bunun sonucunda akrozom membran proteinlerinin yapı ve fonksiyonunda kapasitasyon benzeri değişimler oluşmaktadır (prekapasitasyon / kriyokapasitasyon) (Medeiros ve ark., 2002). Kriyoprezervasyon sırasında şekillenen prekapasitasyon, spermanın yaşam süresini azaltmaktadır. Yapılan çalışmalarda boğa spermasının kriyoprezervasyonu sırasında;

spermatozoonun transmembranel proteinlerini kaybettiği (Ollero ve ark., 1998), boğa seminal plazma proteinlerinin (BSP) %70-%80'inin azaldığı (Nauc ve Manjunath, 2000), süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin %50 ve indirgenmiş glutatyon (GSH) aktivitesinin %78 azaldığı bildirilmiştir (Bilodeau ve ark., 2000). Tüm bu değişiklikler sonucunda spermatozoonun membran, DNA ve akrozom bütünlüğü bozulmakta, mitokondriyal aktivite ve motilite düşüşü şekillenmekte, dolayısıyla, spermanın canlılığı ve fertilizasyon yeteneği azalmaktadır.

2.5.1.2. Oksidatif Fosforilizasyon ve Reaktif Oksijen Türleri

Oksijenin canlılar için yaşamsal önemi vardır. Ancak, metabolik aktiviteler sırasında fizyolojik olarak üretilen kimi ROS canlılar için tehdit oluşturmaktadır. Dolayısıyla oksidatif stres; lipit peroksidasyonu sonucu oluşan serbest radikal oksijen türlerinin artmasına bağlı olarak hücrel hasarların artışı olarak tanımlanabilir (Bucak ve ark., 2015). Lipit peroksidasyonu ise yağların yükseltgenmesi sonucu bozulması ve bileşimlerdeki doymamış moleküllerin oksijenle reaksiyona girerek keton, keto asitler, hidroksi asitler, alkol, aldehit ve buna benzer daha küçük moleküllü yağ asitlerine dönüşmesi olarak tanımlanabilir (Türk, 2015). Reaktif oksijen türleri bu çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) metilen (CH₂) grubundan bir hidrojen atomunu kopartmak yolu ile (CH₂ → CH[•]) lipid peroksidasyonunun başlamasına neden olurlar. Bunun sonucunda, yağ asidi yan zincirinde çifte bağ sayısı artacaktır. Böylece alkol, keton, aldehit ve eterlerin ayrışması kolaylaşır, ardından ise son ürün olarak malondialdehit (MDA) oluşur (Türk, 2015). Tüm bu reaksiyonların sonucunda ortamda MDA oranının artması, yüksek düzeyde lipit peroksidasyonu şekillendiğinin ve antioksidan mekanizmasının yetersiz oluşunun göstergesi olarak kabul edilmektedir (Üstüner ve ark., 2016). Yukarıda açıklanan mekanizmada da görüldüğü gibi, ROS öncelikli olarak PUFA'yı hedef almaktadır. Çünkü çoklu doymamış yağ asitleri peroksidasyona karşı çok duyarlıdır. Spermatozoon membran yapısı yüksek oranda PUFA içermesinden dolayı spermatozoon, oksidatif stres ve bunun sonucunda şekillenen ROS'a karşı oldukça hassastır (Bucak ve ark., 2015).

Serbest radikaller; bir veya daha fazla eşlenmemiş elektronu bulunan kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük kimyasal ajanlardır. Aşırı reaktif olan bu maddeler, diğer atom ve moleküllerle elektron alışverişine girerek, onların kimyasal yapılarını değiştirip kararsız bir yapı haline getirme eğilimindedir (Türk, 2015). Fizyolojik koşullarda hücrelerin antioksidan sistemi ile ROS varlığı arasında bir denge bulunmaktadır. Bu denge korunduğunda ROS varlığının spermatozoonun motilite, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyonuna katkıda bulunduğu bilinmektedir (Agarwal ve ark., 2005). Ancak bu denge bozulduğunda ROS'un spermatozoon canlılık ve fonksiyonu üzerinde zararlı etkisi bulunmaktadır (Lenzi ve ark., 1996). Kriyoprezervasyon sırasında şekillenen soğuk şoku ve ortamın ozmotik basıncında oluşan değişimler, spermatozoonun membran yapısını bozarak mekanik bir stres oluşturmaktadır (Noiles ve ark., 1995). Bu mekanik stres antioksidan mekanizma-ROS dengesini ROS lehinde değiştirmektedir. Artan ROS'un spermatozoon yapısında ilk hedef noktası (yoğun PUFA içermesinden dolayı) hücre membranı olup spermatozoon membran geçirgenliği ve fonksiyonel bütünlüğü üzerinde hasara neden olmaktadır (Toker ve ark., 2016). ROS'un spermatozoon üzerindeki bir diğer hedefinin ise mitokondri olduğu bilinmektedir. Mitokondriye ulaşan kararsız ajanlar oksijeni indirgeyerek ATP sentezine engel olmaktadır (Tremellen, 2008). Oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunun artışı engellenemezse, sitokrom C proteininin serbest kalmasına bağlı olarak, spermatozoonda apoptozis şekillenmektedir (Wang ve ark., 2003). Spermatozoon DNA'sının (kompakt yapısı dolayısıyla) ROS'a karşı plazma-akrozom membranı ve mitokondri kadar duyarlı olmadığı bilinmektedir. Ancak, aşırı düzeyde ROS varlığının spermatozoon DNA'sı üzerinde zararlı etkisi bulunmaktadır (Henkel ve ark., 2005).

2.5.2 Kriyoprezervasyonun Olumsuz Etkilerine Karşın Çözüm Stratejileri

Spermanın uzun süre kullanılmasına olanak sağlamak için +5 °C'a soğutulması ve dondurulması gerekmektedir (İleri ve ark., 2000). Spermatozoonun membran yapısı lipoprotein karakterli olduğundan, yapısında kolesterol molekülleri barındırır (Amidi ve ark., 2010). Kolesterol ise kriyoprezervasyon aşamasında spermatozoa membranının

dayanıklılığını artırır. Dolayısıyla, kolesterol miktarları düştükçe o oranda membran dayanıklılığı da azalır (Amidi ve ark., 2010). Bu nedenle, spermanın kısa ya da uzun süreli saklanması amacıyla öncelikle sulandırılması gerekmektedir. Ayrıca, sulandırıcı olarak hazırlanan çözeltilerin spermayı ani ısı değişimlerine karşı koruyacak makromolekülleri içermesinin yaşamsal önemi vardır.

Spermanın uygun bir şekilde dondurulabilmesi için sperma sulandırıcılarında aranan özellikler aşağıda belirtildiği şekilde sıralanabilir:

- 1- Spermatozoonların enerji gereksimini karşılayabilecek maddeleri içermelidir.
- 2- İçerisinde soğuk şokuna karşı sperma hücrelerini koruyan kriyoprotektif maddeler içermelidir.
- 3- Spermatozoonların metabolik artıklarını elimine edebilmelidir.
- 4- Sulandırılmış spermanın ozmotik basıncı, seminal plazmanın ozmotik basıncına eşit olmalıdır.
- 5- Spermatozoonları ve dişi genital kanalını etkileyebilecek mikroorganizmaları taşımamalıdır.
- 6- Bakteriyel kontaminasyonun kontrolü için antibiyotikler içermelidir (İleri ve ark., 2000).

Kriyoprezervasyonun spermatozoa üzerindeki olumsuz etkilerini elimine edebilmek için geçmişten günümüze çeşitli baz sulandırıcılar geliştirilmiştir (Aisen ve ark., 2000; Hafez, 1993). Ancak, günümüzde halen spermanın dondurma-eritme sonrası fertilizasyon yeteneğinin artırılması için farklı katkı maddeleri denenmekte, böylelikle koç spermasının dondurma-eritme başarısını artırmak amaçlanmaktadır (Alçay ve ark., 2017a; Uysal ve Bucak, 2007; Bucak ve ark., 2009; Bucak ve ark., 2013; Matsuoka ve ark., 2006; Toker ve ark., 2016; Üstüner ve ark., 2016). Bu amaçla spesifik antioksidanlar, vitaminler, kriyoprotektanlar, seminal plazma gibi çeşitli etken maddeleri sulandırıcıya ekleyerek dondurma başarısı üzerindeki etkileri sınanmaktadır (Alçay ve ark., 2017a; Alçay ve ark., 2017b; Arando ve ark., 2019; Banday ve ark., 2017; Bucak ve ark., 2009; Bucak ve ark.,

2013; Toker ve ark., 2016; Toker, 2018; Sharafi ve ark., 2015; Silva ve ark., 2012; Üstüner ve ark., 2016 Üstüner ve ark., 2018).

2.5.2.1. Antioksidanların Kullanımı

Antioksidanlar spermanın dondurulması sırasında serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunların oluşturduğu yıkımı önlemek için adeta bir savunma mekanizması olarak işlev gördüklerinden dolayı, günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Genel olarak antioksidanların serbest oksijen radikallerine karşı bu koruyucu etkileri, aşağıda belirtilen mekanizmalar ile ortaya çıkmaktadır (Bucak ve ark., 2015).

1. Serbest oksijen radikalleri ile bir takım enzimatik reaksiyonlara girerek hücre zarlarındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu önler ve membran yapısının bozulmasını engeller.
2. Serbest oksijen radikallerini nötralize ederek bunların toksik etkilerini önler.
3. Metal iyonlarını baskılaması ile serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engeller.
4. Oksidatif hasar görmüş hücreyi onararak etkilerini gösterirler.

Antioksidanlardan etkin bir şekilde yararlanabilmek için antioksidanların yapı ve işleyiş mekanizmaları hakkında fikir sahibi olmak önemlidir. Antioksidanlar etki şekillerine ve yapılarına göre genel olarak enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan (sentetik) antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

- Enzimatik Antioksidanlar

Enzim yapılı bu antioksidanlar; süpeoroksid anyonunun H_2O_2 'ye indirgenmesi, organik peroksitlerin detoksifikasyonu ya da H_2O_2 'i H_2O 'ya indirgemesi gibi reaksiyonları katalize ederek etki gösterirler (Bucak ve ark., 2015; Guemouri ve ark., 1991). Süperoksid dismutaz (SOD), katalaz, peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz bu gruba örnek olarak gösterilebilir (Bucak ve ark., 2015).

- Enzimatik Olmayan (sentetik) Antioksidanlar

Bu gruba ait antioksidanlar; hidrofilik veya hidrofobik yapılı sentetik bileşiklerdir (Bucak ve ark., 2015). Hidrofilik moleküller su ile H^+ bağı oluşturarak su içerisinde çözünürler (Bucak ve ark., 2015). Bu moleküller, lipid peroksidasyonuna karşı O_2^- , OH^- ve lipid hiperoksitleri ile reaksiyona girer ve bu şekilde antioksidatif etki gösterirler (Lenzi ve ark., 1996). Ergotiyonin, askorbik asit, tiyoredoksinler bu gruba örnek olarak gösterilebilmektedir (Antmen, 2005). Hidrofobik moleküller ise; suda çözünmediği için hücre membran yapısında veya lipoproteinlerde bulunan antioksidan özellikli maddelerdir. Bu moleküller peroksitleri elimine edip H_2O_2 ve O_2 'nin oluşumunu engelleyerek etki gösterirler. Bu gruba örnek olarak Vitamin E, sistein, metiyonin ve karnitin gösterilebilir (Bucak ve ark., 2015).

Testis ve diğer erkek üreme organlarının yanı sıra, sperma ve seminal plazma içerisinde çeşitli antioksidan maddeler bulunmaktadır (Bucak ve ark., 2015). Ancak, daha önceden de sözü edildiği gibi spermatozoonlar olgunlaşma esnasında sitoplazmasının büyük bir bölümünü yitirerek kendine özgü bir şekil almaktadır (İleri ve ark., 2000). Bu süreç sırasında sitoplazma ile beraber sitoplazma içerisindeki antioksidan maddelerin bir kısmını da kaybetmektedir. Dolayısıyla spermatozoanın hücre içi antioksidan mekanizması diğer hücrelere göre daha zayıf kalmaktadır (Bucak ve ark., 2015). Bu nedenle; spermadaki antioksidanlar ağırlıklı olarak seminal plazma kaynaklıdır.

Seminal plazmanın serbest oksijen radikallerine karşı savunma mekanizması; içerisindeki süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimatik ve askorbik asit, tokoferol, pirüvat, glutatyon, karnitin, sistein taurin, hipotaurin gibi enzimatik olmayan antioksidanlarca sağlanmaktadır (Özdaş ve Baran, 2015). Seminal plazma içerisindeki antioksidan düzeyi doğal şartlar altında yeterlidir. Ancak, spermanın dondurulması, sperma üzerinde doğal koşullardan daha fazla oksidatif strese neden olmaktadır (Bucak ve ark., 2013). Bu nedenle; spermanın dondurulması işlemi ROS miktarında artışa neden olmakta ve seminal plazma antioksidan içeriği açığa çıkan ROS'un olumsuz etkilerini minimize etmekte yetersiz kalmaktadır (Bucak ve ark., 2013). Bu sorundan yola çıkan birçok araştırmacı; memeli hayvanların spermasının etkin bir

şekilde dondurulabilmesi için sperma sulandırıcılarına çeşitli antioksidan maddeleri eklemeyi denemiş ve etkin sonuçlar almıştır (Alçay ve ark., 2017a; Bucak ve ark., 2013; Bucak ve ark., 2015; Gangwar ve ark., 2018; Toker ve ark., 2016).

Toker ve ark. (2016), koç spermasının dondurulması sırasında antioksidan maddelerin (methiyonin, sisteamin ve sistein) etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında; dondurma-eritme işlemleri sonrası antioksidan içeren gruplarda, içermeyen grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek motilite, plazma membran fonksiyonel bütünlük ve akrozomal bütünlük oranları saptadıklarını bildirmişlerdir.

Banday ve ark. (2017), taurin, kuarsetin ve indirgenmiş glutatyonun (GSH) koç spermasının dondurma-eritme sonrası spermatolojik parametreler üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmada; söz konusu antioksidanları içeren gruplarda dondurma-eritme işlemleri sonrası motilite oranının kontrol grubundan daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Najafi ve ark. (2014) tarafından koç spermasının dondurulmasında sisteamin ve ergothioninin farklı dozlarının (2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM) denendiği bir çalışmada, 6 mM sisteamin ve ergothionin içeren grupların dondurma-eritme sonrası motilite, canlılık ve plazma membran fonksiyonel bütünlük oranlarının diğer çalışma gruplarından daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

2.5.2.2. Seminal Plazmanın Sperma Dondurulmasında Kullanılması

Seminal plazma (SP) içerdiği organik ve inorganik bileşenler ile spermanın *in vivo* ve *in vitro* olarak korunmasını sağlamaktadır (Hafez, 1993; Üstüner ve ark., 2018). Bu nedenle, spermanın dondurulması sırasında seminal plazma ilavesi dondurma başarısı üzerinde de etkili olmaktadır (Hafez 1993; Perez Pe ve ark., 2001; Üstüner ve ark., 2009; Üstüner ve ark., 2018). Üstüner ve ark (2018), teke spermasının dondurulmasında seminal plazmanın etkinliğinin değerlendirildiği çalışmada, seminal plazmanın uzaklaştırılmasının dondurma-eritme işlemleri sonrasında motilite, plazma membran

fonksiyonel bütünlüğü değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüğe neden olduğunu bildirmiştir. Birçok araştırmacı benzer şekilde seminal plazmanın uzaklaştırılmasının dondurma öncesi ve sonrası motiliteyi önemli ölçüde düşürdüğünü belirtmiştir (Azerêdo ve ark., 2001; Cabrera ve ark., 2005; Ferreira ve ark., 2014). Seminal plazmanın; sperma dondurma-eritme sonrası başarısını artırdığının gözlemlenmesi, araştırmacıları spermanın dondurulması sırasında var olan seminal plazmanın yanısıra ekstra SP katkısının dondurma-eritme üzerine etkisini değerlendirmeye yönlendirmiştir (Üstüner ve ark., 2016; Üstüner ve ark., 2018).

Arı ve Daşkın, (2010); teke, koç ve boğa seminal plazmasının Ankara tekesi spermasının dondurulması üzerinde etkisini değerlendirmişlerdir. Anılan çalışmada araştırmacılar teke seminal plazmasını uzaklaştırarak yerine %5 oranında koç veya boğa seminal plazması eklemiştir. Dondurma-eritme sonrası motilite ve plazma membran fonksiyonel bütünlük oranı, koç seminal plazması eklenen grupta daha yüksek bulunmuştur.

Ledesma ve ark. (2015), farklı yöntemler (suni vajen, elektroejakülasyon) ile elde edilen seminal plazmaların koç spermasına katılmasının dondurma başarısı üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Söz konusu çalışmada; elektroejakülasyon yöntemi ile elde edilen seminal plazmanın katıldığı koç spermasının, dondurma-eritme sonrası daha yüksek fertilizasyon potansiyeli olduğu sonucuna varılmıştır. Araştırmacılar, elde ettikleri sonuç doğrultusunda elektroejakülasyon yöntemi ile eklenti üreme bezlerinin daha fazla uyarılması sonucu seminal plazma protein miktarının daha yüksek olduğu ve söz konusu proteinlerin koç spermasının dondurulmasında olumlu etki yarattığı çıkarımında bulunmuşlardır.

Üstüner ve ark. (2016), koç spermasının dondurulmasında alabalık seminal plazması (ASP) eklenmesinin dondurma-eritme sonrası spermatolojik parametreler üzerindeki etkisini değerlendirmiştir. Söz konusu çalışmada, farklı oranlarda (%0,1, %1, %10) ASP eklenen spermaların dondurma-eritme sonrası spermatolojik parametreleri ASP eklenmeyen kontrol grubuna göre daha yüksek oranda korunduğunu bildirilmiştir.

Araştırmacılar, ASP'nin koç spermasının dondurulması üzerinde gözlemlenen bu olumlu etkisinin ASP'nin biyokimyasal içeriğinden kaynaklandığı görüşünde olduklarını bildirmişlerdir.

2.5.2.2.1. Alabalık Seminal Plazmasının Kimyasal İçeriğı

Seminal plazma, eklenti üreme bezlerince salgılanan ve spermatozoonların devinimi için gerekli enerji maddelerini kapsayan çeşitli proteinler, enzimler, lipitler ve mineralleri içeren, spermanın spermatozoa dışında kalan sıvı kısmıdır. Spermanın pH değişimlerini önleyerek tamponlama özelliğı gördüğünden, spermatozoonların fonksiyonu üzerinde önemli bir etkisi vardır (Chacur, 2012). Alabalık seminal plazmasının önemi, spermatozoon için önemli bir besin kaynağı olması, spermatozoonun yaşaması için uygun çevre koşullarını oluşturması, spermanın motilite yeteneğini ve canlılığını koruması için gerekli olmasından ileri gelmektedir (Nynca ve ark., 2014). Ancak, memeli hayvanların tersine, alabalıklarda eklenti üreme bezi bulunmadığı için, ASP eklenti üreme bezi kaynaklı değil, kan plazması ve sperma kanalındaki kübik hücreler kaynaklıdır (Nynca ve ark., 2017). Diğer canlıların seminal plazması gibi alabalık seminal plazması da çeşitli organik ve inorganik maddeleri içermekte, ancak, bu içeriklerin nicelik ve kompozisyonu diğer türler ile farklılık göstermektedir (Shaliutina-Koleřová ve ark., 2016). ASP içerisindeki monosakkarit ve trigliseritler, spermatozoonun enerji kaynağını oluşturarak bu hücrelerin canlılığının korunmasında görev alırlar (Lahnsteiner ve ark., 2004). Proteinler ise spermatozoonun canlılığını sürdürebilmesinin yanısıra motilite yeteneğine yardımcı olması bakımından önem arz etmektedir (Lahnsteiner ve ark., 1993).

ASP protein kompozisyonu, mevsim ve beslenme koşullarına göre değişiklik gösterebilmektedir (Shaliutina-Koleřová ve ark., 2016). Üreme mevsiminde artan seminal plazma protein kompozisyonu, üreme mevsiminin sonlarına doğru azalmakta, üreme mevsimi dışında ise ciddi anlamda düşmektedir (Shaliutina-Koleřová ve ark., 2016). Mevsimin etkisiyle seminal plazma ozmolaritesinin de değişim gösterdiği bilinmektedir (Ciereszko ve ark., 2000; Shaliutina-Koleřová ve ark., 2016). Üreme mevsiminin sonuna doğru seminal plazma protein içeriğinin düşmesi ve ozmolarite değişimi, alabalık

spermasında sözü edilen dönemde motilite ve spermatozoon hızının düşüşü ile karakterizedir (Shaliutina-Kolešová ve ark., 2016).

Nynca ve ark. (2014), ASP proteinlerini biyolojik ve moleküler fonksiyonlarına göre aşağıda belirtildiği şekilde sınıflandırmıştır.

Araştırmacılar alabalık seminal plazma proteinlerini biyolojik işlevlerine göre:

- Metabolik işlevi olan proteinler
- Stimulus yanıt veren proteinler
- Transportta etkili proteinler
- Hücre organizasyonunda etkili proteinler
- Spermatozoonun olgunlaşmasında etkili proteinler
- Hücreler arası iletişim sağlayan proteinler olarak sınıflandırmıştır.

Alabalık seminal plazma proteinlerini moleküler fonksiyonlarına göre ise:

- Katalitik aktivite gösterenler
- Bağlanma özelliği olan proteinler
- Enzim aktivitesini regüle edenler
- Taşıyıcı proteinler
- Reseptör aktivitesi gösterenler
- Yapısal proteinler olmak üzere 6 kategoriye ayrılmıştır (Nynca ve ark., 2014).

Biyolojik işlevlerine göre metabolik işlevli proteinler total proteinlerin %58'ini oluşturmaktadır. Stimulus yanıt sağlayan (uyarıcı etki gösteren) proteinlerin total proteinlere oranı ise %16'dır (Nynca ve ark., 2014). Moleküler yapılarına göre değerlendirildiğinde ise total proteinlerin ise %42'sini katalik aktivite gösteren seminal plazma proteinleri (ligaz, hidrolaz, oksidoreduktaz, transferaz ve isomeraz aktiviteli) oluşturmaktadır. Bağlanma özelliği olan proteinler (androjen bağlayıcı proteinler, karbonhidrat bağlayıcı proteinler, lipit bağlayıcı proteinler, DNA'ya bağlanan proteinler ve küçük moleküllere bağlanan proteinler) %40'luk kısmını oluştururken, geriye kalan %18'lik dilimi diğer işlevleri olan proteinler oluşturmaktadır (Nynca ve ark., 2014).

ASP'de bulunan katalitik özellikli ve bağlanma yeteneği olan proteinlerin %70'i insan seminal plazmasında da identifiye edilmiştir (Nynca ve ark., 2014; Pilch ve Mann, 2006). Ayrıca, identifiye edilen bu proteinlerin %87'si insan, boğa ve koç seminal plazmalarının da en az birinde identifiye edilmiştir (Nynca ve ark., 2014).

Shaliutina-Kolešová ve ark. (2016) ise, alabalık seminal plazmasında identifiye edilen proteinlerin yaklaşık %25'ini çok işlevli proteinler (apolipoprotein, transferrin, serum albumin), immün yanıt ile ilişkili proteinler (komplementler), soğuk şoku proteinleri, antioksidan proteinler (SOD, thirodoxin, glutathione-S-transferaz vb), 14-3-3 ailesi üyeleri ve enzimler (laktat dehidrojenaz, kreatin kinaz, gliseraldehit-3-fosfat, dehidrojenaz) olarak belirtmektedir. Bu protein grupları içerisinde ise çok işlevli proteinler ve immün yanıt ile ilişkili olanlar daha fazla yer tutmaktadır (Nynca ve ark., 2014). Buna karşın, şu ana kadar yalnızca ASP içerisinde izole edilmiş spesifik proteinler de bulunmaktadır (Nynca ve ark., 2014) (Tablo-1).

Seminal plazma proteinlerinin büyük bir çoğunluğu spermatozoon yüzeyi tarafından absorbe edilerek spermatozoonu korumaktadır (Belleannee ve ark., 2011). Akut faz proteinleri olarak da bilinen transferrin, apolipoproteinler, komplement C3, serum albümin, hemopoeksin benzeri protein, alfa1-antiproteanaz ve prerserebellin benzeri proteinlerin spermatozoonun korunması ve canlılığını sürdürmesi konusunda önemleri büyüktür (Nynca ve ark., 2014). Bu proteinler içerisinde transferrin, demir bağlama, mikrobiyal koruma, antioksidan ve toksik maddelere karşı koruma işlevlerinin yanı sıra, kriyoprotektif özellik de göstermektedir. α 1-proteinaz ise diğer proteinazları inhibe ederek spermatozoonu proteolitik ataklara ve bunun sonucu açığa çıkacak ROS'a karşı korumaktadır. Bu özelliğinden ötürü spermanın saklanması sırasında bu proteinin önemli bir yeri bulunmaktadır (Nynca ve ark., 2014). Benzer şekilde, 14-3-3 proteinleri ve EF-hand ailesi kalsiyum bağlayıcı proteinler de (EF-hand calcium-binding domain-containing protein 1, parvalbumin, calmadulin) spermatozoonu proteolizis ve oksidatif strese karşı korumaktadır. Ayrıca, sözü edilen bu proteinlerin hücre içi Ca^{+2} geçişini regüle ederek spermanın motilitesi üzerinde de etkili olduğu bilinmektedir (Nynca ve ark., 2014). Dietrich ve ark. (2014), sazan balıklarının seminal plazmasında yoğun olarak bulunan C3

protein komponentinin, alabalık seminal plazmasında da bulunduğunu ve spermatozoanın korunmasında önemli rolü olduğunu bildirmiştir. Alabalık seminal plazmasında bol miktarda bulunan transferrin ve albumin ise spermatozoon membranını oksidatif strese ve sitotoksik bileşiklere karşı korumaktadır (Gomme ve ark., 2005). Serum albumin 1 ve 2 ise lipit peroksidasyonunun zararlı etkilerinden koruduğu için en önemli ekstrasellüler antioksidanlar arasında sayılmaktadır (Halliwell, 1988). Antioksidan özelliği ön planda olan diğer ASP proteinleri olarak ise SOD ve Glutasyon-S-Transferaz (GST) göstermek olasıdır (Nynca ve ark., 2014). Cathepsin D ve M, calpain, sitosolik nonspsifik dipeptidaz ve proteozomların ise motilitenin uyarılması ve hasarlı spermatozoon atıklarının elimine edilmesinde önemleri büyüktür (Nynca ve ark., 2014). Alabalık seminal plazmasında da izole edilen type-4 ice-structuring protein ise LS-12 antifriz protein olarak bilinmekte ve balıkların/balık spermasının düşük sıcaklıktaki sularda donmasını engellemektedir (Nynca ve ark., 2017; Zhao ve ark., 1998). Sözü edilen bu proteinin, doğal koşullar altında balığın ve balık gamet hücrelerini soğğun zararlı etkisinden korunması konusunda önemleri büyüktür (Nynca ve ark., 2017). Alabalık seminal plazmasından izole edilen type-4 ice-structuring proteinin memeli seminal plazmasında bulunmamasından dolayı, soğuk şokuna karşı çok duyarlı olan koç spermasının dondurulmasında kullanılabileceğini akla getirmektedir. Alabalık seminal plazmasında izole edilen proteinlerin genel işlevlerine bakıldığında ise, spermatozoa için canlılığını sürdürebileceği mikro bir çevre olmasının yanı sıra, spermatozoayı ortamda bulunan metabolik atık ve lipit peroksidasyonun zararlı etkilerine karşı koruduğu sonucu çıkarılmaktadır (Nynca ve ark., 2017). Tüm bu nedenlerden dolayı, alabalık seminal plazmasından izole edilen proteinlerin spermayı dondurma-eritme işlemlerinin zararlı etkilerinden koruyacağı sonucu çıkarılabilir.

Tablo-1. Alabalık Seminal Plazması Protein İçeriği			
NO	ALABALIK SEMİNAL PLAZMASI İÇERİSİNDE İDENTİFİYE EDİLEN PROTEİNLER	MEMELİ SEMİNAL PLAZMASINDA BULUNMAYANLAR	ALABALIK SEMİNAL PLAZMASI MAJOR PROTEİNLERİ
1	14-3-3A2 protein	X	
2	14-3-3C1 protein	X	
3	14-3-3C2 protein	X	
4	Apolipoprotein C-I precursor	X	
5	Cathepsin M precursor	X	
6	CD18 protein	X	
7	Complement component C3-3	X	
8	Complement component C3-4	X	
9	Complement factor Bf-2	X	
10	Differentially regulated trout protein 1	X	
11	FBPL4	X	
12	Gonadal-soma derived growth factor precursor	X	
13	Lysozyme complex with 4-methyl-umbelliferyl chitotriose, chain A	X	
14	Lysozyme g	X	
15	Myeloid cell lineage chitinase	X	
16	Natsectin precursor	X	
17	Nonmetastatic cells 1 protein	X	
18	Otolith matrix macromolecule-64	X	
19	Parvalbumin beta-1	X	
20	Precerebellin-like protein precursor	X	X
21	Rhamnose-binding lectin STL1 precursor	X	
22	Serum albumin 1 protein	X	X
23	SLAM family member 7 precursor	X	
24	TAP2a protein	X	
25	Toxin-1 precursor	X	
26	Vitellogenin	X	
27	Alpha-1-antiproteinase-like protein precursor		X
28	Apolipoprotein A-I-1 precursor		X
29	Apolipoprotein A-I-2 precursor		X
30	Apolipoprotein A-II		X
31	Complement C3		X
32	Hemopexin-like protein		X
33	Serum albümin		X
34	Transferrin precursor		X
35	14-3-3 protein beta/alpha-1		
36	14-3-3 protein beta/alpha-2		
37	14-3-3E1 protein		
38	14-3-3-eta		
39	14-3-3 protein gamma-1		
40	14-3-3 protein gamma-2		
41	14-3-3 protein zeta		
42	Actin beta		
43	Activator of basal transcription 1		
44	ADP ribosylation factor 4		
45	Alcohol dehydrogenase		
46	Aldolase a, fructose-bisphosphate 2		
47	Angiotensinogen precursor		
48	Antithrombin protein precursor		
49	Apolipoprotein E precursor		
50	Biotinidase fragment 1		
51	Biotinidase fragment 2		
52	C1 inhibitor		
53	C4b-binding protein alpha chain precursor		
54	C-reactive protein precursor		
55	C-type mannose-binding lectin precursor		
56	C-type lectin receptor B		
57	C-type MBL-2 protein precursor		

58	C-type lectin 2-2		
59	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II delta chain		
60	Calmodulin		
61	Calpain 1, large subunit		
62	Carnitine O-palmitoyltransferase I		
63	Catechol-O-methyltransferase domain-containing protein 1		
64	Cathelicidin-derived antimicrobial peptide 2 isoform B		
65	Cathepsin D precursor		
66	Clusterin-1		
67	Coactosin-like protein		
68	Coagulation factor II precursor		
69	Coagulation factor X precursor		
70	Collagen a1(I)		
71	Complement C4		
72	Complement component C6 precursor		
73	Complement component C8 beta		
74	Complement component C9 precursor		
75	Complement factor B		
76	Complement factor H precursor		
77	Complement factor H1 protein precursor		
78	Complement factor I		
79	Cofilin-2		
80	Creatine kinase, testis isozyme		
81	Cystathionine-beta-synthase		
82	Cystatin		
83	Cysteine proteinase		
84	Cytosolic nonspecific dipeptidase		
85	EF-hand calcium-binding domain containing protein 1		
86	Epithelial cadherin precursor		
87	Epididymal secretory protein E1 precursor		
88	FAM3C precursor		
89	Fatty acyl-CoA hydrolase precursor, medium chain		
90	Fatty acid binding protein, heart		
91	FK506-binding protein 1A		
92	Galectin-3-binding protein precursor		
93	GST P		
94	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase		
95	Haptoglobin fragment 1		
96	Haptoglobin fragment 2		
97	90-kDa HSP beta isoform a		
98	HSP 70b		
99	70-kDa HSP 8 isoform a		
100	Hemopexin-like protein variant 1		
101	Ig kappa chain V-III region MOPC 63 precursor		
102	Ig light chain-rainbow trout (fragment)		
103	Ig light chain-rainbow trout		
104	Inositol monophosphatase		
105	Keratin 12		
106	Keratin, type I cytoskeletal 13		
107	Keratin E3 type II		
108	L-lactate dehydrogenase B chain		
109	Latexin		
110	LECT2 neutrophil chemotactic factor precursor		
111	Lipocalin precursor		
112	Lumican precursor		
113	Lysozyme C II precursor		
114	Malate dehydrogenase 1		
115	Mannan-binding lectin H3 precursor		
116	Mannan-binding lectin H2 precursor		
117	Beta-2 microglobulin		
118	Multidrug resistance associated protein 2		
119	NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 6, mitochondrial precursor		

120	Notch1		
121	Nucleoside diphosphate kinase		
122	Nucleoside diphosphate kinase B		
123	2-Peptidylprolyl isomerase A		
124	Plasminogen precursor		
125	Prion protein 2		
126	Profilin-1		
127	Protein AMBP precursor		
128	Prostaglandine D synthase		
129	Proteasome delta		
130	Proteasome subunit beta type 1-A		
131	Proteasome subunit alpha type 1		
132	Proteasome subunit alpha type 7		
133	Proteasome subunit alpha type 3		
134	Proteasome subunit alpha type 4		
135	Proteasome subunit alpha type 6		
136	Proteasome subunit alpha type 2		
137	Proteasome subunit beta type 3		
138	Proteasome subunit beta type 4		
139	S-phase kinase-associated protein 1A		
140	Serum albumin 1 precursor		
141	Sex hormone-binding globulin precursor		
142	Sex hormone-binding globulin beta form		
143	Small ubiquitin-related modifier 3 precursor		
144	SOD		
145	Thioredoxin		
146	Triosephosphate isomerase		
147	Translin-associated protein X		
148	Tubulin alpha chain, testis-specific		
149	Ubiquitin		
150	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1		
151	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3		
152	UPF0762 protein C6orf58 homolog precursor		
Nynca ve ark., 2014			

2.5.2.2.2. ASP Antioksidan Kompozisyonu

Alabalık seminal plazmasında bulunan antioksidanların kaynağı ile ilgili yapılan araştırmalarda, antioksidanların seminal plazma içerisindeki düşük molekül ağırlıklı bileşiklerden köken aldığı bildirilmiştir (Sasaki ve ark., 1996). Liu ve ark. (1995) ise, seminal plazmada bulunan antioksidanların protein kaynaklı olduğunu ileri sürmüştür. Konu ile ilgili yapılan diğer bir araştırmada, serbest aminoasitlerin büyük bir bölümünün antioksidan etki gösterdiği, alabalık seminal plazması içerisinde yoğun arjinin, glutamik asit, isolöysin, löysin, metiyonin ve prolin, spermatozoa içerisinde ise sistein, arjinin ve metiyonin bulunduğu saptanmıştır (Lahnsteiner, 2009). Alabalık seminal plazması içerisinde çok yoğun metiyonin bulunmaktadır (Lahnsteiner, 2009). Metiyonin, salt antioksidan etkisi ile birlikte sistein ile bir araya gelerek hipotaurin ve taurin sentezini sağladığı için önemli olan bir aminoasittir (Karafakıoğlu, 2010). Ayrıca, seminal plazma içerisinde bulunan isolöysin ve löysin ise antioksidan mekanizmasının yanı sıra,

özellikle inkübasyon sırasında spermatozoa tarafından ek enerji kaynağı olarak da kullanıldığı bilinmektedir (Lahnsteiner, 2009). Söz konusu bu aminoasitler, memeli spermasının dondurulmasında sulandırıcı katkı maddesi olarak birçok araştırmada kullanılmıştır (Agarwal ve ark., 2005; Alçay ve ark., 2017a; Banday ve ark., 2017; Bucak ve ark., 2009; Bucak ve ark., 2013; Gangwar ve ark., 2018; Kulaksız ve Daşkın 2009; Najafi ve ark., 2014; Sharafi ve ark., 2015). Yapılan bu çalışmalarda, yukarıda sözü edilen aminoasitlerin spermanın dondurma-eritme sonrası motilite ve diğer spermatolojik parametrelerinde önemli derecede iyileşme sağladığı bildirilmiştir (Alçay ve ark., 2017a; Bucak ve ark., 2009; Karafakıoğlu, 2010; Toker ve ark., 2016).

Alabalık seminal plazmasının aminoasitlerin yanı sıra, antioksidan özellik gösteren vitaminler yönünden de zengin olduğu bilinmektedir (Lahnsteiner ve ark., 2010). Askorbik asit (vitamin C) antioksidan özelliği olduğu bilinen önemli bir organik bileşiktir. Alabalık seminal plazması içerisinde askorbik asit yoğunluğunun kandaki yoğunluğundan daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Ciereszko ve Dabrowski, 1995). Askorbik asit dışında beta karoten, vitamin A ve vitamin E alabalık seminal plazmasında izole edilen vitaminler olarak göze çarpmaktadır (Nazıroğlu ve ark., 2000).

2.5.3 ASP-Sistein Kombinasyonunun Koç Spermasının Dondurulmasında Kullanımı

Sistein tiyol grubu bir aminoasittir (Bucak ve ark., 2015). Sisteinin moleküler ağırlığı düşük olduğu için hücre membranına kolaylıkla penetre olup hücre içerisinde GSH sentezini artırmaktadır (Hendin ve ark., 1999). Hücre ya da hücre kültür ortamında bulunan GSH ile antioksidan kapasite arasında doğru bir orantı bulunmaktadır (Gökçe ve ark., 2017). Bu nedenle, sisteinin glutatyon prokürsörü olarak antioksidatif etki gösterdiğini söylemek olasıdır (Bucak ve ark., 2015).

Koç sperma sulandırıcısına farklı dozlarda sistein (0 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM) ekleyen araştırmacılar dondurma-eritme sonrası sırasıyla %39,50, %45,00, %59,00 ve %39,50 motilite oranı elde etmişlerdir (Uysal ve Bucak 2007). Söz konusu çalışmada, koç sperma sulandırıcısına 10 mM sistein eklenmesinin dondurma-eritme sonrası motilite

değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme oluşturduğu sonucuna varılmıştır ($P < 0,05$). Benzer bir diğer çalışmada, koç sperma sulandırıcısına 0 mM, 5 mM ve 10 mM sistein ekleyen Sharafi ve ark. (2015), koç spermasının dondurma-eritme sonrası motilite oranlarını sırasıyla %47,14; %49,14 ve %55,86 olarak saptamışlardır. Söz konusu çalışmada, koç sperması sulandırıcısına 10 mM sistein eklenmesinin dondurma-eritme sonrası motilite değerini istatistiksel olarak iyileştirdiği sonucuna varılmıştır.

Alabalık seminal plazması içerisinde yoğun olarak metiyonin sülfoksid redüktaz enzimi ve metiyonin olduğu kaydedilmiştir (Lahnsteiner, 2009). Metiyonin sülfoksit redüktaz enzimi, metiyonin üretimi için önem taşımaktadır (Lahnsteiner, 2009). Metiyonin ise sistein ile birlikte bir dizi zincir reaksiyonu sonucu önce hipotaurin ardından ise taurin sentezi için gerekli bir aminoasittir (Karafakıoğlu, 2010). Taurin memeli spermasının dondurma-eritme sonrası spermatolojik parametrelerin başarılı şekilde korunmasında önemli yeri olan antioksidanlardan bir tanesi olarak bilinmektedir (Karafakıoğlu, 2010). Metiyoninin alabalıklarda hem spermatozoa hem seminal plazma kompozisyonu içerisinde saptanmasına karşın, sistein aynı türde yalnızca spermatozoa içerisinde lokalize olmakta (Lahnsteiner, 2009) ya da seminal plazma içerisinde minimal düzeylerde bulunmaktadır (Nynca 2014). Alabalık seminal plazmasının sistein içermemesinden (ya da eser nicelikte içermesinden) ötürü; ASP'nin sisteinin direkt ve indirekt (GSH sentezi) antioksidan etkinliğinden yoksun olduğu sonucunu çıkarmak olasıdır. Ayrıca, ASP'nin sisteinden yoksun olması nedeniyle tek başına kullanılması hipotaurin ve taurin sentezi için yetersiz kalacaktır.

Yapılan literatür taramasında, ASP'nin ve sisteinin tek başına kullanımının koç sperması dondurma başarısı üzerine etkinliğinin değerlendirildiği çalışmaların bulunduğu görülmektedir (Alçay ve ark., 2017a; Toker ve ark., 2017; Toker, 2018; Uysal ve Bucak 2007; Üstüner ve ark., 2016). Ancak, ASP'nin dondurma-eritme sonrası koç sperması DNA bütünlüğü üzerine etkinliğinin ve ASP-sistein kombinasyonunun dondurma-eritme sonrası in vitro spermatolojik parametreler üzerine etkisinin belirlendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, koç spermasının dondurulması ve eritilmesi sırasında uğradığı çeşitli mekanik ve metabolik zararlara karşı; koç sperma sulandırıcısına tek

başına ya da sistein ile kombine edilmiş alabalık seminal plazması eklenerek çözüm sonu spermatolojik özellikler üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, standart sulandırıcı (%20 yumurta sarısı içeren Tris-sitrik asit-fruktoz sulandırıcısı) (Aisen ve ark., 2000) veya 1 mM sistein eklenen standart sulandırıcıya farklı dozlarda alabalık seminal plazması (%0, %1, %10, %15) ilave edilerek dondurulan koç spermalarının, eritme sonrası motilite, plazma membran fonksiyonel bütünlüğü, akrozomal hasar ve DNA bütünlüğü parametreleri değerlendirilmiştir. Yapılan çalışma ile standart koç sperması dondurma sulandırıcısına eklenecek alabalık seminal plazması niceliğinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Sunulan tez çalışması için Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınmış (13/12/2016 Tarih ve 2016-15/06 numaralı etik kurul kararı) olup; tez çalışması Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Doktora Destek Projesi (BAP DDP 2017/10 nolu proje) tarafından desteklenmiştir.

Çalışmada, sperma sulandırıcısının hazırlanması amacıyla kullanılan kimyasal maddelerin listesi Tablo-2 de verilmiştir. Sunulan tez çalışmasında, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Sağlığı ve Hayvansal Üretim ve Uygulama Merkezi Koyunculuk Ünitesinde aynı bakım ve besleme koşullarında barındırılan 2-4 yaşlarında 10 baş Kıvırcık ırkı koç kullanıldı. Kullanılan koçlar, deney süreci boyunca kuru çayır otu ve hayvan başı günlük 1 kg konsantre yemden oluşan rasyon ile beslenirken; koçlara yalama taşı ile su *ad-libitum* olarak verildi.

3.1. Koçlardan Sperma Alınması

Sperma aşım mevsimi dışında (Ocak-Ağustos) elektroejakülasyon yöntemi ile gün aşırı olarak beş kez alındı. Elektroejakülasyon yöntemi ile sperma almak amacıyla sperma alınacak koç öncelikle yatırılarak zapturapta alındı. Ardından spermayı alacak kişilerce prepusyal bölgedeki uzun kıllar makas yardımıyla kesildikten sonra, fizyolojik tuzlu su (FTS) ile nemlendirilen pamukla koçun prepusyal bölgesi temizlenip hemen ardından pamuk ile kurulandı. Elektroejakülatörün (Ruakura koç probu, Hamilton, Yeni Zelanda) probuna kayganlaştırıcı jel uygulandıktan sonra prop rektuma yerleştirildi. Bu işlemten hemen sonra penis, spermayı alan kişi tarafından el manüplasyonu ile prepusyumdan dışarı çıkarıldı ve sperma toplama kadehi penisin prosessus uretra bölümüne yönlendirildi. Otomatik olarak dörder saniyelik aralıklarla, elktroejakülatörün probu ile koçun ampulla bölgesine 12 V'luk elektrik akımı verilirken, akım durduğu zaman ise penise elle masaj yapılarak ejakülasyon uyarıldı. Ejakülasyonun uyarılması ile gelen sperma, huni yardımı ile önceden 28-32 °C sıcaklıkta tutulan sperma toplama kadehine toplandı. Ejakülasyonun

tamamlamasının ardından kullanılan koçun kulak numarası kaydedilerek sperma toplama kadehi 28-32 °C'a ayarlanmış su banyosuna yerleştirildi.

3.2. Taze Spermada Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Tüm koçlardan spermanın alınmasının ardından, 28-32 °C'ta bekletilen sperma örnekleri, hızlı bir şekilde laboratuvara götürüldü ve taze spermada kitle hareketi, motilite ve yoğunluk muayeneleri yapıldı.

3.2.1. Sperma Hacmi

Sperma toplama kadehine alınan spermalarda hacim değerlendirilmesi yapılması amacıyla, sperma kadehleri düz bir ekseninde tutuldu ve dereceli kadehin (mL) üzerinde bulunan skaladan yararlanılarak kadeh içerisindeki sperma hacmi mL olarak kayıt edildi. En az 0,5 mL hacime sahip olan ejakülat örnekleri çalışmada kullanıldı.

3.2.2. Kitle Hareketi (Mass-aktivite)

Sperma laboratuvara getirildikten sonra, hızlı bir şekilde kitle hareketi muayenesi yapıldı. Bu amaçla, bir damla sperma örneği daha önceden ısıtılmış lamın üzerine damlatıldı ve ısıtıcı tablalı faz kontrast mikroskop altında (Olympus BX51-TF - Olympus Optical Co., Ltd., Japonya) x10 objektifte spermanın değerlendirilmesi yapıldı. Mass aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla +++++'lik skaladan yararlanıldı. En az +++ ve üzeri mass aktivitesi olan ejakülat örnekleri çalışmada kullanıldı.

3.2.3. Spermatozoon Motilitesi

Daha önceden ısıtılan lamın üzerine bir damla kontrol sulandırıcısı ve bir damla sperma damlatıldıktan sonra üzeri lamel ile kapatıldı. Ardından ısıtıcı tablalı faz kontrast mikroskopta (Olympus BX51-TF - Olympus Optical Co., Ltd., Japonya) x40 objektif ile motilite muayenesi yapıldı. Bu amaçla her bir sperma örneği için en az üç mikroskop alanı incelendi ve ileriye doğru giden spermatozoa motil olarak değerlendirildi; motil spermatozoonun değerlendirilmesi yapılan mikroskop alanındaki spermatozoon sayısına oranı % olarak belirlendi. Çalışmada motilitesi en az %80 olan sperma örnekleri dondurma işlemleri için kullanıldı.

3.2.4. Spermatozoon Yoğunluğu

Spermatozoon yoğunluğunun saptanması amacıyla hemositometrik yöntem kullanıldı. Bu amaçla, sperma örnekleri santrifüj tüpleri içerisinde 1:200 oranında musluk suyu ile sulandırıldı (5 µL sperma+995 µL su). Önceden lamel kapatılarak hazırlanmış Thoma lamında, lam ile lamelin kesişim noktasına bir damla sperma damlatıldı. Thoma lamı üzerinde dördü köşeden ve bir tanesi ise ortadan olmak üzere beş büyük kare (80 küçük kare) içerisindeki spermatozoon sayısı, spermatozoonların başının konumu göz önünde bulundurularak sayıldı. Toplam sayılan spermatozoon sayısı 10^7 ile çarpılarak 1 ml'deki spermatozoon sayısı (spt/mL) saptandı. Çalışmada en az 1×10^9 spt/mL yoğunluğu olan sperma örnekleri dondurma işlemi için kullanıldı.

3.3. Sperma Sulandırıcısının Hazırlanması ve Spermanın Kriyoprezervasyonu

Çalışmada kullanılacak olan alabalık seminal plazmasının temini amacıyla, alabalıkların üreme mevsimi içerisinde, erkek alabalıklardan sperma sağım yöntemi ile alındı. Sperma sağım işlemi öncesinde erkek balıklar, 100 mg/lt yoğunlukta MS-222 bulunan su dolu kaba konularak anestezi sağlandı. Anestezi altına alınan balıklar sudan çıkarılıp havlu ile kurulanmalarının ardından abdominal basınç ile sperma sağımı gerçekleştirildi (Şekil-1). Alınan spermalar 10,000 x g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi ve süpernatant kısmı alınarak 10,000 xg'de 10 dakika ikinci bir santrifüj işlemi uygulandı. Ardından elde edilen süpernatant 1,5 mL hacimli santrifüj tüplerine bölünerek sulandırıcı hazırlanacağı güne kadar -20 °C'ta saklandı. Buzdolabında saklanan alabalık seminal plazmaları, çalışma günü oda sıcaklığında eritilerek çalışma gruplarına uygun şekilde sperma sulandırıcılarına eklendi.



Şekil 1. Alabalıklardan sperma toplanması.

3.3.1. Sperma Sulandırıcısının Hazırlanması

Spermanın sulandırılması amacıyla %20 yumurta sarısı içeren Tris-sitrik asit-fruktoz sulandırıcısı kullanılmıştır (Tablo-2). Hazırlanan sulandırıcı sekiz eşit gruba ayrılarak alabalık seminal plazması ve sistein içerip içermemesine göre deneme grupları oluşturularak isimlendirildi (Tablo-3).

Tablo-2. Kullanılan Sperma Sulandırıcısı Kimyasal İçeriği				
SULANDIRICI A		SULANDIRICI B		Kimyasal Kodu
Kimyasal	Miktar	Kimyasal	Miktar	
THAM (Tris (hydroxymethyl) aminometane)	223,7Mm/lt	THAM (Tris (hydroxymethyl) aminometane)	223,7mM/lt	Sigma-Aldrich – T6791
D- früktoz	55,5 mM/lt	D- früktoz	55,5 mM/lt	Merck-Millipore – 100242
Sitrik Asit	66,6 mM/Lt	Sitrik Asit	66,6 mM/Lt	Merck-Millipore – 104007
Penisilin G	0,3 g/lt	Penisilin G	0,3 g/lt	Sigma-Aldrich – P7794
Dihidrostreptomisin	0,4 g/lt	Dihidrostreptomisin	0,4 g/lt	Sigma-Aldrich – S1277
Yumurta Sarısı	%20	Yumurta Sarısı	%20	
		Trehaloz*	100,4 mM/lt	Sigma-Aldrich – T0167
		EDTA*	4,03 mM/lt	Fisher Scientific – BP118
		Gliserol**	%6	Sigma-Aldrich – S5516

*Sigma, St. Louis, MO, USA

**Merck, Darmstadt, Germany

Tablo-3. Çalışma Gruplarının ASP ve Sistein İhtiva Etme Oranlarına Göre İsimlendirilmesi		
GRUP ADI	ASP %	SİSTEİN* 1mM
KONTROL	0	-
ASP%1	1	-
ASP%10	10	-
ASP%15	15	-
KONTROLS	0	+
ASP%15	1	+
ASP%10S	10	+
ASP%15S	15	+

ASP: Alabalık Seminal Plazması

*Sigma-Aldrich – C7352

3.3.2. Koç Spermalarının Dondurulması

Koçlardan elektroejakülatör yöntemi ile sperma örnekleri alınarak 28°C'ye ayarlanmış su banyosu içine aktarıldı. En az 0,5 mL hacim, +++ mass aktivite, %80 motilite ve 1×10^9 spt/mL yoğunluğa sahip ejakulat örnekleri birleştirildi (pooling) ve spermatolojik muayeneler için numuneler alındı.

Pooling yapılan sperma sekiz eşit hacme bölünerek ve Tablo-3'te belirtildiği üzere çalışma grupları oluşturuldu. Her bir çalışma grubuna ait sperma, kendi çalışma grubuna ait sulandırıcı A (sistein ile kombine edilmemiş %0, %1, %10 ve %15 ASP içeren sırasıyla; K, ASP%1, ASP%10 ve ASP%15 sulandırıcısı; sistein ile kombine edilmiş %0, %1, %10 ve %15 ASP içeren sırasıyla; KS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S sulandırıcısı) ile final hacim 1:5 olacak şekilde (sperma/sulandırıcı) sulandırıcı A ile yarı hacimde sulandırıldı ve her bir çalışma grubundan spermatolojik muayeneler için numuneler alındı.

Sulandırılan sperma örnekleri içerisinde +28 °C su bulunan bir kaba yerleştirilerek +5 °C'a ayarlı yatay buzdolabına yerleştirildi. Kaptaki suya buz kalıpları atılarak suyun sıcaklığı aşamalı olarak bir saat içinde +5°C'a düşürüldü.

Soğutulmuş sperma finalde %6 gliserol olacak şekilde 1:1 (sperma+sulandırıcı A/sulandırıcı B) oranında, kendi çalışma grubuna uygun Sulandırıcı B ile aşamalı olarak sulandırıldı. Aşamalı sulandırma amacıyla eklenecek Sulandırıcı B miktarı 5 eşit hacme bölündü ve her eşit hacim 10 dakikalık aralıklarla ilave edildi. Böylelikle ikinci sulandırma 50 dakikada tamamlandı.

Sulandırıcı B ile sulandırma işleminin tamamlanmasının ardından, sperma 2 saat ekilibasyon sürecine bırakıldı. Sürecin bitmesinin ardından, her bir grup spermadan spermatolojik parametrelerin (motilite, plazma membran, akrozom ve DNA bütünlüğü) değerlendirilmesi amacıyla numuneler alındı. Numune alma işleminin ardından sulandırma işlemi tamamlanmış spermalar 0,25 mL hacimli mini payetlere otomatik payet doldurma ve kapatma cihazı (IMV, Fransa) yardımıyla çekildi. Payetlere çekilen sperma 5°C'tan -8°C'a 3°C/dk ve -8°C tan -120°C'a 25°C/dk hızda programlanabilir dondurma

makinesiyle (Air Liquide, Marne-la-Vallée Cedex 3, France) 9 dk içerisinde dondurulduktan sonra sıvı azot (-196°C) içine aktarıldı.

3.4. Spermanın Eritilmesi ve İnkübasyonu

Eritme günü her bir gruba ait 3 adet payet 37 °C sıcaklıktaki su banyosunda 30 sn bekletilerek eritildi ve sperma plastik test tüplerine aktarıldı. Eritme sonrası 0. saat spermatolojik parametrelerin (motilite, plazma membran, akrozom ve DNA bütünlüğü) değerlendirilmesi için sperma numuneleri alındı. Ardından sperma örnekleri 39°C sıcaklıkta neme doyurulmuş %5 CO₂'li atmosferde (Labconco Kansas City, U.S.A.) 5 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 3. ve 5. saatlerinde tekrar aynı spermatolojik parametrelerin değerlendirilmesi amacıyla sperma örnekleri alındı.

3.5. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Sperma alındıktan sonra pooling, sulandırma sonrası, ekilibrasyon sonrası, eritme sonrası, inkübasyonun 3. saat ve 5. saatlerinde numuneler alınarak motilite değerlendirilmesi yapıldı. Ayrıca, aynı çalışma saatlerinde alınan sperma örneklerine HOST testi ve FITC-PSA ile TUNEL boyamalar yapılarak sırasıyla spermatozoon plazma membran fonksiyonu, akrozom ve DNA bütünlüğü değerlendirildi.

3.5.1. Spermatozoon Motilitesi

Daha önceden ısıtılan lamın üzerine bir damla sperma damlatılıp üzeri lamel ile kapatıldı. Ardından ısıtıcı tablalı faz kontrast mikroskopta (Olympus BX51-TF) x40'lık objektifte motilite muayenesi yapıldı.

3.5.2. Hipoozmotik Şişme Testi (HOST) ile Plazma Membran Bütünlüğünün Belirlenmesi

HOST için 10 µL taze (pooling) ya da sulandırılmış (sulandırma sonrası, ekilibrasyon sonrası, inkübasyonun 0, 3 ve 5. saatleri) sperma örnekleri daha önceden hazırlanarak 37°C'a ayarlı su banyosunda bekletilen 100 µL sodyum sitrat-fruktoz hipotonik solüsyonu (100 mOsm) üzerine eklenerek 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı (Nur ve ark., 2010). HOST değerlendirmeleri inkübasyon süresinin ardından gerçekleştirildi.

Bu amaçla; lam üzerine bir damla örnek aktarılarak üzeri lamel ile kapatılıp faz kontrast mikroskopta x100'lük objektifte inceleme yapıldı. Yapılan inceleme sırasında her bir örnekten toplam 200 spermatozoon sayılarak kuyruk bölümü şişerek kıvrılmış olan spermatozoanın plazma membran fonksiyonel bütünlüğünü koruduğu saptandı ve kuyruk kısmı kıvrık olan spermatozoa değerlendirildi ve miktarı % olarak kaydedildi.

3.5.3. FITC-PSA ile Akrozomal Yapının Ortaya Konması

Akrozomal bütünlüğün belirlenmesi amacıyla, 75µL Phosphate buffered saline (PBS) içeren minisantrifüj tüplerinin içerisine 25 µL sperma örneği eklenerek karışım 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Ardından süpernatant kısmı atılarak dipte kalan pellet yeniden 75 µL PBS ile sulandırıldı. Mikropipet yardımı ile PBS ve pellet kısmı yeniden karıştırıldıktan sonra karışımdan 1 damla lam üzerine alınarak lamel yardımı ile frotiler çekildi ve havada kurutuldu. Kurutulan frotiler daha sonra +4°C sıcaklıkta 10 dk aseton ile tespit edilip, ardından PSA-FITC (50 µg/mL fosfat buffer solüsyonu) solüsyonu eklenerek 30 dakika karanlıkta boyanması beklendi. Boyama işleminden sonra, frotiler PBS ile yıkanıp üzerlerine 1 damla gliserol eklendi ve floresan mikroskop altında incelendi. Akrozom bölümünün tamamı yeşil olarak görülen ve akrozomal çeperi bütünlüğünü/özgün yapısını koruyan spermatozoa akrozomal bütünlüğü sağlam spermatozoon olarak not edildi (Şekil-2). Her bir preparattan en az 200 spermatozoa incelenerek hasarlı akrozomu olana spermatozoa oranı (%) olarak belirlendi.

3.5.4. Terminal Deoxynucleotidyl Transferasemediateddntp Nick-End Labeling (TUNEL) ile DNA Hasarının Belirlenmesi

Spermada hasarlı DNA oranının saptanması amacıyla histokimyasal TUNEL yöntemi kullanılmıştır. TUNEL boyama prosedürü için öncelikle sperma 25-50 x 10⁶ spt/mL olacak şekilde PBS ile yıkandıktan sonra, elde edilen yıkanmış sperma örneği pap-pen ile sınırlandırılmış poly-lizin kaplı lamlara damlatıldı. Poly-lysine kaplı lama alınan örnekler 1 gece boyunca +4°C sıcaklıkta buzdolabında bekletildi. Bir sonraki gün +4°C'tan çıkarılan frotiler boyama havuzuna yerleştirilerek %10 formaldehit içerisinde 20 dakika tespit edildi ve ardından 3 kez PBS ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Kuruyan frotiler boyama zamanına kadar +4 °C sıcaklıkta buzdolabında saklandı. Boyama günü frotilerin pap-pen ile sınırlandırılan bölgesine 10 µL Proteinaz K damlatılarak 10 dk inkübasyona bırakıldı, inkübasyon sürecinin ardından frotiler 3 kez PBS ile yıkandı. Ardından endojen peroksidaz aktivitesini önlemek amacıyla frotiler %10 H₂O₂ doldurulan boyama şalelerine yerleştirilerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve H₂O₂ uzaklaştırılarak PBS ile 3 kez yıkandı. Histokimyasal boyanın permeabilizasyonunu artırmak amacıyla preparatlar önce buz akülerinin üzerine yerleştirilip ardından preparatların sınırlandırılan bölgesine %0,1 oranında Triton X-100 eklendi ve 5 dakika boyunca beklendi. Bekleme süresinin ardından preparatlar yeniden PBS ile yıkandı ve preparatın sınırlandırılmış bölgesi dışındaki bölümü kuru bir peçete yardımı ile silinerek preparat kurutuldu. Ardından sınırlandırılmış bölgeye önceden hazırlanmış 20 µL Tunel Dilution Buffer, 10 µL Tunel Enzyme ve 90 µL Tunel Label karışımından 10 µL damlatılarak preparatlar 37°C sıcaklıktaki etüvde 1 saat inkübe edildi. Boyama işleminin sonunda, preparatlar PBS ile yıkanarak boyanın fazlalığı uzaklaştırıldı ve ardından preparatlar karanlık ortamda kurutuldu. Kuruyan preparatların sınırlandırılmış bölgesinin üzerlerine mounting medyum damlatılarak ardından aynı bölge lamel ile kapatıldı ve karanlık ortamda floresan mikroskopta x40 objektif ile değerlendirildi. Değerlendirme amacıyla öncelikle DAPI küp altında mavi renk veren spermatozoon başları sayılarak alandaki toplam spermatozoon sayısı saptandı, ardından preparatın alanı değiştirilmeden floresan mikroskobu test kübüne alındı ve aynı mikroskop alanında yeşil renk veren spermatozoon sayısı belirlendi (Şekil-3). Yeşil renk

veren spermatozoon DNA bütünlüğünü kaybetmiş olarak not edildi. Bu değerlendirme amacıyla 200 spermatozoa incelendi ve hasarlı DNA oranı % olarak belirlendi.

3.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçların istatistiksel analizinin yapılması amacıyla IBM SPSS İstatistik 20 (Chicago, IL, ABD) isimli program kullanıldı. Spermatolojik parametrelerin, betimleyici istatistiği yapılarak ortalama değerleri saptandı. Sözkonusu verilere normalite testleri yapıldı ve elde edilen sonuca göre kullanılacak testler belirlendi. Homojen dağılım gösteren parametrik değerler için One-Way ANOVA testi uygulandı. İstatistiksel anlam içeren spermatolojik parametrelerde hangi gruplar arası fark olduğunu belirlemek amacıyla Post hoc test olarak Tukey kullanıldı. Parametrik olmayan değerler için ise Kruskal-Wallis testi, sonrasında gruplar arası ikili karşılaştırmalar için ise Mann-Whitney U testi ile değerlendirmeleri yapıldı. Spermanın kriyoprezervasyonu sırasında uygulanan basamakların spermatolojik parametrelere etkisinin belirlenmesi için parametrik veriler için “bağımlı T Testi”, nonparametrik veriler için “Wilcoxon” testi kullanıldı. Yapılan değerlendirmelerde $P < 0,05$ anlamlılık düzeyinin istatistiksel farkı temsil ettiği kabul edildi.

4. BULGULAR

Sunulan tez çalışmasında dondurma-eritme işlemleri sırasında 6 farklı zamanda motilite, HOST, PSA-FITC (Şekil-2), ve TUNEL (Şekil-3) değerlerine bakıldı. Değerlendirme zamanları aşağıdaki belirtilmiştir.

1. Kryoprezervasyon aşamalarında (pooling, sulandırma sonrası ve ekilibrasyon sonrası).
2. Dondurulmuş spermanın 37°C'ta 30 sn'de (eritildikten sonra).
3. Eritme sonrası inkübasyonun 3. ve 5. saatlerinde

4.1. Taze Sperma, Sulandırma Sonrası ve Ekilibrasyon Sonrası Saptanan Spermatolojik Bulgular

Pooling yapılan spermalara ait ortalama değerler Tablo-4; sulandırma sonrası ve ekilibrasyon sonrası elde edilen veriler Tablo-5; spermanın sulandırılması, dondurulması, eritilmesi ve inkübasyonun spermatolojik parametreler üzerindeki etkisi ise Tablo-6'da sunulmuştur.

Taze sperma ile pooling sonrası elde edilen ortalama motilite, plazma membran fonksiyonel bütünlük, akrozomal hasar ve DNA hasar oranı sırasıyla %83,00; %89,80; %8,20; %3,4 olarak saptandı. Pooling yapılan taze spermanın spermatolojik bulguları ile sulandırma sonrası tüm çalışma gruplarının motilite, HOST, PSA, TUNEL verileri arasında istatistiksel yönden fark saptanmadı ($P>0,05$).

TABLO-4. Pooling Sonrası Taze Spermada Elde Edilen Spermatolojik Parametreler ($\bar{x}\pm S\bar{x}$) (n:5).

Motilite (%)	Plazma Membran Bütünlüğü (%)	Akrozom Hasarı (%)	DNA Fragmentasyonu (%)
83,00±2,74	89,80±1,92	8,20±1,10	3,4±0,55

Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarının sulandırma sonrası motilite değerleri sırasıyla %79,00; %78,00; %80,00; %79,00; %81,00; %80,00; %83,00 ve %81,00 iken, aynı grupların ekilibrasyon sonrası motilite değerleri sırasıyla %73,00; %75,00; %75,00; %73,00; %77,00; %74,00; %78,00 ve %75,00 olarak saptandı. Sulandırma sonrası rakamsal olarak en düşük motilite değeri ASP%1 grubunda saptanmasına karşın, var olan grup motilite değeri yalnızca ASP%10S grubundan istatistiksel olarak daha düşük bulundu ($P<0,05$) (Tablo 5). Ekilibrasyon sonrası gruplar motilite bakımından kendi içinde değerlendirildiğinde; istatistiksel bir fark bulunmadı. Yapılan istatistiksel değerlendirmenin ardından, spermanın +5 °C'a düşürülmesi ve gliserol içeren sulandırıcı B ile sulandırma işleminin (gliserolizasyon), -ASP%1 grubu hariç- tüm gruplarda spermanın motilite değerinde düşüşe neden olduğu gözlemlendi. ($P<0,05$) (Tablo 6).

Plazma membran fonksiyonel bütünlüğü olan spermatozoon oranı [HOST (+)] % olarak ifade edilmiştir. Sulandırma sonrası Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarına ait plazma membran bütünlüğü oranları sırasıyla %83,00; %85,60; %85,80; %85,20; %86,00; %86,80; %88,00 ve %86,20 olarak belirlendi. Sulandırma sonrası çalışma grupları arasında plazma membran fonksiyonel bütünlük değerleri yönünden istatistiksel bir fark bulunmadı ($P>0,05$). Ekilibrasyon sonrası Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarının plazma membran fonksiyonel bütünlük değerleri sırasıyla %78,20; %81,20; %82,00; %80,80; %83,20; %83,00; %84,20 ve %80,20 olarak saptandı. Ekilibrasyon sonrası Kontrol grubuna ait plazma membran fonksiyonel bütünlük değeri KontrolS ve ASP%10S grubundan daha düşük bulunurken ($P<0,05$), diğer gruplar arasında plazma membran bütünlüğü bakımından istatistiksel bir fark bulunmadı ($P>0,05$). Aynı grupların sulandırma sonrası ve ekilibrasyon sonrası plazma membran bütünlüğü kendi içerisinde karşılaştırıldığında, spermanın sıcaklığının +5 °C'a düşürülmesi, gliserilizasyon ve ekilibrasyon işlemlerinin sulandırıcı içeriğinden bağımsız olarak plazma membran bütünlüğünde azalmaya neden olduğu saptandı ($P<0,05$).

Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarına ait sulandırma sonrası akrozomal hasar oranları sırasıyla %9,00; %8,80; %8,60; %8,60; %8,80; %8,80; %8,40 ve %9,20; ekilibrasyon sonrası değerler ise sırasıyla %11,00; %10,20; %9,40; %10,00; %10,00; %10,20; %9,60 ve %10,60 olarak belirlendi. Sperma grupları sulandırma ve ekilibrasyon aşamalarının her biri kendi içinde değerlendirildiğinde, akrozomal hasar oranının benzer olduğu sonucuna varıldı ($P>0,05$). Spermanın sulandırma sonrası sıcaklığının 5°C 'a düşürülmesi, gliserolizasyon ve ekilibrasyon işlemlerinin, tüm gruplarda akrozomal hasar oranının istatistiksel olarak artmasına neden olduğu gözlemlendi ($P<0,05$).

Sulandırma sonrası Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarına ait DNA hasarı oranı sırasıyla %3,80; %3,60; %3,60; %4,20; %4,00; %3,80; %3,60 ve %3,80 olarak saptandı. Ekilibrasyon sonrası Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S, ASP%15S gruplarına ait DNA hasarı oranı ise sırasıyla %5,00; %4,20; %4,40; %4,60; %4,40; %4,20; %4,20 ve %4,40 olarak bulundu. Hem sulandırma sonrası hem ekilibrasyon sonrası DNA hasarı bakımından gruplar arasında istatistiksel bir farklılık olmadığı gözlemlendi ($P>0,05$). Ayrıca, yapılan bağımlı değişken testleri ışığında, spermanın sulandırılması, gliserilizasyon ve ekilibrasyon işlemleri kontrol grubunun DNA bütünlük oranında azalmaya neden olurken ($P<0,05$), aynı işlemlerin diğer çalışma gruplarının DNA bütünlük oranında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe neden olmadığı sonucuna varıldı ($P>0,05$).

TABLO-5. Sulandırma Sonrası ve Eklirasyon Sonrası Elde Edilen Spermatojik Parametreler ($\bar{x}\pm S\bar{x}$).

AŞAMA	GRUP	n	Motilite (%)	Plazma Membran Bütünlüğü (%)	Akrozom Hasarı (%)	DNA Hasarı (%)
Sulandırma sonrası	KONTROL	5	79,00±2,24 ^{ab}	83,00±5,15	9,00±1,22	3,80±0,45
	ASP%1	5	78,00±2,74 ^a	85,60±2,70	8,80±1,30	3,60±0,55
	ASP%10	5	80,00±3,54 ^{ab}	85,80±2,50	8,60±1,34	3,60±0,90
	ASP%15	5	79,00±2,24 ^{ab}	85,20±2,68	8,60±0,90	4,20±0,84
	KONTROLS	5	81,00±2,23 ^{ab}	86,00±1,58	8,80±0,84	4,00±1,00
	ASP%1S	5	80,00±0,00 ^{ab}	86,80±1,79	8,80±0,45	3,80±0,45
	ASP%10S	5	83,00±2,73 ^b	88,00±1,41	8,40±0,90	3,60±0,90
	ASP%15S	5	81,00±2,23 ^{ab}	86,20±0,84	9,20±1,10	3,80±0,45
Eklirasyon sonrası	KONTROL	5	73,00±2,74	78,20±2,59 ^a	11,00±0,71	5,00±0,71
	ASP%1	5	75,00±3,54	81,20±3,56 ^{ab}	10,20±1,10	4,20±0,45
	ASP%10	5	75,00±3,54	82,00±2,12 ^{ab}	9,40±1,52	4,40±0,55
	ASP%15	5	73,00±2,74	80,80±1,48 ^{ab}	10,00±1,43	4,60±0,90
	KONTROLS	5	77,00±2,74	83,20±2,59 ^b	10,00±1,41	4,40±1,14
	ASP%1S	5	74,00±2,24	83,00±1,78 ^{ab}	10,20±0,84	4,20±0,43
	ASP%10S	5	78,00±2,74	84,20±1,79 ^b	9,60±0,89	4,20±0,45
	ASP%15S	5	75,00±5,00	80,20±2,39 ^{ab}	10,60±1,14	4,40±0,55

a,b,: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası istatistiksel fark vardır (P<0,05).

TABLO-6. Sperm Kriyoprezervasyon Aşamalarınınve Eritme Sonrası İnkübasyonun (3 ve 5. Saatler) Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkileri ($\bar{x}\pm S\bar{x}$).

	GRUP	Sulandırma sonrası	Ekilibrasyon sonrası	Eritme sonrası	İnkübasyon 3. Saat	İnkübasyon 5. Saat
Motilite (%)	KONTROL	79,00±2,24 ^a	73,00±2,74 ^b	42,33±3,20 ^c	28,00±2,74 ^d	16,00±2,23 ^e
	ASP%1	78,00±2,74 ^a	75,00±3,54 ^a	52,67±3,20 ^b	40,00±3,54 ^c	32,00±2,74 ^d
	ASP%10	80,00±3,54 ^a	75,00±3,54 ^b	60,00±4,23 ^c	47,00±2,74 ^d	41,00±2,24 ^e
	ASP%15	79,00±2,24 ^a	73,00±2,74 ^b	57,00±3,16 ^c	38,00±2,74 ^d	31,00±2,24 ^e
	KONTROLS	81,00±2,23 ^a	77,00±2,74 ^b	53,33±3,09 ^c	41,00±2,24 ^d	34,00±4,18 ^e
	ASP%1S	80,00±0,00 ^a	74,00±2,24 ^b	54,67±2,97 ^c	42,00±2,73 ^d	37,00±2,74 ^e
	ASP%10S	83,00±2,73 ^a	78,00±2,74 ^b	63,66±3,52 ^c	50,00±3,54 ^d	45,00±3,54 ^e
	ASP%15S	81,00±2,23 ^a	75,00±5,00 ^b	57,33±3,72 ^c	46,00±2,24 ^d	38,00±2,74 ^e
Plazma Membran Bütünlük (%)	KONTROL	83,00±5,15 ^a	78,20±2,59 ^b	60,20±3,11 ^c	33,00±4,00 ^d	21,00±2,55 ^e
	ASP%1	85,60±2,70 ^a	81,20±3,56 ^b	61,60±2,41 ^c	45,80±3,56 ^d	40,00±2,24 ^e
	ASP%10	85,80±2,50 ^a	82,00±2,12 ^b	65,60±3,85 ^c	56,00±2,65 ^d	50,20±1,92 ^e
	ASP%15	85,20±2,68 ^a	80,80±1,48 ^b	62,00±2,00 ^c	44,00±2,92 ^d	36,40±3,78 ^e
	KONTROLS	86,00±1,58 ^a	83,20±2,59 ^b	62,00±2,55 ^c	48,40±2,30 ^d	40,40±3,78 ^e
	ASP%1S	86,80±1,79 ^a	83,00±1,78 ^b	62,60±2,40 ^c	51,60±2,41 ^d	46,60±1,52 ^e
	ASP%10S	88,00±1,41 ^a	84,20±1,79 ^b	71,70±1,95 ^c	60,40±2,41 ^d	56,40±3,71 ^e
	ASP%15S	86,20±0,84 ^a	80,20±2,39 ^b	62,40±3,05 ^c	53,00±2,24 ^d	47,80±2,68 ^e
Akrozom Hasarı (%)	KONTROL	9,00±1,22 ^a	11,00±0,71 ^b	37,20±1,92 ^c	41,60±2,88 ^d	48,00±2,35 ^e
	ASP%1	8,80±1,30 ^a	10,20±1,10 ^b	36,40±1,52 ^c	39,60±1,82 ^d	43,80±2,28 ^d
	ASP%10	8,60±1,34 ^a	9,40±1,52 ^b	33,00±1,22 ^c	35,60±0,90 ^d	39,20±2,86 ^e
	ASP%15	8,60±0,90 ^a	10,00±1,43 ^b	36,60±1,52 ^c	40,60±1,52 ^d	45,40±4,04 ^e
	KONTROLS	8,80±0,84 ^a	10,00±1,41 ^b	33,60±2,07 ^c	37,40±2,07 ^d	42,20±4,50 ^e
	ASP%1S	8,80±0,45 ^a	10,20±0,84 ^b	30,80±1,64 ^c	34,40±2,19 ^d	39,80±1,48 ^e
	ASP%10S	8,40±0,90 ^a	9,60±0,89 ^b	28,80±1,79 ^c	31,80±1,30 ^d	33,80±1,30 ^e
	ASP%15S	9,20±1,10 ^a	10,60±1,14 ^b	32,20±1,48 ^c	36,00±2,24 ^d	39,20±1,30 ^e
DNA Hasarı (%)	KONTROL	3,80±0,45 ^a	5,00±0,71 ^b	10,80±0,86 ^c	12,20±1,30 ^d	13,80±1,64 ^e
	ASP%1	3,60±0,55 ^a	4,20±0,45 ^a	9,00±0,71 ^b	9,80±1,30 ^b	11,00±1,41 ^c
	ASP%10	3,60±0,90 ^a	4,40±0,55 ^a	6,20±0,84 ^b	6,60±0,90 ^b	7,60±1,52 ^b
	ASP%15	4,20±0,84 ^a	4,60±0,90 ^a	7,80±0,84 ^b	8,20±1,45 ^b	9,20±0,45 ^c
	KONTROLS	4,00±1,00 ^a	4,40±1,14 ^a	10,20±0,45 ^b	10,80±0,84 ^b	11,60±0,55 ^c
	ASP%1S	3,80±0,45 ^a	4,20±0,43 ^a	7,40±0,89 ^b	8,20±0,84 ^c	8,80±0,84 ^c
	ASP%10S	3,60±0,90 ^a	4,20±0,45 ^a	6,40±0,55 ^b	6,80±0,45 ^b	7,00±0,71 ^b
	ASP%15S	3,80±0,45 ^a	4,40±0,55 ^a	7,60±1,14 ^b	8,40±1,14 ^c	8,80±0,84 ^c

a,b,c,d,e Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arası istatistiksel fark vardır (P<0,05).

4.2. Eritme Sonrası Saptanan Spermatolojik Bulgular

4.2.1. Eritme Sonrası 0. Saatte Saptanan Spermatolojik Bulgular

Eritme sonrası 0. saat Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarına ait motilite değerleri sırasıyla; %42,33; %52,67; %60,00; %57,00; %53,33; %54,67; %63,66 ve %57,33 olarak belirlendi (Tablo-7). Kontrol grubuna ait motilite değerinin (%42,33) diğer tüm gruplardan daha düşük olduğu gözlemlendi ($P<0,05$). Eritme sonrası en yüksek motilite değeri ASP%10S (%63,66) grubundan elde edilirken, söz konusu motilite değeri ile yalnızca ASP%10 grubu motilite değeri arasında istatistiksel bir fark gözlemlenmedi ($P>0,05$). Ayrıca, aynı oranda ASP eklenen gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında (ASP%1-ASP%1S, ASP%10-ASP%10S ve ASP%15-ASP%15S), sisten eklenmesinin 0. saat motilite değerleri üzerinde istatistiksel bir farka yol açmadığı gözlemlendi ($P>0,05$). Tüm grupların eritme sonrası ve ekilibrasyon sonrası motilite değerleri karşılaştırıldığında, spermanın dondurma-eritme aşamasının sulandırıcı içeriğinden bağımsız olarak motilite oranlarında düşüşe neden olduğu gözlemlendi ($P<0,01$).

Dondurma-eritme işlemleri sonrası Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarına ait plazma membran bütünlük oranları sırasıyla; %60,20; %61,60; %65,60; %62,00; %62,00; %62,60; %71,70 ve %62,40 olarak saptandı. Eritme sonrası en yüksek plazma membran fonksiyonel bütünlük oranı, motilite parametreleri ile paralel olarak ASP%10S sulandırıcısı ile sulandırılan grupta bulunurken ($P<0,05$), diğer deneme grupları arasında plazma membran fonksiyonel bütünlük yönünden istatistiksel olarak bir fark olmadığı gözlemlendi ($P>0,05$). Dondurma-eritme işlemleri sonrası tüm grupların plazma membran bütünlük oranlarının, ekilibrasyon sonrası değerlere göre istatistiksel olarak düştüğü saptandı ($P<0,01$).

Mevcut değerlendirme zamanında Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarına ait akrozom hasar değerleri sırasıyla %37,20; %36,40; %33,00; %36,60; %33,60; %30,80; %28,80 ve %32,20 olarak saptandı. Eritme sonrası kontrol grubu akrozomal hasar oranının ASP%1 ve ASP%15

grubundan rakamsal olarak ($P>0,05$) diğer tüm gruplardan ise istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlendi ($P<0,05$). Sayısal olarak en düşük akrozom hasarı oranı (%28,80) ASP%10S grubundan elde edilmesine karşın, sistein içeren ASP grupları (ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S) ile arasında istatistiksel bir fark olmadığı gözlemlendi ($P>0,05$). Ayrıca, aynı oranda ASP (%0, %1, %10 ve %15) eklenen tüm gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde, sistein eklenen gruplarda akrozom hasar oranının sistein eklenmemiş versiyonlarına göre daha düşük olduğu sonucuna varıldı ($P<0,05$). Eritme sonrası ve ekilibrasyon sonrası PSA boyama sonuçları karşılaştırıldığında, spermanın dondurma-eritme işlemlerinin akrozomal hasar oranında artışa neden olduğu gözlemlendi ($P<0,05$).

Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarına ait DNA fragmentasyon oranları sırasıyla %10,80; %9,00; %6,20; %7,80; %10,20; %7,40; %6,40 ve %7,60 saptandı. Kontrol (%10,80) ve KontrolS (%10,20) gruplarına ait DNA fragmentasyon oranı diğer tüm gruplara göre daha yüksek bulundu ($P<0,05$). En düşük DNA hasarı ise ASP%10 (%6,20) ve ASP%10S (%6,40) sulandırıcıları ile dondurulan spermalarda belirlenirken, söz konusu çalışma grupları ile ASP%15, ASP%1S, ASP%15S grupları arasında DNA fragmentasyon oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmedi ($P>0,05$). Aynı dozda ASP eklenen gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde, sistein eklenmesinin DNA bütünlük oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı gözlemlendi ($P>0,05$). Buna karşın, dondurma-eritme işlemlerinin tüm çalışma gruplarında DNA bütünlüğünü olumsuz etkilediği saptandı ($P<0,05$).

TABLO-7. Eritme Sonrası Elde Edilen Spermatolojik Parametreler ($\bar{x}\pm S\bar{x}$).

GRUP	n	Motilite (%)	Plazma Membran Bütünlüğü (%)	Akrozom hasarı (%)	DNA Hasarı (%)
KONTROL	15	42,33±3,20 ^a	60,20±3,11 ^a	37,20±1,92 ^a	10,80±0,86 ^a
ASP%1	15	52,67±3,20 ^b	61,60±2,41 ^a	36,40±1,52 ^{abc}	9,00±0,71 ^{bc}
ASP%10	15	60,00±4,23 ^{cf}	65,60±3,85 ^a	33,00±1,22 ^{bd}	6,20±0,84 ^d
ASP%15	15	57,00±3,16 ^{cde}	62,00±2,00 ^a	36,60±1,52 ^{ac}	7,80±0,84 ^{bd}
KONTROLS	15	53,33±3,09 ^{bd}	62,00±2,55 ^a	33,60±2,07 ^{bcd}	10,20±0,45 ^{ac}
ASP%1S	15	54,67±2,97 ^{bde}	62,60±2,40 ^a	30,80±1,64 ^{de}	7,40±0,89 ^{bd}
ASP%10S	15	63,66±3,52 ^f	71,70±1,95 ^b	28,80±1,79 ^e	6,40±0,55 ^d
ASP%15S	15	57,33±3,72 ^{ce}	62,40±3,05 ^a	32,20±1,48 ^{de}	7,60±1,14 ^{bd}

a,b,c,d,e: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası istatistiksel fark vardır (P<0,05).

4.2.2. İnkübasyonun 3. Saatinde Saptanan Spermatolojik Bulgular

İnkübasyonun 3. saatinde Kontrol, ASP% 1, ASP% 10, ASP% 15, KontrolS, ASP% 1S, ASP% 10S ve ASP%15S motilite oranları sırasıyla %28,00; %40,00; %47,00; %38,00; %41,00; %42,00; %50,00; %46,00 olarak saptandı (Tablo-8). Deneme grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, Kontrol grubunun inkübasyonun 3. saatinde motilite oranının (%28,00) en düşük olduğu gözlemlendi (P<0,05). Sayısal olarak en yüksek motilite oranı ASP%10S (%50,00) grubundan elde edilmesine karşın, elde edilen sonuçlar ASP% 10 ve ASP% 15S motilite değerleri ile benzer bulundu (P>0,05). ASP eklenmeyen (Kontrol ve KontrolS) ve %15 ASP eklenen gruplarda (ASP% 15 ve ASP% 15S), sistein eklenen grupların sistein bulunmayan versiyonlarına göre motilite değerlerinin daha yüksek olduğu gözlemlendi (P<0,05). Buna karşın, %1 ve %10 ASP eklenen gruplarda sistein eklenmesinin motilite üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmadığı gözlemlendi (P>0,05). İnkübasyonun 3. saatinde deneme gruplarına ait motilite değerleri, eritme sonrası 0. saat motilite değerleri ile karşılaştırıldığında; inkübasyon süresinin uzamasının motiliteyi düşürdüğü gözlemlendi (P<0,01). İnkübasyonun 3. saatinde Kontrol, ASP% 1, ASP% 10, ASP% 15, KontrolS, ASP% 1S, ASP% 10S, ve ASP% 15S gruplarına ait plazma membran fonksiyonel bütünlük oranları sırasıyla %33,00; %45,80; %56,00; %44,00; %48,40; %51,60; %60,40 ve %53,00 olarak saptandı. ASP% 10S (%60,40) grubunun plazma membran fonksiyonel bütünlük oranı, diğer gruplardan istatistiksel olarak yüksek bulundu (P<0,05). En düşük plazma membran fonksiyonel bütünlük oranı %33,00 ile Kontrol grubundan elde edildi (P<0,05). Sulandırıcıya sistein

eklenmesi %1 ve %10 ASP içeren çalışma gruplarında (ASP%1-ASP%1S ve ASP%10-ASP%10S) anlamlı bir etki oluşturmazken ($P>0,05$), aynı oranda ASP eklenen diğer tüm çalışma gruplarında (Kontrol-KontrolS ve ASP%15-ASP%15S) sistein eklenmesinin plazma membran fonksiyonel bütünlüğünü olumlu yönde etkilediği gözlemlendi ($P<0,05$). İnkübasyonun 3. saatinde çalışma gruplarına ait plazma membran bütünlük oranlarının, eritme sonrası 0. saatte aynı grupların gözlemlenen plazma membran bütünlük değerlerinden düşük olduğu saptandı ($P<0,05$).

İnkübasyonun 3. saatinde Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarına akrozom hasarı oranları sırasıyla %41,60; %39,60; %35,60; %40,60; %37,40; %34,40; %31,80; %36,00 olarak tespit edildi. ASP%10S grubu akrozomal hasar oranı (%31,80) Kontrol, ASP%1, ASP%15, KontrolS ve ASP%15S gruplarından istatistiksel olarak ($P<0,05$), diğer tüm gruplardan ise rakamsal olarak düşük bulundu. Yalnızca %10 oranında ASP ilave edilen gruplarda sistein ilavesinin akrozom hasar oranında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı gözlemlendi ($P>0,05$). Mevcut zaman dilimi verileri ile eritme sonrası elde edilen veriler karşılaştırıldığında inkübasyonun ilk 3 saati tüm gruplarda akrozomal hasar oranında artışa neden olduğu belirlendi ($P<0,05$).

İnkübasyonun ilk üç saatinde Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarına ait DNA fragmentasyon oranları sırasıyla %12,20; %9,80; %6,60; %8,20; %10,80; %8,20; %6,80; %8,40 olarak saptandı. Kontrol (%12,20) ve KontrolS (%10,80) grubu DNA fragmentasyon oranları; ASP%1S ve KontrolS grubu arasındaki benzerlik dışında tüm çalışma gruplarından istatistiksel olarak daha yüksek bulundu ($P<0,05$). Aynı oranda ASP içeren gruplar kendi arasında değerlendirildiğinde, sulandırıcıya sistein eklenmesinin %0 ve %1 ASP içeren gruplarda DNA fragmentasyon oranını rakamsal olarak düşürmesine karşın, istatistiksel olarak anlamlı bir farka neden olmadığı gözlemlendi ($P<0,05$). İnkübasyonun 0. ve 3. saati karşılaştırıldığında, Kontrol, ASP%1S ve ASP%15S gruplarında DNA fragmentasyon oranının istatistiksel ($P<0,05$), diğer gruplarda ise rakamsal olarak arttığı gözlemlendi ($P>0,05$).

Tablo-8. İnkübasyon 3. Saatinde Elde Edilen Spermatojik Bulgular ($\bar{x}\pm S\bar{x}$).

GRUP	n	Motilite (%)	Plazma Membran Bütünlüğü (%)	Akrozom Hasarı (%)	DNA Hasarı (%)
KONTROL	15	28,00±2,74 ^a	33,00±4,00 ^a	41,60±2,88 ^a	12,20±1,30 ^a
ASP%1	15	40,00±3,54 ^b	45,80±3,56 ^{bd}	39,60±1,82 ^{abc}	9,80±1,30 ^{bd}
ASP%10	15	47,00±2,74 ^{ce}	56,00±2,65 ^{cf}	35,60±0,90 ^{bde}	6,60±0,90 ^c
ASP%15	15	38,00±2,74 ^b	44,00±2,92 ^b	40,60±1,52 ^{ac}	8,20±1,45 ^{cd}
KONTROLS	15	41,00±2,24 ^{bd}	48,40±2,30 ^{bde}	37,40±2,07 ^{bcd}	10,80±0,84 ^{ab}
ASP%1S	15	42,00±2,73 ^{bcd}	51,60±2,41 ^{cde}	34,40±2,19 ^{de}	8,20±0,84 ^{cd}
ASP%10S	15	50,00±3,54 ^e	60,40±2,41 ^f	31,80±1,30 ^e	6,80±0,45 ^c
ASP%15S	15	46,00±2,24 ^{cde}	53,00±2,24 ^{ce}	36,00±2,24 ^{bd}	8,40±1,14 ^{cd}

a,b,c,d,e,f : Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası istatistiksel fark vardır (P<0,05).

4.2.3. İnkübasyonun 5. Saatinde Saptanan Spermatojik Bulgular

İnkübasyonun 5. saatinde Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarının motilite oranları sırasıyla %16,00; %32,00; %41,00; %31,00; %34,00; %37,00; %45,00 ve %38,00 olarak saptandı (Tablo-9). Kontrol grubu motilite değeri (%16,00) diğer tüm çalışma gruplarından düşük olarak bulundu (P<0,05). Rakamsal olarak en yüksek motilite değerleri ASP%10 ve ASP%10S gruplarında elde edildi. ASP%10S grubunun motilite değerinin, ASP%10 grubu hariç, diğer gruplardan istatistiksel olarak yüksek olduğu gözlemlendi (P<0,05). Sulandırıcıya sistein eklenmesinin %1 ve %10 oranında ASP içeren gruplarda motilite değerinde istatistiksel bir fark yaratmamasına karşın (P>0,05), diğer tüm çalışma gruplarında motilite oranında artışa neden olduğu gözlemlendi (P<0,05). İnkübasyonun 5. saatine ait motilite değerleri 3. saat değerleri ile karşılaştırıldığında, tüm çalışma gruplarının motilite değerlerinde bir düşüş olduğu gözlemlendi (P<0,01).

İnkübasyonun 5. saatinde Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarına ait plazma membran bütünlük oranları sırasıyla %21,00; %40,00; %50,20; %36,40; %40,40; %46,60; %56,40; %47,80 olarak saptandı. Kontrol grubunun plazma membran fonksiyonel bütünlük oranı en düşük olurken, ASP%10S grubunun ise plazma membran bütünlük oranının en yüksek olduğu gözlemlendi (P<0,05). Aynı oranda ASP içeren tüm gruplarda ve kontrol grubunda; sistein ilave edilen grupların sistein ilave edilmeyen versiyonlarına daha yüksek plazma

membran fonksiyonel bütünlük oranına sahip olduğu saptandı ($P<0,05$). İnkübasyonun son 2 saatinin yalnızca ASP%1 grubu plazma membran fonksiyonel bütünlük değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe neden olmadığı gözlemlendi ($P>0,05$).

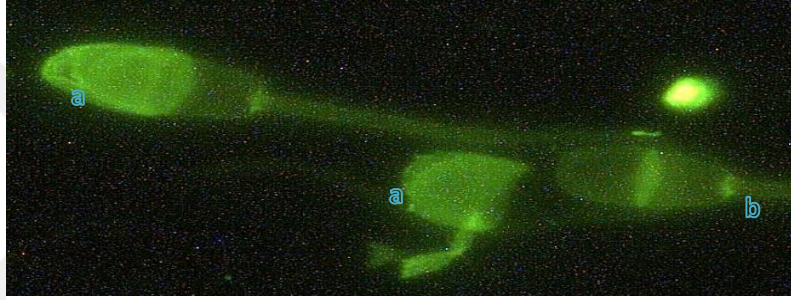
İnkübasyonun 5. saatinde Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarında akrozomal hasar oranları sırasıyla %48,00; %43,80; %39,20; %45,40; %42,20; %39,80; %33,80 ve %39,20 olarak saptandı. En düşük akrozomal hasar oranları ASP%10, ASP%10S ve ASP%15S gruplarında gözlemlendi ($P>0,05$). ASP içermeyen ve %15 oranında ASP içeren gruplarda sistein eklenmesinin akrozomal hasar oranında azalma sağladığı ($P<0,05$), diğer çalışma gruplarında ise sistein eklenmesinin akrozom hasarı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye neden olmadığı gözlemlendi ($P>0,05$). İnkübasyonun 3 ve 5. saatleri karşılaştırıldığında, ASP%1 grubu dışında diğer tüm çalışma gruplarında akrozom bütünlük bozukluk oranının istatistiksel olarak arttığı gözlemlendi ($P<0,05$).

İnkübasyonun 5. saatinde Kontrol, ASP%1, ASP%10, ASP%15, KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarına DNA hasarı oranları sırasıyla %13,80; %11,00; %7,60; %9,20; %11,60; %8,80; %7,00 ve %8,80 olarak belirlendi. Kontrol ve KontrolS gruplarına ait DNA hasar oranı, diğer tüm çalışma gruplarından rakamsal olarak daha yüksek bulundu. ASP%10 ve ASP%10S gruplarının DNA fragmentasyon oranının ise diğer tüm grupların DNA kırık oranından rakamsal olarak daha düşük olduğu saptandı. Aynı oranda ASP içeren tüm çalışma gruplarında, inkübasyonun 5. saatinde sistein eklenmesinin DNA fragmentasyon oranı üzerinde anlamlı bir etkisinin bulunmadığı gözlemlendi ($P>0,05$). İnkübasyonun son iki saatinin ASP%10, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarına ait DNA hasar oranında istatistiksel anlamlı bir artışa neden olmadığı saptandı ($P>0,05$). Kontrol, KontrolS, ASP%1 ve ASP%15 çalışma gruplarında ise inkübasyon süresinin artması ile birlikte DNA fragmentasyonundaki artış dikkat çekici bulundu ($P<0,05$). Ayrıca, tüm inkübasyon süreci göz önünde bulundurulduğunda (0. saat - 5. saat), ASP%10 ve ASP%10S gruplarının DNA fragmentasyon oranı, inkübasyon boyunca rakamsal olarak artmasına karşın, istatistiksel bir farkın olmadığı gözlemlendi ($P>0,05$).

Tablo-9. İnkubasyon 5. Saatinde Elde Edilen Spermatolojik Bulgular ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

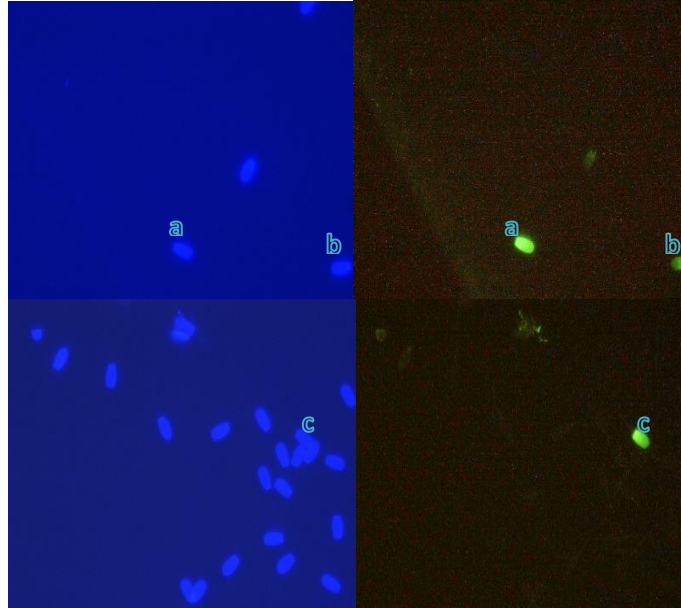
GRUP	N	Motilite (%)	Plazma Membran Bütünlüğü (%)	Akrozom Hasarı (%)	DNA Hasarı(%)
KONTROL	15	16,00±2,23 ^a	21,00±2,55 ^a	48,00±2,35 ^a	13,80±1,64 ^a
ASP% 1	15	32,00±2,74 ^{bd}	40,00±2,24 ^b	43,80±2,28 ^{abc}	11,00±1,41 ^{bd}
ASP% 10	15	41,00±2,24 ^{cf}	50,20±1,92 ^c	39,20±2,86 ^{bd}	7,60±1,52 ^c
ASP% 15	15	31,00±2,24 ^b	36,40±3,78 ^b	45,40±4,04 ^{ac}	9,20±0,45 ^{cd}
KONTROLS	15	34,00±4,18 ^{bde}	40,40±3,78 ^b	42,20±4,50 ^{bc}	11,60±0,55 ^{ab}
ASP% 1S	15	37,00±2,74 ^{def}	46,60±1,52 ^c	39,80±1,48 ^{bc}	8,80±0,84 ^{cd}
ASP% 10S	15	45,00±3,54 ^c	56,40±3,71 ^d	33,80±1,30 ^d	7,00±0,71 ^c
ASP% 15S	15	38,00±2,74 ^{ef}	47,80±2,68 ^c	39,20±1,30 ^{bd}	8,80±0,84 ^{cd}

a,b,c,d,e,f : Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası istatistiksel fark vardır (P<0,05).



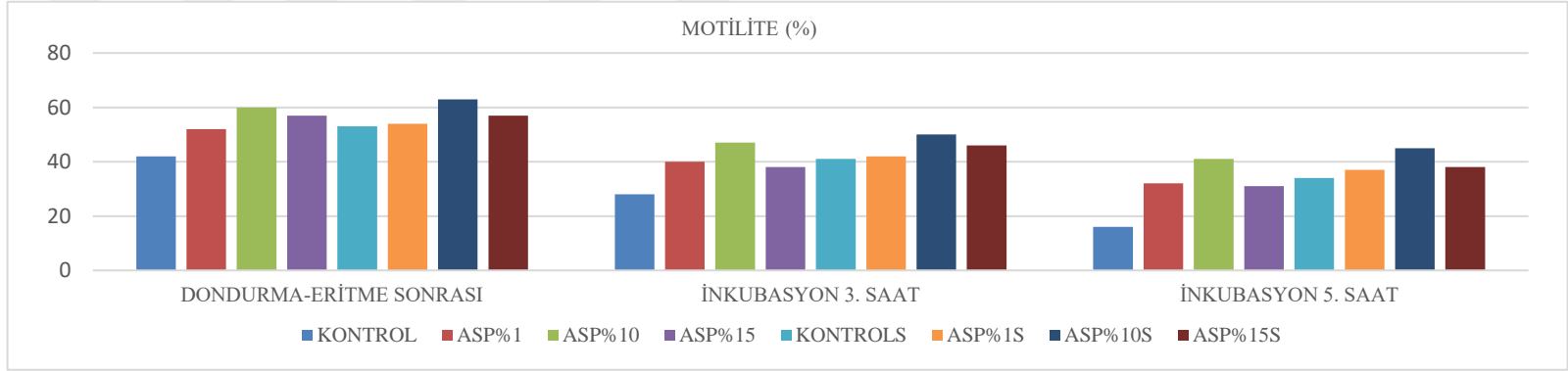
Şekil-2. PSA-FITC boyama sonucu akrozomal morfolojinin değerlendirilmesi.

a: Akrozombölgesi morfolojik bütünlüğünü kaybetmiş spermatozoon
b: Akrozomal bütünlüğünü koruyan spermatozoon

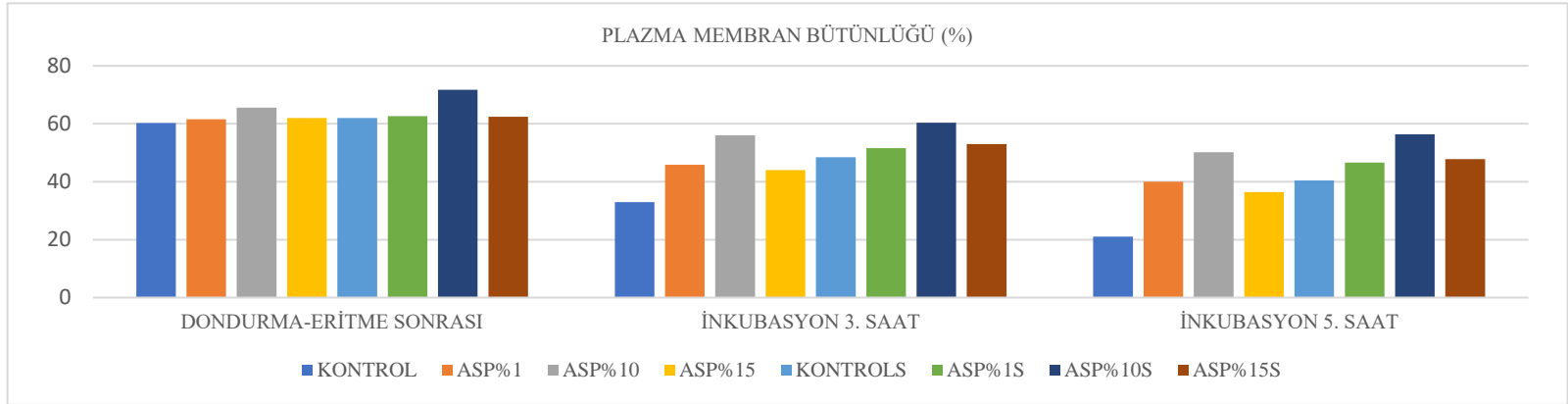


Şekil-3: TUNEL boyama ile DNA hasarının belirlenmesi

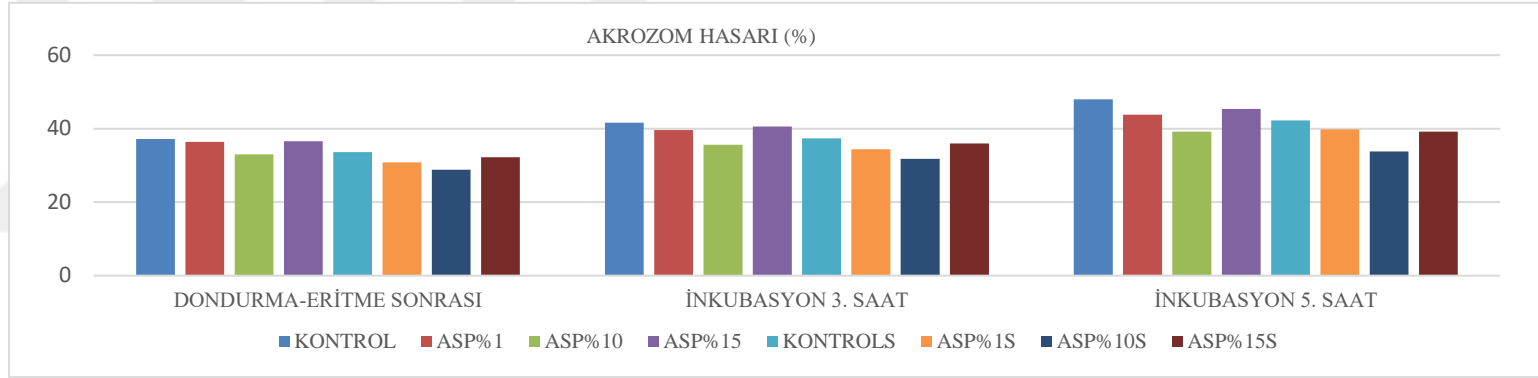
a,b,c: DNA fragmentasyonu olan spermatozoon. Aynı mikroskop alanında farklı küplerde (Sol: DAPI, Sağ: Test Küpü) floresan renk veren spermatozoon işaretçi ile işaretlenmiştir.



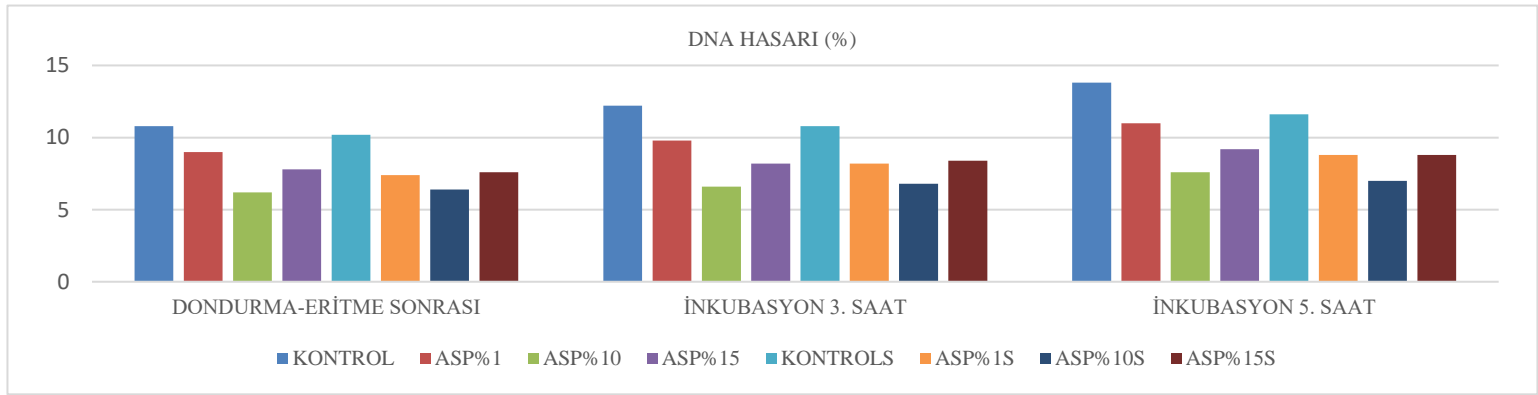
Şekil-4: Dondurma-eritme sonrası 0, 3 ve 5. saatlerde çalışma gruplarına ait motilite oranları (%)



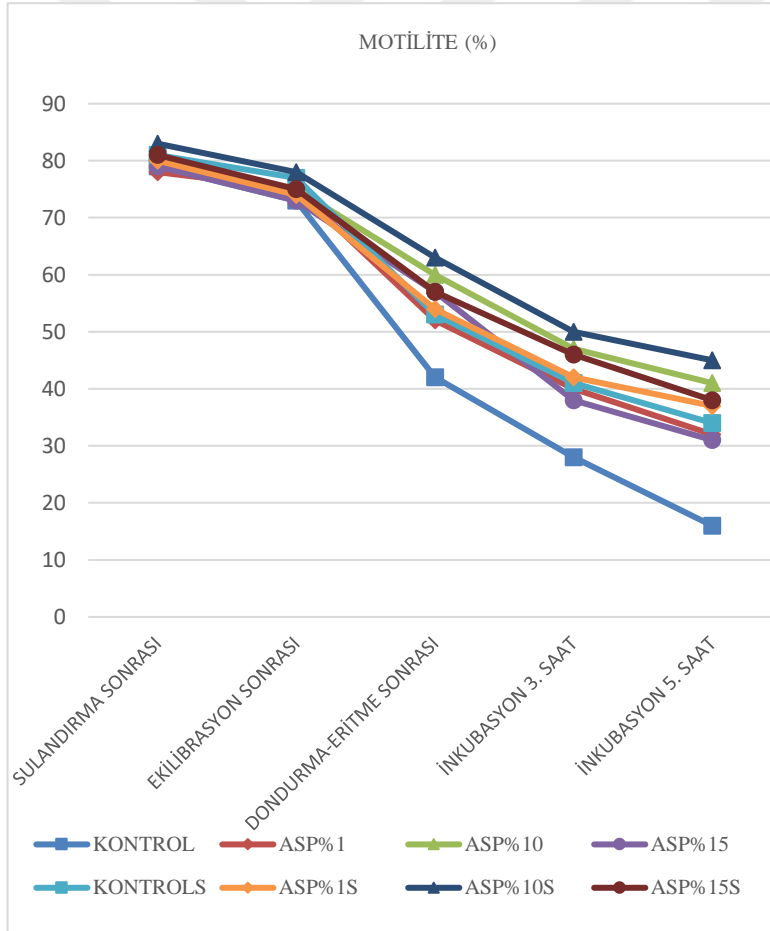
Şekil-5: Dondurma-eritme sonrası 0, 3 ve 5. saatlerde çalışma gruplarına ait plazma membran bütünlük oranları (%)



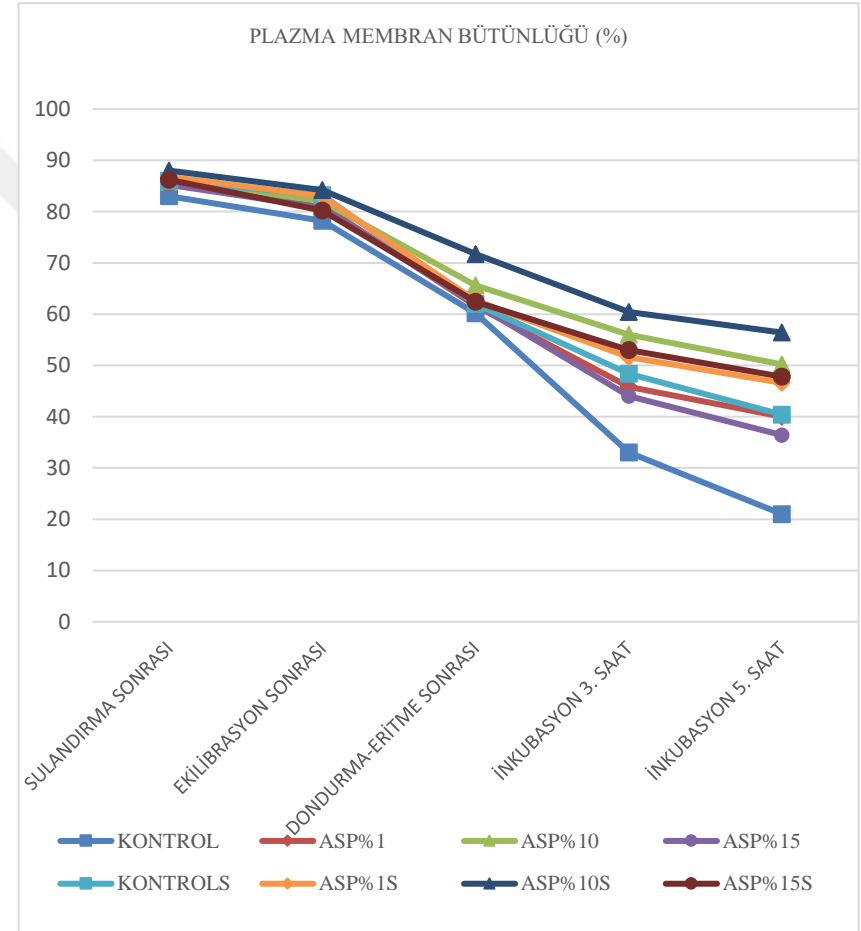
Şekil-6: Dondurma-eritme sonrası 0, 3 ve 5. saatlerde çalışma gruplarına ait akrozom hasarı oranları (%)



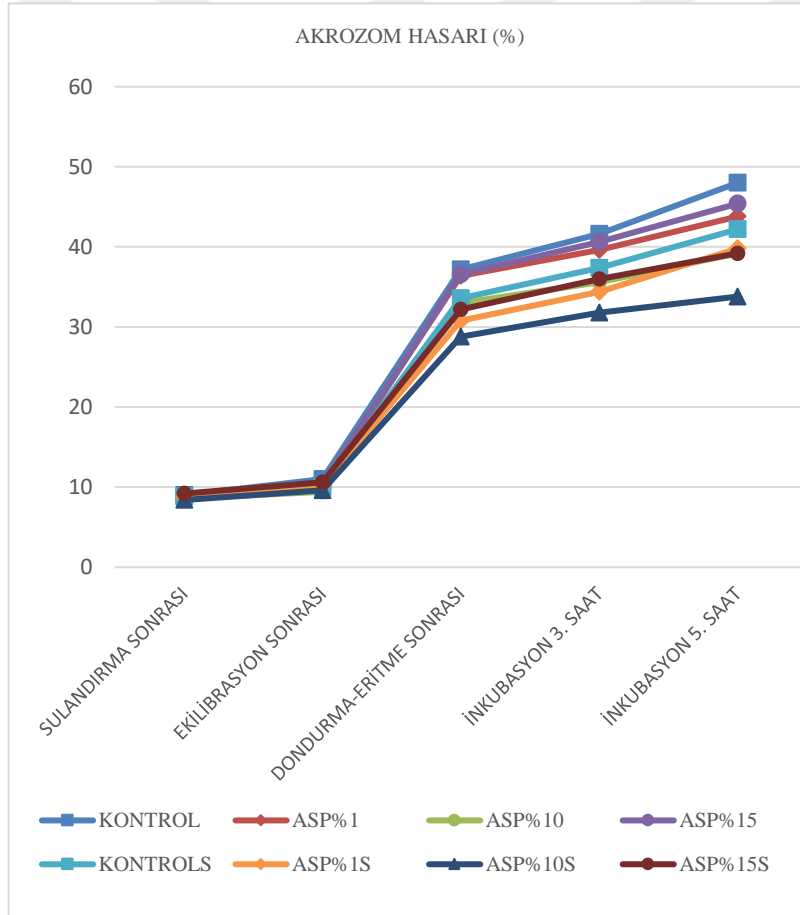
Şekil-7: Dondurma-eritme sonrası 0, 3 ve 5. saatlerde çalışma gruplarına ait DNA fragmentasyon oranları (%)



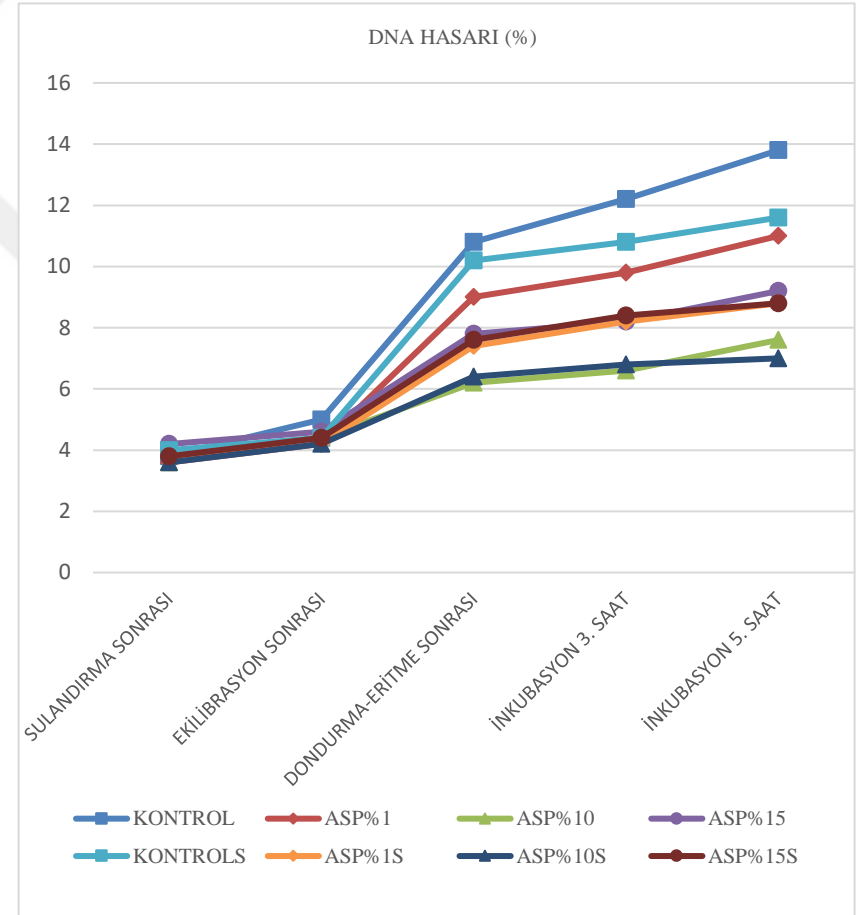
Şekil-8: Dondurma-eritme sonrası 0, 3 ve 5. saatlerde aşamalarına göre motilite oranları (%)



Şekil-9: Dondurma-eritme sonrası 0, 3 ve 5. saatlerde aşamalarına göre plazma membran bütünlük oranları (%)



Şekil-9: Dondurma-eritme sonrası 0, 3 ve 5. saatlerde aşamalarına göre akrozom hasarı oranları (%)



Şekil-10: Dondurma-eritme sonrası 0, 3 ve 5. saatlerde aşamalarına göre DNA fragmentasyon oranları (%)

5. TARTIŞMA

Suni tohumlama, hayvan ıslahı alanındaki en önemli reproduktif biyoteknolojik gelişmedir. Suni tohumlama, hızlı verim artışı (genetik iyileşme) sağlaması, veneral hastalıkların kontrolü ve daha ekonomik olması nedeniyle yirminci ve yirmi birinci yüzyılda doğal aşımaya göre daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Suni tohumlama başarısının artırılması için ise spermanın en uygun şekilde dondurulması ve eritme sonrası yüksek spermatolojik değerler elde edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, spermanın kriyoprezervasyon teknolojisinin reproduktif biyoteknoloji içerisinde önemli bir yeri vardır. Dünya genelinde suni tohumlama biyoteknolojisinin en yaygın olarak kullanıldığı çiftlik hayvanları sığır ve domuzlar olmasına rağmen; koyunculuk sektöründe ise kabul edilebilir gebelik oranları elde edilemediğinden, suni tohumlama uygulamalarından aynı ölçüde yararlanılamamaktadır. Bunun en önemli nedeni, koç spermasının dondurma işlemlerine diğer çiftlik hayvanlarından çok daha duyarlı olmasıdır.

Spermanın dondurma-eritme sonrası fertilitite yeteneğini etkileyen ilk parametre olarak taze spermanın kalitesi önem kazanmaktadır. Spermanın kalitesi ise genetik gibi bireysel faktörlerin yanı sıra sperma alma yöntemi ve sıklığı, bakım-beslenme koşulları, sağlık durumu gibi çevresel faktörlerden de etkilenebilmektedir. Bu nedenle, tez çalışmasında aynı bakım ve besleme koşullarında barındırılan 2-4 yaşlı 10 adet koç kullanılmış ve spermanın dondurulması sırasında bireysel faktörleri elimine etmek amacıyla pooling işlemi yapıldı. Alınan taze spermada spermatolojik muayeneler yapılarak; pooling için kullanılacak sperma örneklerinin seçimi gerçekleştirildi. Bunun için en az +++ mass aktivite, %80 motilite ve 1×10^9 spt/mL yoğunluğu olan sperma örnekleri pooling yapılmak üzere ayrıldı.

Pooling yapılan spermada ortalama motilite, HOST, PSA ve TUNEL değerleri sırasıyla %83,00; %89,80; %8,20 ve %3,40 olarak saptandı. En az %75 motilitesi olan ejakülatlarla pooling yapan Alçay ve ark. (2016), pooling sonrası %77 motilite elde ederken, en az %70 motilitesi olan taze sperma örnekleri ile pooling yapan Toker (2018),

pooling sonrası %84,00 ve yine en az %70 motilite gösteren ejakulatlarla pooling yapan Soylu ve ark., (2007) ise, pooling sonrası %72,2 motilite elde etmişlerdir. Tez çalışmasında pooling sonrası elde edilen motilite değerinin Alçay ve ark., (2016) ile Soylu ve ark., (2007)'nin elde ettiği sonuçlardan daha yüksek bulunması, çalışmamızda pooling yapmak için yeğlenen taze spermaya ait minimum motilite değerlerinin daha yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir. Aynı motilite sonuçlarının Toker (2018)'in sunduğu değerlerden daha düşük olması ise, kullanılan koçların bireysel farklılıkları ve çalışmamızda sperma alma işlemlerinin üreme mevsimi dışında gerçekleştirilmesi ile açıklanabilir.

Sperma kalitesi; ejakulasyon, pooling, sulandırma, +5°C'a soğutma, ekilibrasyon, dondurma, eritme ve inkübasyon işlemlerinden farklı düzeylerde etkilenmektedir. Dolayısıyla, elde edilen sperma bu işlemler sırasında fertilizasyon yeteneğini belli oranlarda kaybetmektedir. Sunulan tez çalışmasında, pooling sonrası spermatolojik değerler ile her grubun sulandırma sonrası spermatolojik değerleri karşılaştırıldı. Yapılan değerlendirmede, sulandırma işleminin koç sperması motilite, plazma membran fonksiyonel bütünlüğü, akrozom hasarı ve DNA fragmentasyon oranları üzerinde istatistiksel bir fark oluşturmadığı gözlemlendi ($P>0,05$). Elde edilen bu sonuç, Alçay ve ark. (2016)'nın belirttiği sulandırma işleminin sperma üzerinde olumsuz bir etki oluşturmadığı, spermanın kriyoprezervasyonun ilerleyen aşamalarında motilite ve diğer fonksiyonel özelliklerini yitirdiği hipotezini desteklemektedir.

Sulandırma sonrası en düşük ve en yüksek motilite, plazma membran fonksiyonel bütünlük, akrozomal hasar ve DNA fragmentasyon oranları sırasıyla %78,00-%83,00; %83,00-%88,00; %8,40-%9,20; %3,60-%4,20 olarak bulundu. Elde edilen minimum ve maksimum değerler, koç sperması ile ilgili birçok araştırmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Alçay ve ark., 2016; Toker ve ark., 2016; Toker, 2018; Üstüner ve ark., 2016).

Spermanın sulandırılması sırasında seminal plazma yoğunluğunun azalması "sulandırma etkisi" olarak anılmaktadır (Mann, 1954). Araştırmacılar sulandırma etkisi

sonucu spermatozoon membran stabilizasyonunun bozulması nedeniyle, spermanın motilite, metabolik aktivite ve fertilizasyon yeteneğini yitirdiğini belirtmişlerdir (Maxwell ve ark., 1996). Sulandırıcı:sperma oranının yüksek olduğu durumlarda ekstra seminal plazma eklenmesi “sulandırma etkisini” minimize etmektedir (Ashworth ve ark., 1994; Maxwell ve ark., 1996; Soylu, 1997). Çalışmamızda, ASP%10S grubunun en yüksek motilite değerine sahip olduğu (%83,00) saptandı. Ayrıca düşük dozda kullanılan ASP'nin motiliteyi korumakta tek başına yetersiz kaldığı, sulandırıcıya sistein eklenmesi ya da kullanılan ASP'nin oranının artırılması ile motilitenin arttığı gözlemlendi. Elde edilen bu veriler ışığında, sperma sulandırıcısına eklenen ASP'nin sulandırma etkisini minimize ettiği sonucu çıkarılabilir. Sulandırma sonrası plazma membran bütünlüğü, akrozomal ve DNA hasar oranları göz önünde bulundurulduğunda ise, gruplar arasında istatistiksel bir fark olmadığı gözlemlendi. Spermatolojik parametreler arasında istatistiksel fark olmamasını, sulandırma aşamasında spermanın maruz kaldığı çevre şartlarında ani bir değişim olmaması ve bu aşamanın sperma üzerinde kritik bir stres oluşturmaması ile açıklamak olasıdır. Aynı oranda ASP eklenen grupların sistein ile kombine edilen ve edilmeyen versiyonlarının spermatolojik parametreleri ile karşılaştırıldığında, aralarında herhangi bir istatistiksel fark bulunmadı ($P>0,05$). Bu bulgular, koç spermasının dondurulması için sisteinin farklı dozlarını (1 mM ve 2 mM) kullanan Toker, (2018)'in elde ettiği sonuçlarla uyum göstermektedir.

Sulandırma işleminin ardından spermanın sıcaklığının +5 °C'a düşürülmesi taze spermanın karşılaştığı ilk büyük stres kaynağı (soğuk şoku) olarak değerlendirilmektedir. Spermanın soğuk şokuna duyarlılığı ise türlere göre değişmektedir. Spermatozoon membranında bulunan doymamış yağ asidi oranı ile spermanın soğuk şokuna duyarlılığı arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır (Watson, 1981). Bu nedenle, koç spermasının boğa, tavşan ve insan spermasına göre soğuk şokuna karşı daha duyarlı olduğu bilinmektedir (Fiser ve Fairfull, 1989; Holt ve North, 1984; Watson, 1995). Spermanın soğuk şokuna uğraması, öncelikli olarak spermatozoonun plazma ve akrozomal membran fosfolipitleri üzerinde termodinamik bir faz değişimine neden olmaktadır. Sıvı fazdaki membran lipitlerinin sıcaklık düşüşüne bağlı olarak jel faza

geçmesi sonucu membran morfolojisinde değişimler şekillenmekte, spermatozoon membranı daha sert bir durum almaktadır. Tüm bu sözü edilen değişiklikler, hücre zarının morfolojik yapısının yanı sıra plazma membran fonksiyonunda da (seçici geçirgen yapı) değişime neden olmaktadır (Medeiros ve ark., 2002). Soğuk şoku sonucu spermatozoonun lipit faz yapısının yeniden düzenlenmesi ile kriyokapasitasyon şekillenmektedir. Erken kapasitasyon olarak da adlandırılan bu durum, spermatozoonun akrozomal hasar oranında artışa neden olmaktadır (Cormier ve ark., 1997; Pommer ve ark., 2003). Tüm bu değişimler sonucu, spermatozoa metabolik ve oksidatif strese girmekte ve hücre içi ROS niceliğinde artış şekillenmektedir (Bucak ve ark., 2015). ROS'nin artışı öncelikli olarak mitokondriyal kılıfı etkileyerek spermatozoon ATP üretimini kısıtlamakta dolayısıyla motilite üzerinde olumsuz etki oluşturmaktadır. İlerleyen safhalarda ise ROS nükleus membranı ve kromozom üzerinde etkisini göstererek DNA hasarına neden olmaktadır (Bucak ve ark., 2015). Spermanın başarılı bir şekilde dondurulabilmesi için sıcaklığının +5°C'ın altına düşürülmeden önce (ekilibrasyon aşamasında), motilite ve diğer spermatolojik özelliklerini başarılı bir şekilde koruması önem taşımaktadır. Çalışmada her bir gruba ait sulandırma ve ekilibrasyon sonrası motilite, HOST, PSA ve TUNEL değerleri, kendi içerisinde değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmede spermatozoonun motilite, plazma membran ve akrozomal bütünlük oranının, sulandırıcı içeriğinden bağımsız olarak soğuk şokundan olumsuz etkilendiği gözlemlendi (P<0,05). Diğer spermatolojik parametrelerin tersine, soğuk şokunun DNA bütünlüğü üzerindeki etkisi sulandırıcı içeriğinden etkilenmektedir. Sunulan çalışmada, sulandırma sonrası ve ekilibrasyon sonrası aşamalar karşılaştırıldığında, yalnızca kontrol grubu sulandırıcının DNA bütünlük oranını korumada başarısız olduğu gözlemlendi (P<0,05). Spermatozoon fragil yapısı olan bir hücre olmasına karşın, somatik hücrelerin DNA'larına göre DNA yapısı çok daha kompakttır (Silva ve Gadella, 2006). Bu nedenle spermatozoonda edinsel irreversible DNA fragmentasyonu, ancak spermatozoonun ciddi hasar gördüğü durumlarda ya da apoptozis sırasında oluşmaktadır. Kontrol grubu soğuk şoku ve stres kaynaklı DNA hasarını önlemekte yetersiz kalırken, ASP'nin tüm dozlarının bu hasarı minimize etmek için yeterli olduğu sonucuna varıldı.

Ekilibrasyon sonrası en düşük ve en yüksek motilite, plazma membran fonksiyonel bütünlüğü, akrozom ve DNA hasarlarına ilişkin oranlar ise sırasıyla %73,00-%78,00; %78,20-%84,20; %9,40-%11,00 ve %4,20-%5,00 olarak bulundu. Elde edilen minimum ve maksimum değerler diğer çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (Alçay ve ark., 2016; Toker, 2018; Üstüner ve ark., 2016). Ekilibrasyon sonrası gruplar arası motilite, akrozom hasarı ve DNA fragmentasyon oranları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($P>0,05$). Buna karşılık, KontrolS (%83,20) ve ASP%10S (%84,20) gruplarının diğer gruplar ile arasında istatistiksel bir fark bulunmamasına karşın ($P>0,05$), Kontrol grubuna (%78,20) göre ekilibrasyon sonrası plazma membran fonksiyonel bütünlüğünü daha iyi koruduğu tespit edildi ($P<0,05$). Elde edilen veriler göz önünde bulundurulduğunda, ekilibrasyon sonrası plazma membran bütünlüğü dışında, spermatolojik parametrelerin sulandırıcının içeriğinden etkilenmediği sonucunu çıkarmak olasıdır. Söz konusu farkın gözlenmemesi, baz sulandırıcının ekilibrasyon sonrası aşamaya kadar spermayı etkin bir şekilde koruduğunu, sulandırıcıda yapılan modifikasyonun özellikle sperma sıcaklığının $+5^{\circ}\text{C}$ 'ın altına indiği durumlarda önem taşıdığını düşündürmektedir.

Memeli spermasının kriyoprezervasyonu, çiftlik hayvancılık sektöründe seleksiyon programlarının yürütülebilmesi bakımından önemlidir (İleri ve ark., 2000; Hafez, 1993). Ancak, dondurma-eritme işlemleri, spermanın morfolojik ve biyokimyasal yapısında hasarlara neden olarak spermada kısmi fonksiyon kaybına neden olmaktadır (Hafez, 1993). Diğer çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde de olduğu gibi dondurulup-eritilmiş koç sperması ile tohumlanan koyunlarda fertilizasyon oranı taze sperma ile elde edilen oranlardan daha düşük olmaktadır (Watson, 2000). Bu durumun temel nedeni olarak spermanın dondurma-eritme işlemleri sırasında birtakım fiziksel-biyokimyasal değişimler sonucunda potansiyel fertilesini belli oranlarda yitirmesidir (Watson, 2000). Kullanılan sulandırıcı ve dondurma-eritme prosedürünün optimize edilmesi durumunda bile spermatozoanın %40-50'si kriyoprezervasyonun yan etkileri sonucu zarar görmektedir (Watson, 2000). Koç spermasının ise yüksek miktarda PUFA içermesinden dolayı diğer

memeli spermasına göre dondurma-eritme işlemlerine karşı daha duyarlı olduğu bilinmektedir (Abdelhakem ve ark., 1991a; Abdelhakem ve ark., 1991b).

Fertilizasyonun şekillenebilmesi için yeterli sayıda fertil spermatozoonun ovulasyon zamanına yakın isthmus-ampulla bölgesine ulaşmış olması gerekmektedir (Watson, 2000). Ancak, canlı ve işlevsel spermatozoonun büyük bir kısmı bile dişi genital kanalda; vajina, serviks ya da uterutubal bağlantı gibi bariyerlere takılarak oosite ulaşmayı başaramaz (Hunter, 1996). Bu nedenle, fertilizasyonun gerçekleşebilmesi için suni tohumlamada kullanılacak spermatozoonun nitelik ve niceliği çok önemlidir. Dondurma-eritme prosedürünün başarısı; sulandırıcı ve soğutma hızı gibi kriyoprezervasyon protokolünün türe göre optimize edilerek spermanın eritme sonrası motilite, viabilite, morfolojik bütünlük, akrozomal bütünlük ve DNA bütünlüğünün yüksek oranda korunması ile bağlantılıdır. Birçok araştırmacı kriyoprezervasyon işleminin sperma motilitesi (Alçay ve ark., 2017a; Arando ve ark., 2019; Holt, 2000; Nur ve ark., 2010; Toker ve ark., 2016; Treulen ve ark., 2018; Üstüner ve ark., 2016), plazma membran bütünlüğü (Alçay ve ark., 2017a; Gangwar ve ark., 2018; Nur ve ark., 2010; Reddy ve ark., 2018; Toker ve ark., 2016; Üstüner ve ark., 2016), akrozomal bütünlük (Alçay ve ark., 2017a; Toker ve ark., 2016; Üstüner ve ark., 2016) ve DNA bütünlüğü (Alçay ve ark., 2017a; Nur ve ark., 2010; Toker ve ark., 2016; Üstüner ve ark., 2018) üzerinde olumsuz etki yarattığını bildirmektedir. Sunulan tez çalışmasında da, yukarıdaki araştırmacılara paralel olarak, ekilibrasyon sonrası ve eritme sonrası 0. saat bulguları karşılaştırıldığında, tüm gruplarda dondurma-eritme işleminin motiliteyi ($P<0,01$), akrozomal bütünlüğü ($P<0,01$), plazma membran fonksiyonel bütünlüğü ($P<0,05$) ve DNA bütünlüğünü ($P<0,05$) olumsuz etkilediği görülmektedir.

Spermatozoonun dişi genital kanalda ilerleyerek fertilizasyon bölgesine ulaşması ve oosit yüzeyinde bulunan kumulus hücreleri ile zona pellusidaya (ZP) penetre olması, için motilite yeteneğinin olması gerekmektedir (Özdaş ve ark., 2007). Ayrıca, motilite ile fertilizasyon arasında sıkı bir korelasyon olduğunu bildiren araştırmacılar da bulunmaktadır (İleri ve ark., 2000; Hafez, 1993). Fertilizasyon için son derece önemli olmasına karşın motilite, spermatozoonun duyarlı yapısından dolayı kolaylıkla

yitirebileceği fonksiyonların başında gelmektedir (Alçay ve ark., 2017a; Üstüner ve ark., 2016). Spermatozoon motilitesi, kriyoprezervasyon işlemlerinde kullanılan sulandırıcının içeriği ve ozmotik basıncı, soğutma hızı, soğuk şoku, dondurma hızı, ROS varlığı, çözündürme sıcaklığı ve süresi gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Hafez, 1993; Salamon ve Maxwell, 1995; Salamon ve Maxwell, 2000). Dondurma-eritme işlemleri sonrası spermatozoon canlılığının yüksek oranda korunduğu durumlarda bile motilitede eritme sonrası trajik düşüşlerin göze çarptığı öne sürülmektedir (Watson, 2000). Sunulan tez çalışmasında eritme sonrası ve inkübasyonun 3. ve 5. saatlerinde elde edilen motilite sonuçları karşılaştırıldığında, inkübasyon süresi boyunca tüm gruplara ait motilite değerlerinin bir önceki değerlendirme saatine göre kademeli olarak düştüğü saptandı ($P<0,05$).

Sunulan çalışmada, ASP'nin farklı dozlarının eritme sonrası sperma motilitesi üzerinde farklı düzeyde koruyucu etki gösterdikleri tespit edildi. Eritme sonrası 0. saat verileri göz önünde bulundurulduğunda, motilite değerleri %42,33 ile %63,66 arasında değişmektedir. Elde edilen 0. saat motilite değerleri diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir (Alçay ve ark., 2015; Alçay ve ark., 2017a; Alçay ve ark., 2018; Motamedi-Mojdehi ve ark., 2014; Nur ve ark., 2010; Toker ve ark., 2016; Üstüner ve ark., 2016; Vichas ve ark., 2018). Ayrıca, kontrol grubu motilite değerinin diğer tüm çalışma gruplarından daha düşük olduğu saptandı ($P<0,05$). Elde edilen bu verileri ASP içerisindeki cathepsin D ve M, calpain, sitosolik nonspesifik dipeptidaz, proteozom ve antifiriz protein (type-4 ice-structuring protein [LS-12]) vb. proteinler ile ilişkilendirmek olasıdır. Söz konusu proteinler içerisinde özellikle LS-12'nin balık spermasının soğuk su koşullarında zarar görmesini engellediği bilinmekte olup memeli spermasında bulunmaması göze çarpmaktadır (Nynca ve ark., 2017; Zhao ve ark., 1998). Yukarıda söz edilen diğer proteinlerin ise motilitenin uyarılması ve hasarlı spermatozoonların metabolik atıklarının elimine edilmesinde önemli olduğu bilinmektedir (Nynca ve ark., 2014).

ASP dozlarının etkinliği karşılaştırıldığında, düşük (%1) ve yüksek (%15) dozlarda eklenen ASP gruplarının eritme sonrası motilitesinin kontrol grubuna göre daha yüksek

olduğu ancak, %10 ASP içeren grubun motilite sonuçlarından daha düşük olduğu saptandı. Elde edilen bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, %1 ASP gibi düşük dozların optimum motilite değerlerine ulaşmak için yetersiz kaldığı, tersine ASP'nin artan dozlarının ise belli bir baz düzeyden sonra olumsuz etki yaratabileceği sonucuna varılabilir. Son yıllarda konuyla ilgili yapılan araştırmalarda, artan antioksidan dozlarının sulandırıcı antioksidatif kapasitesini düşürdüğü ve belli bir düzeyden sonra oksidatif etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Gökçe ve ark., 2017; Metodiewa ve ark., 1999; Watjen ve ark., 2005). Sunulan tez çalışmasında ASP%15 grubu motilite değeri, ASP%10 grubundan rakamsal olarak düşük iken ($P>0,05$), ASP%15S grubu motilite değeri ASP%10S grubundan istatistiksel olarak düşük bulundu ($P<0,05$). Alabalık seminal plazması birçok organik ve inorganik içeriğin yanı sıra antioksidan da içermektedir. ASP%15S grubu motilite değerinin ASP%10S grubundan istatistiksel olarak düşük bulunmasını, sulandırıcının optimum antioksidan kapasitesini aşarak oksidan etki göstermeye başlaması ile açıklamak olasıdır.

Eritme sonrası, sistein eklenen ve eklenmeyen kontrol grupları ile aynı oranda ASP içeren sulandırıcılar kendi aralarında değerlendirildiğinde, kontrol grubuna sistein eklenmesinin, eritme sonrası motilite değerini istatistiksel olarak artırdığı görülmektedir. Koç sperma sulandırıcısına 1 mM ve 2 mM sistein ekleyen Toker (2018), kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla %45,00; 56,00; 53,33 motilite elde etmiş ve kontrol ile deneme grupları arasında istatistiksel fark olduğunu belirtmiştir. Alçay ve ark. (2017a), koç spermasının dondurmada 1 mM sistein içeren grupta elde edilen motilite değerinin (%60,40), kontrol grubu motilite değerinden (%50,00) istatistiksel olarak daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Toker ve ark. (2016), 1mM sistein içeren lesitin bazlı sulandırıcı kullandıkları çalışmalarında, kontrol grubu koç spermasının motilite değerinin (%46,20) deneme grubundan (%56,40) istatistiksel olarak daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Koç sperma sulandırıcısına farklı oranlarda sistein (0 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM) eklenen bir diğer çalışmada Uysal ve Bucak (2007), 10mM sistein eklenen çalışma grubunda dondurma-eritme sonrası motilite değerinin (%59,00) diğer gruplardan (%39,50, %45,00, ve %39,50) istatistiksel olarak daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Sunulan tez

çalışmasında, ASP içermeyen sulandırıcı gruplarına (Kontrol-KontrolS) ait dondurma-eritme sonrası motilite değerleri göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen sonuçlar yukarıda anılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Ancak, sunulan tez çalışmasında, ASP içeren çalışma gruplarında sistemin benzer olumlu etkisi görülmemektedir. Bu veriler, ASP antioksidan içeriğinin dondurma-eritme sonrası koç sperma motilitesini korumak için yeterli olduğunu düşündürmektedir.

Sperm hücrelerinin *in vivo* ortamda fertilizasyon yeteneği kazanabilmesi için en az 6 saat süre ile dişi genital kanalda bulunması ve “kapasitasyon” adı verilen bir olgunlaşma süreci geçirmesi gerekmektedir (İleri ve ark., 2000). Dolayısıyla, dondurma-eritme sonrası spermatolojik parametrelerin istenilen düzeyde olması, spermanın fertilizasyon yeteneğinin belirlenmesi için gerekli olmasına karşın, tek başına yeterli değildir. Bu nedenle, sunulan çalışmada dişi genital organ sıcaklık, nem ve CO₂ değerleri taklit edilerek sperma 5 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon boyunca spermatozoon aynı ortamda bulunmayı sürdüreceğinden, kısıtlı enerji kaynaklarını tüketerek ortamdaki metabolik atık oranını artırmaktadır. Bu süreç boyunca, spermanın test tüpü içerisinde bulundurulmasından dolayı, canlı ve apoptozise uğrayan spermatozoon aynı ortamı paylaşmakta, dolayısıyla, zaman içerisinde ortamdaki apoptozise uğrayan hücrelerin kalıntıları, ROS ve diğer kirlenici miktarları artış göstermektedir. Ortamda bulunan ROS, plazma membranına bağlanarak fosfolipitlerde oksidasyona ve bunun sonucu dejenere olan yağ asitlerinin ortaya çıkmasına neden olur (Bucak ve ark., 2015). Dejenere olan yağ asitinden açığa çıkan peroksitlerin ise spermanın motilite ve diğer fertilizasyon ilişkili metabolik ve fonksiyonel özelliklerinin sekteye uğraması ve bunun sonucu spermanın fertilizasyon yeteneğinin azalmasına neden olacağı bilinmektedir (Hafez, 1993). Sunulan tez çalışmasında, inkübasyonun 3. saatinde motilite değerleri %28,00 ile %50,00 arasında değişmektedir. Söz konusu sonuçlar, diğer çalışmaların 3. saat bulguları ile karşılaştırıldığında benzerlik göstermektedir (Üstüner ve ark., 2016; Vichas ve ark., 2018). Elde edilen veriler göz önünde bulundurulduğunda, kontrol grubu sulandırıcısının, motiliteyi korumakta diğer sulandırıcılara göre zayıf kaldığı görülmektedir (P<0,05). Bunun yanında, sperma sulandırıcısına %10 oranında ASP eklenmesinin motiliteyi

başarılı olarak koruduğu gözlemlendi. Motilite değerleri karşılaştırıldığında, 0. saatin aksine 3. saatte ASP%10S ve ASP%15S grupları arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamaktadır ($P>0,05$). KontrolS grubunun motilite değerinin Kontrol grubundan istatistiksel olarak ($P<0,05$); %1 ve %10 ASP içeren gruplarda ise sistein eklenen grupların motilite değerlerinin, sistein içermeyen versiyonlarından rakamsal olarak daha yüksek olduğu saptandı. Elde edilen bu sonuçlar, inkübasyon sırasında metabolik atıkların artmasına bağlı olarak spermanın daha yüksek oranda antioksidan etkiye gerek duyması ile açıklanabilir. İnkübasyonun bu aşamasında ASP'nin %15 oranında tek başına kullanması %10 oranında kullanımına göre motilite üzerinde olumsuz etki oluşturmaktadır ($P<0,05$). Söz konusu saatte %15 oranında ASP kullanımının oksidan etkiye neden olduğu yorumunda bulunmak olasıdır. Ancak %15 ASP'nin sisteinle kombine edilmesi ile yüksek doz ASP kullanımının neden olduğu oksidan etki elimine edilmektedir ($P<0,05$). Elde edilen sonucun, sisteinin tiyol grubunda (SH) bulunan hidrojeni kararsız moleküllere vererek kararlı hale getirmesi (direkt antioksidan etki) (Bucak ve ark., 2015) ve GSH yapısına katılması ile (dolaylı antioksidan etki) gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Hendin ve ark., 1999). Dolayısıyla, inkübasyonun 3. saatinde sisteinin antioksidan etkisi, ortamda başka bir antioksidan içeriğinin bulunmadığı (Kontrol) ve eklenen içeriğinin oksidan etki göstermeye başladığı (%15 ASP) gruplarda görülmektedir. Diğer çalışma gruplarında ise söz konusu saatte ASP antioksidan içeriğinin yeterli olduğu, ekstra sistein katkısına gerek kalmadığı görülmektedir.

İnkübasyonun 5. saatinde motilite değerleri %16 ile %45 oranında değişmektedir. Sunulan çalışmada, koçlardan üreme mevsimi dışında sperma alınmış olmasına karşın, ASP%10 ve ASP%10S grubunda elde edilen motilite sonuçları (sırasıyla %41,00 ve %45,00) diğer çalışmaların inkübasyon sonrası değerleri ile karşılaştırıldığında umut verici olduğu görülmektedir (Alçay ve ark., 2017a; 2018; Toker ve ark., 2016; Üstüner ve ark., 2016).

Kriyoprezervasyon sırasında oluşan soğuk şoku, ozmotik basınç değişimi, buz kristalleri ve ROS oluşumu hücre membranında lipit kompozisyon değişimine ve buna bağlı olarak plazma membranında morfolojik hasarlar ve fonksiyon kaybına neden

olmaktadır (Amann ve Pickett, 1987; Holt ve Linda, 2014; Salamon ve Maxwell, 1995; Salamon ve Maxwell, 2000). Spermatozoonun dış ortamla madde alışverişi yapabilmesi fizyolojisi için gereklidir. Bu olgu ancak plazma membran fonksiyonel bütünlüğünün korunması ile olasıdır (Jeyendran ve ark., 1984). Ayrıca, motilite ile plazma membran fonksiyonel bütünlüğü arasında sıkı bir korelasyon olduğu bilinmektedir (Nur ve ark., 2010). Sunulan çalışmada ekilibrasyon, dondurma-eritme ve inkübasyon işlemlerinin spermatozoon plazma membran fonksiyonel bütünlüğü üzerinde olumsuz etki oluşturduğu saptanmıştır ($P<0,05$). Eritme sonrası 0. saat plazma membran fonksiyonel bütünlük değerleri %60,20 ile %71,70 arasında yer almış ve elde edilen sonuçlar geçmiş çalışmalar ile benzerlik göstermiştir (Alçay ve ark., 2016; Alçay ve ark., 2017a; 2018; Forouzanfar ve ark., 2013; Najafi ve ark., 2014; Toker ve ark., 2016; Uysal ve Bucak, 2007 Üstüner ve ark., 2016). Sunulan çalışmada, ASP%10S grubunun plazma membran fonksiyonel bütünlüğünü başarılı olarak koruduğu sonucuna varıldı ($P<0,05$). Rakamsal olarak eritme sonrası en düşük plazma membran bütünlüğü Kontrol grubunda elde edildi ve ASP%10S grubu dışında tüm deneme grupları ile istatistiksel olarak benzerlik gösterdi ($P>0,05$). Çalışmanın eritme sonrası motilite değerleri arasında istatistiksel fark olmasına karşın, grupların plazma membran fonksiyonel bütünlüğü değerlerinin aynı istatistiksel farkı yansıtmadığı saptandı. Bu durumu kriyoprezervasyon işlemleri sonrası spermatozoonun canlılığının yüksek oranda korunduğu durumlarda bile motilitede trajik düşüşlerin olabileceği varsayımı ile açıklanabilir (Watson, 2000).

İnkübasyonun 3. saatinde ise Kontrol grubunun plazma membran fonksiyonel bütünlüğünde önemli bir düşüş göze çarparken, ASP%10S grubunda ise plazma membran fonksiyonel bütünlüğünün başarılı olarak korunduğu gözlemlendi ($P<0,05$). Üstüner ve ark. (2016), koç sperma sulandırıcısına farklı dozlarda ASP (%0; %0,1; %1 ve %10) ekledikleri çalışmada inkübasyon 3. saatinde plazma membran fonksiyonel bütünlüğü değerlerini sırasıyla %40,06; %49,80; %55,40 ve %57,80 olarak belirtmişlerdir. Anılan çalışmada, ASP gruplarının plazma membran fonksiyonel bütünlüğü oranları arasında istatistiksel fark gözlemlenmezken, kontrol grubundan yüksek olduğunu belirtilmiştir ($P>0,05$) (Üstüner ve ark., 2016). Sunulan tez çalışmasında, Kontrol grubu plazma

membran fonksiyonel bütünlüğünün ASP içeren gruplardan istatistiksel olarak düşük olması, bahsedilen çalışmanın verileri ile paralellik göstermektedir. Ancak, çalışmamızda ASP%1 ve ASP%10; ASP%1S ve ASP%10S gruplarının plazma membran fonksiyonel bütünlüğü değerleri arasında istatistiksel fark elde edilmesi, Üstüner ve ark. (2016)'nın verileri ile uyuşmamaktadır. Üstüner ve ark. (2016), çalışması ile sunulan tez çalışması aynı laboratuvar ortamında, farklı yıllarda toplanan ASP ile farklı zamanlarda yapılmıştır. Verilerde elde edilen uyuşmazlığın sebebinin, farklı yıllarda toplanan ASP'nin içerik ve kompozisyonundaki bireysel ve döneme bağlı farklılıklardan kaynaklı olması olasıdır. ASP'nin plazma membran bütünlüğünü başarılı olarak koruyor olmasını alabalık seminal plazması içerisindeki proteinlerin, spermatozoon membranına tutunarak membran fosfolipit yapısı ve kompozisyonunu düzenlemesi ile açıklamak olasıdır (Lahnsteiner, 2009; Lahnsteiner ve ark., 2004; Shaliutina-Kolešová ve ark., 2016). Gomme ve ark. (2005), alabalık seminal plazmasında içerisinde yüksek oranda bulunan transferrin ve albuminin, spermatozoon membranını oksidatif strese ve sitotoksik bileşiklerin olumsuz etkilerinden koruduğunu bildirmektedir. ASP'nin sperma membran fonksiyonel bütünlüğü üzerindeki koruyucu etkisinin, içerisinde bulunan transferrin, serum albümin 1, serum albümin 2 gibi kriyoprotektan özelliğinde olan proteinler (Gomme ve ark., 2005; Halliwell, 1988; Nynca ve ark., 2014) ve 14-3-3 proteinleri, EF-hand ailesi kalsiyum bağlayıcı proteinler (EF-hand calcium-binding domain-containing protein 1, parvalbumin, calmodulin vb) gibi antioksidan etkisi olan proteinler (Nynca ve ark., 2014) kaynaklı olduğu yorumunda bulunulabilir. Aynı oranda ASP içeren gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde, sistein eklenen grupların plazma membran fonksiyonel bütünlüğü değerlerinin, sistein içermeyen versiyonlarından rakamsal olarak daha yüksek olduğu göze çarpmaktadır. ASP'nin %0 ve %15 eklendiği gruplarda ise, sistein eklenmesi, plazma membran fonksiyonel bütünlük oranını istatistiksel olarak anlamlı şekilde korumaktadır ($P < 0,05$). İnkübasyon 3. saatinde plazma membran fonksiyonel bütünlüğü verileri değerlendirildiğinde, sistein eklenmesinin %1ASP ve %10 ASP içeren çalışma gruplarında (ASP%1-ASP%1S ve ASP%10 ve ASP%10S) anlamlı bir etki oluşturmadığı gözlemlendi. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda, %10 oranında ASP eklenmesinin plazma membran fonksiyonel bütünlüğünü korumada tek başına yeterli

olduğu, dolayısıyla ekstra sistein eklenmesine gerek olmadığı yorumunda bulunmak olasıdır.

İnkübasyonun 5. saatinde elde edilen plazma membran fonksiyonel bütünlüğünün, %21,00 ile %56,40 arasında değiştii gözlemlendi. Elde edilen bu sonuçlar, geçmiş çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (Alçay ve ark., 2016; Alçay ve ark., 2017a; Toker, 2018; Üstüner ve ark., 2016). Aynı oranda ASP içeren gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında, sistein eklenen grupların plazma membran fonksiyonel bütünlük değerlerinin sistein içermeyen versiyonlarından istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görüldü ($P<0,05$). İnkübasyonun son aşamasında, ortamda bulunan metabolik atıkların artması sonucu, ROS'un spermatozoon üzerindeki etkisi daha fazla artmaktadır. Bu nedenle, inkübasyonun son aşamasında plazma membran fonksiyonel bütünlüğünün korunması için antioksidan katkı maddesi kullanımı (sistein) daha büyük önem kazanmıştır. Bu aşamada, diğer sulandırıcılarla karşılaştırıldığında, ASP%10S sulandırıcısının plazma membran fonksiyonel bütünlüğünü en başarılı koruyan sulandırıcı olduğu tespit edildi ($P<0,05$).

Fertilizasyon, spermatozoonun ampulla ile istmus arasındaki bölgede akrozom reaksiyonu geçirerek akrozomal enzimlerini açığa çıkarması, bu enzimlerin ZP'yi lize etmesiyle erkek pronükleusun oolemma içerisindeki dişi pronükleus ile biraraya gelmesi ve diploid kromozom yapılı, yüksek mitoz yeteneği olan yeni bir hücre oluşumu olarak açıklanabilir (İleri ve ark., 2000). Fertilizasyonun şekillenebilmesi için spermatozoonun kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi bir dizi değişim geçirmesi gerekmektedir. Bu değişimlerin fertilizasyon anına yakın olması ve o ana kadar ise akrozomal bütünlüğün korunuyor olması gerekmektedir (İleri ve ark., 2000, Hafez, 1993). Akrozomal bütünlüğün korunması ile hyaluronidaz, korona penetreting enzim, nöraminidaz ve tripsin gibi fertilizasyonda etkin rol oynayan enzimlerin akrozomal kabın içerisinde korunuyor olması, bu enzimlerin fertilizasyon anında spesifik görevlerini yerine getirmelerine olanak sağlayacaktır (İleri ve ark., 2000). Bu nedenle, fertilizasyonda önemli rol oynayan akrozom bütünlüğünün önemi spermanın morfolojik değerlendirilmesinde gözardı edilemez. Kriyoprezervasyon sırasında oluşan soğuk şoku, buz kristallerinin oluşumu,

ROS artışının spermatozoonun diğer bölümlerinde olduğu gibi, akrozom üzerine de olumsuz etkileri bulunmaktadır. Özellikle sıcaklığın +5°C ve -120°C'a düşürülmesi sırasında, spermatozoon plazma ve akrozomal membran fosfolipitleri üzerinde, termodinamik bir faz değişimine neden olmaktadır. Bu süreçte hücre membranı sıvı fazdan jel faza geçmekte ve bunun sonucu membran morfolojisinde değişimler şekillenmektedir (Medeiros ve ark., 2002). Lipit faz yapısındaki bu değişimler sonucunda, akrozom üzerinde kriyokapasitasyon olarak adlandırılan bir reaksiyon gerçekleşmektedir (Cormier ve ark., 1997; Pommer ve ark., 2003). Kriyokapasitasyon, spermanın dondurulması sırasında akrozomal hasar oranını artırmaktadır. Bu nedenle, kriyoprezervasyonun her aşamasında bu zararları minimize etmek amacıyla güncel araştırmalar sürekli yapılmaktadır (Alçay ve ark., 2018; Cormier ve ark., 1997; Gangwar ve ark., 2018, Motamedi-Mojdehi ve ark., 2014; Pommer ve ark., 2003; Üstüner ve ark., 2018; Vichas ve ark., 2018).

Sunulan çalışmada, akrozomal bütünlüğün dondurma-eritme ve inkübasyon süreçlerinden olumsuz bir biçimde etkilendiği saptandı. Eritme sonrası elde edilen akrozomal bozukluk oranları ekilibasyon sonrası bozukluk oranlarından daha yüksek olduğu tespit edildi ($P<0,01$). Ayrıca, inkübasyonun her aşamasında da tüm gruplarda akrozomal bozukluk oranının istatistiksel olarak arttığı gözlemlendi ($P<0,05$).

Sunulan çalışmada, eritme sonrası 0. saatte akrozomal bozukluk oranının %28,80 ile %37,20 arasında değiştiği görülmektedir. Alçay ve ark., (2016), koç spermasının dondurulmasında farklı kriyoprotektan maddelerin etkisini incelediği çalışmalarında, eritme sonrası akrozomal bozukluk oranının %49,70 ila %55,60 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında, kullanılan baz sulandırıcının Alçay ve ark., (2016) ile benzer olmasına karşın elde edilen eritme sonrası akrozomal hasar oranının daha düşük olması, baz sulandırıcıya eklenen ASP'nin, akrozomu etkin bir şekilde korumuş olması ile açıklanabilir. Aynı laboratuvar koşullarında yürütülen bir başka tez çalışmasında Toker (2018), koç spermasının dondurma-eritme sonrası akrozomal bozukluk oranının %12,40-%18,67 arasında değiştiğini bildirmiştir. Bu verilerin sunulan tez çalışmasında elde edilen sonuçlardan daha düşük olması, kullanılan boyama

prosedürünün, hayvanların yaşlarının ve sperma alınan mevsimin farklı olması ile açıklanabilir. Bittencourt ve ark., (2018), dimethylacetamide ve trehalozun koç spermasının mevsim dışı dönemde dondurulması üzerine etkinliğini değerlendirdiği çalışmada, akrozomal hasar oranınının %23,40 ile %55,00 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Anılan çalışma ile tez çalışmasında elde edilen veriler uyum göstermektedir.

Lahnsteiner (2007), ASP içerisinde bulunan lipoproteinlerin, spermatozoon plazma ve akrozomal membranında bulunan lipit kompozisyonunu koruduğunu belirtmiştir. Spermanın dondurma-eritme işlemleri sırasında membran stabilitesini korumasını ASP lipoprotein içeriği ile ilişkilendirilmiştir (Lahnsteiner, 2007). Sunulan tez çalışmasında, eritme sonrası en yüksek akrozomal bozukluk oranı %37,20 ile kontrol grubunda elde edilirken, kontrol grubu ile ASP%1 (%36,40) ve ASP%15 (%36,60) grupları arasında istatistiksel bir fark elde edilmedi ($P>0,05$). Sunulan çalışmada eritme sonrası en düşük akrozomal bozukluk oranı (%33,00) %10 ASP içeren grupta elde edildi. Koç sperma sulandırıcısına eklenen %10 ASP'nin akrozomal membran üzerindeki koruyucu etkisi alabalık seminal plazma dozu ve lipoprotein içeriğinden kaynakladığı düşünülmektedir. Söz edilen koruyucu etkinin diğer ASP dozları ile elde edilememesi, koç spermasının dondurulmasında %1 ASP dozunun yetersiz kalması ve %15 ASP'nin ise kullanılacak optimum dozun üzerine çıkması nedeni ile olumsuz etki oluşturması kaynaklı olabilir. Üstüner ve ark. (2016), %0, %0,1, %1 ve %10 oranında ASP eklenmesinin koç spermasının dondurulması üzerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmada, akrozomal bozukluk oranlarını sırasıyla %47,64; %44,93; %40,83; %37,38 olarak saptamışlardır. Söz konusu çalışmada %10 ASP eklenen grubun akrozomal hasar oranı, kontrol grubundan istatistiksel olarak düşükken, %1 ASP içeren grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark bulunmadığı bildirilmiştir. Üstüner ve ark. (2016), aynı çalışmalarında ASP içeren deneme gruplarının akrozom hasar oranları arasında istatistiksel bir farklılık olmadığını belirtmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında, eritme sonrası ASP%10S grubuna ait akrozomal hasar oranı (%28,80) sistein içermeyen çalışma gruplarından istatistiksel ($P<0,05$), sistein içeren gruplardan ise rakamsal olarak daha düşük bulundu ($P>0,05$).

Benzer şekilde eritme sonrası elde edilen PSA verileri göz önünde alındığında, sistein eklenen grupların sistein eklenmeyen yayasyonlarına göre akrozomal bütünlüğü daha iyi koruduğu sonucuna varıldı (P<0,05). Toker ve ark. (2016), koç spermasının dondurulmasında farklı antioksidanların etkilerini inceledikleri çalışmada, 1 mM sistein eklenen sulandırıcı ile dondurulan spermada eritme sonrası akrozomal bozukluk oranını %25,75 olarak belirtmişlerdir. Aynı çalışmada, sistein içeren grubun, kontrol grubuna (%35,60) göre akrozomal bütünlüğü daha iyi koruduğu belirtilmiştir. Alçay ve ark. (2017a), farklı antioksidanlar ile koç spermasını dondurdukları benzer bir çalışmada, 1 mM sistein eklenen deneme grubunda, akrozomal hasar oranını %30,00, sistein içermeyen kontrol grubunda ise %40,25 olarak bulmuşlardır. Anılan çalışmalar sunulan tez çalışmasında elde edilen sonuçları desteklemektedir.

Sunulan tez çalışmasında, inkübasyonun 3. saatinde sistein içermeyen çalışma grupları ele alındığında, akrozomal bozukluk oranının %35,60 ile %41,60 arasında değiştiği tespit edildi. Üstüner ve ark. (2016), koç spermasının dondurulmasında farklı ASP dozlarını denedikleri bir çalışmada, 3. saat inkübasyonda akrozomal hasar oranlarını %47,60-%59,79 olarak saptamışlar ve yalnızca %10 ASP içeren grubun kontrol grubuna göre akrozomal hasarı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde koruduğunu gözlemlemişlerdir. Sunulan tez çalışmasında, 3. saat inkübasyonda elde edilen akrozomal hasar oranı, anılan çalışmadan daha düşük olarak bulunmuştur. Sistein içermeyen gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, %1 ve %15 oranında ASP içeren grupların akrozomal bozukluk oranının kontrol grubu ile benzer olmasına karşın, %10 ASP eklenmesinin akrozomal bütünlüğü başarılı bir şekilde koruduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu veriler, Üstüner ve ark., (2016) yaptığı çalışma ile kısmen benzerlik göstermektedir. İnkübasyonun 3. saatinde sistein içeren gruplara (KontrolS, ASP%1S, ASP%10S ASP%15S) ait akrozomal hasar oranları sırasıyla, %37,40; %34,40; %31,80 ve %36.00 olarak değerlendirildi. Sistein ile kombine edilen %15 ve %10 ASP dozları karşılaştırıldığında, yüksek doz ASP kullanımının toksik etki oluşturarak akrozomal hasarı arttırdığı görülmektedir (P<0,05). Elde edilen bu sonuçlar, sistein içeren sulandırıcıda ASP'nin %10'un üzerindeki dozlarının oksidan etki göstermeye başladığı

olasılığını ortaya koymaktadır. Aynı oranlarda ASP içeren gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde ise %0, %1 ve %15 ASP içeren gruplarda sistein eklenmesinin, akrozomal bütünlüğünü daha iyi korumasına karşın ($P<0,05$); yalnızca %10 oranında ASP eklenen gruplarda sistein eklenmesinin akrozom hasar oranı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı gözlemlendi ($P>0,05$). Bu verilere dayanarak, sulandırıcıya %10 oranında ASP katılmasının, sistein varlığından bağımsız bir şekilde akrozomal bütünlüğü koruduğu düşünülmektedir.

Sunulan çalışmada, inkübasyonun 5. saatinde akrozomal bozukluk oranları %33,80 ile %48,00 arasında değişmektedir. Üstüner ve ark. (2016), ASP eklenmiş yumurta sarılı sulandırıcı kullandıkları çalışmada, inkübasyonun 5. saatinde akrozomal bozukluk oranını %52,40 ile %63,92 arasında bulmuşlardır. Sunulan çalışmada elde edilen akrozomal hasar oranı Üstüner ve ark. (2016)'ın çalışmasından daha düşük bulunmuştur. İnkübasyonun benzer zamanında elde edilen veriler arasında gözlenen bu farkı kullanılan koçların yaşları, beslenme koşulları, bireysel sperma kalitesi, üreme mevsimi ve sperma dondurulabilirliği arasındaki fark ile açıklamak olasıdır. Sistein içermeyen gruplar kendi arasında değerlendirildiğinde kontrol, ASP%1 ve ASP%15 gruplarının akrozomal hasar oranları arasında istatistiksel bir fark olmadığı ($P>0,05$), ASP%10 grubunun ise akrozomal bütünlüğü kontrol grubuna göre daha üstün bir şekilde koruduğu gözlemlendi ($P<0,05$). Elde edilen bu sonuçlar, inkübasyonun 5. saatinde yalnızca kontrol grubu ile %10 ASP içeren sulandırıcı grubunun değerler arasında istatistiksel anlamlı bir fark olduğunu belirten Üstüner ve ark. (2016) ile benzerlik göstermektedir. Sistein içeren gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında ise, KontrolS ASP%1S ve ASP%15S gruplarının akrozomal hasar değerlerinin benzer olduğu ($P>0,05$), ASP%10S grubunun ise akrozomal bütünlüğü diğer çalışma gruplarına göre daha iyi koruduğu sonucuna varılmaktadır ($P<0,05$). Belirtilen çalışma saatinde sistein içeren ve içermeyen gruplar, kendi aralarında değerlendirildiğinde, %0, %1 ve %15 ASP içeren gruplarda sistein eklenmesinin akrozomal hasarı azalttığı saptandı ($P<0,05$). %10 ASP içeren gruplarda sistein eklenmesinin rakamsal olarak akrozomal bütünlüğü daha yüksek oranda korumasına karşın, iki grup arasında istatistiksel fark bulunmadığı gözlenmektedir.

($P>0,05$). Buna karşın, ASP%10S grubuna ait akrozom hasar oranı diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak düşük bulundu ($P<0,05$).

Paternal DNA'nın kompakt yapısı ile birlikte, fizyolojik ve morfolojik bütünlüğünü koruması, embriyonun oluşumu ve gelişimi için çok büyük önem taşımaktadır (Seli ve ark., 2004). Spermatozonda oluşan minimum düzeydeki DNA hasarları reverzibl olup fertilizasyon için önemli bir tehlike oluşturmazken, ciddi DNA hasarları infertiliteye neden olmaktadır (Seli ve ark., 2004). DNA hasarının infertilite üzerindeki bu olumsuz etkisi, spermatozoonun fertilizasyon yeteneğini düşürmekten çok, embriyonun canlılığı ve gelişimini kesintiye uğratması bakımından önemlidir (Silva ve Gadella, 2006). Ekonomik hayvancılıkta fertilizasyonun şekillenmesi kadar, fertilize olmuş oositin embriyo ve diğer prepartum aşamalarını sağlıklı biçimde sürdürebilmesi ve bunun sonucunda yavru elde edilmesi de önemlidir. Bu nedenle, spermanın dondurma başarısının belirlenmesinde, dondurma-eritme işlemleri sonrası DNA bütünlüğünün değerlendirilmesi de önem taşımaktadır. İnkübasyon işlemi sırasında, spermatozoon morfolojik ya da fonksiyonel olarak zarar görerek canlılığını zaman içerisinde kaybetmektedir. *In vitro* inkübasyon ortamında, apoptozise uğramış spermatozoon ile canlı spermatozoon aynı ortamda kaldığından, canlılığını yitiren spermatozoanın metabolik artıkları sağlam spermatozoaya da zarar vermektedir. Kontrol grubu sperma, inkübasyonun her aşamasından olumsuz olarak etkilenecek ve DNA fragmentasyon oranı, eritme sonrası 0. saat, inkübasyonun 3. ve 5. saatlerde zamanla birlikte artış göstermiştir ($P<0,05$). ASP%1, ASP%15, KontrolS, gruplarına ait DNA bütünlük oranları ise inkübasyonun ilk 3 saatinden olumsuz etkilenmezken, inkübasyonun 3. ila 5. saatleri arasında anılan grupların DNA hasar oranları istatistiksel olarak artış gösterdi ($P<0,05$). ASP%10 ve ASP%10S gruplarında ise inkübasyona bağlı olarak DNA hasarı oranında istatistiksel bir artış gözlenmedi ($P>0,05$). Alabalık seminal plazmasında yoğun olarak bulunan "clusterin" isimli protein, anormal spermatozoonlara bağlanarak komplementlerce indüklenen spermatozoonun lizisi ve şaperon gibi proteinlerin oksidatif strese bağlı olarak aglutinasyonunu engeller (Ciereszko ve ark., 2017). Clusterin bu etkisi ile, spermatozoon yoğunluğu yüksek olan türlerde, hasarlı spermatozoonun metabolik

atıklarının sağlam spermatozoonun metabolizmasına zarar vermemesi yönünden önemlidir (Ciereszko ve ark., 2017). Sunulan tez çalışmasında, kontrol grubunun DNA bütünlük oranı inkübasyonun tüm aşamalarından etkilenirken, diğer deneme gruplarında DNA'nın değerlendirme saatlerinin en az birinden olumsuz etkilenmediği gözlemlendi. KontrolS grubunun DNA hasar oranının inkübasyonun ilk 3 saatinde anlamlı olarak artmamış olmasını, sisteinin ROS oluşumunu engellemesi ile açıklamak olasıdır. ROS oluşumu, öncelikli olarak plazma, akrozom ve mitokondriyal membranı etkilerken, ROS'un DNA üzerindeki olumsuz etkisi daha ileriki aşamalarda gözlemlenmektedir (Silva ve Gadella, 2006). Bu nedenle sisteinin tek başına kullanılması, inkübasyonun ilk 3 saatinde DNA bütünlüğünü korumak için yeterli iken, inkübasyonun ilerleyen saatlerinde ROS miktarının sisteinin tek başına tolere edebileceğinden daha fazla artmasına bağlı olarak yetersiz kalmıştır. ASP içeren grupların DNA bütünlüğünü inkübasyonun zararlı etkilerinden korumasını ise ASP'nin içerisinde bulunan clusterin varlığı ile açıklamak olasıdır. Ancak, inkübasyonun 3. saatinden sonra ölü spermatozoon oranının artmasına bağlı olarak, ortamda metabolik atık miktarı artmakta ve düşük doz (%1) ASP bu metabolik atıkların zararlı etkilerini kompanze etmek için yetersiz kalmaktadır. ASP'nin yüksek dozunun inkübasyonun son 2 saatinde DNA bütünlüğünü korumada yetersiz kalmasını ise antioksidan maddelerin optimum dozun üzerinde kullanılmasının oksidatif etki oluşturmaya başlaması ile açıklamak olasıdır. Sulandırıcıya %10 oranında ASP eklenmesi, sulandırıcının sistein içerip içermemesinden bağımsız olarak inkübasyonun tüm dönemlerinde spermatozoon DNA bütünlüğünü başarılı olarak korumaktadır ($P>0,05$). Eritme sonrası DNA hasar oranları göz önünde alındığında, rakamsal olarak en düşük DNA hasar oranının %6,20 ile ASP%10 grubundan elde edildiği ve ASP%15, ASP%1S ASP%10S ve ASP%15S gruplarının ise sırasıyla %7,80; %7,40; %6,40; %7,60 olan DNA fragmentasyon oranlarının ASP%10 grubu ile benzerlik gösterdiği gözlemlendi ($P>0,05$). DNA bütünlüğünün korunmasında ASP eklenmesinin anlamlı bir etkisi olmasına karşın, anılan değerlendirme zamanında sistein eklenmesinin DNA bütünlüğünü korunması üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı saptandı ($P>0,05$). Toker ve ark., (2016), koç spermasının dondurulmasında sulandırıcıya 1 mM sistein ilave edilmesinin dondurma eritme sonrası DNA bütünlüğü üzerine etkilerini

değerlendirmiş ve dondurma-eritme sonrası sistein içermeyen gruba ait DNA hasar oranı (%8,20) ile sistein içeren grup (%7,60) arasında istatistiksel anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Alçay ve ark., (2017a), koç spermasını dondurmak için 1mM sistein içeren ve içermeyen sulandırıcıları kullandıkları çalışmalarında, dondurma-eritme sonrası DNA kırık oranını sırasıyla %5,80 ve %7,50 olarak bulmuşlardır ($P>0,05$). Sunulan tez çalışmasında, eritme sonrası sistein içermeyen baz sulandırıcı grubu (kontrol) DNA kırık oranı %10,80, sistein içeren baz sulandırıcı grubu (KontrolS) DNA fragmentasyon oranı ise %10,20 olarak bulundu ($P>0,05$). Sunulan çalışmada elde edilen DNA fragmentasyon oranları, anılan çalışmalarda elde edilen rakamlardan daha yüksek bulunmasına karşın, sisteinin dondurma-eritme sonrası DNA bütünlüğü üzerine etkisinin olmadığı saptaması ile paralellik göstermektedir.

İnkübasyonun 3. saatinde en düşük DNA hasarı %6,60 ile ASP%10 grubunda elde edilirken, ASP%15, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S DNA fragmentasyon oranları ile (sırasıyla %8,20; %8,20; %6,80 ve %8,40) aralarında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı ($P>0,05$). Yapılan literatür taramasında, koç spermasının dondurma-eritme sonrası inkübasyonun 3. saatinde DNA hasarının değerlendirildiği başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Sunulan çalışmadan elde edilen veriler göz önüne alındığında, ASP'nin %1 oranında eklenmesinin koç spermasının dondurma-eritme sonrası 3. saat inkübasyonda DNA bütünlüğünü korumada ASP eklenen diğer gruplara göre yetersiz kaldığı görülmektedir. Ancak, aynı oranda ASP'nin (%1) sistein ile kombinasyonu sonrası DNA'nın etkin bir şekilde korunabileceği saptanmıştır. Ayrıca, sulandırıcıya sistein eklenmesi inkübasyonun 3. saatinin sonunda Kontrol ve %1 ASP içeren gruplarda DNA hasar oranını rakamsal olarak düşürürken, %1 ve %10 ASP içeren gruplarda ise rakamsal bir artışa neden olduğu gözlemlendi. Buna karşın, aynı oranda ASP içeren grupların sistein içeren ve içermeyen versiyonlarına ait DNA hasar oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı sonucuna varıldı ($P>0,05$).

İnkübasyonun 5. saati sonunda bir önceki değerlendirme zamanına (inkübasyonun 3. saati) benzer şekilde en düşük DNA fragmentasyon oranlarının ASP%10, ASP%15, ASP%1S, ASP%10S ve ASP%15S gruplarından elde edildiği gözlemlendi

(sırasıyla %7,60; %9,20; %8,80; %7,00 ve %8,80) ($P>0,05$). En yüksek DNA fragmentasyon oranları %13,80 ve %11,60 ile Kontrol ve KontrolS grubundan elde edilirken, KontrolS grubu ile ASP%1 grubu (%11,00) arasında istatistiksel bir fark bulunamadı ($P>0,05$). Aynı oranda ASP içeren tüm gruplar kendi arasında incelendiğinde sistein eklenen gruplarda DNA fragmentasyon oranı rakamsal olarak düşmesine karşın, aralarında istatistiksel bir fark saptanmadı ($P>0,05$). Elde edilen bu sonuç, sulandırıcıya 1 mM sistein eklenmesinin inkübasyonun 6. saatinde DNA bütünlüğünü baz sulandırıcıya göre daha iyi koruduğunu bildiren diğer araştırmacıların çalışmaları ile uyumluluk göstermemektedir (Alçay ve ark. 2017a; Toker ve ark. 2016). Daha önceden belirtildiği gibi spermatozoon DNA'sı morfolojik yapısı nedeniyle, ROS ve buna bağlı hasarlara oldukça dayanıklı olup spermatozoonun en son hasar alan komponentlerindedir (Silva ve Gadella, 2006). Elde edilen verilerin anılan çalışmalar ile uyumsuz olmasını DNA'nın kompakt yapısı aracılığıyla inkübasyonun ilk 5 saatinde kendisini ROS'un zararlı etkilerine karşı savunabildiği, ancak, 5 saatten daha uzun süre inkübasyona bırakılacak olursa, spermatozoonun kendi koruma mekanizmasının yetersiz kalacağı ve sistein katkısına gereksinim duyulacağı şeklinde açıklamak olasıdır.

Sistein ile kombine edilen alabalık seminal plazmasının koç spermasının dondurulması üzerine etkisi konulu bu çalışmadan özet olarak:

- Koç sperma sulandırıcısına eklenen alabalık seminal plazması gruplarının (%1, %10 ve %15) kontrol grubuyla karşılaştırılmasında dondurma-eritme sonrası motilite değerinin alabalık seminal plazması eklenen gruplarda daha yüksek oranda korunduğu gözlemlendi. Ayrıca, tek başına ya da sistein ile kombine edilerek %10 oranında eklenen ASP'nin motilite değerini diğer tüm çalışma gruplarından yüksek oranda koruduğu saptandı.
- Dondurma-eritme sonrası rakamsal olarak en yüksek motilite, plazma membran fonksiyonel bütünlüğü, akrozomal bütünlük ve DNA bütünlük oranları sistein ile kombine edilen %10 ASP içeren sulandırıcılarla dondurulan gruptan elde edildi. Ayrıca anılan sulandırıcı grubu ile kontrol grubu arasında tüm değerlendirmelerde istatistiksel fark elde edildi ($P<0,05$).
- Dondurma-eritme sonrası ASP-sistein kombinasyonunun akrozomal bütünlük üzerinde sinerjik olumlu bir etkisinin olduğu, dondurma-eritme sonrası ve inkübasyonun 3. ve 5. saatlerinde yalnızca %10 ASP ile sisteinin beraber kullanımının plazma membran fonksiyonel bütünlüğü üzerinde anlamlı bir etki oluşturduğu belirlendi.
- İnkübasyonun 3. ve 5. saatlerinde koç sperma sulandırıcısına ASP'nin tek başına ya da sisteinle kombine edilerek eklenmesinin motilite, plazma membran fonksiyonel bütünlük ve DNA bütünlük oranını kontrol grubundan daha iyi koruduğu gözlemlendi. Buna karşın, düşük (%1) ve yüksek doz (%15) ASP'nin tek başına kullanımının koç spermatozoon akrozomal bütünlüğünün korumasında bir etkisinin olmadığı ve kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği saptandı.

Sonuç olarak, koç sperma sulandırıcısına %10 oranında eklenen ASP'nin tek başına veya sisteinle kombine edilerek dondurma-eritme sonrası incelenen spermatolojik parametreler üzerine koruyucu etkisinin olduğu kanısına varıldı.

6. KAYNAKLAR

1. Abdelhakem AA, Graham EF, Vazquez IA (1991a) Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology* 28: 36-42.
2. Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA et al (1991b) Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. Development of an extender for freezing: effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars and the method of dilution. *Cryobiology* 28: 43– 49.
3. Ahmad M, Nasrullah R, Riaz H et al (2014) Changes in motility, morphology, plasma membrane and acrosome integrity during stages of cryopreservation of buck sperm. *Journal of The South African Veterinary Association* 85(1): 972. DOI: 10.4102/jsava.v85i1.972
4. Ahmadi A, Ng SC (1999) Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 284:696–704.
5. Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A et al (2000) Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.
6. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM (2005) Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl* 26(6):654-60.
7. Ak K, İleri İK, Horoz H et al (1994) Kıvrıkcık koyunlarında mevsim içi östrus senkronizasyonu. *İÜ Vet Fak Derg* 20: 2-3.
8. Ak K, Ak S, Gürel A et al (1995) Koçlarda mycoplasma agalactiae'nin spermatolojik özelliklere deneysel araştırmalar. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg* 26 (2): 139-155.
9. Alçay S, Toker MB, Gökçe E et al (2015) Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender, *Cryobiology*, vol. 71, no. 2, pp. 329–333, 2015.
10. Alçay S, Üstüner B, Nur Z (2016) Effects of low molecular weight cryoprotectants on the post-thaw ram sperm quality and fertilizing ability. *Small Rumin Res* 136: 59–64.
11. Alçay S, Toker MB, Gökçe E et al (2017a) Improvement of incubation resilience with various antioxidants in cryopreserved ram semen. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 13(3): 183–190.
12. Alçay S, Toker MB, Önder NT et al (2017b) Royal jelly supplemented soybean lecithin-based extenders improve post-thaw quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology* 74: 81–85.
13. Amann RP, Pickett BW (1987) Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7: 145-173.
14. Amidi F, Farshad A, Khor AK (2010) Effects of cholesterol-loaded cyclodextrin during freezing step of cryopreservation with TCGY extender containing bovine serum albumin on quality of goat spermatozoa. *Cryobiology* 61: 94–99. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2010.05.006

15. Angulo C, Rauch MC, Droppelmann A et al (1998) Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and Vitamin C. *J Cell Biochem* 71:189–203.
16. Antmen ŞE (2005) Beta Talasemide Oksidatif Stres. Yüksek lisans tezi T.C. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı.
17. Arando A, Delgado JV, Fernández-Prior E et al (2019) Effect of different olive oil-derived antioxidants (hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol) on the quality of frozen-thawed ram sperm. *Cryobiology* 86: 33-39. DOI:10.1016/j.cryobiol.2019.01.002
18. Arı UÇ, Daşkın A (2010) Freezing of washed Angora goat semen with extenders added bull or ram seminal plasma. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 16(2): 233-237.
19. Ashworth PJC, Harrison RAP, Miller NGA et al (1994) Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 6: 173–180.
20. Azeredo GA, Esper CR, Resende KT (2001) Evaluation of plasma membrane integrity of frozen thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Ruminant Reserch* 41: 527-263.
21. Banday MN, Lone FA, Rasool F et al (2017) Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. *Cryobiology* 74: 25–30. DOI:10.1016/j.cryobiol.2016.12.008
22. Belleannee C, Belghazi M, Labas V et al (2011) Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. *Proteomics* 10: 1952-1964.
23. Barrios B, Fernandez-Juan M, Muino-Blanco T, et al (2005) Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J Androl* 26: 539–549.
24. Barrios B, Perez-Pe R, Gallego M et al (2000) Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod* 63: 1531–1537.
25. Berndtson WE (2014) Sperm Production and its Harvest Animal. Editor: PETER JC, STEVEN PL, *Andrology Theories and Applications*, First Edition, CAB International, UK, pp: 11-33.
26. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA et al (2000) Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 55: 282-288.
27. Bittencourt RF, Oba E, de Almeida Biscarde CE et al (2018) Dimethylacetamide and trehalose for ram semen cryopreservation. *Cryobiology* 85: 1–6. DOI:10.1016/j.cryobiol.2018.10.266
28. Brooks DE (1970) Acid-soluble phosphorus compounds in mammalian semen. *Biochemical Journal* 118: 851–857.
29. Brooks DE (1979) Carnitine, acetylcarnitine and the activity of carnitine acyltransferases in seminal plasma of men, rams and rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 56: 667–673.

30. Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S et al (2009) Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. *Research in Veterinary Science* 87: 468–472.
31. Bucak MN, Güngör Ş, Sariözkan S et al (2015) Spermanın dondurulmasında antioksidanların etkisi. *Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics* 1(3): 39–47.
32. Bucak MN, Keskin N, Taşpınar M, et al (2013) Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. *Cryobiology* 67(1): 34-39.
33. Cabrera F, González F, Batista M et al (2005) The effect of removal seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of Canary buck (*Capra hircus*). *Reproduction in Domestic Animals* 40: 191-195.
34. Cardozo JA, Fernandez-Juan M, Forcada F et al (2006) Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 66(4): 841-850.
35. Chacur MGM (2012) Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in Zebu Bulls (*Bos taurus-indicus*). Editor: KIUMARS G, Electrophoresis. First Edition, Intechopen, pp: 173-193.
36. Cheng FP, Gadella BM, Voorhout WF et al (1998) Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biol Reprod* 59: 733–742.
37. Ciereszko A, Dietrich MA, Nynca J (2017) Fish semen proteomics-New opportunities in fish reproductive research. *Aquaculture* 472: 81–92.
38. Ciereszko A, Glogowski J, Dabrowski K (2000) Biochemical Characteristics of Seminal Plasma and Spermatozoa of Freshwater Fishes. Editors: TIERSCH TR, MAZIK PM, Cryopreservation in aquatic species. First Edition, World Aquaculture Society, USA, pp: 20-48.
39. Ciereszko A, Dabrowski K (1995) Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biol Reprod* 52: 982–988.
40. Cormier N, Sirard MA, Bailey JL (1997) Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 18: 461-468.
41. Cryogenetics, Cryopreservation, <http://www.cryogenetics.com/products-and-services/cryopreservation/> 02.07.2019
42. Curry MR, Kleinhans FW, Watson PF (2000) Measurement of water permeability of the membrane of boar, ram and rabbit spermatozoon using concentration dependent self quenching of an entrapped fluorophore. *Cryobiology* 41: 167-173.
43. Çoyan K, Karaca F, Ataman B, Kaya A (2002) Evcil Hayvanlarda Dölerme ve Sun’i Tohumlama. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Konya, s: 15-43.
44. Dai GC, Meng Y, Zhang L et al (2019) Effect of addition of melatonin on liquid storage of ram semen at 4°C. *Andrologia* (in press) DOI:10.1111/and.13236
45. Darin-Bennett A, White IG (1977) Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14: 466-470.

46. Davis BK (1981) Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7560-7564.
47. Desnoyers L, Manjunath P (1992) Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 267: 10149–10155.
48. Dietrich MA, Georg JA, Nynca J et al (2014) Characterization of carp seminal plasma proteome in relation to blood plasma. *J Proteomics* 98: 218-232.
49. Domínguez MP, Falcinelli A, Hozbor F, Sánchez E, Cesari A, Alberio RH (2007) Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology* 69: 564-73. DOI:10.1016/j.theriogenology.2007.11.010
50. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T et al (1993) Cold shock damage is due to lipid phase-transitions in cell-membranes - a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool* 265: 432-437.
51. Eddy EM (2006) *The Spermatozoon in Physiology of Reproduction*. Editor: NEILL JD, Elsevier Academic Press, San Diego, pp: 1–54.
52. Emsen E, Koşum N (2009) Koyunculukta Yeni Üretim Teknikleri. *UÜ Ziraat Fak Derg* 23(2): 33-42.
53. Eppleston J, Maxwell, WMC (1993) Recent attempts to improve the fertility of frozen ram semen inseminated in to the cervix. *Wool Technol Sheep Breed* 41: 291-302.
54. Evans G, Maxwell WMC (1987) Frozen storage of semen. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butter- worths, Wellington, pp. 122–141.
55. Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E et al (2006) DNA damage in bovine sperm cells does not block fertilization but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl* 27(2): 176-189.
56. Fawcett DW (1975) The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology* 44: 394-436.
57. Fernandez-Juan M, Gallego M, Barrios B et al (2006) Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. *J Androl* 27: 588-595.
58. Ferreira S, Roberto M, Mello BD et al (2014) Effect of seminal plasma and egg yolk concentration on freezability of goat semen. *Revista Brasileira de Zootecnia* 43: 513-518.
59. Fiser PS, Fairfull RW (1986) The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology* 23: 599-607.
60. Fiser PS, Fairfull RW (1989) The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26: 64-69.
61. Flesch FM, Voorhout WF, Colenbrander B et al (1998) Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biol Reprod* 59: 1530-1539.

62. Forouzanfar M, Fekri Ershad S, Hosseini SM et al (2013) Can permeable super oxide dismutase mimetic agents improve the quality of frozen–thawed ram semen? *Cryobiology* 66: 126–130. DOI:10.1016/j.cryobiol.2012.12.006
63. Franca LR, Avelar GF, Almeida FF (2005) Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 63: 300-318.
64. Gadella BM (2013) Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida prior to and after fertilization. *Reproduction, Fertility and Development* 25: 26–37.
65. Gangwar, C, Saxena, A, Patel A et al (2018) Effect of reduced glutathione supplementation on cryopreservation induced sperm cryoinjuries in Murrah bull semen. *Anim Reprod Sci* 192: 171–178. DOI:10.1016/j.anireprosci.2018.03.005
66. Ganjam VK, Amann RP (1976) Steroids in fluids and sperm entering and leaving the bovine epididymis, epididymal tissue and accessory sex gland secretions. *Endocrinology* 99: 1618–1630.
67. Gomme PT, McCann KB, Bertolini J (2005) Transferrin: Structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today* 10: 267-273.
68. Gökçe E, Alçay S, Gül Z (2017) Positive effect of BSA supplemented soybean lecithin based extender on liquid storage of ram semen at 5°C. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 64: 313–320.
69. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B et al (1991) Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin Chem* 37(11): 1932-1937.
70. Halliwell B. (1988) Albumin-an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol* 37: 569-571.
71. Hammerstedt R, Parks J (1987) Changes in sperm surfaces associated with epididymal transit. *J Reprod Fertil Suppl* 34: 133–149.
72. Hafez ESE (1993) *Reproduction in Farm Animals*, 6th Edition, Philadelphia-USA.
73. Hafez B, Hafez ESE (2000). *Reproduction in Farm Animals*. 7th Edition, Blacwell Publishing, Maryland-USA.
74. Hartree EF, Mann T (1961) Phospholipids in ram semen: metabolism of plasmalogen and fatty acids. *Biochem J* 80(3): 464–476.
75. Hauser R, Yavetz H, Paz GF et al (1992) The predictive fertilization value of the hypoosmotic swelling test (HOST) for fresh and cryopreserved sperm. *J Assist Reprod Genet* 9: 265–270.
76. Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, et al (1999) Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol* 161(6): 1831-1834.
77. Henkel R, Kierspel E, Stalf T et al (2005) Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril* 83(3): 635-642.
78. Holden CA, Hyne RV, Sathananthan AH et al (1990) Assessment of the human sperm acrosome reaction using concanavalin A lectin. *Mol Reprod Dev* 25: 247–257.

79. Holt WV, North RD (1984) Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J Exp Zool* 230: 473-483.
80. Holt WV (2000) Fundamental Aspects of Sperm Cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53(1): 47-58.
81. Holt WV, Linda MP (2014) Fundamental and Practical Aspects of Semen Cryopreservation Editor: PETER JC, STEVEN PL, *Andrology Theories and Applications*, First Edition, CAB International, UK, pp: 76-100
82. Honda A, Siruntawineti J, Baba T (2002) Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Hum Reprod Update* 8: 405-412.
83. Hunter RHF (1996) Ovarian control of very low sperm egg ratios at the commencement of fertilisation to avoid polyspermy. *Mol Reprod Dev* 44: 417-422.
84. İleri İK (1985). Koyunlarda bir PGF₂ α analogu olan Tiaprost (iliren) ile östrus senkronizasyonu ve sun'i tohumlama çalışmaları. *İÜ Vet Fak Derg* 11(1): 15-30.
85. İleri İK, Ak K, Pabuççuoğlu S, Birler S. (2000) *Reproduksiyon ve Suni Tohumlama*, Ders Notu, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, İstanbul.
86. Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Peez-Pelaez M, et al (1984) Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 70: 219-228.
87. Karafakıoğlu YS (2010) Antioksidanlar ve bir antioksidan olarak taurin. *Kocatepe Vet Derg* 3: 55-61.
88. Kaya A, Birler S, Enwall L, Memili E (2014) Determinants of Sperm Morphology Editor: PETER JC, STEVEN PL, *Andrology Theories and Applications*, First Edition, CAB International, UK, pp: 34-56.
89. Kaymakçı M, Sönmez R (1992) *Koyun Yetiştiriciliği*. Hasat Yayıncılık, İstanbul: Hayvancılık Serisi 3.
90. Kelly RW (1978) Prostaglandins in semen: their occurrence and possible physiological significance. *International Journal of Andrology* 1: 188-200.
91. Keskintepe L, Pacholczyk G, Machnicka A, et al (2002) Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 67: 409-415.
92. Koşum N (2006) Koyun ve keçilerde yapay tohumlama (Artificial insemination in sheep and goats). *Hasad Aylık Gıda Tarım ve Hayvancılık Dergisi* 22: 259.
93. Kulaksız R, Daşkın A (2009) Farklı antioksidanlarla dondurulan Saanen teke spermasının in vitro ve in vivo değerlendirilmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 56: 201-205.
94. Lackey BR, Gray SL, Henricks DM (2002) Measurement of leptin and insulin-like growth factor-I in seminal plasma from different species. *Physiological Research* 51: 309-311.
95. La Falci VS, Tortorella H, Rodrigues JL et al (2002) Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology* 57: 1035-1048.

96. Lahnsteiner F (2007) Characterization of seminal plasma proteins stabilizing the sperm viability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim Reprod Sci* 97: 151–164.
97. Lahnsteiner F (2009) The role of free amino acids in semen of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and carp *Cyprinus carpio*. *J Fish Biol* 75: 816–33. DOI:10.1111/j.1095-8649.2009.02317.x
98. Lahnsteiner F, Patzner RA, Weismann T (1993) Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Pisces, Teleostei). *Reprod Nutr Dev* 33: 349–60.
99. Lahnsteiner F, Mansour N, Berger B (2004) Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* 62(5): 801–808. DOI:10.1016/j.theriogenology.2003.12.001
100. Lahnsteiner F, Mansour N, Plaetzer K (2010) Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. *Anim Reprod Sci* 119: 314–321. DOI:10.1016/j.anireprosci.2010.01.010
101. Leboeuf, B., Restall B., Salamon S (2000) Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62: 113–141.
102. Ledesma A, Manes J, Ríos G et al (2015) Effect of seminal plasma on post-thaw quality and functionality of Corriedale ram sperm obtained by electroejaculation and artificial vagina. *Reprod Domest Anim* 50: 386–392. DOI:10.1111/rda.12500
103. Lenzi A, Picardo M, Gandini L et al (1996) Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update* 2(3): 246–256.
104. Liu L, Dabrowski K, Ciereszko A (1995) Protective effect of seminal plasma proteins on the degradation of ascorbic acid. *Mol. Cell. Biochem.* 148, 59–66.
105. Manjunath P, Therien I (2002) Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation *Journal of Reproductive Immunology* 53: 109–119.
106. Mann T (1946) Fructose, a constituent of semen. *Nature* 157: 79.
107. Mann T (1951) Inositol, a major constituent of the seminal vesicle secretion of the boar. *Nature* 168: 1043.
108. Mann T (1954) *The Biochemistry of Semen*. Methuen and Co Ltd, London.
109. Mann T, Lutwak-Mann C (1981) *Male Reproductive Function and Semen*. Springer-Verlag, Berlin, pp: 55–159.
110. Marin S, Chiang K, Bassilian S et al (2003) Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett* 554: 342–346.
111. Marti E, Mara L, Marti JI et al (2007) Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology* 67: 1446–1454.
112. Mata-Campuzano M, Alvarez-Rodríguez M, Álvarez M et al (2012) Effect of several antioxidants on thawed ram spermatozoa submitted to 37°C up to four hours. *Reprod Domest Anim* 47: 907–914. DOI:10.1111/j.1439-0531.2012.01990.x

113. Mathur AK, Srivastava RS, Joshi A et al (1989). Pellet freezing of ram semen. *Indian Journal of Animal Sciences* 59(12): 1529.
114. Mattner PE, Voglmayr JK (1962). A comparison of ram semen collected by the artificial vagina and by electroejaculator. *Aust J Exp Agric Anim Husb* 2: 78.
115. Maxwell WMC, Watson PF (1996) Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci* 42(1): 55–65. DOI:10.1016/0378-4320(96)01544-8
116. Maxwell WMC, Welch GR, Johnson LA (1996) Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 8: 1165–1178.
117. McDonald LE, Pineda MH (1989) *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Lea&Febiger, USA-UK, pp: 428-447.
118. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD et al (2002) Current status of sperm cryopreservation: Why isn't better. *Theriogenology* 57: 327-344.
119. Mendoza N, Casao A, Del Valle I et al (2012) Quality characteristics and fertilizing ability of ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 880: 74–81. DOI:10.1016/j.jchromb.2011.11.019
120. Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N et al (1999) Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic Biol Med* 26: 107-116.
121. Metz KW, Berger T, Clegg ED (1990) Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. *Theriogenology* 34: 691–700.
122. Moore SG, Hasler JF (2017) A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *J Dairy Sci* 100(12): 10314–10331.
123. Morris ID, Ilott S, Dixon L et al (2002) The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 17(4): 990-998.
124. Motamedi-Mojdehi R, Roostaei-Ali MM, Rajabi-Toustani R (2014) Effect of different levels of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on cryosurvival of ram spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 49(1): 65-70.
125. Motlagh MK, Sharafi M, Zhandi M et al (2014) Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. *Cryobiology* 69: 217–222. DOI:10.1016/j.cryobiol.2014.07.007
126. Muino-Blanco T, Perez-Pe R, Cebrian-Perez JA (2008) Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. *Reprod Anim Sci* 43(4): 18-31.
127. Najafi A, Kia HD, Mohammadi H, et al (2014) Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. *Cryobiology* 69: 68–73. DOI:10.1016/j.cryobiol.2014.05.004
128. Nauc V, Manjunath P (2000) Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-30 Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol Reprod* 63: 1058-1066.

129. Nazıroğlu M, Gür S, Şimşek H et al (2000) Relationship between levels of beta-carotene, vitamin A and vitamin E in the seminal plasma, spermatozoa, blood serum and liver of rainbow trout. *Vet Rec* 147: 484–486.
130. Noiles EE, Bailey J, Storey BT (1995) The temperature dependence in the hydraulic conductivity, L_p , of the mouse sperm plasma membrane shows a discontinuity between 4 and 0 degrees C. *Cryobiology* 32(3): 220-238.
131. Nur Z, Zık B, Ustuner B, Sagırkaya H et al (2010) Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology* 73: 1267-1275.
132. Nynca J, Arnold G, Fröhlich T, Ciereszko A (2017). Proteomic identification of rainbow trout blood plasma proteins and their relationship to seminal plasma proteins. *Proteomics*, 17(11): 1–15. DOI:10.1002/pmic.201600460
133. Nynca J, Arnold GJ, Fröhlich T et al (2014) Proteomic identification of rainbow trout sperm proteins. *Proteomics* 14: 133-140.
134. Ollero M, Bescos O, Cebrian-Perez JA et al (1998) Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology* 49: 547-555.
135. Özdaş ÖB, Bacınoglu S, Ak K et al (2007) The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine. *Anim Reprod Sci* 104(1): 38–46.
136. Özdaş ÖB, Baran A (2015) Çiftlik hayvanlarında reaktif oksijen türleri ve antioksidanların gamet hücrelerinin in vitro gelişimlerine etkileri. *Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics* 1(3): 35–38.
137. Özkoca A (1984) Çiftlik hayvanlarında Reprodüksiyon ve Sun’i Tohumlama. İÜ Vet Fak Yayınları, İstanbul.
138. Perez-Pe R, Barrios B, Muino-Blanco T et al (2001) Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 760: 113–21.
139. Pilch B, Mann M (2006) Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol* 7: R40.
140. Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA (2003) Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biol Reprod* 68: 1208-1214.
141. Pontbriand D, Howard JG, Schieve MC et al (1989). Effect of cryoprotective diluent and method of freeze thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoon. *Cryobiology* 26: 341-354.
142. Ritar AJ, Salomon S (1983) Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. *Aust J Biol Sci* 36: 49-59.
143. Ramalho-Santos J, Schatten G, Moreno RD (2002) Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 67: 1043-1051.
144. Reddy VS, Yadav B, Yadav CL, et al (2018) Effect of sericin supplementation on heat shock protein 70 (HSP70) expression, redox status and post thaw semen quality in goat. *Cryobiology* 84: 33–39. DOI:10.1016/j.cryobiol.2018.08.005

- 145.Salamon S, Maxwell WMC (1995) Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science* 37(3–4): 185–249. DOI:10.1016/0378-4320(94)01327-I
- 146.Salamon S, Maxwell WMC (2000) Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62: 77–111. DOI:/10.1016/S0378-4320(00)00155-X
- 147.Salmon VM, Castonguay F, Demers-Caron V et al (2017) Cholesterol-Loaded Cyclodextrin Improves Ram Sperm Cryoresistance in Skim Milk-Extender. *Animal Reproduction Science* 177: 1–11.
- 148.Sasaki S, Ohta T, Decker EA (1996) Antioxidative activity of water soluble fractions of salmon spermary tissue. *J Agric Food Chem* 44: 1682–1686.
- 149.Sathe S, Shipley CF (2014) *Applied Andrology in Sheep, Goats and Selected Cervids* Editor: PETER JC, STEVEN PL, *Andrology Theories and Applications*, First Edition, CAB International, UK, pp: 226-253.
- 150.Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB et al (2004) Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 82: 378–83.
- 151.Senger PL (2003) *Reproductive behavior, pathways to pregnancy and parturition*. 2nd edition, Ephrata: Cadmus Professional Communications Science Press Division.
- 152.Setchell BP (1991) *Male reproductive organs and semen in Reproduction in Domestic Animals*. 4th edition Editor: CUPPS PT, Academic Press, USA, pp: 221–249.
- 153.Setchell BP (2014) *Semen and its constituents*. Editor: PETER JC, STEVEN PL, *Andrology Theories and Applications*, First Edition, CAB International, UK, pp: 3-10.
- 154.Setchell BP, Hinks NT, Voglmayr JK et al (1967) Amino acids in ram testicular fluid and semen and their metabolism by spermatozoa. *Biochemical Journal* 105: 1061–1065.
- 155.Seviç A (1977) *Dölerme ve Sun’i Tohumlama Ders Kitabı 5*. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Elazığ, s:180-188.
- 156.Shaliutina-Kolešová, A., Kotas, P., Štěrbá, J., et al (2016). Protein profile of seminal plasma and functionality of spermatozoa during the reproductive season in the common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction and Development* 83(11): 968-982. DOI:10.1002/mrd.22737
- 157.Sharafi M, Zhandi M, Akbari-Sharif A (2015) Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. *Cell Tissue Bank* 16: 261-269. DOI:10.1007/s10561-014-9458-5
- 158.Silva ECB, Cajueiro JFP, Silva SV (2012) Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology* 77: 1722-1726. DOI:10.1016/j.theriogenology.2011.11.023
- 159.Silva PFN, Gadella BM (2006) Detection of damage in mammalian sperm cells *Theriogenology* 65: 958–978.

- 160.Soylu MK (1997) Koç spermasının 5°C'de saklanması boğa seminal plazmasının etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 3(2): 21-26.
- 161.Soylu, MK, Nur, Z, Üstüner, B et al (2007) Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thaw ram semen. *Bull Vet Inst Pulawy* 51: 241-246.
- 162.Toker MB (2018) Methionine, Cysteine ve Bht ilave edilmiş Tris-yumurta sarısı ile dondurulan koç spermasının in-vitro olarak değerlendirilmesi. Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- 163.Toker MB, Alcay S, Gokce E et al (2016) Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience *Cryobiology* 72(3): 205–209.
- 164.Topfer-Petersen E, Ekhlash-Hundrieser M, Kirchoff C et al (2005) The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Animal Reproduction Science* 89: 159–170.
- 165.Tremellen K (2008) Oxidative stress and male infertility a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 14(3):243-58.
- 166.Treulen F, Aguila L, Arias ME et al (2018) Impact of post-thaw supplementation of semen extender with antioxidants on the quality and function variables of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 201: 71–83. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2018.12.011
- 167.Türk G (2015) Reaktif oksijen türlerinin spermatozoon fonksiyonları üzerindeki fizyolojik ve patolojik etkileri. *Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics* 1(3): 26–34.
- 168.Türkiye İstatistik Kurumu (2018) Hayvansal üretim istatistikleri (07.03.2019).<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=30728>
- 169.Uysal O, Bucak MN (2007) Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *ACTA VET. BRNO* 76: 383–390. DOI: 10.2754/avb200776030383
- 170.Üstüner B, Günay Ü, Nur Z (2009) Effect of seminal plasma, egg yolk, and season on the freezability of Saanen buck semen. *Bull Vet Inst Pulawy* 53: 369-374.
- 171.Üstüner B, Alçay S, Nur Z et al (2014) Effect of Egg Yolk and Soybean Lecithin on Tris-Based Extender in Post-Thaw Ram Semen Quality and in vitro Fertility. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 20 (3): 393-398.
- 172.Üstüner B, Alçay S, Toker MB et al (2016) Effect of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plasma on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based or egg yolk-based extender. *Anim Reprod Sci* 164: 97–104.
- 173.Üstüner B, Gökçe E, Toker MB et al (2018) Effect of sperm pooling with seminal plasma collected in breeding or nonbreeding season on Saanen goat sperm cryosurvival. *Andrologia* 50(4): 1–7.
- 174.Van der Horst CJG, Grooten HJG (1966) The occurrence of hypotaurine and other sulphur-containing amino acids in seminal plasma and spermatozoa of boar, bull and dog. *Biochimica et Biophysica Acta* 117: 495–497.
- 175.Vichas L, Tsakmakidis IA, Vafiadis D et al (2018). The effect of antioxidant agents' addition and freezing method on quality parameters of frozen thawed ram

- semen. *Cell and Tissue Banking*, 19(1): 113–121. DOI:10.1007/s10561-017-9633-6
176. Voglmayr JK (1973) Prostaglandin F2a concentration in genital tract secretions in dairy bulls. *Prostaglandins* 4: 673–678.
177. Wang X, Sharma RK, Gupta A et al (2003) Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril* 80(2): 844-850.
178. Watjen W, Michels G, Steffan B et al (2005) Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J Nutr* 135: 525-531.
179. Watson PF (1981) The effects of cold shock on sperm cell membranes. Editors: MORRISGJ, CLARKE A, *Effects of low temperatures on biological membranes*. Academic Press, London, pp: 189-218.
180. Watson PF (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Develop* 7: 871-891.
181. Watson, PF (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60–61: 481–492. DOI:10.1016/S0378-4320(00)00099-3
182. White IG (1993) Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation *Reprod Fertil Dev* 5(6): 639–658.
183. Yarney AT, Sanford ML, Palmer MW (1990) Pubertal development of ram lambs: body weight and testicular size measurements as indicators of postpuerperal reproductive function. *Can J Anim Sci* 70:139-147.
184. Zhandi M, Sharafi M (2015) Negative effect of combined cysteine and glutathione in soy lecithin-based extender on post-thawed ram spermatozoa. *Cell Tissue Bank* 16: 443–448. DOI:10.1007/s10561-014-9488-z
185. Zhao, Z., Deng, G., Lui, Q et al (1998) Cloning and sequencing of cDNA encoding the LS-12 antifreeze protein in the longhorn sculpin, *Myoxocephalus octodecimspinosus*. *Biochim Biophys Acta* 1382: 177–180.

7. SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	→ Derece santigrat
µL	→ Mikrolitre
µm	→ Mikrometre
ASP	→ Alabalık Seminal Plazması
BAP	→ Bilimsel Araştırma Projeleri
BSP	→ Bovine Seminal Plasma
BUÜ	→ Bursa Uludağ Üniversitesi
Ca	→ Kalsiyum
Cl	→ Klor
CAT	→ Katalaz
CH	→ Monokarbon Hidrojen
CH ₂	→ Metilen
ConA	→ Cancanavalin A lectin
CPE	→ Corona Penetrating Enzyme
DDP	→ Doktora Destek Projesi
dk	→ dakika
DNA	→ Deoksiribo nükleik asit
Fe	→ Demir
FTS	→ Fizyolojik Tuzlu Su
GnRH	→ Gonadotropin Releasing Hormone
GSH	→ Glutasyon
GST	→ Glutasyon S-transferaz
H	→ Hidrojen
H ₂ O ₂	→ Hidrojen peroksit
HOST	→ Hypo-osmotic swelling test
HO ₂	→ Hidroksiperoksil
ICSI	→ In Vitro Sperm Injection
IGF	→ Insulin Growth Factor
IVF	→ İn Vitro Fertilizasyon
K	→ Potasyum
Kda	→ Kilodalton
kg	→ Kilogram
LDL	→ Düşük yoğunluklu lipoprotein
LPO	→ Lipit peroksidasyon
MDA	→ Malondialdehit
Mg	→ Magnezyum
mL	→ Mililitre
mM	→ Milimolar
Mn	→ Manganez
mOsm	→ Miliosmol
Na	→ Sodyum
O	→ Oksijen
O ₂	→ Süperoksit

OH → Hidroksil
P → İstatistiki anlam düzeyi
PI → Propidium Iodide
PNA → Peanut agglutinin
PSA-FITC → Pisum SativumFluorescein Isothiocyanate
PUFA → Poliansatüre yağ asidi
ROS → Reaktif oksijen türleri
RSVP → Ram Seminal Vesicle Protein
sn → Saniye
SO₂ → Kükürt Dioksit
SOD → Süperoksit dismutaz
SP → Seminaş Plazma
Spt → Spermatozoon
TUNEL → Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling
V → Volt
Zn → Çinko
ZP → Zona Pellusida

8. TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca hem akademik hem kişisel olarak beni her daim destekleyen ve yönlendiren, tecrübelerini esirgemeyen benim için danışmandan öte olan değerli hocam Doç. Dr. Burcu ÜSTÜNER'e teşekkürü bir borç bilirim. Doktora eğitimim boyunca bilimsel önerilerini benimle paylaşan başta Prof. Dr. M. Kemal SOYLU ve tüm Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocalarımın teşekkürlerimi sunarım. Akademik ve özel hayatımda her daim abi ve arkadaş olarak yanımda olan, desteklerini hiçbir zaman üzerimden esirgemeyen kendileri ile çalışmanın benim için çok büyük bir şans olduğunu hissettiren Doç. Dr. Selim ALÇAY, Dr. M. Berk TOKER ve N. Tekin ÖNDER'e çok teşekkür ederim. Yeni kurumumda doktora tez çalışmamı tamamlayabilmem için gerek fiziki olanak sağlayan gerekse manevi olarak elinden gelen yardımı esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Muzaffer TAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim. Farklı disiplinlerde çalışıyor olmamıza rağmen akademik anlamda bana çok farklı bakış açıları kazandıran, her şeyin kötü gittiğini düşündüğüm zamanlarda dahi motivasyonumu korumama yardımcı olan Ahmed Burak ÇAĞLAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Özellikle tez çalışmamın yazımı esnasında en karamsar olduğum dönemlerde zaman kavramını önemsemeyen yanımda olan bana manevi destek olan Dr. Öğr. Üyesi Deniz BELENLİ ve Araş. Gör. Tuba Damla ERTAŞ'a teşekkürü borç bilirim. Bugünlere gelmemde emeği çok büyük olan annem ve babama, doktora çalışmam boyunca tüm gerginliğimi çeken kardeşlerime her şey için çok teşekkür ederim. Tez çalışmamı devam ettirebilmem için bana olanak sağlayan Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yönetimine; lisans ve doktora eğitimi boyunca desteklerini esirgemeyen Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Akademik ve İdari personeline, teşekkürü bir borç bilirim. Doktora çalışmamı DDP 2017/10 numaralı "Farklı antioksidanlar ile kombine edilen alabalık seminal plazmasının koç spermasının dondurulabilirliği ve embriyonik gelişim üzerine etkileri" başlıklı proje ile destekleyen Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine destekleri için teşekkür ederim.

9. ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Düzce’de doğmuştur. İlk ve orta öğretimini Düzce Namık Kemal İlköğretim Okulu, lise öğrenimini Düzce Fen Lisesinde tamamlamıştır. Liseden mezun olduğu 2008 yılında Lisans eğitimi için Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazanmış ve 2014 yılında buradan mezun olmuştur. Mezuniyetle beraber, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başlamıştır. 01.02.2018 tarihinde Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır. 2016-2019 yılları arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrenci temsilciliği görevini üstlenmiştir. Bekar ve Tekirdağ’da ikamet etmektedir.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Elif GÖKÇE
Tez Adı	Sistein ile Kombine Edilen Alabalık Seminal Plazmasının Koç Spermalarının Dondurulabilirliği Üzerine Etkisi
Enstitü	Sağlık Bilimleri
Anabilim Dalı	Veteriner-Dölerme ve Suni Tohumlama
Tez Türü	Doktora
Tez Danışmanı	Doç. Dr. Burcu ÜSTÜNER
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) İzni Kısıtlama	<input checked="" type="checkbox"/> Patent Kısıt (2 yıl) <input type="checkbox"/> Genel Kısıt (6 ay) <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum.

Hazırlamış olduğum tezimin belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Bursa Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih: 29/07/2019

İmza :