

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOÇ SPERMASINA KATILAN BAZI ANTİOKSİDANLARIN
DONDURMA VE ÇÖZDÜRME SONRASI SPERMATOLOJİK
PARAMETRELER, OKSİDATİF STRES VE DNA HASARI
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Fatih AVDATEK

**DÖLERME VE SUN'İ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI
(VETERİNER)
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa GÜNDOĞAN

**Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
tarafından 10.VF.15 proje numarası ile desteklenmiştir.**

Tez No: 2013-003

2013-AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Dölerme ve Sun’i Tohumlama Anabilim Dalı

çerçevesinde yürütölmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17/01/2013



Prof. Dr. Fikret KARACA
Mustafa Kemal Üniversitesi
Jüri Başkanı




Prof. Dr. Mustafa GÜNDOĞAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Zehra BOZKURT
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Mustafa TEKERLİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye



Yrd. Doç. Dr. Deniz YENİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Raportör

Dölerme ve Sun’i Tohumlama Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Fatih AVDATEK’in “Koç spermasına katılan bazı antioksidanların dondurma ve çözdürme sonrası spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkileri” başlıklı tezi 17.01.2013. günü saat 10.00’de Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğı’nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Kağan ÜÇOK
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Türkiye’de et, süt, deri ve yapağı gibi ürünleri ile halkın beslenmesinde ve yaşamında ayrı bir yere sahip olan koyun yetiştiriciliğinde, elde edilen ürünlere yılın her mevsiminde talep vardır. Diğer hayvancılık kollarında olduğu gibi koyun yetiştiriciliğinde de üzerinde durulması gereken en önemli özellik dölverimidir. Çünkü ekonomik değer taşıyan hayvansal ürünler ancak düzenli dölverimi sonucu elde edilen yeni kuşaklarla sürdürülebilmektedir. Günümüzde gen kaynaklarını taşıyan eşey hücrelerinin yeni kuşaklara aktarılması, kaynakların korunması ve saklanması ile mümkündür.

Dondurulmuş sperma ile yapılan tohumlamalardan elde edilen fertilitite oranı ineklere nazaran koyunlarda daha düşüktür. Bunun nedeni dondurma-çözdürme esnasında spermatozoon membranında oluşan değişimler, ozmotik stres, ortamda meydana gelen serbest oksijen radikalleri nedeniyle hücrede oluşan deformasyonlar ve hücre DNA’larında meydana gelen hasarlardır. Bu olumsuzluklara neden olabilecek etkenleri ortadan kaldırmak amacıyla sperma sulandırıcılarına bazı antioksidanlar ilave edilmektedir.

Yapılan bu tez çalışmasında Afyonkarahisar koşullarında yetiştirilen Pırlak ırkı koçların spermalarının uzun süreli saklanmasında sulandırıcılara katılacak olan farklı antioksidanların spermatolojik parametrelere, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkilerinin ortaya konulması, meydana gelen hasarların en aza indirilmesinde çözdürme sonrası antioksidanların etkinliğinin araştırılması ve nihayetinde mevcut metodun geliştirilerek bölge ve ülke ekonomisine katkı sağlaması hedeflenmektedir.

Tüm akademik yaşamım ve doktora çalışmam sürecinde tecrübe ve birikimlerini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa GÜNDOĞAN’a şükranlarımı sunarım. Tez izleme komite üyeleri Prof. Dr. Zehra BOZKURT ve Prof. Dr. Mustafa TEKERLİ’ye çalışmalarım süresince verdikleri destekten dolayı teşekkürlerimi sunarım. Doktora çalışmam boyunca her aşamasında birlikte çalışma fırsatı bulduğum Dölerme ve Suni Tohumlama A. D. Öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Deniz YENİ’ye, spermanın dondurulması ön çalışmalarında desteklerini esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama A. D. Öğretim üyesi Doç. Dr. Mustafa Numan BUCAK’a, örneklerin alınmasında yardımlarını esirgemeyen Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim elemanı Arş. Grv. Dr. Muhammed Kürşad BİRDANE’ye, Veteriner Hekimler Mikail GÖKDEMİR, Rıfat ÖZCAN, Hulusi ŞAHİN, Mehmet BAŞEĞMEZ ve Mehmet AYKUR’a, CASA analizlerinin gerçekleştirilmesindeki desteklerinden dolayı Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürü Sayın Talat GÖZET’e ve Suni Tohumlama Laboratuvar personelleri Doç. Dr. Pürhan Barbaros TUNCER, Dr. Hüseyin KİNET, Dr. Serhat BÜYÜKLEBLEBİCİ ve emeği geçen tüm personele, oksidatif stres parametrelerinin ölçülmesinde desteklerini esirgemeyen Farmakoloji ve Toksikoloji A. D. öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Sinan İNCE’ye öğretim elemanı Arş. Grv. Dr. Ruhi TÜRKMEN’e ve Patoloji A. D. öğretim elemanı Arş. Grv. Dr. Hasan Hüseyin DEMİREL’e, tez yazımı ve okunması sürecinde yardımlarından

dolayı Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Duygu BAKİ ACAR'a, ayrıca Pırlakların halk elinde ıslahı projesine katkılarından dolayı A.K.Ü. Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi idari personeline ve bu çalışmayı 10.VF.15 no'lu proje olarak destekleyen A.K.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bugüne kadar maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anne ve babama, gösterdikleri sabır ve destek için eşim Keziban AVDATEK ve oğullarım Ahmet ve Ali İhsan AVDATEK'e şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Çizelgeler	xi
Şekiller	xii
Resimler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Koçlarda Spermanın Saklanması	2
1.2. Spermanın Saklanmasında Kullanılan Sulandırıcılar	3
1.3. Kriyoprotektantlar	9
1.3.1. Gliserol	10
1.3.2. Etilen Glikol	12
1.3.3. Amid Türevleri	13
1.3.4. Dimetilsülfoksit	14
1.4. Antioksidanlar ve Reaktif Oksijen Türleri	14
1.4.1. Non-enzimatik Antioksidanlar	22
1.4.1.1. Taurin	22
1.4.1.2. Trehaloz	25
1.4.1.3. Vitamin E	27
1.4.1.4. Alfa Lipoik Asit	29
1.4.2. Enzimatik Antioksidanlar	30
1.4.2.1. Glutasyon Redüktaz	30
1.4.2.2. Glutasyon Peroksidaz	31
1.4.2.3. Katalaz	31
1.4.2.4. Süperoksid Dismutaz	32
1.5. Sperma Dondurma Yöntemleri	32
1.6. Donmuş Spermanın Değerlendirilmesi	34
1.6.1. Motilite ve CASA	34
1.6.2. HE-Test	38
1.6.3. Anormal Spermatozoon Oranı	38
1.6.4. DNA Hasarı	39
1.6.5. Oksidatif Stres Parametreleri	43
2. GEREÇ VE YÖNTEM	45
2.1. Hayvan Materyali	45
2.2. Hayvanların Bakım ve Beslenmesi	45
2.3. Suni Vajenin Hazırlanması	46
2.4. Spermanın Alınması	46
2.5. Sulandırıcı ve Antioksidanlar	46

2.6. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması	47
2.7. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi	49
2.7.1. Makroskopik Muayene	49
2.7.1.1. Spermanın Viskozitesi	49
2.7.1.2. Spermanın pH Değeri	49
2.7.2. Mikroskopik Muayene	50
2.7.2.1. Spermatozoon Kitle Hareketi	50
2.7.2.2. Spermatozoon Motilitesi	50
2.7.2.3. Spermatozoon Yoğunluğu	50
2.7.2.4. Anormal Spermatozoon Oranı	51
2.7.2.5. HE-test	53
2.7.3. CASA ile Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi	55
2.8. DNA Hasarının Belirlenmesi	56
2.8.1. Spermanın Yıkanması	57
2.8.2. Slaytların Hazırlanması	57
2.8.3. Hücre Lizisi	57
2.8.4. Slaytların Elektroforezi	58
2.8.5. Slaytların Nötralizasyonu	58
2.8.6. Slaytların Boyanması	58
2.8.7. Slaytların Değerlendirilmesi	58
2.9. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi	61
2.9.1. Glutasyon	61
2.9.2. Glutasyon Peroksidaz	61
2.9.3. Katalaz	62
2.9.4. Lipit Peroksidasyon	62
2.9.5. Superoksid Dismutaz	62
2.10. İstatistiksel Analiz	63
3. BULGULAR	64
3.1. Dondurma Öncesi Spermatolojik Parametreler	64
3.2. Dondurma-Çözdürme Sonrası Spermatolojik Parametreler	64
3.3. Dondurma-Çözdürme Sonrası Anormal Spermatozoon Oranları	67
3.4. Dondurma-Çözdürme Sonrası HE-Test Parametreleri	67
3.5. Dondurma-Çözdürme Sonrası DNA Hasarları	72
3.6. Dondurma-Çözdürme Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri	72
4. TARTIŞMA	76
5. SONUÇ	94
ÖZET	97
SUMMARY	98
6. KAYNAKLAR	99

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALA	Alfa lipoik asit
ALH	Başın Lateral Yerdeğiştirme Amplitüdü
AO	Akridin oranj
ATP	Adenozin trifosfat
ark.	Arkadaşları
AU	Arbitrary Unit
BCF	Çapraz Kesişme Frekansı
BHT	Butil Hidroksi Toluen
BSA	Sığır serum albumin
Ca ⁺²	Kalsiyum iyon
CASA	Bigisayar destekli sperma analiz cihazı
CAT	Katalaz
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Trehaloz
cm	Santimetre
cm ³	Santimetre küp
CO ₂	Karbondioksit
COMET	Tek hücre jel elektroforez yöntemi
cAMP	Siklik adenosin monofosfat
dk	Dakika
DHLA	Dihidrolipoik asit
DMA	Dimetilasetamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asid
g	Gram
Gy	Gray
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSSG-R	Glutatyon redüktaz
GST	Glutatyon-s-transferaz

HCl	Hidroklorik asit
HOS	Hipo-ozmotik şişme
HO·	Hidroksil
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HOX	Hipohalöz asid
HQ·	Semikinon
Hz	Hertz
IU	İnternasyonal ünite
kg	Kilogram
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LIN	Linearite
LMA	Düşük kaynama dereceli agaroz
LPO	Lipit peroksidasyon
LOOH	Lipit hidroperoksit
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
Mg ⁺²	Magnezyum iyonu
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mm ³	Milimetre küp
mM	milimolar
mOsm	Miliozmol
mU	mili Ünite
µl	mikrolitre
µm	Mikrometre
µmol	mikromol
NBT	Nitroblue tetrazolium
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Sodyum sitrat
Na ₂ HPO ₄	Sodyum fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit

nm	Nanometre
nmol	nanomol
NO [•]	Nitrik oksid
NO ₂	Azot dioksit
O ₂ ^{•-}	Süperoksit anyonu
O ₃	Ozon
ONOO ⁻	Peroksinitrit
(¹ O ₂) ₂	Singlet oksijen
P	Probability
PBS	Fosfat tamponlu tuz
PLGPx	Peroksidaz
R [•]	Organik radikaller
RCOO [•]	Organik peroksit
R-NH-X	N-Halojenli aminler
RO [•]	Alkoksil
ROO [•]	Peroksil
ROS	Reaktif oksijen türleri
s	Saniye
SCD	Sperm chromatin dispersion
SCGE	Tek hücre jel elektroforez
SCSA	Sperm chromatin structure assay
S.E.M.	Standart hata
SOD	Süperoksid dismutaz
STR	Doğrusallık
TBA	Tiobarbitürik asit
TUNEL	TdT-mediateddUTP nick end labeling
VAP	Ortalama Rota Hızı
VCL	Eğri Çizgi Hızı
VSL	Düz Çizgi Hızı
X/XO	Xanthine/xanthine oxidase
α	Alfa
±	Artı-eksi

β	Beta
>	Büyüktür
<	Küçüktür
°	Derece
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
~	Yaklaşık

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 3.1. Dondurma öncesi başlıca spermatolojik parametreler	64
Çizelge 3.2. Dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik parametreler	65
Çizelge 3.3. Dondurma-çözdürme sonrası anormal spermatozoon oranları	68
Çizelge 3.4. Dondurma-çözdürme sonrası HE-test parametreleri	70
Çizelge 3.5. Dondurma-çözdürme sonrası DNA Hasarları	72
Çizelge 3.6. Dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametreleri	74

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1.1. Reaktif oksijen türleri	16
Şekil 1.2. Biyolojik sistemlerdeki antioksidanların sınıflandırılması	19
Şekil 2.1. Çalışma gruplarının oluşum şeması	48
Şekil 2.2. Spermatozoonların kinetik hareketleri	56
Şekil 3.1. Subjektif motilite ve CASA parametreleri	66
Şekil 3.2. Anormal spermatozoon oranları	69
Şekil 3.3. HE-test parametreleri	71
Şekil 3.4. DNA hasarları	73
Şekil 3.5. Oksidatif stres parametreleri	75

RESİMLER

	Sayfa
Resim 2.1. Araştırmanın yapıldığı merkez ve koçların genel görünümü	45
Resim 2.2. Koçların spermalarında gözlenen bazı anormal spermatozoonlar	52
Resim 2.3. Spermatozoonlarda HE-testinde gözlenen şişme ve kıvrılmalar	54
Resim 2.4. CASA	55
Resim 2.5. Görsel Skorlama Tekniği İle Hücrelerin Sınıflandırılması	59
Resim 2.6. Spermatozoonlardaki DNA hasarları	60

1. GİRİŞ

Küçük ruminantların beslenmesindeki doğal kaynakların varlığı ve uygunluğu, halkın sosyo-ekonomik yapısı ve tüketim alışkanlıkları gibi nedenlerden dolayı Türkiye hayvancılığı içerisinde koyun yetiştiriciliğinin önemli bir yeri vardır. Modern koyun yetiştiriciliğinde en önemli hedefler verimliliğin sürdürülebilirliği ve reproduktif performansın yükseltilmesidir. Ekonomik değer taşıyan hayvansal ürünler ancak düzenli üreme ile elde edilen yeni kuşaklar ile sürdürülebilir. Bundan dolayıdır ki dölverimi çiftlik hayvanlarının en önemli verimlerinden olup dölverimi düşük olan bir hayvandan yüksek verimli yavru alınamayacağı gibi dölverimleri değişik faktörler tarafından olumsuz yönde etkilenmiş hayvanlardan da istenen bir dölverimi elde edilemez. Dölveriminin artırılması, yetiştiriciye başlıca iki yönde yarar sağlar. Bunlardan birincisi, dölverimi yüksek populasyonlarda daha sıkı seleksiyon yapma imkanının olması, ikincisi ise elde edilen yavrulardan damızlık dışı kalanların sayısal artışıyla sağlanacak kazancın yükselmesidir.

Sürü hayvanı olan koyunlarda bireysel infertilite veya sterilite olguları dışında fazla önem taşımazken erkek hayvanlarda sürünün dölverimi açısından büyük önem taşımaktadır. Çünkü, koyunlar mevsimsel poliöstrik hayvanlar olduklarından aşım sezonu esnasında tohumlandıkları halde gebe kalmayan dişiler genellikle et olarak değerlendirildiklerinden dolayı dölveriminin dolayısıyla yavru veriminin düşmesine neden olmaktadır. Bu nedenle damızlık olarak seçilecek erkek hayvanların androlojik parametrelerinin bilinmesinin yüksek verimli ırkların oluşturulmasında ve geliştirilen genotiplerin devamlılığının sağlanmasında önemli bir yeri vardır. Günümüzde genetik materyalin önemli bir parçasını oluşturan erkek gamet hücrelerinin dondurulması nesli ile tükenmekte olan, değerli ve eşsiz hayvanların genetik korunması için son derece önemli bir araç haline gelmiştir.

Günümüzde boğa spermasının dondurularak suni tohumlama çalışmalarında kullanılması sonucunda elde edilen başarı tatmin edici olmakla birlikte koç ve teke spermalarının dondurulup suni tohumlama uygulamalarında kullanılması sonucu elde edilen dölverimlerdeki başarı oranları yeterli düzeylere ulaşamamıştır. Bunun da en önemli nedenlerinden başlıcası koç ve teke spermatozoonlarının plazma membranlarının yapısının donmaya karşı boğa spermatozoonlarına göre daha hassas olması ve böylelikle çözüm sonu elde edilen spermatozoonların kalitesinin istenen seviyede olmamasıdır. Gerek büyük ruminantlarda elde edilen başarının daha da ilerletilmesi gerekse küçük ruminantlar da bu problemlerin ortadan kaldırılması amacıyla spermanın dondurulmasında farklı kimyasal maddeler kullanılarak spermanın uzun süre saklanma çalışmaları devam etmektedir.

1.1. Koçlarda Spermanın Saklanması

Spermatozoonların dondurulmak suretiyle canlılığının uzun yıllar muhafaza edilmesi olarak bilinen kriyopreservasyon işleminde amaç, çok düşük ısıda canlı bir hücrenin veya dokunun minimum hasarla fonksiyon kaybı olmaksızın uzun süreli saklanmasıdır (Bailey ve Bilodeau, 2000; Trounson, 1990). Bu işlem spermanın sulandırılması, soğutulması, dondurulması ve çözündürülmesi aşamalarını kapsamaktadır. Bu prosedürler esnasında spermatozoon hücresinde soğuk şoku, ozmotik şok, kapasitasyon benzeri değişimler ve akrozom bozukluğu şekillenebilmektedir (Holt, 2000a).

Suni tohumlama uygulamalarının yaygın hale gelmesinden sonra değerli damızlık hayvanların spermalarının farklı alanlara taşınarak, daha fazla sayıda hayvanın tohumlanması amacıyla spermanın uzun süre saklanma gerekliliği ortaya çıkmıştır. Spermatozoon metabolizmasının yavaşlatılması veya durdurulması yoluyla fertilitenin devamı sağlanabilmektedir. Bazı araştırmacılar (Maxwell ve Saloman, 1993; Saloman ve Maxwell, 2000) spermanın sıcaklığının düşürülerek spermatozoon metabolizmasının yavaşlatılması veya durdurulması suretiyle spermanın sıvı olarak ya da 0 °C'nin altında dondurularak saklanabileceğini bildirmişlerdir. Spermanın

dondurulması konusunda bilinen ilk çalışmalar 1780 yılında İtalyan fizyolog Lazzaro Spallanzani'ye aittir (Demirci, 2002; Yoshida, 2000). Bernstein ve Petropavlovsky (1937) spermanın dondurulması çalışmalarına memeli ve kanatlı spermasını -21 °C'de gliserol yardımıyla dondurarak devam etmişlerdir. Bundan sonra 1949 yılında Polge ve ark. (1949)'nın spermanın dondurulması üzerine yaptıkları çalışmalar neticesinde gliserolün soğuğa karşı koruyucu etkisinin olduğu ön planda yer almıştır. Bu tekniğin dayandığı temel ilke, uygun tekniklerle sperma sıcaklığının -79 °C ile -120 °C'ye kadar düşürülerek sıvı azot içerisinde (-196 °C) muhafaza edilmesidir. Bu önemli buluşu Emmens ve Blackshaw (1955)'ın boğa, koç ve tavşan spermalarını gliserol içeren koruyucu maddeler içerisinde ve düşük sıcaklıklarda dondurup saklamaları izlemiştir. Bu çalışmalarda dondurulmuş boğa spermalarından tatmin edici sonuçlar alınırken başta koç olmak üzere diğer evcil hayvan türlerinden istenen sonuçlar sağlanamamıştır.

Organik sulandırıcıların kullanımı üzerine 1970'li yıllarda yoğun çalışmalar yapılmış ve Visser ve Salamon (1973) spermanın saklanması amacıyla Tris (Tris (hydroxymethyl)-aminomethane) içeren sulandırıcılar kullanmışlardır. Prensipde bu sulandırıcılar pH değişimlerine karşı diğer sulandırıcılara göre daha esnektir. Günümüzde de Tris sulandırıcısı tüm evcil hayvanların spermalarının kısa ve uzun süre saklanması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Bucak ve ark., 2009; Gündoğan ve ark., 2011; Maia ve ark., 2010). Spermanın dondurulması ve saklanmasında, soğutucu ve dondurucu olarak bilinen sıvı nitrojen 1957'de rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır. Konteyner olarak adlandırılan paslanmaz çelikten yapılmış vakumlu geniş kapların geliştirilmesi, spermanın çiftliklerde saklanması ve uzun mesafelere taşınması amacıyla günümüzde de halen pratik olarak kullanılmaktadır (Demirci, 2002).

1.2. Spermanın Saklanmasında Kullanılan Sulandırıcılar

Sperma değişik hayvan tür ve ırklarına göre değişen teknik ve yöntemlerle dondurulabilmektedir. Ancak dondurma işleminin prensipleri ortaktır. Bu

prensiplerin başında spermanın uygun medyumlarla sulandırılması gelmektedir. Spermayı sulandırmak için kullanılacak sulandırıcıların sahip olması gereken temel özellikler aşağıdaki şekilde sıralanmaktadır; (Demirci, 2002; Hafez, 1987; Yurdaydın, 1990)

- a- İzotonik bir osmotik basınç ve elektrolit dengesi sağlamalıdır.
- b- Spermatozoon canlılığını ve aktivelerini uzun süre sağlaması için gerekli olan kimyasal maddeler arasında bir denge olmalıdır.
- c- Gerek aerob ve gerekse anaerob koşullarda spermatozoonların beslenmesini sağlayacak besin maddelerini içermelidir.
- d- Soğuk şokuna ve hızlı soğutmanın zararlı etkilerine karşı spermatozoonları korumalıdır.
- e- Spermatozoonların metabolizma artıklarından meydana gelen toksik etkileri ortadan kaldıracak kimyasal maddeler içermelidir.
- f- Spermatozoonlara ve dişi genital kanala zarar vererek fertilizasyonun şekillenmesine engel olabilecek enfeksiyon etkenlerini taşımamalıdır.
- g- pH'nın zararlı etkileri sonucu oluşan laktik asitten korunmak için bir tampon görevi yapmalıdır.

Bunun yanı sıra spermatozoonlar ani sıcaklık değişimlerinden çabuk etkilendiğinden sperma ile sulandırıcının aynı sıcaklık derecesinde olması gerekmektedir. Ayrıca kademeli bir şekilde sulandırıcı spermaya katılmalıdır. Diğer yandan sulandırıcının miktarı, ejakülat miktarı, spermatozoon motilitesi ve yoğunluğu ile hayvan türlerinde bir tohumlama dozunda bulunması gereken motil spermatozoonların oranına göre belirlenmektedir (Yurdaydın, 1990).

Standart dondurma metodu sıcaklığın azaltılması, hücrel dehidrasyon, dondurma ve çözündürme işlemlerini kapsamaktadır. Kriyopreservasyon işlemleri spermatozoonların erken kapasite olmalarını artırmaktadır. Bu değişimler belki spermatozoon motilitesini etkilememekte ancak spermatozoonların yaşam ve fertil yaşam sürelerini, dişi reproduktif sistemle etkileşimini ve spermatozoonların fertilizasyon yeteneklerini azaltmaktadır (Medeir ve ark., 2002).

Günümüze kadar evcil ya da vahşi hayvanların spermalarının kısa veya uzun süreli saklanması bir çok sulandırıcı ve bu sulandırıcılara katılan maddeler kullanılmıştır. Yumurta sarısı hemen hemen tüm evcil hayvanların spermalarının kısa süreli saklanma ve dondurulma aşamasında sulandırıcılara farklı oranlarda katılmaktadır. Yumurta sarısının sulandırıcılara katılmasındaki amaç spermatozoonları 37 °C'den 5 °C'ye kadar soğutulması esnasında meydana gelen soğuk şokundan korumaktır (Hafez, 1987). Yumurta sarısının soğuğa karşı koruyucu etkisi, fosfolipit, kolesterol ve düşük yoğunluktaki lipoproteinleri (Low density lipoprotein, LDL) içermesinden kaynaklanmaktadır (Clulow ve ark., 2007; Medeir ve ark., 2002). Yumurta sarısında bulunan LDL'nin % 75'ini lipitler, % 25'ini ise rezidüel lipoproteinler oluşturmaktadır (Evans ve ark., 1973). Ancak bu koruma mekanizması hala tam olarak anlaşılamamış olup çeşitli teoriler öne sürülmektedir. Bergeron ve Manjunath (2006)'ın ileri sürdüğü ilk teoriye göre LDL'nin spermatozoon membranı ile etkileşime girip membranı stabilize hale getirerek etki yaptığı bildirilmektedir. İkinci teori LDL içerisinde bulunan fosfolipitlerin koruyucu ince bir film tabakası gibi spermatozoonun yüzeyini kaplayarak ya da kriyopreservasyon süresince hasarlanan fosfolipitlerin yerine geçerek koruyucu etki yaptıkları bildirilmektedir. Öne sürülen son teoride ise LDL'nin seminal plazmadaki katyonik peptidler ile yarış halinde olduğu ve spermatozoon membranına bağlanarak koruyucu etki yaptığını bildirmektedirler.

Phillip (1939) ilk defa boğa sperması sulandırıcısına 10 °C'de yumurta sarısı ilave ederek boğa spermatozoonlarının yaşam sürelerini uzatılabildiğini bildirmiştir. Daha sonra yumurta sarısının boğa ve koç spermasının saklanması yararlı olduğu görülmüş ve yumurta sarısı sperma sulandırıcısının en yaygın bileşeni haline gelmiştir. Yumurta sarısının bu koruyucu etkisi sadece soğutma esnasında değil aynı zamanda dondurma esnasında da devam etmektedir (Watson, 1981). Yumurta sarısı spermatozoon membranındaki lipit faz geçişini etkileyerek soğuk şokunu engellemekte ve bu koruma etkisini -20 °C'ye kadar sürdürmektedir (Drobnis ve ark., 1993). Abdelhakeam ve ark. (1991)'ları sulandırıcıya yumurta sarısı ilavesinin,

özellikle spermanın 5 °C'ye kadar hızlı bir şekilde soğutulmasından sonra elde edilen motilite oranı üzerine pozitif etki yaptığını bildirmişler.

Spermatozoon hücre bileşenlerinden fosfolipitler ve kolesterol soğuk şokuna karşı korumada önemlidir. Spermatozoonların soğuk şokuna duyarlılığı hücre membranında bulunan fosfolipitlerdeki doymamış yağ asitlerinin yüksek konsantrasyonda olmasından ve düşük kolesterol içeriğinden kaynaklanmaktadır. Yüksek oranda doymamış yağ asitleri spermatozoonların motilite, metabolizma, ayrıntılı yapısı ve fertilizasyon yeteneği üzerine negatif etki yapan peroksidasyona karşı duyarlı hale getirmektedir. Lipit peroksidasyon türevlerinden 4- hidroksynonenal koç spermasında spermatozoonların motilitesini azaltarak veya tamamen ortadan kaldırarak mutajenik etki göstermektedir.

Yumurta sarısının spermatozoonlardaki lipit peroksidasyon oranını belli oranda azaltmaktadır (White, 1993). Yumurta sarısında bulunan düşük dansitiye sahip fosfolipitler spermatozoonun yüzeyine bağlanır ve hücresel adenilat siklazı aktive ederek kriyoprotektif etki göstermektedir (Holt, 2000a; Luvoni ve ark., 2003).

Yumurta sarısı yerine benzer etkiye sahip maddeler bulunsa da yumurta sarısının spermatozoonların plazma membranı üzerindeki koruyucu etkisi özellikle koç spermasını dondurma amacıyla kullanılan sulandırıcılardaki önemini halen korumaktadır. Koç ve teke spermasında kullanılan Tris sulandırıcısına dondurma yöntemine ve sulandırıcıdaki diğer kimyasalların oranlarına bağlı değişmekle beraber % 15 oranında yumurta sarısı katılmasının uygun olduğu bildirilmektedir (Saloman ve Maxwell, 2000). Boğa spermasının dondurulmasında kullanılan sulandırıcılara ise % 20 oranında katılmaktadır (Su ve ark., 2008). Yumurta sarısının spermatozoonların membran bütünlüğüne koruyucu etkisi evcil hayvanlarda kabul edilmiştir. Ancak yumurta sarısı oranının artırılmasıyla membran destabilizasyonu ve akrozomal bozukluk meydana geldiği rapor edilmiştir (Watson, 2000). Yumurta sarısı genel olarak, yumurta sarısı - fosfat sulandırıcısı, yumurta sarısı - sodyum sitrat, yumurta sarısı - tris ve yumurta sarısı - süt tozu kombinasyonları şeklinde ve bunlara da

hayvan türlerine göre uygun olarak glikoz, sukroz, fruktoz ve rafinoz şekerlerinin ilave edilmesi ile kullanılmaktadır (Demirci, 2002; Hafez, 1987).

Yağlı, yağsız ve işlenmiş süt yıllardır gerek koç gerekse diğer hayvan türlerinin spermatozoonlarının kısa ya da uzun süreli saklanması için kullanılmaktadır. Bu sulandırıcıların başarısı içinde bulundurduğu protein fraksiyonlarına dayandırılmaktadır. Bu protein fraksiyonları pH değişimlerine karşı ve ağır metallerle etkileşime girip şelat oluşturarak etkinliklerini göstermektedir. Süt, çözdürme sonrası koç spermasında yüksek yaşama yeteneği, akrozom bütünlüğü ve motilite sağlamada temel sulandırıcılardandır (D'alessandro ve ark., 2001; D'alessandro ve Martemucci, 2005). İnek sütü diğer türlerlere göre daha fazla tercih edilmektedir. Kullanılmadan önce 92-95 °C de 8-10 dk ısıtılıp protein fraksiyonlarından lesitin inaktive edilmesi gerekmektedir. Çünkü lesitin spermatozoonlar için toksik etkili bir maddedir. Kısa süreli saklamalarda yağsız sütün tam yağlı süte göre daha iyi bir koruma sağladığı bildirilmektedir (Saloman ve Maxwell, 2000). Sütün içerisinde en iyi koruyucu bileşik kazein miselleridir. Sütteki kazein misellerinin izole edilip direkt olarak sulandırıcıya eklenmesi sonucunda kısa süreli saklamada koç, boğa, aygır ve teke spermatozoonlarını koruyabilmektedir. Kazein miselleri boğa spermatozoonlarının dondurulmasında gliserol ve laktoz ile beraber kullanıldığında iyi bir koruma sağlamaktadır (Bergeron ve Manjunath, 2006).

Ollero ve ark. (1998) laktoalbüminin spermatozoonların yaşama yeteneğini ve motilitesini arttırdığını, kazeinin antioksidan etkiye sahip olduğunu, süt lipoproteinlerinin ise yumurta sarısındakilere benzer etki oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Gerek yumurta sarsısı gerekse süt bazlı sulandırıcılar hayvansal orjinli bileşikler olduğundan sulandırıcı medyumunu ve spermayı kontamine etme olasılığı oldukça yüksektir. Bu yüzden sulandırıcılara katılacak olan bu bileşiklerin mikrobiyal açıdan temiz olmasına dikkat edilmelidir. Bu bileşiklerin yerine

kullanılacak yeni bileşikler henüz tam olarak ortaya konamamıştır. Yumurta sarısı ve sütün depolanmaya, soğutmaya ve dondurma hasarına karşı gösterdiği olumlu etkisine eşdeğer bileşikler halen tam anlamıyla bulunamamıştır (Bergeron ve Manjunath, 2006). Günümüzde başta koçlar olmak üzere diğer hayvan türlerinin spermalarının saklanması ve dondurulmasında yoğun olarak kullanılan sulandırıcı; glikoz - yumurta sarısı - sitrat'dan oluşan bileşimdir.

Sitrat sulandırıcısının bileşimi;

2.37 g sodyum sitrat

0.50 g glikoz

15 ml yumurta sarısı

100000 IU penisilin

100 mg streptomisin

ve 100 ml'ye kadar distile sudan oluşmaktadır (Saloman ve Maxwell, 2000).

Boğa spermalarının saklanması sırasında kullanılan sulandırıcılara tampon madde olarak ilk önce fosfat kullanılmış daha sonra sitratın keşfedilmesi ile rutin olarak sitrat kullanılmaya başlanmıştır. Sitratın şelat oluşturma özelliği, yumurta sarısında bulunan protein fraksiyonlarının eriyebilirliğini artırarak etki yapmaktadır (Vishwanath ve Shannon, 2000).

Organik sulandırıcılar üzerine 1970'li yılların başında ve ortalarında yoğun çalışmalar yapılmıştır. Buradaki ana ilke fosfat ve sitratın tamponlama kapasitesinden daha iyi ve canlı hücreler üzerine toksik olmayan, spermatozoon hücrelerine penetre olabilen ve pH değişimlerine karşı hücre içi tamponu gibi reaksiyon verebilen maddeleri bulmak olmuştur. Araştırmalar neticesinde bu organik sulandırıcılardan Tris günümüzde koç, boğa ve domuz spermalarının saklanmasında en çok tavsiye edilen sulandırıcı haline gelmiştir.

Tris sulandırıcısının bileşimi;

3.63 g Tris

0.50 g fruktoz

1.99 g sitrik asit

14 ml yumurta sarısı

100000 IU penisilin

100 mg streptomisin

ve 100 ml'ye kadar distile sudan oluşmaktadır (Vishwanath ve Shannon, 2000).

Paulenz ve ark.'ları (2002) koç spermasının dondurulmasında süt ya da sodyum sitrat bazlı sulandırıcılar yerine organik Tris bazlı sulandırıcıların kullanılmasının, gerek sulandırma sonrası gerekse de çözündürme sonrası spermatozoonların yaşayabilirlikleri ve motiliteleri üzerine daha etkili olduğunu bildirmektedirler.

Gündoğan (2009) koçlarda yumurta sarısı içermeyen AndroMed® sulandırıcısının, yumurta sarısı içeren Tris, sodyum sitrat, süt tozu ve glikoz fosfat ile sulandırdığı koç spermasındaki motilite, HOS test, ölü ve anormal spermatozoon oranını üzerine en olumlu etkiyi Tris ve sodyum sitrat sulandırıcılarının sağladığını bildirmektedir.

Bunun yanında çeşitli hayvanların spermalarının saklanması ve dondurulmasında farklı isimlerle anılan kullanıma hazır sulandırıcılarda bulunmaktadır (Vishwanath ve Shannon, 2000).

1.3. Kriyoprotektantlar

Donmaya karşı koruyucu maddeler olarak bilinen kriyoprotektantlar, hücrenin soğutulması, dondurulması ve çözündürülmesi esnasında gelişen fiziksel, kimyasal ve oksidatif stres sonucu meydana gelen soğuk şoku, ozmotik değişim, intraselüler

kristal oluşumu ve serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasarları azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. Kriyoprotektantlar direkt olarak çözüm sonu spermatolojik parametreleri ve fertilitiyi etkilemektedir. Kullanılan kriyoprotektantların en önemli özellikleri düşük moleküler ağırlığa sahip olmaları ve toksik etkilerini ise ancak belirli oranlarda katıldığında görülmesidir (Oehninger ve ark., 2000). Kriyoprotektantlar oda sıcaklığı yerine sıklıkla 0-4 °C'de sulandırıcıya eklenir. Bu sayede sıcaklığın kimyasal toksisite etkisinden korunmaktadır. Kriyoprotektant maddelerin sulandırıcıda kullanılacak oranları ve koruyucu etkileri hayvan türüne, hücredeki geçirgenlik farklılıklarına, spermanın dondurma metotlarına, sulandırıcının bileşenlerine bağlı olarak değişmektedir (Saloman ve Maxwell, 2000).

Kriyoprotektantlar etki mekanizmasına göre permabl olmayan (Şeker, EDTA) ve permabl (Gliserol, Etilen Glikol, Amid Türevleri, Dimetil sülfoksit) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar (Hammerstedt ve ark., 1990; Purdy, 2006; Sieme ve ark., 2008).

1.3.1. Gliserol

Gliserol günümüzde spermanın dondurulmasında kullanılan en yaygın kriyoprotektantdır (Curry, 2000; Holt, 2000a; Medeir ve ark., 2002). Gliserol, yüksek oranda hidrofilik yapı gösteren bir poliol bileşiktir. Kimyasal yapısındaki C/OH oranının eşit olması onun spermatozoon üzerine olan etkisini artırmaktadır. Gliserolün toksisitesi metabolik dönüşümünde oluşan methylglycosal tarafından oluşturulmaktadır. Hücrelerdeki gliserolün toksik etkisi soğutma ve donma hızına, sulandırıcının kompozisyonuna, gliserolizasyon yöntemlerine, membran yapısında meydana getirdiği değişikliğe ve ozmotik strese neden olmasıyla şekillenmektedir (Fahy, 1986; Holt, 2000a; Woods ve ark., 2000). Saloman ve Maxwell (2000) gliserolün koruyucu etkisinin su bağlama özelliğine dayandığını bildirmektedirler. Gliserolün kriyoprotektant olarak koruyucu etkisi kısmen donma esnasında spermatozoon plazma membranının su geçirgenliğini ve akışkanlığını artırmak

yoluyla membranlarda bazı faz geçişlerini engellemesine bağlanmaktadır. Gliserol, donma anında geniş hücre içi kristal oluşumunu önler, hücrelerde dehidrasyonu gerçekleştirir, hücre içi yoğunluğu artırır ve spermatozoonu donmanın zararlı etkilerine karşı korur. Gliserol temelde hücre içi ve dışı kristalizasyon olayını etkilemekte ve hücrede kısmi dehidrasyon sonrasında jelimsi bir yapı oluşturmaktadır. Yumurta sarısı ile bu yönde birbirini tamamlayıcı etkisinin varlığı da bildirilmektedir (Medeir ve ark., 2002).

Gliserol katılmadan yapılan dondurma işlemleri sonucunda spermatozoonların canlı kalma oranları önemli ölçüde azalmaktadır. Bu nedenle buz kristallerinin şekillenmesinin tamamen önlenmesi için % 30'dan daha fazla gliserol gereklidir (Hammerstedt ve ark., 1990; Leeuw ve ark. 1993). Ancak spermaya gliserol ilave edilmesinin dondurulup çözdürülmüş spermada olduğu gibi dondurulmamış spermanın da kalitesini bozduğuna, akrozomal bozukluklara neden olduğuna, akrozom reaksiyonun başlamasını hızlandırması sebebiyle spermatozoonların fertilizasyon kapasitesini azalattığına ilişkin görüşler bulunmaktadır (Jeyendran ve ark. 1984; Slavik, 1987).

Mann ve White (1957) gliserolün protein ve enzim denatürasyonunu engelleyerek spermatozoonları donmanın zararlı etkilerinden koruduğunu, fakat bu etkinin koç spermasında daha az olduğunu bildirmişlerdir.

Slavik (1987) gliserolün, sulandırıcının ozmotik basıncını artırarak akrozom reaksiyonunun indüklenebileceğini vurgulamıştır. Jones ve ark.'ları (1992) gliserolün çözdürme sonrası koç, boğa, teke spermatozoonları tarafından metabolize edildiğini, artan enerji gereksinimi sonrasında ATP sentezi ve tüketiminin arttığını, neticede spermatozoonlarda hasarlar meydana geldiğini ifade etmişlerdir.

Molina ve ark. (1994) koç spermasının dondurulmasında farklı konsantrasyonlarda (% 0, 1,5, 3, 6, 12) kriyoprotektant madde olarak DMSO, etilen glikol, propilenglikol ve gliserol kullandıkları çalışmalarında gliserolün özellikle % 3

ve % 6'lık konsantrasyonun çözüm sonrası motilite ve akrozom bütünlüğü üzerine diğer gruplara göre olumlu etki yaptığını bildirmektedirler.

Fiser ve Fairfull (1984) koçlarda % 4-6 gliserol konsantrasyonlarının optimal olduğunu, fakat ihtiyaç duyulan bu oranların sulandırıcının ozmolaritesini etkileyebileceğini vurgulamışlardır.

Büyük ruminantların spermalarının dondurulmasında sulandırıcıya katılacak olan gliserol oranı % 4-8, koçta bu oran % 4-6, aygırlarda % 4-5, mandalarda % 6-7 olarak bildirilmektedir (Holt, 2000b; Leboeuf ve ark., 2000; Morrel ve Hodge, 1998; Purdy, 2006; Saloman ve Maxwell, 2000; Sansone ve ark., 2000).

1.3.2. Etilen Glikol

Birçok türün spermasının dondurulması ve çözdürülmesi esnasında meydana gelen soğuk şokuna karşı etilen glikol, gliserol ile benzer etki yapmaktadır. Etilen glikol ile gliserolde bulunan karbon atomları ve hidroksil gurupları (C/OH) aynı olduğundan dolayı benzer kimyasal yapıya sahiptirler. Etilen glikolün molekül ağırlığı (62.07 g/mol) gliserolün molekül ağırlığından (92.10 g/mol) daha düşük olduğu için daha az toksik ve hücre permabilitesi daha yüksek olabilir. Bu sebepten dolayı etilen glikol birçok türün spermasının dondurulmasında kullanılabilir (Martins-Bessa ve ark. 2006; Massip, 2001).

Etilen glikolün sığır, insan ve domuz spermalarındaki kriyoprotektif etkinliği gliserole göre çok daha iyidir çünkü gliserolden daha hızlı bir şekilde spermatozoon membranını geçmektedir. Gliserolden daha düşük konsantrasyonda kullanıldığında etilen glikol aygır spermatozoonlarının motilite ve yaşayabilirlikleri üzerine daha az zarar verici etki yapmaktadır. Ancak küçük ruminantların spermatozoonlarının dondurulmasında gliserol kadar iyi bir kriyoprotektant değildir (Santiani ve ark., 2005).

Silva ve ark. (2012) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına ilave edilen % 3 oranında etilen glikolün çözüm sonrası spermatozoonları dondurmanın zararlı etkilerine karşı koruduğunu bildirmişlerdir.

Ortloff ve ark. (2006) etilen glikolün insan spermasının dondurulması sırasında akrozomu sıcaklık değişimlerinden gliserol ve dimetilsülfoksite göre daha iyi koruduğunu bildirmişlerdir.

1.3.3. Amid Türevleri

Amid türevi kriyoprotektantlar olarak formamid, dimetilasetamid (DMA), asetamid ve dimetilformamid sayılabilir. Amid türevi kriyoprotektantlar düşük moleküler ağırlığa sahip, suda mükemmel çözünebilen ve minimum toksik etkinliğe sahiptirler. Molekül ağırlıkları gliserole oranla çok daha düşük olduğu için daha az osmotik hasar meydana getirirler. Bunlar özellikle aygır spermalarının dondurulmasında gliserole nazaran daha iyi koruma göstermektedir. Aygır spermasının dondurulmasında kullanılan sulandırıcıya % 3-5 oranında katılması donma zararına karşı etkili olurken, çözüm sonu elde edilecek motilite, canlılık gibi özelliklerde pozitif etki yapmaktadır (Gomes ve ark., 2002).

Amid türevi kriyoprotektantlar gliserole karşı duyarlı türler olan kanatlı (Donoghue ve Wishart, 2000), balık (Psenicka ve ark., 2008) ve tavşan (Moce ve Vicente, 2009) spermalarının dondurulmasında alternatif kriyoprotektantlar olarak kullanılabilir.

Bittencourt ve ark. (2009) tris bazlı trehaloz ilaveli sperma sulandırıcısına % 3 DMA ve % 6 gliserol katarak dondurdukları koç spermalarında çözüm sonrası % 3'lük DMA'nın spermatozoonlar üzerine kötü bir kriyoprotektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

1.3.4. Dimetilsülfoksit

Dimetilsülfoksit (DMSO) kimyasal özelliğinden dolayı hem sıvı hem de organik medyumlarda çözünebilmektedir. Kanatlı sperması için en toksik kriyoprotektant DMSO iken, en az toksik etkiyi dimetilasetamid ile gliserolün verdiği bildirilmektedir (Donoghue ve Wishart, 2000). Tavşan spermasında çözürme sonrası en yüksek motilite oranını, sulandırıcıya % 10-15 oranında DMSO'nun katılımı sonucunda elde edildiği bildirilmektedir (Moce ve Vicente, 2009).

1.4. Antioksidanlar ve Reaktif Oksijen Türleri

Hayati öneme sahip olan oksijen tüm canlılar için gerekli bir moleküldür ve enerji üretimi için kullanılmaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROS) enerji üretiminde önemli ürünler olup fazla üretildikleri takdirde zararlı etkilere sahip maddelerdir. ROS'ların lipitlere, proteinlere ve hücre DNA'sına hasar verici etkileri vardır. ROS'ların negatif etkilerine karşı koymak amacıyla savunma mekanizması olarak hücreler antioksidanları oluşturmaktadırlar ve bu iki olay arasında bir denge bulunmaktadır. ROS'lar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozularak ROS miktarının artması ile hücrede yapısal ve fonksiyonel bozukluklar meydana gelir ki bu oksidatif stres ya da hasar olarak adlandırılmaktadır (Aitken ve ark., 1989).

ROS'lar süperoksit, hidroksil, lipit peroksid gibi farklı yapılara sahiptirler. Oksijen süperoksit grubuna ($O_2^{\cdot-}$) demir - kükürt içeren yükseltgenme ve indirgenme enzimleri vasıtasıyla indirgenir. Hücre hasarına yol açan süperoksit bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz kanalıyla hidrojen peroksid (H_2O_2) ve oksijene çevrilir (Agarwal ve ark., 2006).

Spermatozoon plazma membranında doymamış yağ asiti formunda bulunan yağlar oksidatif strese en duyarlı makromoleküllerdir ve bunların içerisinde ikiden fazla çift karbon bağları bulunmaktadır. ROS'lar hücre membranında bulunan doymamış yağ asitlerine zincirleme reaksiyon ile saldırımlarına lipit peroksidasyon

(LPO) denilmektedir. LPO sonucu oluşan malondialdehit (MDA) çeşitli biyokimyasal analizler ile ortaya konarak spermatozondaki hasarın boyutunu gösterebilmektedir (Aitken ve ark., 1989; Aitken ve ark., 1994).

Yağ asitleri, spermatozoonların fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri için gerekli ve spermatozoonların membran bileşenlerinin yeniden sentezi için önemlidir (Henkel, 2005). Doymamış yağ asitlerinin molekül yapısındaki karbon-karbon çift bağları, komşu hidrojen atomundaki karbon-hidrojen bağını zayıflatarak kırılmaya yatkın hale getirir. Bunun sonucunda, süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi serbest radikaller hücre membranları ile reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olmaktadır (Geva ve ark., 1998; Sharma ve Agarwal, 1996). Membran yapısında meydana gelen bu hasar sonucunda fazla miktarda ROS'a maruz kalan spermatozoonlar membran birleşmesi olayına bağlı fonksiyonlarını gerçekleştiremezler (Cummins ve ark., 1994). Membran bütünlüğünün bozulması aynı zamanda hücrenin elektrolitlere karşı geçirgen olmasına yol açmaktadır. Kalsiyum ve kısmen sodyum iyonlarının hücre içine alınması, hücrenin enerji üretme mekanizmasını bozar ve ATP'nin azalmasına neden olur. Hücre içi kalsiyum artışı, proteazları ve lipazları aktive ederek proteinlerin ve yağların zarar görmelerine neden olur. Ayrıca ROS'lar DNA'da da hasara neden olur bu da hücrenin ölümüyle sonuçlanır (Erenpress ve ark., 2002; Halliwell, 1994; Lopes ve ark., 1998).

ROS'lar radikal ve radikal olmayanlar olmak üzere iki grupta toplanırlar (Şekil 1.1). Eşleşmemiş elektron içeren atom grubu veya moleküllere serbest radikaller, eşleşmiş elektron içeren atom grubu ya da moleküllere radikal olmayan serbest oksijen türleri olarak adlandırılmaktadır (Onat ve ark, 2002).

LPO spermatozoonlarda motilite kaybının en önemli nedenlerindedir. Antioksidan özelliği bilinen maddelerin sperma sulandırıcısına katılması sonucu elde edilen motilite ve MDA sonuçları da bunu desteklemektedir (Suleiman ve ark., 1996).

Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Süperoksit anyonu	(O ₂ ^{•-})	Hidrojen peroksit	(H ₂ O ₂)
Hidroksil	(HO [•])	Lipit hidroperoksit	(LOOH)
Peroksil	(ROO [•])	Hipohalöz asid	(HOX)
Alkoksil	(RO [•])	N-Halojenli aminler	(R-NH-X)
Semikinon	(HQ [•])	Singlet oksijen	(¹ O ₂) ₂
Organik radikaller	(R [•])	Ozon	(O ₃)
Organik peroksit	(RCOO [•])	Azot dioksit	(NO ₂)
Nitrik oksid	(NO [•])	Hipokloröz asid	(HOCl)
Hemoproteine bağlı radikaller		Peroksinitrit	(ONOO ⁻)

Şekil 1.1. Reaktif oksijen türleri

ROS'un en önemli iki kaynağını kusurlu spermatogenesis sonucu oluşan lökositler ile spermatozoonlar, özellikle de olgunlaşmamış ve ölü spermatozoonlar oluşturmaktadır (Garrido ve ark., 2004). Spermatozoonlar ve lökositler tarafından üretilen ejakulattaki reaktif oksijen türleri spermaya olumsuz etki yaparak memeli spermatozoonlarında hasarlar meydana getirmektedir (Griveau ve Le Lannou, 1997; Neild ve ark., 2003). ROS direkt olarak LPO'ya neden olup spermatozoon motilitesinin geri dönüşümsüz durdurulmasına ve nükleik asit ile protein hasarına yol açarak hücrenin apoptosisine ve ölümüne de sebep olabilmektedir (Agarwal ve ark., 2006; Moustafa ve ark., 2004). ROS dolaylı olarak spermatozoonların enzimatik savunmasını azaltarak oksidatif stres üretebilirler. Diğer taraftan oksidatif mekanizmalar memeli spermatozoonlarının fonksiyonun kontrolünde anahtar rol oynamaktadırlar (Bennetts ve Aitken, 2005). Spermatozoonların fertilizasyon yetenekleri için düşük oranda ROS gereklidir (Saleh ve Agarwal, 2002). ROS özellikle spermatozoonların kinetik fonksiyonları olan hiperaktivasyon ve kapasitasyon için gerekli olup bu işlemi de hücre içi cAMP üretimini ve tyrosin fosforilasyonu stimüle ederek gerçekleştirmektedir (Agarwal ve ark. 2006; Aitken ve ark., 2004; Ford, 2004). Bununla ilgili olarak, Perez ve ark. (1996) dondurulmuş koç

spermatozoonlarının taze spermadaki spermatozoonlara nazaran daha hızlı bir şekilde kapasitasyona uğradıklarını bildirmektedirler.

ROS spermatozoonların fertilizasyon kabiliyetlerinde fizyolojik olarak rol oynamakta olup özellikle spermatozoonların zona pellusidaya bağlanmasını, akrozom reaksiyonu geçirmesini ve zona pellusida içerisinden geçerek oositin membranı ile birleşmesini sağlamaktadır. ROS ne zaman düşük konsantrasyonda bulunursa normal spermatozoon fonksiyonları için arabalucu gibi davranırken ne zamanki üretimi gerekenden daha fazla olursa o zaman hücreler için toksik hale gelmektedir (Griveau ve Le Lannou, 1997).

Dondurma süresince meydana gelen ozmotik stres ve soğuk şoku ile LPO nedeniyle zamanından önce oluşan kapasitasyon dondurma-çözdürme sonrası spermatozoonların motilitesi ile membran bütünlüğünü azaltabilmektedir (Salamon ve Maxwell, 2000; Watson, 2000). Bu fonksiyonel yetersizlik koç spermatozoonlarının membranında yüksek konsantrasyonda uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin bulunması ile ilişkilidir ve bu yapıda oksidatif hasara karşı hassasiyeti artırmaktadır (Watson, 1995).

LPO direkt hasarını membran yapısında değişikliklere neden olarak, indirekt hasarını ise reaktif aldehydler aracılığıyla göstermektedir. İndirekt hasarı meydana getiren reaktif aldehydler; membran bileşenlerinde çapraz bağlanmalar ve polimerizasyona neden olarak membran yapısının bozulmasına katkıda bulunurlar. ROS hasarı sonucu oluşan LPO'nun indirekt bir indikatörü olan MDA oksidatif stres göstergesi olarak kullanılmaktadır (McKinney ve ark., 1996; Verma ve Kanwar, 1999). Oksidatif stres, ROS etkisi sonucu LPO ile spermatozoonun motilite kaybına, hücre içi enzim kaybına ve membran fonksiyonunun kaybolmasına neden olabilmektedir. Bu durumda genetik yapı, metabolizma ve morfolojik bozukluklar oluşmakta ve spermatozoonlarda fruktolitik ve respiratorik aktivitenin geri dönüşümsüz olarak ortadan kalkmaktadır. Sonuç olarak bozulmuş spermatozoon

fonksiyonu ve yapısı infertiliteye yol açabilmektedir (Aitken ve ark., 1993; Cummins ve ark., 1999; Jones ve Mann, 1977; Lenzi ve ark. 1998; Twigg ve ark., 1998).

Dondurma-çözdürme işlemi spermatozoonlarda ROS'ların artmasına, (Chatterjee ve Gagnon, 2001) bunun sonucu olarakta DNA hasarının artmasına (Lopes ve ark., 1998) yol açmaktadır.

Spermada ROS hasarına karşı üç koruyucu enzimatik sistem vardır. Bunlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz/redüktaz'dan oluşmaktadır (Alvarez ve ark., 1987; Griveau, ve ark., 1995). Türler arasında her enzim sisteminin katkısının farklı olduğu ve bunların sinerjik olarak hareket ettikleri tahmin edilmektedir (Hatamoto ve ark., 2006).

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere Antioksidan adı verilir (Elliot, 1999). Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler (Gökpınar ve ark., 2006);

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
2. Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesini ifade etmektedir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, seruloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlayarak inaktive ederler.
4. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onararak etkilerini gösterirler.

Antioksidanlar yapı ve işleyiş mekanizmalarına bakılarak, enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.2) (Halliwell, 1994). Ayrıca görev aldıkları yapılara göre de intrasellüler (SOD, CAT, GSH-Px, Sitokrom oksidaz), ekstrasellüler (Albümin, askorbik asit, ürat vb. gibi) ve membran (Vit. E, koenzim Q, β -Karoten vb. gibi) antioksidanları olarak da sınıflandırılmaktadırlar (Gutteridge, 1995).

Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
Süperoksid dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Melatonin
Katalaz (CAT)	α -Tokoferol (Vit E)	Seruloplazmin
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Askorbat (Vit C)	Transferin
Fosfolipit hidroperoksit glutasyon	β -Karoten (Vit A)	Ferritin
Peroksidaz (PLGPx)	Flonoidler	Laktoferrin
Glutasyon-S-transferaz (GST)	Ürat	Albumin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Biluribin	Lipoik asit
	Taurin	Trehaloz
	Sistein	

Şekil 1.2. Biyolojik sistemlerdeki antioksidanların sınıflandırılması

Somatik hücrelerin stoplazmaları, SOD, CAT ve GSSG-R gibi çeşitli antioksidan enzim sistemlerini içermektedir. Ancak spermatozoon hücrelerinin stoplazmaları bu enzim sisteminden mahrum oldukları için ROS'a karşı korunmaları düşük seviyededir. Oksidatif stres, spermatozoon membranının lipit peroksidasyonu ve gen bütünlüğünü etkileyebilmektedir (Foote ve ark., 2002). Antioksidan ilavesi spermatozoonların saklanması işlemi süresince oksidatif stresi azaltarak etkileyebilmekte ve böylelikle soğutulmuş ve dondurulmuş spermanın kalitesini artırmaktadır (Bilodeau ve ark., 2001; Pena ve ark., 2003).

Antioksidanlar, lökositler tarafından üretilen ROS'ların süpürücüsü olarak spermatozoonları korumaktadır. E vitamini spermatozoon membranında önemli zincir kırıcı etki yapan bir antioksidandır ve etkinliğini doza bağımlı bir şekilde göstermektedir (Hull ve ark., 2000). Süperoksid, hidrojen peroksid ve hidroksil radikallerini süpürücü olarak etkilemektedir (Agarwal ve ark., 2004).

Spermanın dondurulması-çözdürülmesi esnasında oluşan membran lipit faz değişimi, ozmotik-mekanik strese ve ortamdaki serbest oksijene bağlı olarak gelişen lipit peroksidasyonu ve bunun sonucu olarak oluşan serbest oksijen radikalleri (süperoksid anyon radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksid), hücre dışı kristal oluşumu, membran proteinlerindeki denaturasyon, hücre organellerinde yapısal deformasyon, DNA'da kırılmalar ve hücrel lizis antioksidanların ilavesiyle azaltılabilmekte ve çözüm sonu spermatozoon fonksiyonlarını iyileştirmektedir (Gordon, 2005; Maxwell ve Watson, 1996; Peris ve ark., 2007). Spermanın dondurulması-çözdürülmesi, oluşan ROS ürünlerinin yarattığı oksidatif stresle ve spermatozoon membranındaki sülfidril gruplarının yeniden düzenlenmesiyle yakın ilişkilidir. Bununla beraber, sülfidril gruplarında açılmalar, miktar ve dağılımında değişimler, spermatozoonda erken kapasitasyon, spermadaki bazı antioksidan seviyelerinde düşme ve taze spermaya göre lipit peroksidasyona daha duyarlı hale gelmektedir (Bilodeau ve ark., 2001; Chatterjee ve ark., 2001; Mazur ve ark., 2000).

Spermatozoon kriyopreservasyonu üç fazdan oluşmaktadır, birinci faz olan dondurma öncesi fazda hücreler soğuk şokuna maruz kalmakta, ikinci kritik dondurma fazında hücre membranı ozmotik ve termal strese maruz kalmakta ve üçüncü çözdürme fazında ozmotik ve termal stersin yeniden ortaya çıktığı dönemleri içeren bir süreçtir. Sperma sulandırıcısına katılan katkı maddeleri ve antioksidanlar bu aşamalardan bir ya da birkaçını etkileyerek dondurma-çözdürme sonrası spermatozoon motilitesini artırmaktadır (Chen ve ark., 1993). Sperma sulandırıcısına katılan katkı maddeleri spermatozoon hücresinin mitokondrisi ve akrozomun fonksiyonel bütünlüğü üzerine kriyoprotektif etkiyi ATP'yi hücre içerisinde

depolayıp enerji üreterek gösterebilmekte ve bunun sonucu olarak spermatozoonlar üzerine olumlu etki yapmaktadır (Shiva ve ark., 2010).

Serbest oksijen radikallerinin toksik etkilerine ve dolayısıyla lipit peroksidasyona karşı koymak için spermatozoonlar ve seminal plazma bir takım antioksidanları içermektedir (Alvarez ve Storey, 1983). Bu antioksidanların bir kısmı ortamda oluşan ROS ürünleri temizleyicisi olarak non-enzimatik (albumin, taurin, hipotaurin, vitamin E), bir kısmı enzimatik (CAT, SOD, GSH-Px) ve bir kısmı ise zincir reaksiyonlarını kırıcısı (ürat, askorbik asit, vit E, thiol bileşikleri) olarak etkimektedir (Sikka, 1996). Fakat bu antioksidan sistemi, ROS ürünlerinin olası toksik etkilerine ve oksidatif hasara karşı koymada yeterli gelmemektedir (Taylor, 2001). Bu amaçla sperma sulandırıcılara katılan bazı antioksidanların kısa ve uzun süreli saklamada ortamda oluşan lipit peroksidasyonun yarattığı oksidatif hasarı minimize ettiği, canlılığı koruduğu, spermatozoonların kalitesini ve fonksiyonlarını geliştirdiği bildirilmektedir (Peris ve ark., 2007).

Memeli hayvanların vücut sıvıları ve reproduktif dokularında da yüksek konsantrasyonlarda bulunan antioksidan maddeler, eksojen olarak sperma sulandırıcılara katıldığında, spermadaki reaktif oksijen türlerinin (superoksitin, hidroksil radikalının ve hidrojen peroksitin) neden olduğu, hücre membranındaki doymamış yağ asitleri ve fosfolipitlerin peroksidasyonunu minimuma indirmektedir. Böylece lipit peroksidasyonunun spermatozoonların akrozomunda neden olduğu hasar azaltılabilmekte ve dolayısıyla elde edilen dölverimi önemli ölçüde yükseltilebilmektedir (Dziuk ve ark., 1972).

Koçlarda süperoksid dismutaz, katalaz (Maxwell ve Stojanov, 1996) ergotiyonin (Yıldız, 2004) ve trehalozun (Lopez-Saaz ve ark., 2000), aygırlarda glutatyon, katalaz, askorbik asit (Aurich ve ark., 1997) ve taurinin (Ijaz ve Ducharme, 1995), kedi (Luvoni ve ark., 2003) ve tavşanlarda (Alvarez ve Storey, 1983) taurinin sperma sulandırıcılara ilavesinin spermanın kısa ve uzun süreli

saklanması serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerine karşı spermatozoonun yaşama süresini, motilitesini ve membran bütünlüğünü koruduğu bildirilmektedir.

Maxwell ve Watson (1996) taze koç spermasına antioksidan ilavesinin herhangi bir etki yapmadığını, ancak uzun süreli saklanacak spermada ise olumlu etkiler yaptığını, ayrıca antioksidan ilave edilen ve edilmeyen dondurulmuş çözdürülmüş koç sperması ile yapılan laparoskopik tohumlama oranlarını sırasıyla % 82 ve % 67 olarak bildirmektedirler.

1.4.1. Non-Enzimatik Antioksidanlar

Yaygın olarak sperma sulandırıcılarına katılan vitamin E (α - tokoferol), taurin, trehaloz, askorbik asit, lipoik asit, sistein, seruloplazmin, transferin, albumin ve glutatyonda enzimatik olmayan moleküler antioksidanlardır.

1.4.1.1. Taurin

Tiyol içeren aminoasitlerden olan taurin ilk kez sığır safrasından izole edilmiştir. Organizmada sisteinden sentez edilen taurin, renksiz, suda çözünebilir, protein yapısına katılmayan, molekül ağırlığı 125 g/mol olan ve serbest olarak bulunabilen bir aminoasittir (Jacobsen ve Smith, 1968; Kendler, 1989). Taurinin, detoksifikasyon, ozmoregülasyon, Ca^{+2} akışını düzenleme, membran stabilizasyonu gibi önemli olaylarda rol aldığı ileri sürülmektedir (Kendler, 1989). Vücutta oksidan antioksidan dengesi ve hücre bütünlüğünü koruması ve vücut direncini artırması gibi özellikleri ile bir antioksidan olarak koruyucu ve destekleyici etkileri önemlidir (Parcell, 2002).

Dişi genital kanal sıvısı ve seminal plazma yüksek konsantrasyonda taurin, glutamin, glutamat ve glisin gibi belli aminoasitleri içermekte ve bunlar

penetrasyonda, akrozom reaksiyonunda, kapasitasyonda ve embriyo gelişimi ile preimplantasyonda da rol oynayabilmektedirler (Barna, 1998). Taurin insan spermisi ile spermatozoon akrozomunda, tavşan ve fare yumurtalarında da bulunmaktadır. Hamsterlerde ve insanlarda spermatozoon motilitesinin devam ettirilmesinde ve hamster oositlerinin optimal fertilizasyonları için gereklidir (Devreker ve ark., 1999).

Epididymal ve oviduktal sıvıda da bulunan sülfonik aminoasit yapısındaki taurin özellikle dondurma-çözdürme sırasında şekillenen ROS'a karşı spermatozoonları korumada önemli rol oynar. Taurin ve hipotaurin spermatozoonlarda motilite kaybını ve lipid peroksidasyonu azaltarak etkisini göstermektedir (Saleh ve Agarwal, 2002).

Chen ve ark. (1993) boğa spermisi sulandırıcılarına düşük miktarlarda katılan taurin ve hipotaurinin dondurma-çözdürme sonrası motil spermatozoon oranını pozitif yönde geliştirdiğini bildirmektedirler. Ayrıca taurin ve hipotaurin sperma sulandırıcısına kriyoprotektant olarak katılan gliserolün koruyucu etkisini desteklemektedirler (Kundu ve ark., 2001).

Taurin ve potasyumun fertilizasyon ve spermatozoon kapasitasyonu aşamalarında etkileşim içinde oldukları bilinmektedir. Ancak tam rolleri bilinememekle beraber, her ikisinin de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ enzim aktivitelerini etkileyerek etki gösterdikleri ileri sürülmektedir. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ plasma membran enzimi olup hücre içi K^+ miktarını kontrol eder. Yüksek miktarda K^+ spermatozoon motilitesine zararlı etki yapmaktadır (Dumoulin ve ark., 1992).

Atmaca (2003) tiyol gurubu içeren bazı bileşiklerin antioksidan etkilerini karşılaştırdığı çalışmasında daha çok redükte olan bileşiklerin daha güçlü antioksidan etkiye sahip olduğunu, taurininde bu nedenle güçlü bir antioksidan olduğunu bildirmektedir.

Sülfonik bir aminoasit olan taurin spermatozoonları dondurma-çözdürme işlemi ve aerobik koşullara maruz kaldığı durumlarda, reaktif oksijen türlerine karşı non-enzimatik süpürücü gibi davranarak korumada önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (Alvarez ve Storey, 1983; Chen ve ark., 1993).

Tavşan sperması üzerine yapılan bir çalışmada taurinin hipoklorit molekülü ve hidroksil radikali için güçlü, süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit molekülü için de orta derece bir etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Aruoma ve ark., 1998).

Taurin, erkek reproduktif sistemde testisin bazı intersitisyel hücrelerinde, leydig hücrelerinde, peritubuler myoid hücrelerinde, spermatozoonlar ve seminal plasma ile ratların duktus efferenteslerinin epitelial hücrelerinde saptanmıştır. En önemli serbest aminoasitlerden biri olan taurin spermatozoonların motilitesine, kapasitasyonuna, ozmoregülasyonuna ve antioksidan mekanizmaya karışarak etki etmektedir (Hua ve ark., 2006).

Biyolojik sistemlerde antioksidan olarak çalışan taurinin doymamış membran lipitlerinin peroksidasyonunu azaltmak, reaktif oksijen türevlerini temizlemek ve biomembranları stabilize etmek gibi yararlı etkileri bildirilmiştir (Kılıç ve Yıldırım, 2008).

Taurin ve hipotaurin erkek reproduktif sistemde oksidatif hasara karşı koruyucu olarak görev yapmakta ve milimolar düzeyde bulunmaktadır (Fontana ve ark., 2004). Taurin ve hipotaurin hem oviduktal sekresyonda hem de seminal plazmada yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Bunların penetrasyon, akrozom reaksiyonu ve kapasitasyon için gerekli olduğu bildirilmektedir (Barna, 1998).

Sanchez-Partida (1997) tris-bazlı koç sperma sulandırıcısına 25 ve 50 mM taurin ilavesinin çözdürme sonrası motil spermatozoon yüzdesini artırdığını ancak laparoskopik ve servikal tohumlama sonucunda fertlizasyonu etkilemediği, hatta taurin konsantrasyonunu 100 mM üzerinde ilave edildiğinde motil spermatozoon

oranını düşürdüğünü bildirmektedir. Uysal ve ark. (2000) taurinin koç spermatozoonlarının motilite kaybını önlediğini ve plasma membranını lipit peroksidasyona karşı koruduğunu bildirmektedirler. Bucak ve ark. (2007) tris-bazlı koç sperma sulandırıcısına ilave ettikleri taurinin çözündürme sonrası spermatozoon membran bütünlüğü ve canlılığı üzerine olumlu etki yaptığını bildirmektedirler.

1.4.1.2. Trehaloz

Trehaloz (α α -trehalose) iki d-glikoz moleküllerinin α 1, α 1 şeklinde bağlanması ile oluşan bir disakkarittir. İndirgeyici olmayan bir şeker olarak asit tarafından kolayca hidrolize edilemez ve glikozidik bağ α -glikosidaz tarafından koparılamamaktadır (Patist ve Zoerb, 2005). Moleküler ağırlığı 342.31 g/mol ve formülasyonu ise $C_{12}H_{22}O_{11}$ 'dir. Moleküler yapısı ve fiziko-kimyasal özelliklerinin kombinasyonu trehalozun kararlı bir disakkarit olmasını sağlamaktadır. Trehalozun α , β (neotrehaloz) ve β , β (isotrehaloz) izomerlerinin sentezlenmesine rağmen doğada nadiren bulunmaktadır. Trehaloz suda çözünebilen ve osmotik profili maltoza benzeyen bir şekerdir (Richards ve ark., 2002).

Trehaloz osmotik şok, aşırı sıcaklık ve dehidratasyon gibi stres durumlarına cevap olarak çeşitli organizmalar tarafından üretilmektedir. Bununla beraber trehaloz proteinler, membranlar, hücreler ve dokuları da içeren çeşitli biomolekülleri stabilize edebilmektedir (Hounsa ve ark., 1998). Trehaloz biomoleküler yapıyı hem hidrojen bağlarındaki su ile yer değiştirerek hemde hidrasyon için gerekli su moleküllerini yakalayarak korumaktadır (Chen ve ark., 2000; Patist ve Zoerb, 2005). Trehaloz membran etrafındaki su moleküllerini düzenleyerek ya da su ortamdan uzaklaşırken polar biomoleküller ile direkt etkileşime girmek suretiyle lipit çift katmanını dengeleyebilmektedir (Kawai ve ark., 1992). Trehalozun tam olarak etki mekanizması bilinmemekle birlikte, spermatozoon plazma membranına penetre olduğu, donma ve çözüm esnasında membran fosfolipitlerinin polar baş gruplarıyla hidrojen bağları oluşturarak yüzey genişliği sağladığı, reaktif oksijen türlerinin salınımını ve bu salınımla beraber spermatozoon ve sperma plazmasındaki redükte

glutasyon (GSH) tüketimini azalttığı ileri sürülmektedir. Ayrıca hücreyle ortam arasında ozmotik tamponlayıcı bir görev yaparak soğuk şokuna karşı koruma sağlamaktadır (Aisen ve ark., 2002; Aisen ve ark., 2005; Gao ve Crister, 2000).

Trehalozun kriyoprotektif etkisi ve enerji substrat fonksiyonunun (Strauss ve ark., 1986) yanı sıra hücre içi buz kristali oluşumunu ve dondurma süresince spermatozoonların membranındaki su akışını engelleyerek hücre dehidratasyonuna katkı sağlamaktadır (Aisen ve ark., 2002;. Aisen ve ark., 2005; Yıldız, ark., 2000). Dondurma öncesi yüksek membran akışkanlığına sahip spermatozoonlarda dondurma-çözdürme sonrası motil ve canlı spermatozoon oranı daha yüksektir (Giraund ve ark., 2000). Trehaloz dondurma öncesi membran akışkanlığının artmasında önemli bir rol oynamakta ve dondurma-çözdürme hasarına karşı spermatozoonlarda daha iyi bir dayanıklılık sağlamaktadır (Eiman ve ark., 2003).

Tonieto ve ark. (2010) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına 100 mM trehaloz ilave ettikleri çalışmalarında, dondurma-çözdürme sonrası motilite, membran ve akrozom bütünlüğünü üzerine olumlu etki yaptığını bildirmektedirler. Uysal ve ark. (2009) koç sperma sulandırıcılarına farklı konsantrasyonlarda trehaloz ilave ettikleri çalışmalarında 100 mM ilave edilmiş ve yavaş soğutulmuş grupta dondurma-çözdürme sonrası elde edilen spermatolojik parametrelerin diğer gruplara göre daha üstün olduğunu tespit etmişlerdir. Aisen ve ark. (2005) tris bazlı koç sperma sulandırıcılarına trehaloz ilavesinin sadece spermatozoonların akrozomal membranlarını donmaya karşı korumakla birlikte antioksidan etki de sağladığını bildirmektedirler.

Jafaroghli ve ark. (2011) tris bazlı sperma sulandırıcısına 50, 70 ve 100 mM konsantrasyonunda sukroz, trehaloz ve rafinoz ilave ederek dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası motilite, canlılık, anormal spermatozoon oranı ve membran bütünlüğü yönünden kontrol ve diğer gruplara göre 100 mM trehaloz ilave edilen grupta daha olumlu etki meydana getirdiğini bildirmektedirler.

Matsuoko ve ark. (2006) koç sperma sulandırıcısına trehaloz ilave ettikleri çalışmalarında dondurma-çözdüme sonrası spermatozoonların motilitesi ve membran bütünlüğünün diğer gruplara göre arttığını tespit etmişlerdir. Chen ve ark. (1993) süt ve tris bazlı yumurta sarılı sperma sulandırıcılarına farklı konsantrasyonlarda ilave ettikleri sükroz, trehaloz, hipotaurin, taurin ve sığır kan serumunun dondurma-çözdürme sonrası spermatozoonların yaşam sürelerini artırdığını bildirmektedirler.

Aisen ve ark. (2000) koç sperma sulandırıcısına EDTA ve trehalozun kombine şekilde ilavesinin spermatozoonların motilitesini, akrozom bütünlüğünü ve canlılığını artırdığını bildirmektedirler. Yine Aisen ve ark. (2002) koç sperma sulandırıcısına 100 mM trehaloz ilavesinin dondurma-çözdürme sonrası motilite, membran ve akrozomal bütünlük ile fertilitite oranını artırdığını ancak 200-400 mM trehaloz ilavesinin dondurma-çözdürme sonrası spermatozoonlar ve fertilititeye olumsuz etki yaptığını bildirmektedirler.

1.4.1.3. Vitamin E

Yağda çözünen ve hücre membranındaki en önemli zincir kırıcı antioksidan olan α -tokoferol, trolox olan vitamin E spermatozoon motilitesini ve canlılığını artırarak, lipit peroksidasyonu azaltmaktadır. E vitamini; oksidatif strese karşı koruyucu özelliğe sahip olup hücre ölümünü geciktirmektedir. E vitamini indirgeyici bir ajan olarak hücre içinde ROS'un fonksiyonlarını inhibe edici etkisi bulunmaktadır (Akiyama, 1999). Ancak, aşırı dozda veya ROS seviyesinin artmadığı durumlarda gereksiz yere kullanılması, kapasitasyon ve fertilizasyon ile ilgili pozitif etkilerini bloke ederek zararlı olabileceği bildirilmektedir (Donnelly ve ark., 1999). En aktif formu α -tokoferoldür. Çok güçlü bir antioksidan olan α -tokoferolün en önemli görevi serbest oksijen türlerinin ataklarına karşı membran lipitlerindeki doymamış yağ asitlerini korumaktır (Rice ve Kennedy, 1988). α -tokoferolün antioksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir. Bundan dolayı yüksek oksijen kısmi basınçlarına maruz kalan lipit yapılarında etkileri belirgin olup yağda çözünen diğer vitaminler arasında en az toksik olandır (Deichsel ve ark., 2008).

Genel olarak vitamin E alkoksil radikalini ve lipit peroksili nötralize ederek lipit peroksidasyonu engellemektedir. Bu radikaller lipit peroksidasyonun çoğalma bölümünü oluşturarak hem spermatozoon motilitesinin hem de membran akışkanlığının kaybına neden olurlar (Agarwal ve ark., 2003).

E vitamini en önemli lipofilik antioksidan olup hücre membranında bulunmasından dolayı membran stabilitesinin korunmasında yardımcı role sahiptir. E vitamini, doymamış yağ asitlerinden ziyade antioksidan moleküllerinden hidrojen atomunu ayırarak serbest radikallerin oluşmasını sağlar. Böylece, serbest radikal reaksiyon zincirinde kırılmalar meydana getirerek unreaktif olarak bilinen antioksidan radikallerini ortaya çıkarırlar (Özden ve ark., 2009).

Maia ve ark. (2010) tris bazlı sperma sulandırıcısına 50 µg/ml katalaz ve 50 µM trolox ilave ederek dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası her iki antioksidanında spermatozoonları lipit peroksidasyona karşı koruduğunu bildirmektedirler. Yine paralel bir çalışmada (Sicherle ve ark., 2011) süt bazlı sperma sulandırıcısına 100 µg/ml katalaz ve 100 µM trolox ilave ederek dondurdukları koç spermasında trolox grubunun meydana gelen ROS üretimini azaltıcı etki yaptığını bildirmektedirler.

Silva ve ark. (2010) Santa Inês ırkı koçlarda sperma sulandırıcılarına ilave ettikleri 50 µM trolox/10⁸'un dondurma çözündürme sonrası lipit peroksidasyon düzeyleri üzerine kontrol ve diğer gruplara göre olumlu etki yaptığını ve oksidatif stresin kontrolü amacıyla sperma sulandırıcısına trolox'un ilave edilmesinin uygun olduğunu bildirmektedirler. Bunun yanında Marques ve ark. (2010) sığır oositlerinin in vitro fertilizasyonunda swim-up boyunca spermatozoon-TALP medyumuna 50 mM α-tokoferol ilavesinin seçilecek olan spermatozoonun canlılığı üzerine olumlu etki yaptığını bildirmektedirler.

1.4.1.4. Alfa Lipoik Asit

Alfa lipoik asit (ALA) açıl grup transferinde ve krebs döngüsünde bir koenzim gibi yardımcı molekül olarak Reed ve ark. (1951) tarafından keşfedilmiştir. 1980'li yıllarda güçlü bir antioksidan olduğu ortaya konmuş olup birçok farklı özelliği ALA'yı diğer antioksidanlardan ayırmaktadır. ALA hayvanlar ve insanlar tarafından sentezlenebilmektedir (Carreau, 1979). ALA vit. C (suda çözünen) ve vit. E (yağda çözünen)'nin aksine hücrelerin hem sulu hem de yağlı bölgelerinde serbest radikalleri nötralize edilebilmesinin yanısıra okside ve redükte formlarının da antioksidan etkileri mevcuttur (Packer ve ark., 1995). Ayrıca ALA hücre içi glutasyon (Busse ve ark., 1992) ve koenzim Q₁₀ (Kağan ve ark., 1990) miktarını artırmaktadır. Thioktik asit olarak bilinen ALA vitamin benzeri bir antioksidan olup hücre içini ve dışını çeşitli serbest oksijen türlerine karşı korumaktadır (Suzuki ve ark., 1991).

ALA disülfid bir bileşiktir, pürivat dehidrojenaz ve α -ketoglutarat dehidrojenaz için bir koenzim olarak mitokondrilerde bulunmaktadır. Bu maddenin eksojen olarak ilave edilmesi serbest ALA seviyesini artırmaktadır ki bu da hem in vivo hem de in vitro oksidatif stresin azaltılmasını ve kuvvetli bir antoksidan olarak görev yapmasını sağlar. ALA hem suda hem de yağda çözünen, hücre mebranda lipit peroksidasyon dahil serbest radikalleri azaltan ve mitokondri kaynaklı serbest radikal süpürücüleri kadar etkinliği yüksek olan bir antioksidandır (Selvakumar, 2005). Mitokondride doğal olarak bulunan bir ditiol (disülfid) bileşiği olan ALA, enerji metabolizmasında temel bir rol oynar (Estrada ve ark., 1996; Hagen ve ark., 1999; Navari-Izzo ve ark., 2002).

Lipoik asit, hidroksil radikali ve hipokloroz asidi temizlemekte ancak süperoksid ve peroksil radikali üzerine etkili değildir. Dihidrolipoik asit (DHHLA) ise GSH'den daha güçlü bir redüktan olup hipokloroz asit, peroksil ve hidroksil radikallerini temizleyerek lipit peroksidasyonunu önlemektedir (Coleman ve ark., 2001; Roy ve Packer, 1998).

Ibrahim ve ark. (2008) kızıl geyiklerde yaptıkları bir çalışmada ALA spermanın dondurma-çözdürme sonrası motilite ve yaşama gücünü artırdığı bununla beraber DNA hasarını ise azalttığını bildirmektedirler. α -lipoik asit ile ilgili olarak yapılan diğer bir çalışmada Yeni ve ark. (2012) tinere maruz bırakılmış ratlarda, alfa lipoik asitin spermatolojik parametreler üzerine olumlu yönde etki yaptığını bildirmektedirler.

1.4.2. Enzimatik Antioksidanlar

Spermatozoonlarda bulunan glutatyon redüktaz (GSSG-R), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve süperoksid dismutaz (SOD) lipid peroksidasyona karşı bir savunma aracı olarak çalışan enzimatik antioksidanlardır.

1.4.2.1. Glutatyon Redüktaz

Glutatyon redüktaz (GSSG-R) canlı hücre içinde yaygın halde bulunan bir tripeptittir (Irvine, 1996). Glutatyon redüktaz, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ROS ürünlerine karşı koruyucu etkisi non-enzimatik özelliğinde olan memeli sperma ve genital kanalında da bulunan ve protein yapısında olmayan bir tiol bileşiğidir. Bu tiol bileşiği, hücre içi redoks işleminin sürdürülmesi yanında hücredeki ekzojen ve endojen bileşimlerin antioksidasyonunda ve detoksifikasyonunda önemli rol oynar. Antioksidan sistemdeki rolü, suda çözünen antioksidanları rejenere etme yeteneğine sahip olmasındandır. Bu nedenle antioksidanlarla birlikte kullanılmaktadır (Baumber ve ark., 2000; Irvine, 1996).

Glutatyon redüktaz'ın sulandırıcılara katılması, ortamda bulunan ROS ürünleriyle reaksiyona girerek ve donma esnasında membran proteinlerindeki sülfür gruplarında gelişen bozulma ve dağılmayı kısmen engelleyerek oksidatif hasara karşı koruyucu etkinlik oluşturur (Chatterjee ve ark., 2001). Lasso ve ark. (1994) dondurma-çözdürme işleminin spermatozoon hücresinin antioksidan savunma

kapasitesini azalttığı, süperoksid dismutaz aktivitesinin kaybedildiği ve taze spermaya göre glutatyon seviyesinin % 78 azalttığını bildirmektedirler.

1.4.2.2. Glutatyon Peroksidaz

Enzimatik bir antioksidan olan glutatyon peroksidaz (GSH-Px) normal olarak insan, boğa ve aygır spermatozoonlarında bulunmaktadır. GSH-Px spermatozoonları hem reaktif oksijen türlerinin en toksik son ürünü H_2O_2 'e karşı hem de lipit peroksidasyona karşı korumaktadır. GSH-Px, spermatozoonlarda ve DNA'da hasar oluşturan önemli bir etken olan H_2O_2 'e karşı savunma mekanizmasında anahtar rol oynamaktadır (Drevet, 2006).

1.4.2.3. Katalaz

Katalaz (CAT) enzimi tetramer yapıda bir hemoproteindir. Görevi H_2O_2 'i oksijen ve suya parçalamaktır. En yüksek aktivite gösterdiği organeller peroksisomlardır. Katalazın en yaygın rolü H_2O_2 'in katalitik olarak parçalanmasının yanında H_2O_2 'nin düşük konsantrasyonlarında etanol veya fenoller gibi elektron vericilerini oksitlediği de bilinmektedir. H_2O_2 üretimi farklı dokularda farklı düzeyde gerçekleştiğinden, katalazın gerçek fonksiyonu da dokudan dokuya ve subsellüler kompartmanlara göre farklılıklar gösterebilmektedir (Percy, 1984). CAT yumurta sarılı sulandırıcıda boğa spermatozoonlarının canlılıklarını artırırken, süt bazlı sulandırıcıda bu etkiyi sağlamamaktadır (Foote, 1962).

1.4.2.4. Süperoksid Dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD)'lar, süperoksit radikallerinin H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzim grubudur. Hücrelerin sitosolünde, mitokondrilerinde ve plazmalarında bulunurlar. Bakır-çinko, mangan ve demir ihtiva eden başlıca üç tip izomeri mevcuttur. SOD'un antioksidan mekanizmaya etkisi, deneysel koşullara bağlı olarak değişmektedir. SOD, kimi olaylarda lipit peroksidasyonunu arttırırken, kimilerinde de peroksidasyona bağlı membran hasarını azaltmaktadır. Bu zıt etkilerin serbest demir konsantrasyonlarıyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Ramilo ve ark., 1999).

1.5. Sperma Dondurma Yöntemleri

Sperma kuru buz (katı CO_2) üzerinde pellet formunda veya sıvı azot buharında payetler içerisinde dondurulmaktadır (Awad ve Graham, 2004). Bu dondurma teknik ve yöntemlerinin temel prensipleri aynı olmakla birlikte hayvan türleri arasında bazı farklılıklar mevcuttur. Sulandırılmış sperma yaklaşık olarak 1.5-4 saatte 4-6 °C'ye soğutulduktan sonra kuru buz üzerindeki yuvacıklarda pellet formunda ya da sıvı azot buharında payetlerde dondurulmaktadır (Purdy, 2006). Pellet formunda dondurma işlemi, 0.1-0.3 ml'lik sperma hacimleri halinde -79 °C'teki kuru buz kalıpları üzerinde 2-4 dk.'da gerçekleşmektedir. Dondurmanın hızı pelletlerin hacmine bağlı olarak değişebilir ve donan pelletler sıvı azotta (-196 °C) saklanmaktadır. Spermanın payet veya pelletteki hacmi dondurma hızı üzerine önemli etkiye sahiptir. Fakat dondurma çözdürme sonrası canlılık oranı üzerine etkisi görülmemiştir. Spermanın pellet şeklinde dondurulması maliyeti düşürmekte, tohumlamada kullanılmasını daha kolay hale getirmekte ve spermanın soğutulmasına katkı sağlayarak çözüm sonrası spermatozoon motilitesi ve fertilitesinde payet şeklinde dondurmaya göre daha iyi sonuç vermektedir. Ancak dondurulan pelletlerin saklanması esnasında kontaminasyon riski, spermanın dozlanması ve depolanması sırasındaki etiketleme işlemlerinde güçlükler gözlenmektedir (Purdy, 2006; Leboeuf ve ark., 2000). Spermanın payette dondurulma işleminde 0.25-0.5 ml'lik payetler yatay olarak sıvı azotun 4-5 cm üzerinde sıvı azot buharında tutulur

ve daha sonra sıvı azot içerisine daldırılır. Donma hızı payetlerin sıvı azot seviyesinden uzaklığına ve payetlerin hacimlerine göre değişebilir. Payetlerin önceden soğutulmuş ağ veya delikler açılmış metal yüzey üzerinde dondurulmasının sadece iki noktadan temas sağlayan yöntemle göre daha iyi sonuç verdiği belirtilmektedir. Bu durumun, çok noktadan teması sağlayan rafın ani donmayı engelleyerek veya en aza indirerek sıcaklık dalgalanmasının önüne geçmesinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Holt, 2000a; Ritar ve ark., 1992). Programlanabilir dondurma cihazı, çok sayıda payetlerdeki spermaların dondurulması ve soğutma/dondurma hızının kontrollü yapılmasında kullanılmaktadır. Kontrollü dondurma işleminde genellikle 4-5 °C'den -80 °C'ye 7-15 dk.'da soğutma ve sıvı azota nakil; 4 °C'den -5 °C'ye 4 °C/dk. hızda, -110 °C'ye 25 °C/dk hızda ve -140 °C'ye 35 °C/dk hızda soğutma ve sıvı azota nakil protokolleri kullanılmaktadır. Payette dondurma işlemi, pellet şeklinde dondurma işlemine göre daha pahalı ve daha fazla iş gücü doğuran bir yöntemdir (Leboeuf ve ark., 2000; Purdy, 2006). Awad ve Graham (2004) koç spermalarının kriyopreservasyonunda en iyi yöntemin pellet ancak boğa spermalarının kriyopreservasyonunda en iyi yöntemin ise payet olduğunu bildirmektedirler. Çözüm sonrası spermatozoon motilitesi, canlılığı ve fertilitesindeki farklılıklar soğutma hızına bağlı olmakla beraber dondurma tekniği, spermanın dondurulmasına kadar olan işlemler, tohumlama teknikleri gibi faktörlerin de teke ve koç spermasının fertilitesinde önem taşıdığı bildirilmektedir (Purdy, 2006).

Spermatozoonların kriyopreservasyonu sürecinde sıcaklığın 25 °C'den 5 °C'ye hızlı soğutulmasında soğuk şoku meydana gelmekte (Watson, 1981; White, 1993), bunun sonucu olarak spermatozoon metabolizmasında ve motilitesinde kayıplar, mitokondri ve akrozom membranında değişimler, (Jones ve Martin, 1973; Watson, 1995) plasma membran bütünlüğü ile permabilitesinde hasarlar, (Ortman ve Rodriguez, 1994) hücre içi enzimler, lipitler ve iyonlarda değişimler ortaya çıkabilmektedir (Darin ve ark., 1973; Harrison ve White, 1972).

Salamon ve Maxwell (2000) koç spermasının 5 °C'ye soğutulma süresi genellikle 1-3 saat arasında değişmekle birlikte özellikle gliserolsüz sulandırıcılarda

spermanın 2 saatten daha kısa sürede soğutulmasının zararlı olduğu ve sıcaklığın kademeli olarak düşürülmesi gerektiğini bildirmektedir.

1.6. Donmuş Spermanın Değerlendirilmesi

Dondurulmuş spermanın değerlendirilmesi amacıyla gerekli olan spermanın çözdürülmesi, pellet ya da payet formunda dondurulmasına göre değişmektedir. Pellet formunun çözdürülmesi 37 °C'lik çözdürme sıvılarında yapılmaktadır. Payet formunun çözdürülmesinde ise birçok çözdürme sıcaklığı ve süreleri kullanılmaktadır. Bu sıcaklık ve sürelerinin bazıları; 37 °C'de 15-30 sn, 40 °C'de 20 sn, 70 °C'de 7 sn'dir. İlk iki çözdürme protokolü başarıyla kullanılmaktadır. 70 °C'de 7 sn'de çözdürme işlemi sonrası olumlu sonuçlar toplansa da saha şartlarındaki uygulanabilirliği sınırlıdır (Purdy, 2006).

Araştırmamızda çözüm sonrası sperma kalitesinin belirlenmesinde temel olarak kullanılan motilite ve anormal spermatozoon oranı gibi parametrelerin belirlenmesinin yanı sıra CASA, HE-test, COMET analiz ve oksidatif stres parametreleri gibi daha objektif sonuçlar verdiği inanan sperma kalite testleri de spermanın değerlendirilmesi kullanılmaktadır.

1.6.1. Motilite ve CASA

Sperma kalitesinin belirlenmesinde önemli kriterlerden biri olan motilite, bir yönde düzgün doğrusal hareket eden spermatozoonların aynı alandaki tüm spermatozoonlara oranı olarak tanımlanmaktadır (Hafez, 1987; Tekin, 1994). Motil spermatozoonların sayısı fertilité için önemli bir parametredir (Gündoğan ve ark., 2003). Spermatozoonlarda motilitenin düzgün bir şekilde meydana gelmesini sağlayan bir başka faktörde cAMP'dir. cAMP yoğunluğunun artması protein kinaz aktivasyonunu artırmakta bunun sonucu aksonem proteinin fosforilize olarak spermatozoon motilitesinde artışa ve hiperaktivasyona neden olmaktadır (Agarwal ve

ark. 2006; Aitken ve ark., 2004). Motilite subjektif olarak tahmin edilebildiği gibi daha objektif olduğuna inanılan yardımcı teknolojik cihazlarla da tayin edilebilmektedir. Bu amaçla objektif, doğru, güvenilir ve tekrar edilebilen spermatozoon analizi ihtiyacından doğmuş olan Computer Assisted Semen Analysis (CASA) yaygın olarak kullanılmaktadır. CASA optik, ışık kaynağı ve bilgisayardan oluşan bir hardware (bilgisayarın makine kısmı) ile motilite, morfoloji ve canlılık analizi yapabilen modülleri içeren bir software (bilgisayar programı) kombinasyonudur (Güçtaş, 2006).

Günümüzdeki sperma analiz sistemleri, spermatozoonların bireysel değerlendirilmesi ve farklı parametrelerinin doğru hesaplanması esasına dayanmaktadır. Bilgisayar destekli sperma analiz sistemi spermatozoonların hareketlerini fotoğrafik mikroskop altında birçok kere izleyebilmek amacıyla geliştirilmiştir. Görüntülerden spermatozoonların yoğunluğu, hareketleri, morfolojileri ve özelliklede spermatozoon başının morfolojisini içeren birçok parametre elde edilip analiz edilebilmektedir (Avdatek ve ark., 2010; Verstegen ve ark., 2002).

Dijital bilgilerin elde edilip işlenmeye başlanmasından sonra CASA ile morfolojik parametrelerin objektif olarak belirlenmesi ve spermatozoon başındaki değişimlerin ayırt edilmesi gibi işlemler yapılabilirken, subjektif olarak bu özelliklerin gözlemlenmesi ve ölçülmesi inkansızdır. CASA ile ilgili en büyük dezavantajlar arasında ekipmanın maliyetinin yüksek oluşu, ölçümlerinin belirli standartlar içerisinde olması, kalite kontrol ve geçerliliğindeki güçlükler sayılabilir (Davis ve Katz, 1993). Spermatozoon başının muayenesinde kontrast için uygun optiklerin ve aydınlatmanın kullanılması çok önemlidir. Görüntüdeki film kare hızında belirli bir standart yoktur. Çünkü bu film kare hızı sadece kullanılan ekipmana bağlı değil aynı zamanda türlere ve deney şartlarına bağlı olarak da değişmektedir (Kraemer ve ark., 1998).

Muayene esnasında koç ve boğalarda 30 farklı alanda 300 spermatozoonun değerlendirilmesi (Budworth ve ark., 1988) buna karşılık ise aygırlarda optimum 300-500 spermatozoonun değerlendirilmesi tavsiye edilmektedir (Verstegen ve ark., 2002). Sperma örnekleri analizden önce mutlaka sulandırılmalıdır. Çünkü taze ve yoğun dozda dondurulmuş spermada spermatozoonların bireysel izlenmesi ve analizin başarılı olmasını zorlaştırmaktadır (Mortimer ve Swan, 1995).

CASA ile her bir spermatozoon hücresinin dijital görüntüsünün elde edilmesi ile spermatozoonların hareket özellikleri hakkında bilgi edinilebilmekte ve analiz yapılabilmektedir. Spermatozoonların hareketlerinin kalitesini birçok faktör etkileyebilmektedir. Bunlar arasında ortamın sıcaklığı, spermanın işleme prosedürleri (yıkama, kapasitasyon, dondurma-çözdürme), spermatozoonların yoğunluğu ve patolojik bozukluklar sayılabilir (Verstegen, 2002).

Manuel olarak spermatozoon morfolojisinin değerlendirilmesinin her zaman problemli olduğu ispatlanmıştır. Personeller arasındaki sperma özelliklerinin subjektif olarak değerlendirilmesindeki büyük farklılıklar ve sonuçların doğru yorumlanmasındaki zorluklar bulunmaktadır (Ombelet ve ark., 1997). Bu farklılıkları belirlemek amacıyla 1983 yılında aynı sperma örneği 26 farklı personel tarafından değerlendirilmiş ve % 5 - % 85 arasında farklı anormal spermatozoon oranları değerlendirmişlerdir. Aynı sperma örneği çok tecrübeli 3 personel tarafından yapılan değerlendirmede ise % 25 - % 40'a kadar değişen oranda anormal spermatozoon tespit etmişlerdir (Verstegen ve ark., 2002). Bu nedenlerden dolayı objektif değerlendirme metodlarının geliştirilmesi önem kazanmıştır.

Morfolojik muayene sonucunu etkileyen birçok sebep vardır ve bunlar arasında sürme preparat hazırlama tekniği, yorumlamalar, sınıflandırma sistemi ve değerlendirmeyi yapan kişinin deneyimi önemli yer tutmaktadır (Gravance ve ark., 1998). Morfolojik muayenede sonuçların yanlış yorumlanmasını önlemek ve değişkenleri azaltmak için çok miktarda spermatozoon sayılması gerekmektedir. Analizde kullanılan boyamalar türlere bağlıdır. Spermatozoonların morfolojilerini

değerlendirilmesinde birçok boyama önerilmekte bunlar arasında papanikola ve hematoksilen önemlidir (Davis ve Katz, 1993).

Koç ve teke spermatozoonların muayenesi 200, 400 ya da 600'lük büyütmede ve boğa spermatozoonları mutlaka 600'lük büyütmede analiz edilmesi önemlidir. Küçük büyütmenin avantajı, örneklerin analizi için gerekli zamanı azaltmasıdır (Verstegen ve ark., 2002).

Bilgisayar destekli sperma analizi günümüzde insan, koç, teke, boğa, aygır, köpek ve laboratuvar hayvanlarının taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş spermalarındaki spermatozoonların hareket özelliklerini belirlemek amacıyla kullanılan en önemli testlerden biridir.

CASA'da hücrenin izlediği yol durumu şu şekilde özetlenebilir:(Güçtaş, 2006)

Progressif hücreler: İleri hareketli, motil bir hücrenin progressif olarak motil sayılabilmesi için gereken minimum değerleri göstermesidir. Hücre iki kriteride geçmelidir (VAP, STR).

VSL: Düz Çizgi Hızı ($\mu\text{m/s}$). Spermatozoon yolunun başlangıcı ve sonu arasındaki düz çizginin oranıdır.

VCL: Eğri Çizgi Hızı ($\mu\text{m/s}$). Takip edilen yoldaki hız, bir hücrenin katettiği toplam mesafe ele alınarak hesaplanır. Bunun için hücrenin katettiği yol üzerinde, bu yolu temsil eden ve birbirini izleyen 5-30 nokta arasındaki düzgün doğrular alınarak bulunan toplam mesafe toplam zamana bölünür. Tüm spermatozoon hücreleri için bu şekilde hesap edilen yol, hız ortalamasını verir.

VAP: Ortalama Rota Hızı ($\mu\text{m/s}$). Bir spermatozoon başının ortalama rotası boyunca ortalama zamandaki hızıdır. Bu rota, CASA cihazındaki algoritmalara göre

esas rotanın bilgisayarca düzleştirilmesi ile ortaya çıkar. Cihazlar arasında bu algoritmalar açısından farklılıklar olabilir.

ALH: Başın Lateral Yerdeğiştirme Amplitüdü (μm). Bir spermatozoon başının ortalama rotası boyunca yan sapma uzunluğu (yalpalama)'dır. Maksimum ya da ortalama olarak ifade edilir.

BCF: Çapraz Kesişme Frekansı (kesişme/saniye). Spermatozoon eğrisel çizgi rotasının ortalama rotasıyla kesişme sıklığının ortalamasıdır.

LIN: Linearite. Eğri çizgisel rotanın doğrusallığıdır. VSL/VCL .

STR: Doğrusallık. Ortalama yolun doğrusallığıdır. VSL/VAP

1.6.2. HE-Test

Membran bütünlüğü sadece spermatozoon metabolizması için değil, aynı zamanda kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve oosit yüzeyine spermanın tutunma olayının gerçekleşmesinde hayati bir öneme sahiptir. Bu nedenle ozmotik toleransın ve ölü-canlı muayenesinin birleştirildiği HE-test, insanlarda ve diğer memeli hayvanlarda fertilitenin tahmin edilmesinde kullanılan potansiyel sperma fonksiyon testlerinden biri olduğu bildirilmektedir (Gündoğan ve ark., 2011; Jeyendran ve ark 1984). HOS test ile standart spermatolojik parametreler arasında çeşitli korelasyonlar bulunmaktadır (Yeni, 2010).

1.6.3. Anormal Spermatozoon Oranı

Anormal yapılı spermatozoonların fertilizasyon yeteneğinin düşüklüğü ve kimi kalıtsal bozuklukları taşıması bakımından, spermatozoonun morfolojik muayenesi

önem taşımakta ve bu amaçla ya boyama ya da sıvı fikzasyon yöntemleri kullanılmaktadır (Tekin, 1994).

Morfolojik değerlendirmenin başlıca amacı normal ve anormal spermatozoonların ayırt edilmesi temeline dayanır (Hafez, 1987; Rodriguez ve ark., 1993). Morfolojik bozukluğun lokalizasyonu, çeşidi ve miktarı ile fertilité arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Anormal spermatozoon oranının % 20'yi aşması fertilitéyi olumsuz etkilemekle beraber genel manada anormal spermatozoon oranı düşük olsa bile başa bağlı bozuklukların oranı % 5'in, akrozoma bağlı bozuklukların oranının ise % 10'un üzerinde olmaması gerekmektedir. Fertilizasyonda önemli rol oynadığından morfolojik incelemelerde akrozom ayrı bir öneme sahiptir. Araştırmalarda, (Cardulo ve Florman, 1993; Casey ve ark., 1993) akrozom reaksiyonun postmortem bir değişiklik olarak ölü hücrelerde oluştuğu, plazma ve akrozom mebranlarının hasarı veya kaybıyla karakterize olduğu bildirilmektedir.

Genel olarak motil hücre sayısı azaldığında fertilizasyonun düştüğü bununda, sperma kalitesi yönünden olumsuzluk işareti olduğu belirtilmektedir. Ayrıca ölü spermatozoon oranının % 25'in üzerine çıkmasının da istenmeyen bir özellik olduğu, morfolojik olarak % 5-10 arasında anormal spermatozoon oranı normal kabul edilebilirken, bu oranın % 25'ten, anormal başlı spermatozoon oranının da % 1'den yüksek olduğu durumlarda fertilitenin kritik bir sürece girebileceği belirtilmektedir (Maxwell ve Watson, 1996).

1.6.4. DNA Hasarı

Günümüzde erkeklerin fertilitésinin tahmin edilmesinde ve sürü fertilitésinin sürdürülebilirliğinde spermatolojik özelliklerinin belirlenmesinin yanı sıra spermatozoon DNA hasarının tespit edilmesi önemli bir yer tutmaktadır.

Ostling ve Johanson "tek hücre jel elektroforezi veya Comet assay" olarak bilinen bir microgel elektroforez tekniği kullanarak hücrelerde DNA hasarı ölçen ilk bilim adamlarıdır. Ancak kullanılan nötr koşullar sadece DNA çift zincir kırıklarını tespitine izin vermektedir. Daha sonra Singh ve arkadaşları tarafından comet assay alkalın koşullar altında adapte edilmiş böylelikle hem tek hem de çift zincir kırıklarının tespitine olanak sağlayarak daha hassas bir test haline almıştır (Collins, 2004; Speit ve Hartmann, 2005).

Comet assay ya da tek hücre jel elektroforezisi hücrelerin bireysel DNA hasarını belirlemede oldukça hızlı, duyarlı bir metoddur ve hem somatik hem de spermatozoon hücrelerin de kullanılmaktadır. Elektroforetik alan altında hücresel hasar görmüş (fragmentler ve zincir kırıkları) DNA'lar ile hasar görmemiş DNA'ların ayrımını sağlayan mikroskop altında kuyruklu yıldız şeklindeki çözünmeyi gösteren bir tekniktir. Comet assay ya da başka tekniklerle yapılan birçok çalışma genetik materyal miktarındaki değişim ve spermatozoonların fertilizasyon potansiyeli arasında negatif ilişki olduğunu göstermektedir. Günümüzde comet assay hücreleri tek tek değerlendirilebildiği sade, çok yönlü, hızlı, görsel, hassas ve yaygın bir test haline gelmiştir (Olive ve Banath, 2006).

Spermatozoonda oluşan DNA hasarının kaynağı olarak üç hipotez ileri sürülmüş olup bunlardan birincisi, spermatozoonun gelişimi süresince uygun olmayan paketleme ve bağlanma (Sailer ve ark., 1995), ikincisi ise oksidatif stresin neden olduğu hasar (Agarval ve Saleh, 2002; Agarval ve ark., 2003) ve üçüncü olarak da apoptosis nedeniyle oluşan DNA hasarıdır (Sakkas ve ark., 1999; Sakkas ve ark., 2002). Bunlardan oksidatif stres DNA'nın tek ve çift iplikli kırıkları ile ilişkilidir (Kemal ve ark., 2000).

Artmış DNA hasarı infertilite, kusurlu embriyonel gelişim, implantasyon kusuru ve tekrarlayan abortlarla ilişkili olduğundan, fertil ve infertil erkeklerin spermatozoonları arasında farklı seviyelerde DNA hasarının tespit edilmesi, spermatozoon DNA hasarının erkek fertilite potansiyelini değerlendirmede bir

belirteç olarak kullanılabilirliğini ön plana çıkarmaktadır (Collins, 2004; Donnelly ve ark., 2001). Özellikle insan spermatozoonlarındaki yüksek seviyede DNA hasarı ile infertilite ilişkilidir (Irvine ve ark., 2000). İnfertil erkeklerin spermatozoonları, X-ray ışınları, dondurma-çözdürme işlemleri ve ROS gibi stres ajanları yoluyla oluşan DNA hasarına oldukça duyarlıdır (Donnelly ve ark., 2001; Hughes ve ark., 1996).

Reaktif oksijen türlerinin spermatozoon DNA'sının bütünlüğüne saldırması sonucu oluşan DNA hasarı birçok teknikle tespit edilmektedir. Spermaya hidrojen peroksidin direkt katılması sonucu artan DNA parçalanmaları alkaline single-cell gel electrophoresis (COMET) ve terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end-labeling assays (TUNEL) teknikleri tespit edilerek hidrojen peroksidin spermatozoon kromotinine hasar verdiği gözlenmektedir (Peris ve ark., 2007).

Makhlouf ve Niederberger (2006) TUNEL ve COMET tekniklerinin Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) ile karşılaştırıldığında daha güvenilir olduğunu bildirmişlerdir. Duty ve ark (2002)'nin çalışmasında COMET yönteminin düşük düzeydeki DNA hasarının da ortaya çıkarabilme özelliğinde olduğu bildirilmektedir. Fraser ve ark. (2010) domuz spermasında dondurma-çözdürme sonrası meydana gelen DNA hasarını hem nötral comet analiz yönteminde hem de sperm-sus-halomax kiti ile elde ettikleri hasar oranlarını birbirine benzer düzeylerde bulmuşlardır.

Fraser ve Strzezek (2004) domuzlarda sulandırıcı tipine bakılmaksızın 5 °C ve 16 °C'lerde kısa süre saklanan spermatozoonlarda DNA hasarının kademeli olarak arttığını bildirmektedirler. Hughes ve ark. (1998) farklı konsantrasyonlarda sperma sulandırıcısına ilave edilen askorbik asit, α -tokeferol, urat ve sisteinin 30 Gy X ışını ile indüklenerek oluşturulan DNA hasarı üzerine etkisinin araştırdığı çalışmalarında özellikle askorbik asit, α -tokeferol ve uratın koruyucu etkisi olduğunu bildirmektedirler.

Jiang ve ark. (2007) nötral Comet analiz yöntemi ile dondurulmuş çözdürülmüş domuz spermasında DNA bütünlüğü üzerine LDL etkisini araştırdıklarında Comet analiz yönteminin yüksek hassasiyette ve pratik bir yöntem olduğunu ve LDL'nin soğuktan koruyucu olarak spermaya katılmasıyla DNA hasarına karşı koruduğu sonucuna vardıklarını belirtmektedirler. Slovinska ve ark. (2008) boğalarda taze ve dondurulmuş spermada baş DNA miktarı ile comet kuyruk uzunluğu ($p<0.05$) ve kuyruk momenti ($p<0.01$) yönünden fark olduğunu bildirmektedir.

Linfor ve Meyers (2002) aygır spermasının Comet analiz yöntemi ile dondurma hasarlarını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada kriyoprotektantdan yoksun olarak -20°C de dondurulan spermada önemli ölçüde DNA hasarının meydana geldiğini bildirmektedirler. Lopes ve ark. (1998) insan spermasında reaktif oksijen türevi olan xanthine/xanthine oxidase (X/XO) ile indükleyerek oluşturduğu DNA hasarını sperma sulandırıcısına ilave ettiği katalaz, redükte glutatyon ve hipotaurin gibi antioksidanların azalttığını bildirmektedirler. Whitaker ve ark. (2008) domuz sperması sulandırıcısına 5mM GSH ilave ettikleri çalışmalarında, dondurma-çözdürme sonrası comet analiz yöntemiyle belirledikleri DNA hasarının ilk yarım saatlik inkübasyonda kontrol ile GSH ilaveli grupta fark görülmemesine karşın 6 saatlik inkübasyon sonrası kontrole göre GSH ilave edilmiş grupta hasarın ciddi oranda arttığını bildirmektedirler.

Gökkuşığı alabalığında comet assay sonrası belirlenen DNA hasarı ile spermatozoonların fertilizasyonlarının azalması arasında bir korelasyon olduğu bildirilmektedir (Labbe ve ark., 2001). Bundan başka spermatozoon DNA bütünlüğü ile fertilite arasında bir ilişki olduğu teke (Berlinguer ve ark., 2009), boğa (Madrid-Bury ve ark., 2005) ve aygırda (Love ve Kenney, 1998) bildirilmiştir. Gliozzi ve ark. (2011) nötral comet yöntemi ile kanatlı spermatozoonlarında dondurma-çözdürme sonrası DNA hasarlarını belirledikleri çalışmalarında, spermatozoon DNA hasarı ile spermatozoon motilitesi ve membran bütünlüğü arasında negatif korelasyon tespit etmişlerdir.

Henkel ve ark. (2001)'nin insanlarda yaptıkları bir çalışmada SCSA yöntemi ile yaz aylarında DNA hasarını yüksek bulmuşlar ve bunu sıcaklık artışına bağlamışlardır.

Comet analizin değerlendirilmesinde görsel skorlama kullanımı ile görüntü analiz sistemleri arasında önemli düzeyde korelasyon olduğu bir çok araştırmacı (Collins, 2004; Noroozi ve ark., 1998; Møller, 2006) tarafından bildirilmektedir.

Spermatozoon DNA hasarının belirlenmesinde birçok metod kullanılmakla birlikte düşük seviyedeki DNA hasar düzeylerini bile hassas bir şekilde belirlenebilmesi, az sayıda hücre ile analizin gerçekleştirilebilmesi, ekonomik olması, sonuçların kısa sürede elde edilebilmesi ve değerlendirilmesi gibi nedenlerden dolayı DNA hasar tespitinde Comet analiz yöntemi giderek yaygınlaşmaktadır.

1.6.5. Oksidatif Stres Parametreleri

Seminal plazmada, biyolojik enzimatik antioksidanlar olarak bilinen SOD, CAT, GSH-Px fazla miktarlarda bulunur. Bu enzimatik antioksidanlar, süperoksid ve peroksit radikallerini oksijen ve su'ya dönüştürerek lipid peroksidasyona karşı motiliteyi korumaktadır. Ayrıca lipid peroksidasyon sonucu oluşan MDA, spermatozoon membran hasarının hangi boyutta olduğunu gösterir (Aitken ve ark., 1989; Aitken ve ark., 1994). Glutatyonun (GSH) sulandırıcılara katılması, ortamda bulunan ROS ürünleriyle reaksiyona girerek ve donma esnasında membran proteinlerindeki sülfür gruplarında gelişen bozulma ve dağılmayı kısmen engelleyerek oksidatif hasara karşı koruyucu etkinlik oluşturur (Chatterjee ve ark., 2001). Bu bağlamda özellikle son yıllarda sperma kalitesinin tahmininde verdiği sağlıklı sonuçlardan dolayı, spermanın değerlendirilmesinde oksidatif stres parametrelerinin tespitinin kullanımı önem kazanmaktadır (Agarwal ve ark., 2004; Gündoğan ve ark., 2010).

Yapılan bu tez çalışması Afyonkarahisar koşullarında yetiştirilen Pırlak koçların spermalarının dondurularak saklanması konusundaki ilk çalışma olması esasına dayanarak, sperma sulandırıcılarına katılacak olan farklı antioksidanların dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik özellikler, CASA parametreleri, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkileri, çözdürme sonrası meydana gelebilecek hasarların en aza indirilmesinde antioksidanların etkinliklerinin belirlenmesi ile mevcut dondurma metodunun geliştirilerek bölge ve ülke ekonomisine katkı sağlaması hedeflenmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Bu çalışmada hayvan materyali olarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezinde 2010 yılı aşım sezonu içerisinde yetiştirilen 2-3 yaşlarındaki Pırlak ırkı 10 baş koç kullanıldı (Resim 2.1). Koçlar yarı açık besi şartlarında yetiştirilen damızlık hayvanlar arasından Demirci (2002)'nin bildirdiği yöntemler ile androlojik muayeneleri yapılarak seçildi.

2.2. Hayvanların Bakım ve Beslenmesi

Çalışmada kullanılan koçların bakım ve beslenmesi için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin bakım ve beslenme koşullarından yararlandı. Hayvanların beslenmesi için hazırlanan rasyondan koç başına sabah 500 gr akşam 500 gr olmak üzere 1 kg konsantre yem karması ile sabah 750 gr akşam 750 gr kuru yonca verildi. Su ihtiyaçları ise önlerindeki suluklar sürekli dolu ve temiz tutularak sağlandı.



Resim 2.1. Araştırmanın yapıldığı merkez ve koçların genel görünümü

2.3. Suni Vajenin Hazırlanması

Koçlardan sperma suni vajen yardımıyla alındı. Bu amaçla koçlar için üretilmiş 110 mm uzunluğunda ve 55 mm çapındaki Suni vajen silindiri içerisine boru şeklindeki ince kauçuk lastik geçirilip her iki ucu silindirin dış yüzüne çevrilerek üzerine sabitlendi. Daha sonra sperma toplama kadehine sabitlenen lastik huni silindirin uç kısmına uygun şekilde yerleştirildi. Suni vajenin 2/3'lük kısmına 48-52 °C'deki sıcak su dolduruldu ve konulan suyun sıcaklığı sperma alma esnasında 42-45 °C olacak şekilde ayarlandı. Penisin gireceği ön kısmına bir cam baget yardımıyla bir miktar steril vazelin sürülerek kayganlaştırıldı. Basıncı ise içerisine doldurulan sıcak su ve bir miktar hava üflemek suretiyle sağlandı (Demirci, 2002; Hafez, 1987; Tekin, 1994).

2.4. Spermanın Alınması

Sperma alma esnasında aşım partneri olarak kızgınlığı tespit edilmiş koyun, olmadığı zamanda ise kızgınlık göstermeyen koyunlar kullanıldı. Bir yardımcı tarafından tutulan koyunun üzerine atlayan koçun penisine daha önceden hazırlanmış suni vajen usulüne uygun yerleştirilerek sperma alındı. Aşım sezonu esnasında düzenli olarak koçlardan suni vajen yardımıyla haftada iki kez alınmak üzere her bir koçtan toplam 24 ejakulat toplandı (Demirci, 2002; Evans ve Maxwell, 1987; Tekin, 1994).

2.5. Sulandırıcı ve Antioksidanlar

Çalışmada sulandırıcı olarak Tris kullanılmış olup daha sonra farklı 4 antioksidan katılımı gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla Tris stok solüsyonu için;

Trisma base 3,63 g

Sitrik asit 1,99 g

Fruktoz 0,50 g

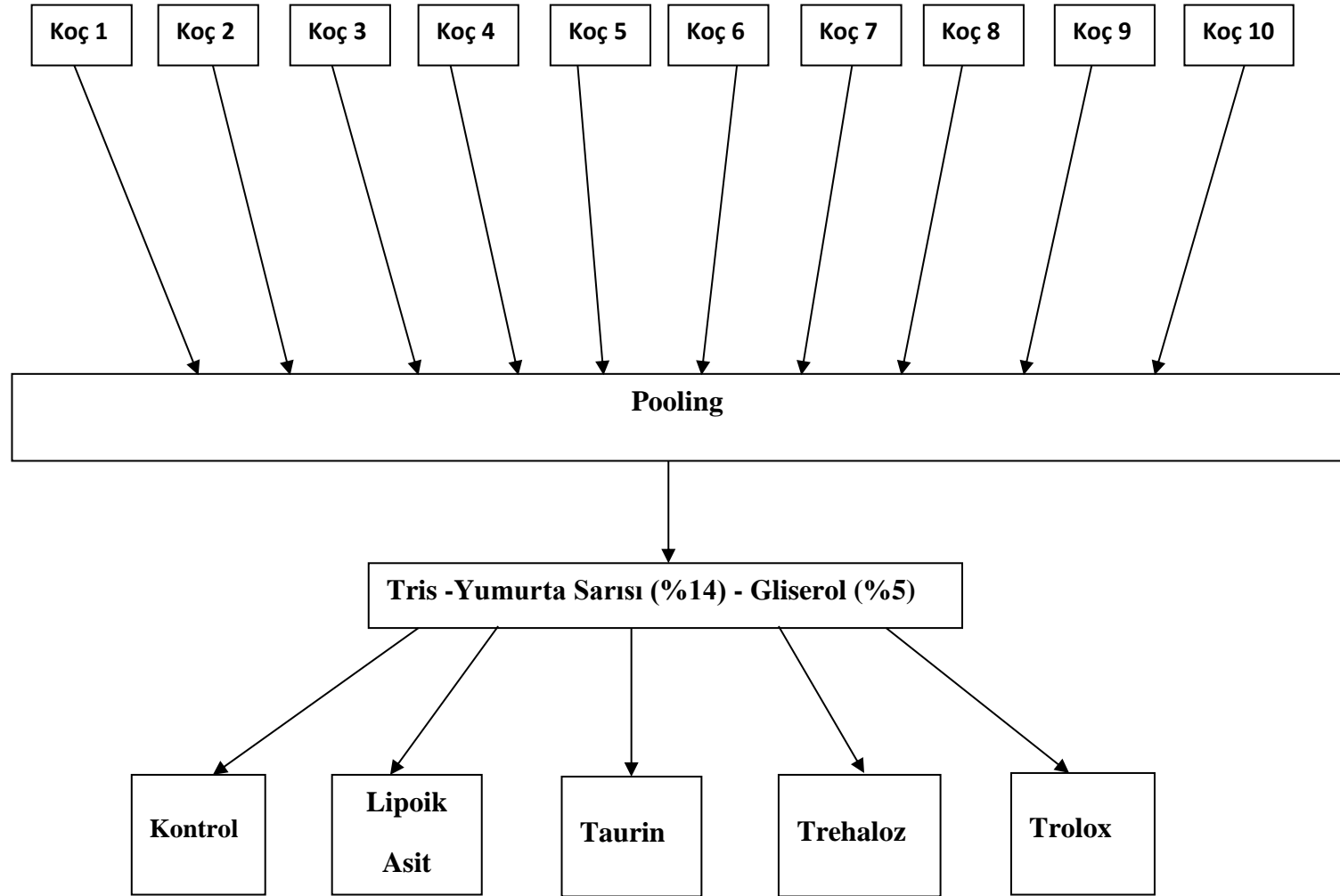
Bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanarak tris - sitrik asit - fruktoz solüsyonu hazırlandı. Elde edilen sulandırıcıya % 14 yumurta sarısı, % 5 gliserol, 100000 IU/ml kristal penisilin ve 100 mg/ml streptomisin eklendi (Evans ve Maxwell, 1987).

Hazırlanan bu sulandırma solüsyonuna literatür taramaları ve kullanılan antioksidanların farklı konsantrasyonları ile yapılan ön çalışmalar sonucu 1 mM Trolox, 100 mM Trehaloz, 50 mM Taurin, 1 mM Lipoik asit ve herhangi bir antioksidan eklenmeyerek (Kontrol) 5 farklı grup oluşturuldu.

2.6. Spermının Sulandırılması ve Dondurulması

Ayrı ayrı tüplere alınan sperma örnekleri bir tüpte birleştirilerek (pooling) dondurma öncesi spermatolojik muayeneleri yapıldıktan sonra 5 eşit hacme ayrıldı. Sperma örnekleri önceden hazırlanmış % 5 gliserollü farklı antioksidanlar içeren sulandırıcılarla ml'de 5×10^8 olacak şekilde dozajlanarak sulandırıldı (Şekil 2.1).

Sulandırma işlemini müteakiben örnekler hemen Dölerme ve Suni Tohumlama A.D. laboratuvarına getirildi. Burada spermalar 0.25 ml'lik farklı renklerdeki payetlere çekilerek 5 °C'de 3 saat ekilibrasyona tabi tutulduktan sonra 48x40x30 cm ölçülerindeki strafor kutu içerisindeki sıvı azottan 4 cm yükseklikteki azot buharında (~ -110 °C) 15 dk. içerisinde dondurularak in vitro değerlendirmelere kadar sıvı azot içerisinde (-196 °C) depolandı. Sezon içi 24 uygulamada her grup için en az 30 payet donduruldu. Daha sonra donmuş spermalar 37 °C su banyosunda 30 sn'de çözdürülerek temel spermatolojik özellikler, CASA parametreleri, oksidatif stres parametreleri ve DNA hasarı yönünden değerlendirildi.



Şekil 2.1. Çalışma gruplarının oluşum şeması

2.7. Spermatojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Gerçekleştirilen araştırmada öncelikle bireysel olarak değerlendirmede normal sınırlar içerisinde olduğu tespit edilen 10 koçtan alınan spermanın karıştırılmasıyla elde edilen miks ejakülattaki sperma viskozitesi, pH'sı, spermatozoon kitle hareketi, motilitesi (%), yoğunluğu ($\times 10^9/\text{ml}$), anormal spermatozoon oranı (%) ve hipozmotik şişme testi ile ölü canlı oranı (HE, %) değerlendirildi.

Dondurulmuş spermalardan her grup için 24 adet olmak üzere 5 grup için toplam 120 payet 37 °C'lik su banyosunda 30 sn'de çözdürüldükten sonra ilgili parametreler yönünden değerlendirildi.

2.7.1. Makroskobik Muayene

2.7.1.1. Spermanın Viskozitesi

Çıplak gözle bakılıp 1-5 aralığında numaralandırılarak değerlendirildi. Bu değerlendirmeye göre 5 çok koyu, 4 krema koyuluğu, 3 sulu krema, 2 süt inceliği ve 1 de sulu olarak değerlendirildi (Evans ve Maxwell, 1987).

2.7.1.2. Spermanın pH Değeri

Spermanın pH'sı, 0.5 birim aralıklı ve duyarlılığı 5.0-10.0 arasında olan Merck Neuralit pH test kağıdı yardımıyla değerlendirildi. Bu amaçla pH indikatör kağıdının yeni alınmış spermaya teması sağlanarak 3-5 sn içerisinde test kağıdındaki renk değişimi kutu üzerindeki skala ile karşılaştırıldı (Demirci, 2002).

2.7.2. Mikroskopik Muayene

2.7.2.1. Spermatozoon Kitle Hareketi

Muayene 37 °C'deki lam üzerine bir damla sperma konulup ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskopun (Olympus CX 31, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) 100'lük büyütmesi ile lamel kapatılmadan farklı mikroskop sahaları incelenerek gerçekleştirildi. Bu amaçla, spermada bulunan ileri yönlü, güçlü harekete sahip spermatozoonların yoğunluğuna bağlı olarak meydana gelen kaynama ve dalgalanma hareketleri göz önüne alınarak 0-5 arasında puan verilerek subjektif olarak değerlendirildi (Tekin, 1994).

2.7.2.2. Spermatozoon Motilitesi

Motilite tayini amacıyla faz-kontrast mikroskopun 37 °C'ye ayarlanmış ısıtma tablasına bir lam yerleştirildi. Lam üzerine % 2.9'luk Sodyum Sitrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) solüsyonu ile toplu iğne başı büyüklüğünde sperma konularak 45°'lik eğimle lamel kapatıldı. Mikroskopun 100'lük büyütmesi ile görüntü bulunduktan sonra 400'lük büyütmede muayene edildi. Motilitenin belirlenmesinde en az üç mikroskop sahasında subjektif değerlendirme yapılarak bir yönde düzgün doğrusal hareket eden spermatozoonların aynı alandaki tüm spermatozoonlara oranı yüzde (%) olarak kaydedildi (Demirci, 2002; Hafez, 1987; Tekin, 1994).

2.7.2.3. Spermatozoon Yoğunluğu

Spermatozoon yoğunluğu Hemositometrik yöntem ile tayin edildi. Bu amaçla eritrosit sayımında kullanılan pipetin 0.5 çizgisine kadar sperma 101 çizgisine kadarda distile su çekilerek 1/200 oranında sulandırıldı. Daha sonra pipetin her iki

ucu baş ve işaret parmaklar arasına kapatılarak yatay konumda ileri-geri hareketlerle karışımı sağlandı. Bu işlemin ardından 1 çizgisine kadar olan kılcal boruda spermatozoon bulunmadığından 5 damlası atıldı. Pipetin ucu Thoma lamı üzerindeki kanala temas ettirilerek daha önceden üzerine lamel yapıştırılmış olan Thoma lamı ile lamel arasına sulandırılmış spermanın akışı sağlandı. Sıvı akışının durması ve spermatozoonların pasif hareketlerinin önlenmesi amacıyla Thoma lamı yatay konumda 3-5 dk. bekletildi. Spermatozoon sayımı faz-kontrast mikroskopta 400'lük büyütmede alt ve üst sayım sahalarında beşer orta karedeki (80 küçük kare) spermatozoonların sayımı ile gerçekleştirilerek yoğunluk ml'deki sayı olarak verildi. (Demirci, 2002; Tekin, 1994).

2.7.2.4. Anormal Spermatozoon Oranı

Sperma örneklerinde anormal spermatozoon oranı sıvı fikzasyon yöntemi ile belirlendi. Fikzasyon amaçlı 1 ml Hancock solüsyonu içerisine 1-2 damla sperma örneği damlatıldı. İyi karışımları sağlandıktan sonra bir damla sperma lam üzerine alınarak üzerine lamel kapatılıp faz-kontrast mikroskopta 1000'lik büyütmede 400 spermatozoon sayılarak anormal spermatozoon oranı % olarak belirlendi. Normal spermatozoon yapısı dışındaki yapılar anormal olarak kabul edildi ve spermatozoon'un akrozom, baş, orta kısım, kuyruk ve toplam anomalileri değerlendirilip kaydedildi (Resim 2.2).

Hancock sıvısının hazırlanışı:

1. Solüsyon:

NaCl (9.01 g) Bidistile su (500 ml)

2. Solüsyon:

A- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21,682 g) Bidistile su (500 ml)

B- KH_2PO_4 (22,254 g) Bidistile su (500 ml)

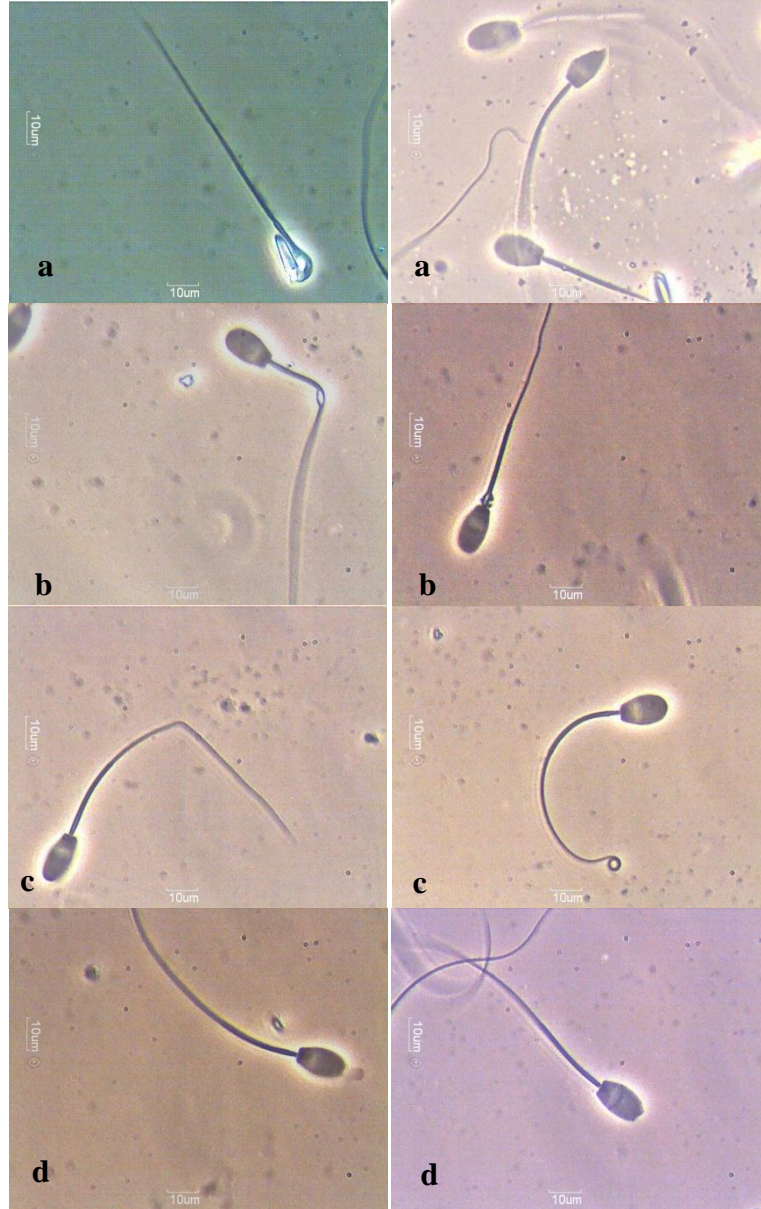
200 ml A ile 80 ml B karıştırılarak 2. karışım hazırlandı.

Hancock solüsyonu;

Formalin (62,5 ml)

1. Solüsyon (150 ml)

2. Solüsyon (150 ml), 500 ml bidistile su eklenerek hazırlandı (Schafer ve Holzmann, 2000).



Resim 2.2. Koçların spermalarında gözlenen bazı anormal spermatozoonlar

a: Baş, b: Orta kısım, c: Kuyruk, d: Akrozom anomalileri

2.7.2.5. HE-test

Sperma numunelerinde ölü-canlı spermatozoon oranını ve hipo-ozmotik şişme testinin birlikte uygulandığı Hipo-ozmotik Eosin boyama testi olarak adlandırılan HE-test kullanıldı (Ducci ve ark., 2002; Gündoğan ve ark., 2010; Mansour, 2009). Ependorf tüpler içerisine su banyosunda 37 °C'deki 100 mOsm'luk HOST solüsyonundan 1 ml alınarak üzerine sperma numunesinden 10 µl eklendi. Daha sonra eosin boyası ilave edilip karışım 37 °C'lik su banyosunda 30 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası lam üzerine bu karışımdan bir damla alınıp frotileri çekilerek çok kısa bir sürede kuruması sağlandı. Hazırlanan frotilerde 400'lük büyütmede 400 spermatozoon baş kısmının tamamın ya da bir bölümünün boya alıp almayışına ve kuyruktaki kıvrılma veya şişme olup olmayışına göre dört tipte sınıflandırıldı (Resim 2.3). Buna göre;

Eosin boyasının hazırlanışı:

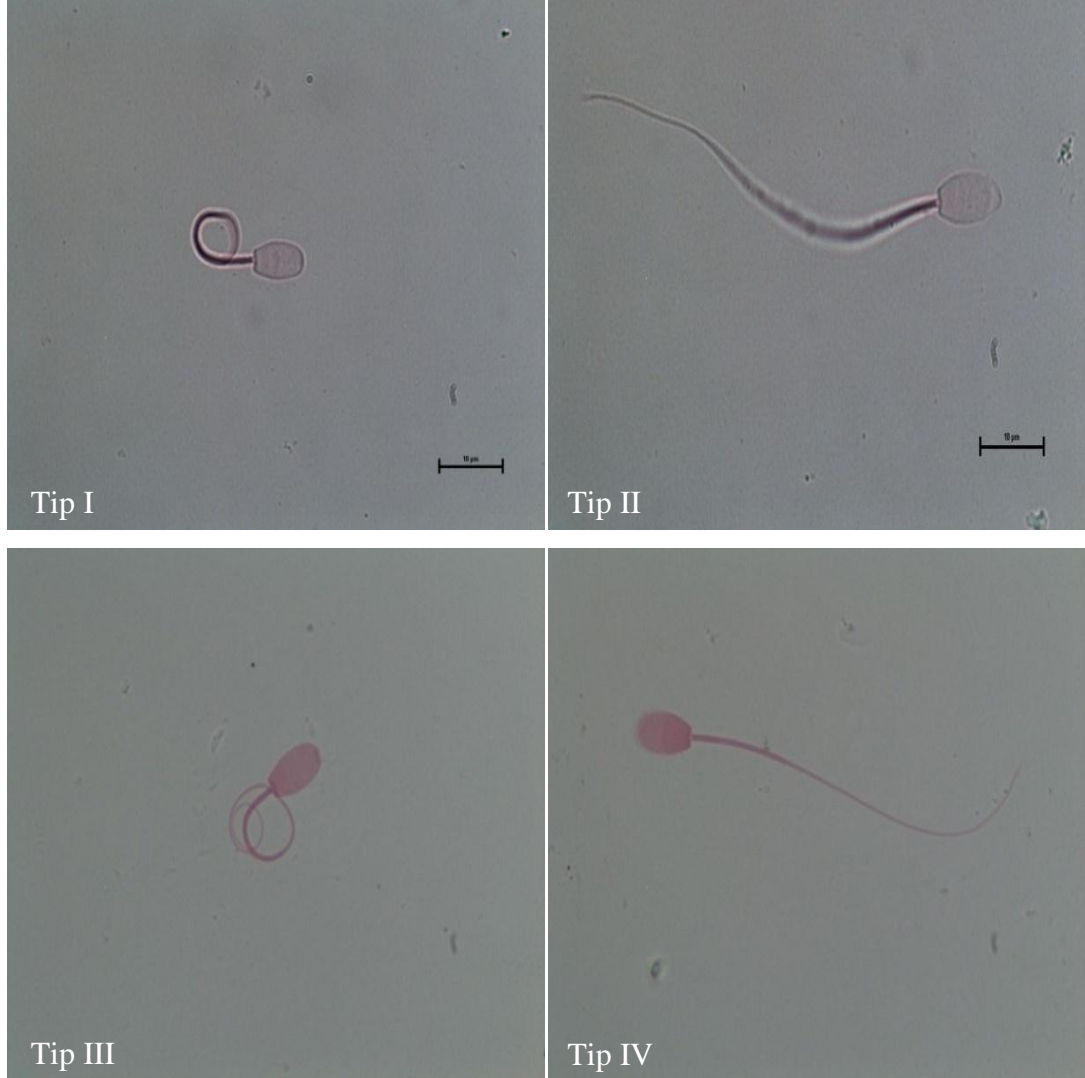
Eosin-Y (1,67 g)

Sodyum Sitrat (2,9 g), 100 ml distile suya tamamlanarak hazırlandı.

HOS Test Solüsyonunun hazırlanışı:

0,9 g fruktoz

0,49 g sodyum sitrat, 100 ml'ye tamamlanarak (100 mOsm/kg) hazırlandı (Aisen ve ark., 2002; Jeyendran ve ark., 1984).



Resim 2.3. Spermatozoonlarda HE-testinde gözlenen şişme ve kıvrılmalar

Tip I. Kuyruk şişmiş, baş boya almamış (H+/E-)

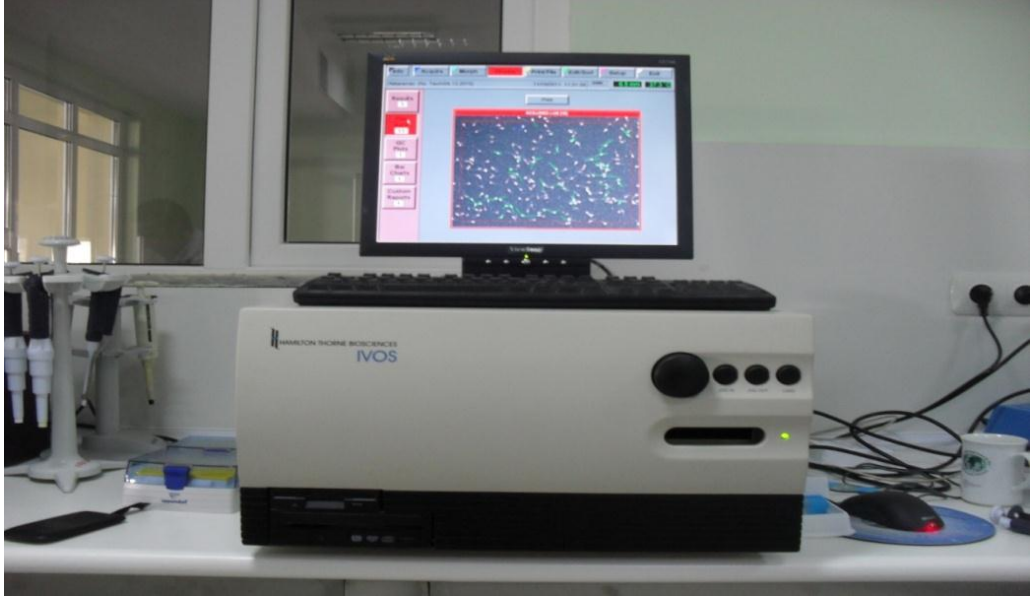
Tip II. Kuyruk şişmemiş, baş boya almamış (H-/E-)

Tip III. Kuyruk şişmiş, baş boya almış (H+/E+)

Tip IV. Kuyruk şişmemiş, baş boya almış (H-/E+)

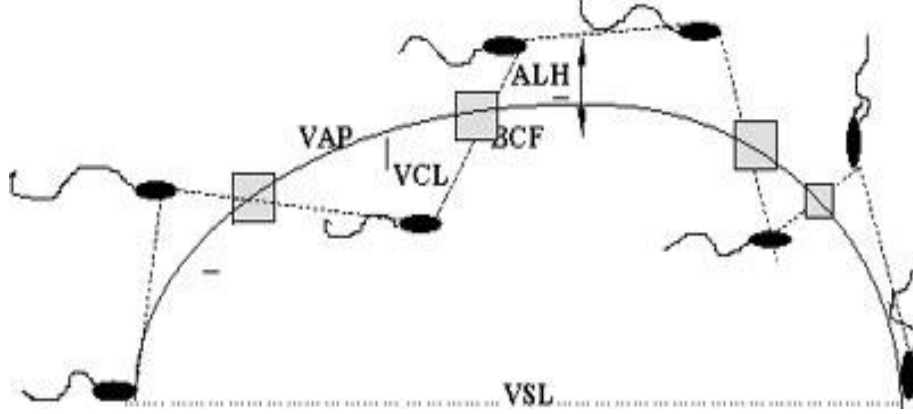
2.7.3. CASA ile Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Dondurma-çözdürme sonrası spermatozoon motilitesinin ve hareketlerinin değerlendirilmesinde CASA (Version 12 IVOS, Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) kullanıldı (Resim 2.4). Değerlendirilmeye başlamadan önce CASA faz kontrast, 60 Hz kare hızı, minimum kontrast -70, küçük ve büyük statik boyutlu girişler -0.6-4.32, küçük ve büyük yoğunluklu girişler -0.20-1.92, küçük ve büyük uzama girişleri 7-91, varsayılan hücre boyutu -10 piksel, varsayılan hücre yoğunluğu -80 olarak ayarlandı. Çözdürülmüş sperma gliserol ve yumurta sarısı içermeyen tampon tris sulandırıcısıyla sulandırılıp (5 μ l sperma + 95 μ l sulandırıcı) hemen değerlendirildi. Sulandırılmış sperma örneğinden 4 μ l önceden ısıtılmış bölmeli lama (Leja 4, Leja Products, Luzernestraat B.V., Holland) bırakılarak spermatozoon motiliteleri ile hareket özellikleri 200'lük büyütmede 37 °C'de belirlendi.



Resim 2.4. CASA

Motilite ve hareket özellikleri olarak; motilite (%), progressif motilite (%), VAP (ortalama yol hızı, $\mu\text{m/s}$), VSL (düz çizgisel hız, $\mu\text{m/s}$), VCL (eğrisel hız, $\mu\text{m/s}$) ve ALH (lateral kafa değiştirme, μm genliği), BCF (Çapraz geçiş frekans ritmi Hertz (Hz)) değerleri kaydedildi (şekil 2.2). Her bir değerlendirme için, 10 mikroskobik alanlarda en az 300 hücre incelendi.



şekil 2.2. Spermatozoonların kinetik hareketleri

VAP (Tüm hareketin ortalama hızı)

VSL (Doğrusal hız)

VCL (Eğrisel yoldaki hızı)

↑↓ ALH (Başın laterale sapma uzaklığı)

□ BCF (Çapraz Kesişme Frekansı)

2.8. DNA Hasarının Belirlenmesi

Spermatozoon DNA hasarının belirlenmesinde Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) yöntemi kullanıldı. Comet assay olarak da adlandırılan bu yöntemde alkali pH da farklı molekül ağırlıklarına ve elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda göçleri esasına dayanır. Değerlendirmede ise elde edilen DNA migrasyon görüntülerine göre yapılmakta olup farklı aşamalardan oluşmaktadır (Ostling ve Johanson, 1984; Singh ve ark., 2003).

2.8.1. Spermının Yıkanması

Donduruluş sperma payetleri 37 °C'de 30 sn çözdürölüp ependorf tüplere aktarıldı. Spermalar Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen fosfat buffer solüsyon (PBS) ile 1:1 oranında sulandırılarak +4 °C'ye ayarlı 800 x g'de 10 dk santrifüj edilerek yıkandı. Santrifüj bitiminde süpernatant atılarak sperma tekrar sulandırıldı ve santrifüj işlemi tekrarlandı. Süpernatant tekrar atılarak sperma ml'de 20x10⁶ olacak şekilde tekrar PBS ile sulandırıldı (Fraser ve Strzezek, 2004; Nandre, 2007).

2.8.2. Slaytların Hazırlanması

PBS içerisinde hazırlanmış % 0.75'lik düşük kaynama dereceli agaroz (low melting agar, LMA) jelden 120 µl alınarak özel olarak buzlanmış lamlar üzerine damlatıldı ve froti şeklinde yayılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Dilüe edilmiş olan sperma süspansiyondan 5 µl alınarak 85 µl % 1 oranında LMA jel ile 37 °C'de karıştırılarak birinci agaroz kat üzerine tabakalandırılıp 24 x 60 mm lamel ile kapatılarak +4 °C'de katılaşması için bekletildi. Katılaşma işleminden sonra lameller dikkatlice çekilerek slaytlar hazırlandı (Hughes ve ark., 1997; Singh ve ark., 2003).

2.8.3. Hücre Lizisi

Lizis solüsyonu hücre ve çekirdek zarını lize edip DNA sarmallarının agaroz içinde serbest kalmasını sağlamak amacıyla kullanılmakta olup spermatozoonlar lam üzerinde agaroz jele gömüldükten sonra, slaytlar yüksek yoğunlukta tuz ve deterjan içeren CometAssayTM, Reagent Kit for Single Cell Gel Electrophoresis Assay kit içindeki lizis solüsyonunda yaklaşık 1 saat süre ile +4 °C'de inkübe edildi. Bir saat sonunda lizis solüsyonuna 40 mM dithioerithrol (DTT) eklenerek slaytlar 1 saat +4 °C'de inkübe edildi. Daha sonra lizis solüsyonuna 100 µg/ml proteinase K eklenerek slaytlar 37 °C'de bir gece inkübe edildi (Hughes ve ark., 1997; Singh ve ark., 2003).

2.8.4. Slaytların Elektroforezi

Elektroforezde yürütmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar taze olarak hazırlanmış ve soğutulmuş elektroforez tamponunda 20 dk. inkübasyona bırakıldı. Agarozaya gömülü spermatozoonların elektroforez tamponunda (300 mM NaOH ve 1 mM EDTA, pH 12.5) inkübasyonu tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözelti içerisinde 300 mA ve 20 volt'luk elektriksel alanda 20 dk. işleme tabi tutuldu (Hughes ve ark., 1997; Singh ve ark., 2003).

2.8.5. Slaytların Nötralizasyonu

Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali elektroforez çözeltisini slaytlardan uzaklaştırmak için slaytlar taze hazırlanmış Tris tamponuyla (40 mM Tris HCl, pH 7.4) 3 kez yıkanarak nötralizasyon sağlandı (Hughes ve ark., 1997; Singh ve ark., 2003).

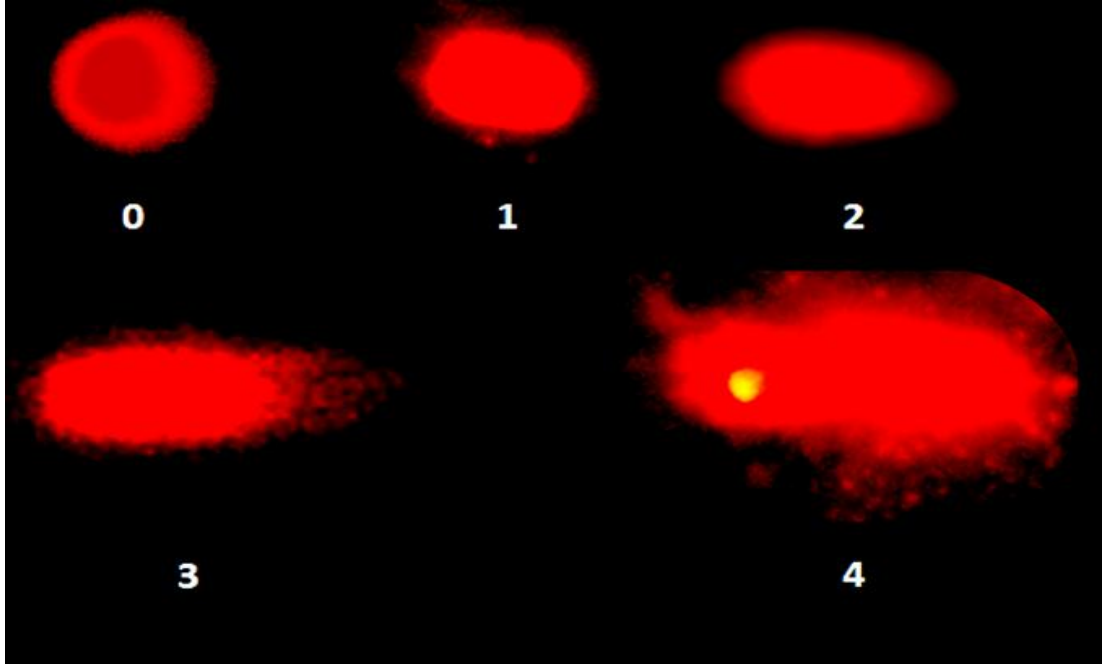
2.8.6. Slaytların Boyanması

Nötralizasyon tamamlandıktan sonra slaytlar floresan boya olan ethidium bromid (5 µg/ml) kullanılarak DNA'lar boyandı ve 4 saat içinde değerlendirildi (Hu ve ark., 2008).

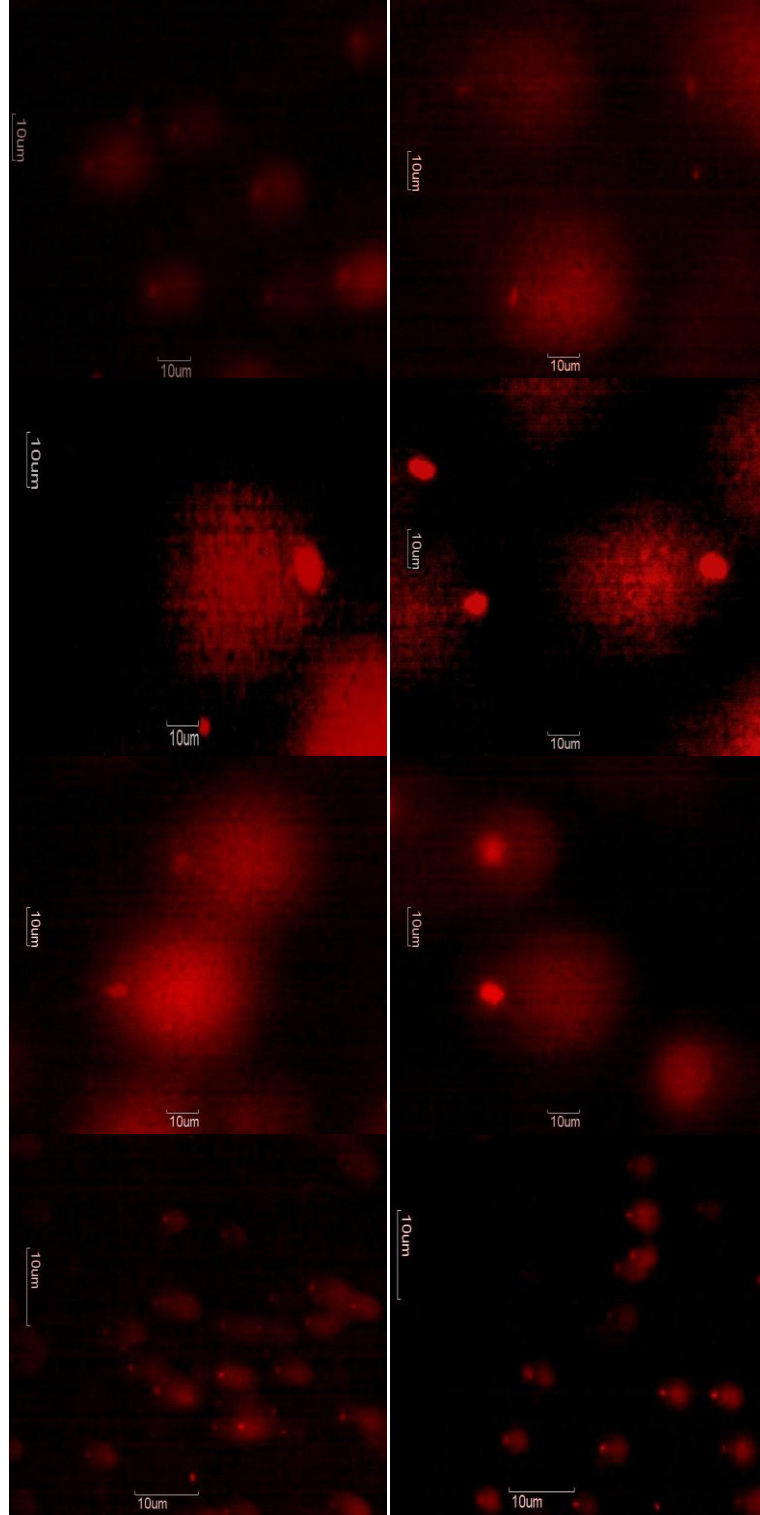
2.8.7. Slaytların Değerlendirilmesi

Ethidium bromide ile boyanan slaytlar üzerine lamel kapatılarak 400'lük büyütme floresan ilaveli mikroskop (Olympus CX-31) ile 100 adet DNA görüntüsü değerlendirildi.

Değerlendirme görsel skorlama yöntemi ile gerçekleştirildi (Resim 2.5). Migrasyon uzunluğu fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırıklarına ve alkali-labil bölgelerin seviyesine bağlı olarak değişiklik gösterdiğinden, oluşan hasarın derecesine göre DNA görüntüleri 5 alt katagoride sınıflandırılarak puanlama yapıldı (Resim 2.6). Hiç hasar olmayan DNA'lar 0, hasar olan DNA'lar ise hasarın derecesine göre 1'den 4'e kadar puanlandırıldı. Sonuçlar arbitrary unit (AU) olarak değerlendirildi (Collins, 2004). Her antioksidan grup için sonuçlar toplanarak kaydedildi.



Resim 2.5. Görsel Skorlama Tekniği İle Hücrelerin Sınıflandırılması (0: Hasarsız DNA Görüntüsü, 1-4: Hasarlı DNA'ların hasar derecelerine göre puanlandırılması)



Resim 2.6. Spermatozoonlardaki DNA hasarları

2.9. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametrelerinin değerlendirilmesi amacıyla spermatozoonları sulandırıcıdan ayırmak için soğutmalı santrifüj ile 800 g'de 20 dk. boyunca santrifüj edildi ve spermatozoonları bu şekilde PBS ile 3 kez yıkandı ardından süpernatant PBS ile 0.5 ml'ye tamamlandı. Homojenizasyon için örnekler buz içerisindeki falkon tüplere alınarak 10 sn süreli sonikasyon işlemi ardından 30 sn buz içerisinde bekletilmek suretiyle sonikasyon işlemi 6 kez tekrarlandı. Lipit peroksidasyon analizi için 120 µl homojenat alınıp üzerine 10 µl 0.5 mM BHT (bütil hidroksi toluen) ilave edilip karıştırıldı. Tüm homojenatlar analizler yapılincaya kadar -20 °C'de saklandı (Başpınar ve ark., 2011a).

2.9.1. Glutatyon

Spermatozoon GSH içeriği Sedlak ve Lindsay (1968) metodu kullanılarak ölçüldü. Örnekler % 50 trikloroasetik asit ile çöktürüldükten sonra 5 dk. 1000 g'de santrifüj edildi. Reaksiyon karışımı 0.5 ml süpernatant, 2.0 ml Tris-EDTA tamponu (0.2 mol/l; pH 8.9) ve 0.1 ml 0.01 mol/l 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoik asit içermektedir. Çözeltinin konsantrasyonu spektrofotometrede 412 nm'de ölçülmesi ile belirlendi. GSH değerleri mg/dl olarak tayin edildi.

2.9.2. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz aktivitesi Sigma-Aldrich CGP1 (Chemical Co. USA) kiti ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kitin işlem prosedürüne göre glutatyon peroksidaz tarafından organik peroksitlerin reaksiyonu sonucu oluşan okside glutatyon, glutatyon redüktaz tarafından tekrar redükte edilmektedir. Redüksiyon aşamasında NADPH'ın NADP⁺'ya dönüşümü 340 nm'de azalan absorbansa neden olmakta ve

GSH-Px aktivitesi belirlenmektedir. 340 nm'deki absorbans düşüşüyle GSH-Px aktivitesi ters orantılıdır. Sonuçlar nmol/dk/ml olarak belirlendi.

2.9.3. Katalaz

Katalaz aktivitesi Sigma–Aldrich CAT 100 (Chemical Co. USA) kiti ile kolorimetrik olarak ölçüldü. Kitin işlem prosedürüne göre hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüşümü katalaz aktivitesi ile doğru orantılı olduğundan örnekler bilinen bir konsantrasyonda hidrojen peroksit ile reaksiyona girdikten sonra 1 dk'lık inkübasyonun ardından sodyum azid ile reaksiyon durduruldu. Geriye kalan hidrojen peroksit 4-aminophenazone ve 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic asit ile oksidatif reaksiyona girerek belirlendi. 520 nm'deki absorbansı ile Katalaz aktivitesi değerlendirilerek sonuçlar $\mu\text{mol/dk/ml}$ olarak kaydedildi.

2.9.4. Lipit Peroksidasyon

MDA ile thiobarbituric asitin (TBA) reaksiyona girip eflatun mor rengin oluşup spektrofotometrede 532 nm'de ölçülmesi esasına dayanan Draper ve Hadley (1990)'in çift kaynatma metodu ile belirlendi. MDA değerleri nmol/ml olarak kaydedildi.

2.9.5. Süperoksid Dismutaz

Süperoksid dismutaz aktivitesi Sigma-Aldrich Fluka FL19160 (Chemical Co. USA) kiti ile ölçüldü. Kitin işlem prosedürüne göre ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan süperoksid anyonları kromojen olarak kullanılan nitroblue tetrazolium (NBT) ile belirlendi. NBT, süperoksid anyonu ile reaksiyona girerek indirgenmekte ve formazon boyası meydana gelmektedir ve bu indirgenme SOD ile

inhibe olmaktadır. Formazon renk yoğunluğunun azalması SOD aktivitesinin yüksekliğini göstermektedir. 450 nm'deki absorbans düşüşü ile SOD aktivitesi arasında ters bir orantı vardır. Sonuçlar 10^9 hücre/ml olarak belirlendi.

2.10. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Gruplar arası farkın önemini belirlemek için Post-hoc Tukey testi kullanıldı. Analizler bilgisayar ortamında SPSS (16.0) paket programı yardımıyla gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

3.1. Dondurma Öncesi Spermatolojik Parametreler

Araştırmada kullanılan 2-3 yaşlarındaki 10 Pırlak koça ait birleştirilmiş ejakulatlarda elde edilen ortalama spermatolojik özellikler Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Dondurma öncesi başlıca spermatolojik parametreler ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:10).

Parametre	Ortalama ($\bar{X} \pm \text{S.E.M}$)
Viskozite (1-5)	3.3 \pm 0.13
pH (5.0-10.0)	6.6 \pm 0.06
Mass Aktivite (0-5)	4.0 \pm 0.12
Motilite (%)	83.8 \pm 1.57
Yoğunluk ($\times 10^9/\text{ml}$)	4.1 \pm 0.10
Anormal Baş Oranı (%)	1.2 \pm 0.09
Anormal Orta Kısım Oranı (%)	0.7 \pm 0.11
Anormal Kuyruk Oranı (%)	5.5 \pm 0.43
Toplam Anormal Spermatozoon Oranı (%)	7.3 \pm 0.48
H+/E- (%)	63.4 \pm 1.00
H-/E- (%)	21.3 \pm 1.12
H+/E+ (%)	4.0 \pm 0.62
H-/E+ (%)	11.3 \pm 0.49

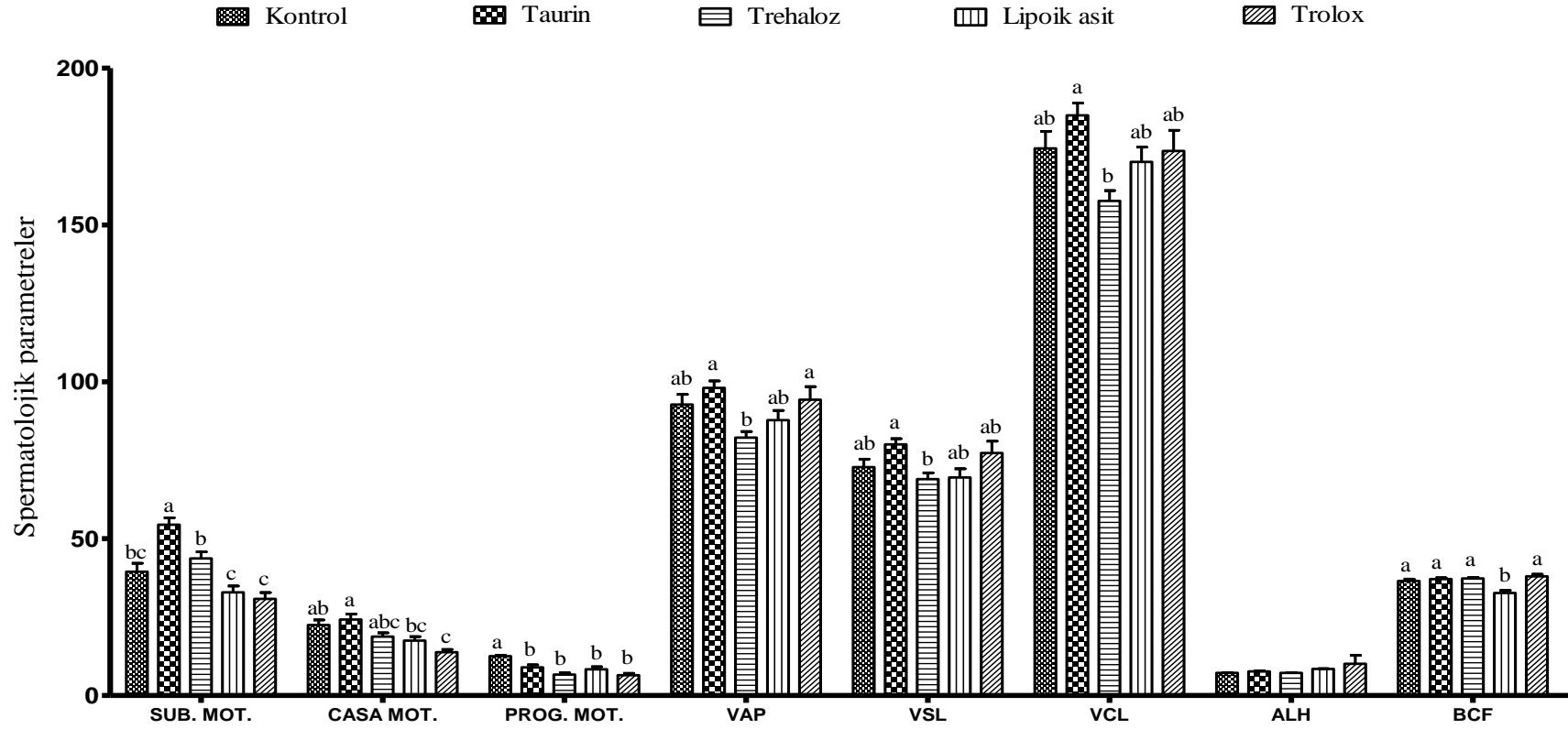
3.2. Dondurma-Çözdürme Sonrası Spermatolojik Parametreler

Dondurma-çözdürme sonrası elde edilen subjektif motilite ve CASA parametrelerine ait bulgular Çizelge 3.2’de, dağılımları ise Şekil 3.1’de sunulmuştur. Buna göre subjektif motilite yönünden taurin içeren grup, hem kontrol hem de diğer gruplara göre belirgin bir üstünlük sağladığı ($P < 0.05$) gözlemlendi. CASA motilitesi açısından kontrol grubuna göre trolox içeren gruptaki düşüş önemli ($P < 0.05$) bulundu.

Çizelge 3.2. Dondurma-çözdürme sonrası spermatojlojik parametreler ($\bar{X} \pm SEM$, n:24).

Gruplar	Subjektif Motilite (%)	CASA Parametreleri						
		Casa Motilite (%)	Progressif Motilite (%)	VAP ($\mu\text{m} / \text{s}$)	VSL ($\mu\text{m} / \text{s}$)	VCL ($\mu\text{m} / \text{s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Kontrol	39.6 ± 2.78^{bc}	22.5 ± 1.63^{ab}	12.6 ± 0.32^a	92.9 ± 3.28^{ab}	72.8 ± 2.69^{ab}	174.3 ± 5.52^{ab}	7.2 ± 0.17	36.6 ± 0.61^a
Taurin	54.6 ± 2.25^a	24.2 ± 1.84^a	9.0 ± 0.88^b	98.2 ± 2.20^a	80.1 ± 1.88^a	185.1 ± 3.94^a	7.8 ± 0.12	37.1 ± 0.41^a
Trehaloz	43.8 ± 2.15^b	18.9 ± 1.22^{abc}	6.8 ± 0.58^b	82.3 ± 2.02^b	69.1 ± 2.02^b	157.7 ± 3.35^b	7.3 ± 0.12	37.4 ± 0.45^a
Lipoik Asit	32.9 ± 2.03^c	17.6 ± 1.39^{bc}	8.4 ± 0.81^b	87.8 ± 3.12^{ab}	69.5 ± 2.83^{ab}	170.1 ± 4.79^{ab}	8.6 ± 0.15	32.7 ± 0.86^b
Trolox	30.8 ± 2.07^c	13.9 ± 0.99^c	6.5 ± 0.64^b	94.3 ± 4.20^a	77.3 ± 3.83^{ab}	173.6 ± 6.63^{ab}	10.2 ± 2.78	38.0 ± 0.71^a

a-c: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir ($P < 0.05$).



Şekil 3.1. Subjektif motilite ve CASA parametreleri

VAP, VSL, VCL ve ALH açısından kontrol ve antioksidan içeren gruplar arasında bir fark ($P>0.05$) bulunamadı. BCF bakımından kontrol grubuna göre lipoik asit içeren gruptaki düşüş önemli ($P<0.05$) bulundu.

3.3. Dondurma-Çözdürme Sonrası Anormal Spermatozoon Oranları

Araştırmada çözüm sonrası anormal spermatozoon ve akrozom ile ilgili elde edilen bulgular Çizelge 3.3'de, dağılımları ise Şekil 3.2'de verilmiştir. Buna göre baş anomalileri yönünden kontrol grubuna göre trehaloz ve trolox gruplarındaki azalma, orta kısım açısından kontrol grubuna göre antioksidan içeren tüm gruplardaki düşüş, kuyruk kısmı ve toplam anormal spermatozoon oranı açısından kontrol grubuna göre trehaloz grubundaki artışın önemli ($P<0.05$) olduğu tespit edildi. Bununla beraber anormal akrozom oranı açısından kontrol grubuna göre tüm antioksidan içeren gruplardaki azalma önemli ($P<0.05$) bulunmuştur.

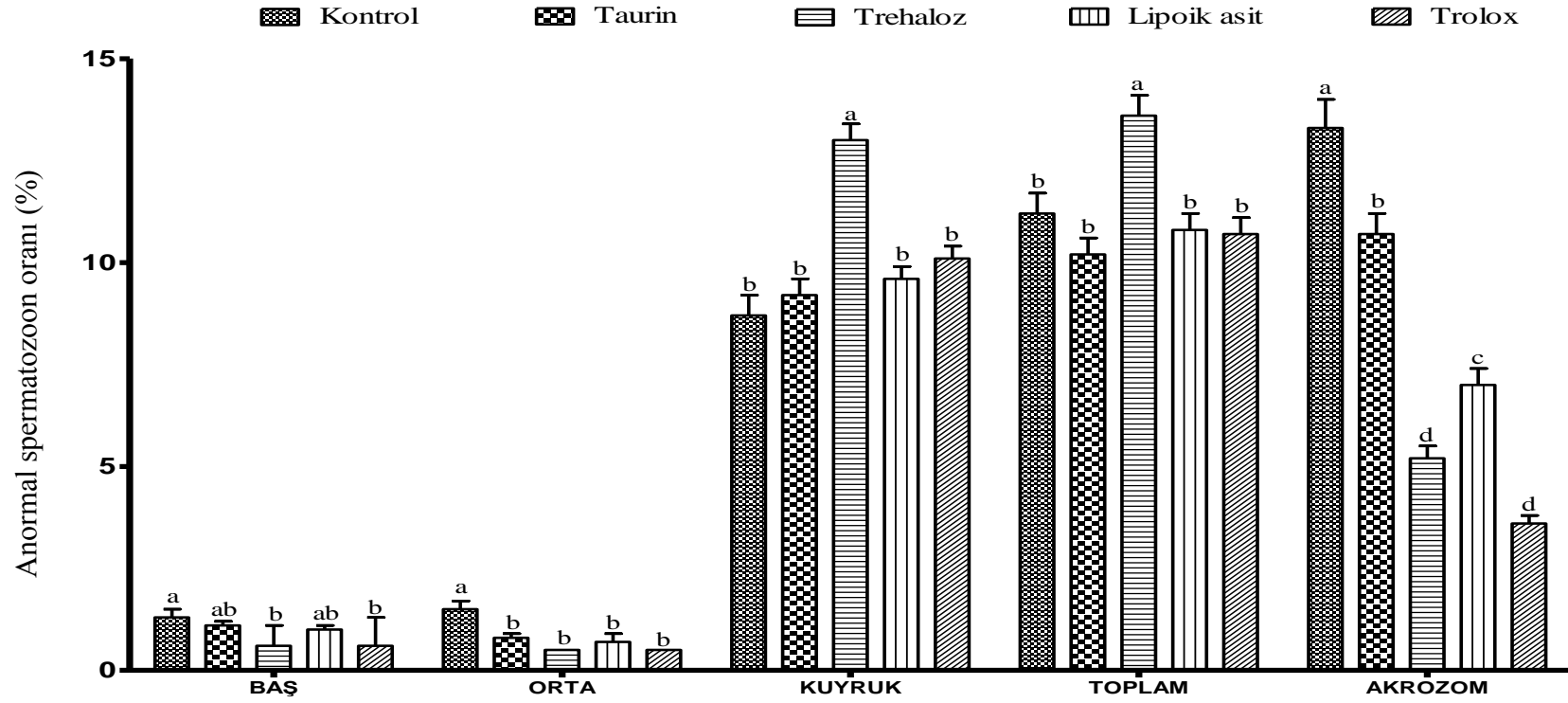
3.4. Dondurma-Çözdürme Sonrası HE-Test Parametreleri

Dondurma-çözdürme sonrası HE-test sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 3.4'de parametrelerin dağılımları ise Şekil 3.3'de verildi. Modifiye HOS Test yönünden değerlendirdiğimizde, H+/E- oranı açısından kontrol grubuna göre taurin, trehaloz ve lipoik asit gruplarındaki artış, H-/E- oranı yönünden kontrol grubuna göre taurin grubundaki artış ve H-/E+ oranı bakımından kontrol grubuna göre antioksidan içeren tüm gruplardaki azalmanın önemli ($P<0.05$) olduğu belirlendi.

Çizelge 3.3. Dondurma-çözdürme sonrası anormal spermatozoon oranları ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:24).

Gruplar	Anormal Spermatozoon Oranı (%)				Akrozom (%)
	Baş	Orta	Kuyruk	Toplam	
Kontrol	1.2 ± 0.21 ^a	1.2 ± 0.21 ^a	8.7 ± 0.54 ^b	11.2 ± 0.51 ^b	13.3 ± 0.70 ^a
Taurin	0.8 ± 0.15 ^{ab}	0.2 ± 0.08 ^b	9.2 ± 0.40 ^b	10.2 ± 0.43 ^b	10.7 ± 0.51 ^b
Trehaloz	0.5 ± 0.07 ^b	0.1 ± 0.04 ^b	13.1 ± 0.48 ^a	13.6 ± 0.46 ^a	5.2 ± 0.26 ^d
Lipoik Asit	1.0 ± 0.12 ^{ab}	0.2 ± 0.07 ^b	9.7 ± 0.38 ^b	10.8 ± 0.39 ^b	7.1 ± 0.41 ^c
Trolox	0.4 ± 0.08 ^b	0.1 ± 0.04 ^b	10.1 ± 0.39 ^b	10.7 ± 0.37 ^b	3.6 ± 0.21 ^d

a-d: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir ($P < 0.05$).

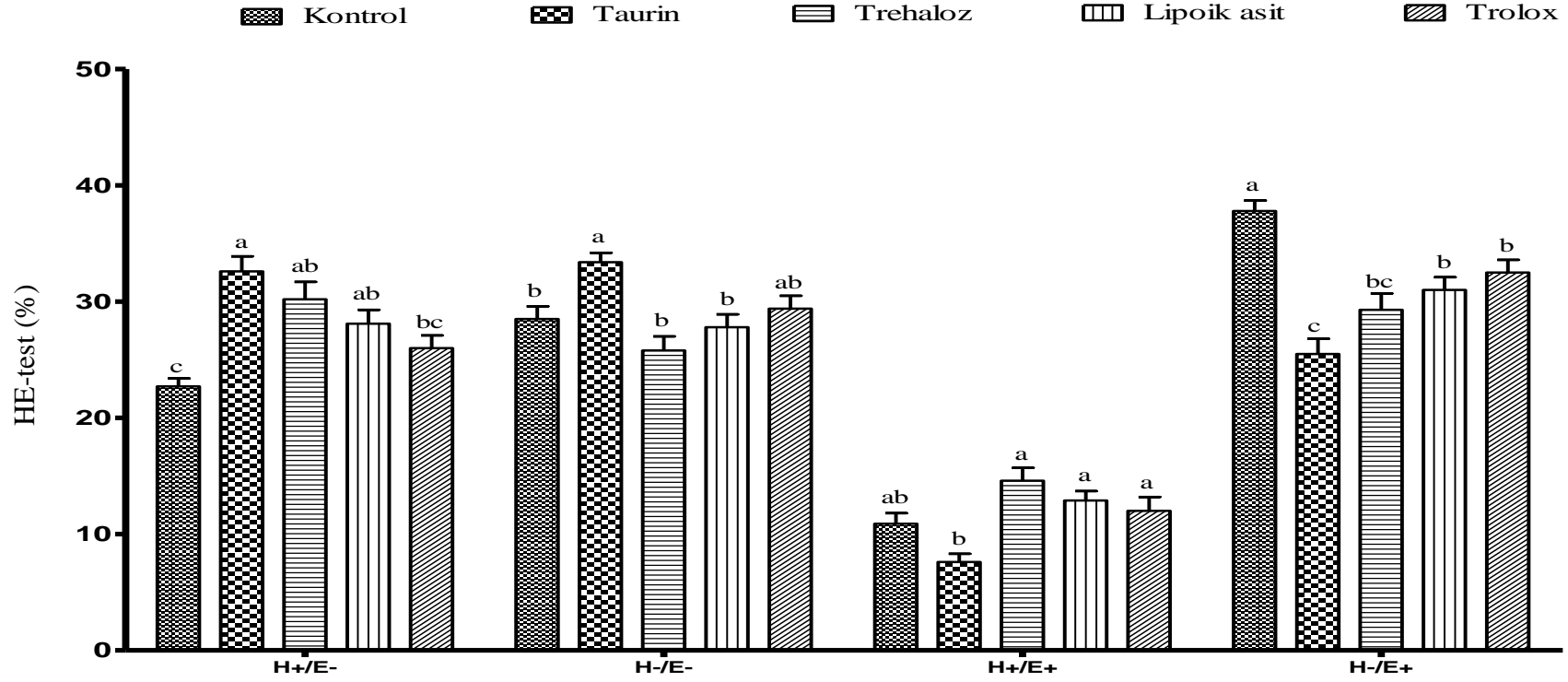


Şekil 3.2. Anormal spermatozoon oranları

Çizelge 3.4. Dondurma-çözdürme sonrası HE-test parametreleri ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:24).

Gruplar	HE-Test (%)			
	H+/E-	H-/E-	H+/E+	H-/E+
Kontrol	22.3 \pm 0.72 ^c	28.5 \pm 1.19 ^b	10.9 \pm 0.98 ^{ab}	37.8 \pm 0.90 ^a
Taurin	32.6 \pm 1.31 ^a	33.5 \pm 0.80 ^a	7.7 \pm 0.79 ^b	25.6 \pm 1.35 ^c
Trehaloz	30.2 \pm 1.52 ^{ab}	25.8 \pm 1.25 ^b	14.6 \pm 1.10 ^a	29.3 \pm 1.43 ^{bc}
Lipoik Asit	28.1 \pm 1.25 ^{ab}	27.9 \pm 1.11 ^b	12.9 \pm 0.81 ^a	31.0 \pm 1.17 ^b
Trolox	26.0 \pm 1.18 ^{bc}	29.4 \pm 1.18 ^{ab}	12.0 \pm 1.20 ^a	32.6 \pm 1.11 ^b

a-c: Aynı sütun içerisindeki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir ($P < 0.05$).



Şekil 3.3. HE-test parametreleri

3.5. Dondurma-Çözdürme Sonrası DNA Hasarları

Dondurma-çözdürme sonrası DNA hasarı yönünden elde edilen bulgular Çizelge 3.5’de gruplara ait değişimler Şekil 3.4’de sunuldu. Buna göre kontrol grubuna göre trehaloz ve lipoik asit içeren gruplardaki düşüşler istatistiki olarak önemli ($P < 0.05$) bulundu.

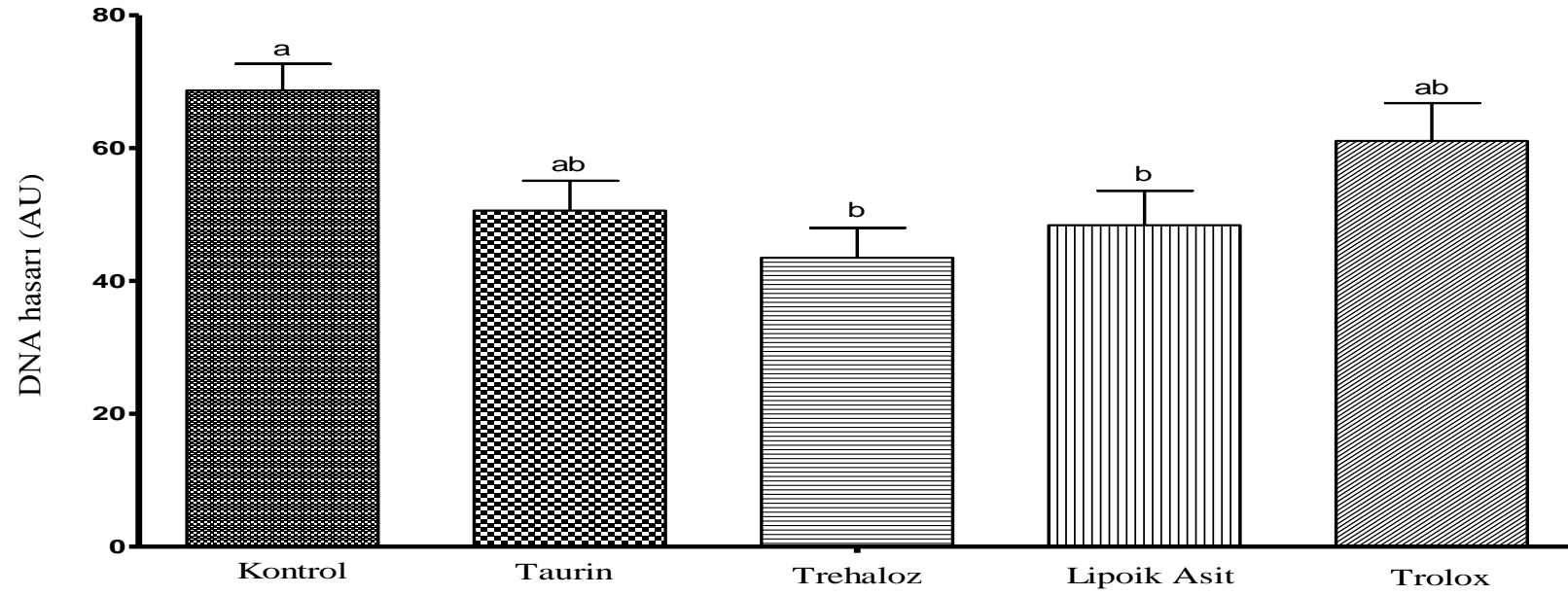
Çizelge 3.5. Dondurma-çözdürme sonrası DNA Hasarları ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:24).

Gruplar	DNA Hasarı (AU)
Kontrol	68.7 ± 4.09^a
Taurin	50.6 ± 4.50^{ab}
Trehaloz	43.5 ± 4.51^b
Lipoik Asit	48.4 ± 5.27^b
Trolox	61.2 ± 5.72^{ab}

a-b: Sütun içerisindeki farklı harfler taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir ($P < 0.05$).

3.6. Dondurma-Çözdürme Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri

Dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametrelerine ait bulgular Çizelge 3.6’da dağılımlar ise grafiksel olarak Şekil 3.5’de verildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, spermatozoon MDA düzeyleri bakımından, lipoik asit ve trolox, CAT aktivitesi bakımından taurin, trehaloz ve trolox, GSH değerleri bakımından da trehaloz, lipoik asit ve trolox gruplarındaki azalmalar istatistikî olarak önemli ($P < 0.05$) bulundu. SOD ve GSH-Px aktiviteleri bakımından kontrol ve antioksidan içeren gruplar arasında istatistiki fark ($P > 0.05$) bulunamadı.

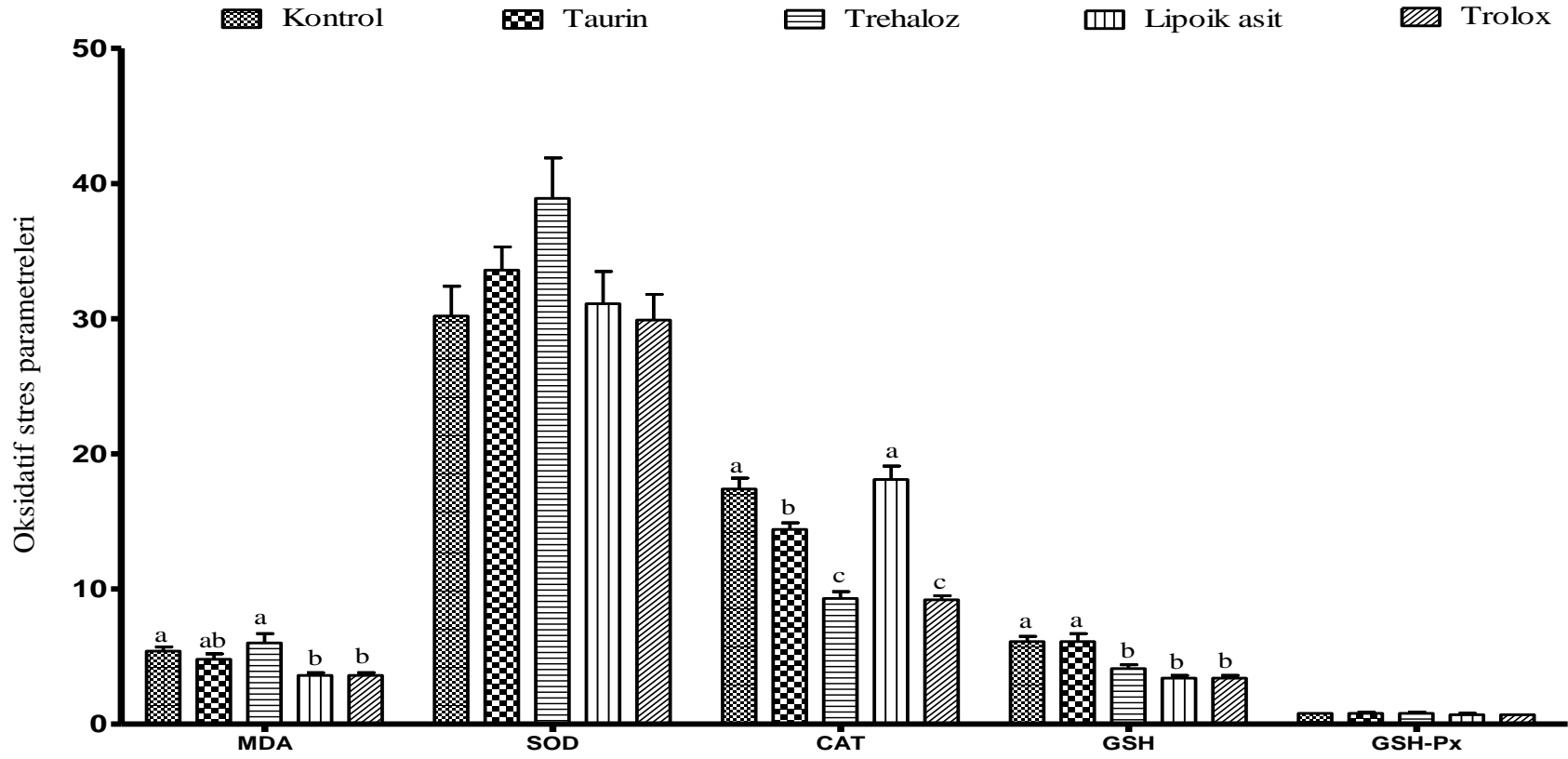


Şekil 3.4. DNA hasarları

Çizelge 3.6. Dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametreleri ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:24).

Gruplar	MDA (nmol/ml)	SOD (10 ⁹ hücre/ml)	CAT ($\mu\text{mol/dk/ml}$)	GSH (mg/dl)	GSH-Px (nmol/dk/ml)
Kontrol	5.4 \pm 0.33 ^a	30.3 \pm 2.29	17.4 \pm 0.80 ^a	6.1 \pm 0.41 ^a	0.9 \pm 0.08
Taurin	4.9 \pm 0.41 ^{ab}	33.7 \pm 1.78	14.4 \pm 0.52 ^b	6.2 \pm 0.68 ^a	0.9 \pm 0.06
Trehaloz	6.0 \pm 0.71 ^a	38.9 \pm 3.00	9.3 \pm 0.58 ^c	4.1 \pm 0.32 ^b	0.8 \pm 0.07
Lipoik Asit	3.7 \pm 0.21 ^b	31.1 \pm 2.40	18.1 \pm 1.02 ^a	3.5 \pm 0.24 ^b	0.8 \pm 0.01
Trolox	3.6 \pm 0.24 ^b	29.9 \pm 1.91	9.2 \pm 0.39 ^c	3.5 \pm 0.22 ^b	0.8 \pm 0.03

a-c: Herbir sütundaki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir (P < 0.05).



Şekil 3.5. Oksidatif stres parametreleri

4. TARTIŞMA

Koç spermasının uygun bir şekilde dondurularak Suni tohumlamada kullanılması koyun yetiştiriciliğini ve ıslahını doğrudan etkilemektedir. Koç spermatozoonları, plazma membranları içerisinde buldukları fazla miktarda doymamış yağ asitlerinde reaktif oksijen türevlerince meydana getirilen lipid peroksidasyon nedeniyle dondurma işlemine çok duyarlıdır. Spermanın dondurulması ve bu esnada gelişen olaylar spermatozoonların fonksiyonlarının hasar görmesine yol açmaktadır. Bu nedenle sperma sulandırıcılarına ilave edilen kryoprotektif maddeler ile antioksidanlar dondurma işleminin ve beraberinde gelişen olumsuz etkileri en aza indirebilmektedir. Sunulan bu tez çalışmasında sperma sulandırıcısına ilave edilen taurin, trehaloz, trolox ve özellikle lipoik asitin spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkileri incelendi.

On Pırlak koçtan alınarak birleştirilen spermanın spermatolojik muayeneleri sonucu elde edilen bulgulara (Çizelge 3.1) göre taze spermaya ait spermatolojik parametrelerden viskozite ile ilgili olarak elde edilen bulgular bazı araştırmacıların (Gündoğan, 1997; Gündoğan, 1999; Gündoğan ve ark., 2002; Yeni, 2010) elde ettikleri değerlerden düşük bulunmuştur. pH ile ilgili olarak elde edilen bulgular bazı araştırmacıların (Gündoğan ve ark., 2002; Yeni, 2010) bulgularına yakın bazı araştırmacıların (Soylu ve ark., 1991; Uysal ve ark., 2003) değerlerinden düşük ve bazı araştırmacıların (Aral ve Tekin, 1996; Gündoğan, 1999) bulgularından yüksek tespit edilmiştir.

Mass aktivite yönünden elde edilen değerler bazı araştırmacıların (Ataman ve ark., 1996; Soylu ve ark., 1991) bulguları ile paralellik arz etmektedir. Bunun yanında yine mass aktivite ile ilgili olarak kimi araştırmacıların (Aral ve Tekin, 1999; Aral ve Aral, 2004; Gündoğan, 1997; Gündoğan, 1999; Gündoğan ve ark., 2002) buldukları değerlerden düşük ve bazı araştırmacıların (Günay ve ark., 2003; Kafi ve ark., 2004; Rege ve ark., 2000; Yeni, 2010) bulgularından ise yüksek olmuştur.

Çalışmada motilite bakımından elde edilen bulgular kimi araştırmacıların (Aksoy ve ark., 1994; Ataman ve ark., 1996; Aral ve Tekin, 1996; Mathur ve ark., 1989; Mert ve ark., 2009; Soylu ve ark., 1991; Yeni, 2010) değerlerine yakın kimi araştırmacıların (Gündoğan, 1999; Gündoğan, 2003; Karagiannidis ve ark., 2000; Taha ve ark., 2000; Türk ve Demirci, 2005; Simplicio ve ark., 1982) bulgularından yüksek, Öztürkler ve ark. (1997) bildirdiği değerden ise düşük bulundu.

Spermatozoon yoğunluğu bakımından elde edilen değerler ise bazı araştırmacıların (Aksoy ve ark., 1994; Aral ve Aral, 2004; Aral ve Tekin, 1996; Demirci, 1993; Gündoğan, 1997; Gündoğan, 1999; Kaya ve ark., 1999; Türk ve Demirci, 2005; Uysal ve ark., 2003; Yeni, 2010) bulgularından yüksek bazı araştırmacıların (Gündoğan, 2006; Gündoğan ve ark., 2002; Gündoğan ve Serteser, 2005; Kafi ve ark., 2004; Langford ve ark., 1998; Pirinçci ve ark., 2001; Taha ve ark., 2000) bildirdiği değerlerden de düşük bulunurken Karagiannidis ve ark. (2000) bildirdiği değerlerle paralellik arz ettiği gözlenmiştir.

Anormal spermatozoon baş, orta, kuyruk ve toplam oranları bakımından elde edilen bulgular kimi araştırmacıların (Ataman ve ark., 1998; Baran ve ark., 2009; Aksoy ve ark., 1993; Ataman ve ark., 1996; Colas ve ark., 1985; Kaya ve ark., 1999; Taha ve ark., 2000; Uysal ve ark., 2003) bulgularından düşük bazı araştırmacıların (Aral ve Aral, 2004; Aral ve Tekin, 1996; Demirci, 1993; Gündoğan, 1999; Gündoğan, 2006; Gündoğan ve ark., 2002; Gündoğan ve Serteser, 2005) değerlerinden yüksek tespit edilmiştir.

Spermatozoon HE-test tiplerinin tümü yönünden elde edilen değerler Gündoğan ve ark. (2011)'nin Pırlak koçlarda spermanın tris ile sulandırılması sonrası 0. saatte elde ettiği değerler ile paralellik arz ederken, Gündoğan ve ark. (2010)'nin Pırlak koçlarda spermanın tris ile sulandırılması sonrası 0. saatte 25 ve 100 milyon yoğunluklu gruplarda H+/E- yönünden elde ettiği değerlerden yüksek bulunmuştur.

Bu araştırmada elde edilen taze ko ejakülatlarında dondurma işleminden önce saptanan başlıca spermatolojik özelliklerin ortalama değerlerine ilişkin bulgular ile diğer araştırmacıların bildirdiği bulgular arasında görülen farklar, araştırmada kullanılan koçların ırkına, yaşlarına, sperma alma metodu ve zamanına bağlı olabileceği gibi bakım-besleme, mevsim ve evre koşullarının farklılıklarından da kaynaklanabilir. Diğer taraftan sperma alma zamanı, muayeneyi yapan kişi ve muayene tekniğinde elde edilen verilerin farklılığında payı olabilir. Bununla birlikte genel olarak değerlendirdiğimizde elde edilen spermatolojik parametrelerin, koçlarda bildirilen optimal değerlerle uyum içerisinde bulunduğu ve alınan spermaların dondurulmaya elverişli olduğu gözlenmiştir.

Dondurulmuş-özdürölmüş sperma, taze spermaya göre peroksidasyona daha duyarlıdır. Son zamanlardaki araştırmalar spermanın saklanması sırasında infertiliteye yol açan en önemli sebebin spermatozoon membran lipitlerinin peroksidasyonun olduğunu göstermektedir. Bu nedenle ko spermasının dondurulmasında, özdürme sonrası spermatolojik parametreler üzerine olumlu etkileri olabileceği düşünöldüğünden, sperma sulandırıcılarına antioksidan maddeler katılmaktadır. Dondurulmuş-özdürölmüş spermada azalan antioksidan kapasite ve artan reaktif oksijen radikallerinin oluşumu, spermatolojik özellikleri ve fertiliteyi olumsuz olarak etkiler (Chen ve ark., 1993; Sinha ve ark., 1996). Yapılan tez çalışmasında çözüm sonrası, 24 örnekten elde edilen subjektif spermatozoon motilitesi en yüksek taurin içeren grupta elde edilmiştir (izelge 3.2, şekil 3.1). Subjektif motilite bakımından taurin içeren grubun kontrol grubuna göre sağladığı üstünlük önemlilik ($P<0.05$) arz etmektedir.

Bucak ve ark. (2007) tris bazlı ko sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonda ilave ettikleri trehaloz (50, 100 mM), taurin (25, 50 mM), cysteamine (5, 10 mM), hyaluronik asit (0,5, 1 mg/ml) alışmalarında özdürme sonrası kontrol, 100 mM trehaloz ve 50 mM taurin ilave edilen gruplardaki ortalama motilite oranlarını sırasıyla % 47.5 ± 4.3 , % 56.0 ± 2.9 ve % 56.0 ± 2.9 olarak bildirmektedirler.

Uysal ve ark. (2007) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonda GSSG, BSA, Sistein ve Lycopene ilave ettikleri çalışmalarında dondurma-çözdürme sonrası kontrol grubunda motilite değerini ortalama 39.5 ± 2.73 olarak bulmuşlardır.

Anela ve ark. (2003) üç farklı dondurma protokolü uygulayarak dondurdukları koç spermasında 35°C 'de gliserol ilave ederek 2 saat inkübsayon uyguladığı tris bazlı sulandırıcı grubunda çözüm sonrası motilite değerini ortalama 63.2 ± 11.1 bulduklarını bildirmişlerdir.

Başpınar ve ark. (2011a) tris bazlı sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonlarda (1, 2, 4 mM) alfa lipoik asit ilave ederek dondurdukları Merinos koç spermasında çözüm sonrası 1mM ilave edilen grupta motilite oranını ortalama 74.3 ± 1.3 olarak tespit etmişlerdir. Ritar ve Ball (1993) Tris - sitrik asit - glikoz - yumurta sarısı - gliserol sulandırıcısı kullanılarak 1/0.5 ve 1/2 sulandırma oranlarında çözdürme sonrası ortalama motilite oranlarını sırasıyla 37.9 ± 0.81 ve 43.9 ± 0.86 olarak bulmuşlardır. Söderquist ve ark. (1999) payetlerde dondurulmuş koç spermasını 70°C (5 sn), 50°C (9 sn) ve 35°C 'de (12 sn) çözdürerek çözüm sonrası ortalama motilite değerlerini sırasıyla 67.0 ± 1.1 , 65.0 ± 1.1 , 63.1 ± 11 olarak saptadıklarını ve 70°C ile 50°C arasında önemli bir istatistiksel fark olmadığını bildirmektedirler.

Aisen ve ark. (2000) koç spermasının dondurulmasında kullanılan sulandırıcıya 76 g/L trehaloz katımı sonucu soğutma sonrası ve çözdürme sonrası ortalama motilite oranlarını sırasıyla 85.0 ± 2.0 ve 64.0 ± 2.6 bulduklarını bildirmişlerdir.

Tekin ve ark. (2006) farklı taurin dozlarının ve dondurma hızının koç spermasının dondurulması üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, koç spermasını 20 mM, 50 mM, 80 mM taurinli ve antioksidansız tris (kontrol) sulandırıcılarıyla dondurdukları çalışmadan elde ettikleri spermatozoon motilite oranlarını sırasıyla %

38.7, % 31.1, % 26.5, % 34.4 olarak bildirmişler ve koç spermasının dondurulmasında değişik taurin dozlarının çözüm sonrası spermatozoon motilitesine olumlu etki yapmadığını belirtmektedirler.

Sanchez-Partida ve ark. (1997) tris bazlı sperma sulandırıcısına farklı antioksidanlar katarak dondurdukları koç spermalarında çözündürme sonrası 50 mM taurin katılmış grupta motilite oranını % 60'ın üzerinde bulduklarını bildirmektedirler. Andreea ve Stela (2010) tris bazlı sulandırıcıya vitamin E ve sistein ilave ederek dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası vitamin E ilave edilen grupta ortalama motilite oranını 59.16 ± 0.86 olarak tespit etmişlerdir.

Anghel ve ark. (2010) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonlarda bovine serum albumin (BSA), sistein ve vitamin E ilave ederek dondurdukları spermalarda çözüm sonrası 1 mM vitamin E ilave edilen grupta motilite değerini ortalama 62.61 ± 1.53 bulduklarını bildirmişlerdir. Kulaksız ve ark. (2010) tris bazlı sulandırıcılara % 15 oranında farklı kanatlı yumurta sarıları ilave ederek dondurdukları Karayaka koç spermasında çözüm sonrası tavuk yumurta sarısı grubunda ortalama motilite oranını 35 ± 1.6 bulmuşlardır. Arı ve ark. (2011) farklı sulandırıcılar ile dondurdukları Tuj ırkı koç spermasında çözüm sonrası tris bazlı sulandırıcıda ortalama motilite değerini 14.1 ± 8.6 olarak bildirmektedirler. Çoyan ve ark. (2011) tris bazlı sulandırıcıya farklı konsantrasyonda antioksidanlar ilave ederek dondurdukları Merinos koç spermasında çözüm sonrası kontrol grubunda ortalama motilite değerini 69.0 ± 2.3 olarak bulmuşlardır.

Nur ve ark. (2011) bioxel sperma sulandırıcısı ile hızlı ve yavaş yöntemle dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası ortalama motilite oranlarını 42.8 ± 8.8 ve 36.5 ± 9.9 bulduklarını belirtmişlerdir. Başpınar ve ark. (2011b) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonda dithioerythritol (DTE) ilave ettikleri araştırmalarında çözüm sonrası kontrol grubunda ortalama motilite değerini 52.0 ± 4.9 olarak tespit etmişlerdir. Bucak ve ark. (2009) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonda antioksidanlar ilave ettikleri çalışmalarında

çözdürme sonrası kontrol grubunda ortalama motilite oranını % 50.7 ± 2.5 olarak bulmuşlardır.

Çözüm sonrası spermatozoon motilitesinde gözlenen farklılıklar dondurma işleminde kullanılan sulandırıcılar ile sulandırıcıların içerdiği komponentlerin miktar ve oranlarının, özellikle sperma sulandırıcısının içerdiği yumurta sarısı oranlarının farklılığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Sperma sulandırıcılarına katılan antioksidanların miktar ve içeriklerinde rolü olabilir. Ayrıca bu farklılıklar spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan tekniklerden çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimlerden ve analizi yapan kişi gibi faktörlerin yanında sperma alma metodu, ırk, mevsim ve bakım beslenme koşullarından da kaynaklanabilir.

Sunulan çalışmada çözüm sonrası, 24 örnekten elde edilen CASA parametrelerine ait değerler Çizelge 3.2’de belirtilmiştir. CASA motilitesi açısından kontrol grubuna göre trolox içeren gruptaki düşüş önemli ($P < 0.05$) bulundu (Şekil 3.1). CASA progressif motilite sonuçları bakımından antioksidan içeren gruplar ile kontrol grubu arasında fark önemli ($P < 0.05$) bulundu. Spermatolojik CASA parametrelerinden VAP, VSL, VCL ve ALH yönünden kontrol grubu ile antioksidan içeren gruplar arasında fark ($P > 0.05$) bulunamamıştır. Çalışmada en düşük BCF değeri lipoik asit içeren grupta elde edildi ve BCF açısından lipoik asit içeren gruptaki düşüş istatistiki olarak önemli ($P < 0.05$) bulundu.

Anela ve ark. (2003) üç farklı dondurma protokolü uygulayarak dondurdukları koç spermasında $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de gliserol ilave ederek 2 saat inkübasyon uyguladığı tris bazlı sulandırıcı grubunda çözüm sonrası CASA parametrelerinden ortalama VAP ($\mu\text{m/s}$) ve VSL ($\mu\text{m/s}$) değerlerini sırasıyla 74.4 ± 10.9 ve 67.3 ± 10.8 olarak bulmuşlardır. Leahy ve ark. (2010) tris bazlı sperma sulandırıcısı ile dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası ortalama VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), ALH (μm) ve BCF (Hz) değerlerini sırasıyla 164.1 ± 4.8 , 147.8 ± 4.7 , 238.8 ± 6.7 , 6.8 ± 0.2 ve 42.7 ± 0.8 olarak bildirmektedirler.

Çoyan ve ark. (2011) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonda antioksidanlar ilave ettikleri çalışmalarında çözündürme sonrası kontrol grubunda elde ettikleri CASA parametreleri olan motilite, progressif motilite, VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$) ve ALH (μm) oranları sırasıyla ortalama 50.9 ± 3.1 , 19.6 ± 1.1 , 109.7 ± 2.6 , 97.6 ± 2.8 , 183.1 ± 7.2 ve 7.2 ± 0.2 bulduklarını bildirmişlerdir. Başpınar ve ark. (2011b) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına DTE'nin farklı konsantrasyonlarını ilave ettikleri araştırmalarında çözüm sonrası kontrol grubundaki CASA parametrelerinden motilite, progressif motilite, VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$) ve ALH (μm) değerlerini sırasıyla ortalama 44.2 ± 8.7 , 15.0 ± 2.5 , 114.9 ± 1.8 , 104.3 ± 2.2 , 184.8 ± 3.3 ve 6.4 ± 0.4 olarak tespit etmişlerdir. Sicherle ve ark. (2011) süt bazlı sperma sulandırıcısına $100 \mu\text{g/ml}$ katalaz ve $100 \mu\text{M}$ trolox ilave ederek dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası trolox grubundaki CASA parametrelerinden motilite, progressif motilite, VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), ALH (μm) ve BCF (Hz) değerlerini sırasıyla ortalama 36.0 ± 3.59 , 22.0 ± 2.67 , 125.0 ± 6.25 , 110.0 ± 6.58 , 179.2 ± 5.98 , 6.3 ± 0.2 ve 39.3 ± 0.66 olarak bildirmektedirler.

Maia ve ark. (2009) tris bazlı sperma sulandırıcısına $50 \mu\text{g/ml}$ katalaz ve $50 \mu\text{M}$ trolox ilave ederek dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası trolox grubunda CASA parametreleri olan motilite, progressif motilite, VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), ALH (μm) ve BCF (Hz) değerleri sırasıyla ortalama 65 ± 1.5 , 26.0 ± 1.1 , 92.6 ± 1.2 , 72.3 ± 1.3 , 163.7 ± 1.6 , 7.4 ± 0.1 ve 37.1 ± 0.4 olarak bulmuşlardır.

Moustacas ve ark. (2011) tris bazlı sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonlarda doğal ve liyofilize LDL ilave ederek dondurdukları koç spermasında çözüm sonu kontrol grubunda CASA parametrelerinden VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$) ve VCL ($\mu\text{m/s}$) değerlerini sırasıyla ortalama 58.6 ± 6.3 , 56.1 ± 6.6 ve 121.5 ± 13.5 olarak tespit etmişlerdir.

Garcia-Alvarez ve ark. (2009) Manchega ırkı koçlardan elektroejakulatör ve posmortem yöntem ile aldıkları spermaları Biladyle ile sulandırıp dondurdukları çalışmalarında çözüm sonrası CASA parametreleri olan VAP ($\mu\text{m/s}$), ALH (μm) ve BCF (Hz) değerlerini sırasıyla ortalama 76.29 ± 4.80 , 117.26 ± 8.14 , 4.37 ± 0.50 , 5.48 ± 0.51 ve 7.67 ± 0.47 , 6.78 ± 0.28 olarak bildirmektedirler.

Marco-Jimenez ve ark. (2005) tris sulandırıcı ile dondurdukları Guirra ırkı koç spermasında çözüm sonrası CASA parametrelerinden motilite (%), VAP ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), ALH (μm) ve BCF (Hz) oranlarını sırasıyla ortalama 40.3 ± 1.7 , 84.3 ± 1.7 , 128.1 ± 3.3 , 68.2 ± 1.8 , 69 ± 0.4 ve 12.6 ± 0.3 bulduklarını bildirmişlerdir.

Joshi ve ark. (2005) tris sulandırıcı ile dondurdukları Garole ırkı koç spermalarında çözüm sonrası ortalama VAP ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), ALH (μm) ve BCF (Hz) değerlerini sırasıyla 77.7 ± 2.74 , 101.1 ± 3.58 , 59.9 ± 2.59 , 6.1 ± 0.19 ve 10.0 ± 0.19 olarak bulmuşlardır.

Çözüm sonrası CASA parametreleri ile ilgili olarak bildirilen değerlerin bazıları (Maia ve ark., 2009; Marco-Jimenez ve ark., 2005) ile paralellik arz etmesi bu çalışmanın benzer çalışmalar ile uyum içerisinde olduğunun göstergesidir. Bunun yanında bazı araştırmacıların (Başpınar ve ark., 2011b; Çoyan ve ark., 2011; Garcia-Alvarez ve ark., 2009; Leahy ve ark., 2010; Sicherle ve ark., 2011) bulgularından düşük ve bazılarının (Anel ve ark., 2003; Joshi ve ark., 2005; Moustacas ve ark., 2011) bulgularından da yüksek olmuştur.

Çözüm sonrası CASA parametrelerinde gözlenen farklılıklar ırk, mevsim, sperma alma metodu gibi faktörlerin yanı sıra dondurma işleminde kullanılan sulandırıcılar ile sulandırıcıların içerdiği komponentlerin miktar ve oranlarının özellikle sperma sulandırıcısının içerdiği yumurta sarısı oranlarının farklılığından ve sulandırıcının antioksidan ilave edilmeden önce santrifüj yapılıp yapılmadığından, kaynaklanmış olabilir. Ayrıca spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında

kullanılan tekniklerdeki farklılıklara, çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimlere, analizin yapılmış olduğu cihazın kurulum ve yazılım ayarları, analizi yapan kişi gibi faktörlere bağlı olarak da meydana gelmiş olabilir.

Yapılan tez çalışmasında anormal spermatozoon ve akrozom oranı ile ilgili olarak elde edilen bulgular Çizelge 3.3'de verilmiş olup baş anomalileri yönünden kontrol grubuna göre trehaloz ve trolox içeren gruplardaki azalma önemli ($P<0.05$) bulunmuştur (Şekil 3.2). Orta kısım oranı bakımından en yüksek değerler kontrol grubunda elde edilmiş ve orta kısma ait anormal spermatozoon oranı açısından kontrol grubuna göre antioksidan içeren tüm gruplardaki azalmalar önemli ($P<0.05$) olmuştur. Kuyruk kısmı açısından en yüksek oran trehaloz grubunda gözlemlendi ve bu artış istatistiki açıdan önemli ($P<0.05$) bulundu. Toplam anormal spermatozoon oranı bakımından en yüksek değer trehaloz grubunda elde edilirken toplam anormal spermatozoon oranı açısından trehaloz grubundaki artış önemli ($P<0.05$) bulundu. Anormal akrozom oranı en yüksek kontrol grubunda en düşük oran ise trehaloz ve trolox grubunda gözlemlendi. Anormal akrozom oranı yönünden kontrol grubuna göre tüm antioksidan içeren gruplardaki azalmalar ve ayrıca taurin ve lipoik asit grupları arasındaki farklar da önemli ($P<0.05$) bulunmuştur.

Bucak ve ark. (2008) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına farklı antioksidanlar ilave ettikleri çalışmalarında dondurma-çözdürme sonrası kontrol grubundaki ortalama anormal spermatozoon ve akrozom oranlarını sırasıyla % 30.25 ± 7.38 ve % 9.75 ± 2.60 bulduklarını bildirmişlerdir. Bucak ve ark. (2007) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonlarda ilave ettikleri trehaloz (50, 100 mM), taurin (25, 50 mM), cysteamine (5, 10 mM), hyaluronik asit (0,5, 1 mg/ml) çalışmalarında çözüm sonrası 100 mM trehaloz ve 50 mM taurin gruplarında ortalama anormal spermatozoon ve akrozom oranlarını sırasıyla % 22.2 ± 0.5 , % 22.6 ± 3.2 ve % 6.2 ± 0.58 , % 6.5 ± 1.17 olarak bildirmektedirler. Uysal ve ark. (2007) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonda GSSG, BSA, Sistein ve Lycopene ilave ettikleri çalışmalarında çözdürme sonrası kontrol grubundaki ortalama anormal spermatozoon ve akrozom oranlarını sırasıyla % 30.1 ± 5.30 ve % 13.4 ± 2.32 olarak tespit etmişlerdir.

Kulaksız ve ark. (2010) tris bazlı sperma sulandırıcılarına % 15 oranında farklı kanatlı yumurta sarıları ilave ederek dondurdukları Karayaka koç spermasında çözüm sonrası tavuk yumurta sarısı grubundaki ortalama anormal spermatozoon ve akrozom oranlarını sırasıyla % 51.0 ± 2.4 ve % 47.4 ± 2.3 olarak bulmuşlardır.

Anghel ve ark. (2010) tris ile sulandırılmış koç spermasına farklı konsantrasyonlarda BSA sistein ve vitamin E ilave ederek dondurdukları çalışmalarında çözüm sonrası 1 mM vitamin E ilave edilen grupta ortalama anormal spermatozoon oranını % 16.76 ± 0.53 olarak bildirmektedirler.

Tekin ve ark. (2006) farklı taurin dozlarının ve dondurma hızının koç spermasının dondurulması üzerin etkilerini araştırdıkları çalışmada, koç spermasını 20 mM, 50 mM, 80 mM taurin içeren ve kontrol grubu olmak üzere 4 farklı grup oluşturarak tris - sitrik asit – fruktoz - gliserol sulandırıcısı ile sulandırmışlar ve sıcaklığı ayarlanabilen sıvı azotla çalışan otomatik programlanabilir dondurma cihazı ile dondurmuşlardır. Çözüm sonrası ortalama anormal spermatozoon oranını sırasıyla % 18.7, % 18.4, % 17, % 19 olarak belirlemişlerdir. Koç spermasının dondurulmasında değişik taurin dozlarının çözündürme sonrası anormal spermatozoon oranlarında farklı değerler göstermesine rağmen söz konusu rakamlar istatistiksel değerlendirmede önemli bulunamamıştır.

Nur ve ark. (2011) bioxel sperma sulandırıcısı ile hızlı ve yavaş yöntemleri ile dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası ortalama anormal akrozom oranlarını sırasıyla % 31.6 ± 12.9 ve % 24.7 ± 11.1 olarak bildirmişlerdir.

Yıldız ve ark. (2000) koç ve köpeklerde taze spermadaki ve dondurma-çözündürme sonrası sperma örneklerindeki akrozomal bozukluk oranlarını saptamak için 6 farklı yöntem denemişler, Hancock solüsyonu ile koçlara ait çözüm sonrası ortalama anormal akrozom oranını % 21.7 ± 0.51 olarak saptamışlardır. Pontbriand ve ark. (1989) koç spermasını farklı dondurma yöntemi ve sulandırıcı kullanarak dondurdukları çalışmalarında tris bazlı sulandırıcı ile payette dondurdukları grupta

çözdürme sonrası elde ettikleri normal akrozom, hasarlı akrozom, eksik (missing) akrom ve kaybolmuş (loose) akrozom oranlarını sırasıyla ortalama % 31.4 ± 1.7 , % 4.6 ± 0.4 , % 9.5 ± 0.7 ve % 54.1 ± 1.7 olarak belirtmişlerdir. Arı ve ark. (2011) farklı sulandırıcılar ile dondurdukları Tuj ırkı koç spermasında çözüm sonrası tris bazlı sulandırıcı grubunda ortalama anormal akrozom oranı % 47.6 ± 11 olarak bildirmektedirler.

Çözüm sonu anormal spermatozoon oranı ile ilgili olarak elde edilen bulgular bazı araştırmacıların (Anghel ve ark., 2010; Bucak ve ark., 2007; Bucak ve ark., 2008; Kulaksız ve ark., 2010; Tekin ve ark., 2006; Uysal ve ark., 2007) değerlerinden düşük bulunurken akrozom oranı ile ilgili olarak elde edilen değerler Uysal ve ark. (2007)'nin bildirdiği değerlere yakın, bazı araştırmacıların (Arı ve ark., 2011; Bucak ve ark., 2007; Kulaksız ve ark., 2010; Nur ve ark., 2011; Yıldız ve ark., 2000) değerlerinden düşük ve kimi araştırmacıların (Bucak ve ark., 2008; Pontbriand, 1989) değerlerinden de yüksek tespit edildi.

Çözüm sonrası elde edilen anormal spermatozoon ve akrozom oranlarında gözlenen farklılıklar ırk, mevsim, sperma alma metodu gibi faktörlerin yanı sıra koçlardaki genotipik değişiklikler, sperma sulandırıcısının içeriği, sulandırıcıda kullanılan yumurta sarısının oranı, sulandırıcılardaki antioksidanlar, dondurma ve çözdürme prosedürleri, değerlendirmede kullanılan teknikler ve muayeneyi yapan kişiler arasındaki farklılıklar gibi nedenlerden kaynaklanmış olabilir.

Sunulan çalışmada HOS Test ve ölü-canlı spermatozoon oranının belirlendiği modifiye HE-test bulguları Çizelge 3.4'de sunuldu. Buna göre H+/E- değeri açısından kontrol grubuna göre taurin, trehaloz ve lipoik asit gruplarındaki artışlar istatistikî açıdan önemli ($P < 0.05$) bulundu (Şekil 3.3). H-/E- değeri açısından kontrol grubu ile taurin grubu arasındaki fark önemli ($P < 0.05$) bulundu. H+/E+ değeri bakımından gruplar arasında bir fark bulunamadı. En yüksek H-/E+ oranı kontrol grubunda gözlenmiş ve H-/E+ oranı açısından kontrol grubuna göre tüm antioksidan gruplarındaki azalma önemli ($P < 0.05$) olarak belirlenmiştir.

Gündoğan ve ark. (2011) Pırlak koçlarda farklı sulandırıcılar ile kısa süreli saklama çalışmalarında tris bazlı sulandırıcı grubunda sulandırma sonrası 0. saatteki ortalama H+/E- , H-/E- , H+/E+ ve H-/E+ oranlarını sırasıyla % 62, % 26, % 3 ve % 9 olarak bulmuşlardır. Yine Gündoğan ve ark. (2010)'nın Pırlak koçlarda spermanın tris ile sulandırılması sonrası 0. saatteki 25 ve 100 milyon yoğunluklu gruplarda H+/E- oranlarını sırasıyla ortalama % 58 ve % 49 olarak bildirmektedirler.

Akman (2007) Swiss Albino ırkı fare spermatozoonlarındaki optimal hipozmotik ozmolariteyi 20-60 mosm olarak belirledikleri çalışmalarında ortalama H+/E-, H-/E-, H+/E+ ve H-/E+ oranlarını sırasıyla % 29.6 ± 3.2 , % 23.8 ± 5.0 , % 18.1 ± 2.7 ve % 28.6 ± 1.0 olarak bulmuştur.

Sınırlı sayıdaki literatür bilgileri ile bu çalışma sonucu elde edilen çözüm sonrası HE-test parametreleri arasında gözlenen farklılıkların temelini ırk, mevsim ve sperma alma metodu gibi faktörlerin yanı sıra sperma sulandırıcılarına katılan antioksidanların farklılığı ve spermanın sulandırılmasında, saklanmasında ve değerlendirilmesinde kullanılan teknik, çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişim ve analizi yapan kişi gibi faktörlerinde oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan tez çalışmasında DNA hasarına ait bulgular Çizelge 3.5'de sunulmuştur. Buna göre çözüm sonrası en yüksek DNA hasarı rakamsal olarak kontrol grubunda elde edilmesine rağmen taurin ve trolox grupları ile aralarında istatistiki fark bulunamadı. Bunun yanında kontrol grubu ile trehaloz ve lipoik asit grupları arasında bulunan farkların istatistiki öneme ($P < 0.05$) sahip olduğu gözlemlendi.

Gündoğan ve ark. (2010) farklı (25×10^6 ve 100×10^6) yoğunluklu koç spermasında kısa süreli saklamanın spermatolojik parametreler ve DNA hasarı üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 100×10^6 yoğunluklu grubun 25×10^6 yoğunluklu gruba göre DNA hasarını azaltıcı etkisinin daha iyi olduğunu bildirmişlerdir. Yeni (2010) Pırlak koçlarda yıl boyu spermatolojik değişimleri değerlendirdiği çalışmasında Eylül, Ekim, Kasım ve Aralık aylarında ortalama DNA

hasarlarını comet analiz yöntemiyle sırasıyla 28.10 ± 3.49 AU, 23.00 ± 3.60 AU, 36.60 ± 4.32 AU ve 37.40 ± 3.82 AU olarak tespit etmiştir. Bununla beraber DNA hasarı ile sperma miktarı ve anormal spermatozoon oranı arasında pozitif ($p < 0.05$), sperma viskozitesi ile ise negatif ($p < 0.01$) yöndeki ilişkilerin önemli olduğunu bildirmektedir. Garcia-Alvarez ve ark. (2009) Manchega ırkı koçlardan elektroejakulatör ve posmortem yöntem ile aldıkları spermaları Biladyle ile sulandırıp dondurdukları çalışmalarında çözüm sonrası SCSA yöntemiyle belirledikleri ortalama DNA hasarını sırasıyla $\% 21.47 \pm 3.29$ ve $\% 15.86 \pm 1.83$ olarak bildirmektedirler.

Nur ve ark. (2010) tris bazlı sperma sulandırıcısına farklı kriyoprotektantlar katarak dondurdukları koç spermalarında çözüm sonrası kriyoprotektant madde olarak gliserol ilave edilen grubun trehaloz, sukroz, 1,2 propanediol ve kontrol grubuna göre TUNEL yöntemi ile belirledikleri DNA bütünlüğü bakımından pozitif yönde etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Kasimanickam ve ark. (2006) Polled Dorset, Hampshire ve Suffolk ırkı 6-11 aylık erkek kuzularda DNA hasarını SCSA yöntemi ile belirlemişler ve klasik sperma parametreleri ile DNA hasarı arasında negatif bir korelasyon bulunduğunu bildirmişlerdir. Lopez - Fernandez ve ark. (2008) farklı ırk koçlarda Spermatozoon Kromatin Dispersion (SCD) yöntemi ile DNA hasarını belirledikleri çalışmalarında dondurulmuş-çözdürülmüş spermatozoonda ve 15°C 'ye soğutulmuş spermatozoonda DNA hasarını $\% 5$ 'ten düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

Nur ve ark. (2011) bioxel sperma sulandırıcısı ile hızlı ve yavaş yöntemle dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası ortalama DNA kromatin indeksini sırasıyla $\% 2.9 \pm 2.4$ ve $\% 3.3 \pm 2.2$ bulduklarını bildirmişlerdir. Bucak ve ark. (2010) tris bazlı boğa sperma sulandırıcısına farklı antioksidanlar ilave ettikleri çalışmalarında dondurma-çözdürme sonrası kontrol grubunda comet analiz yöntemiyle DNA hasarını ortalama $\% 20.2$ olarak tespit etmişlerdir.

Tuncer ve ark. (2010a) tris bazlı sperma sulandırıcısına farklı antioksidanlar ilave ettikleri Ankara teke spermasında dondurma-çözdürme sonrası kontrol grubunda comet analiz yöntemiyle ortalama DNA hasarını $80.4 \pm 7,9$ AU olarak bulmuşlardır. Yine Tuncer ve ark. (2010b) laiciphose sulandırıcısı ile dondurdukları holstein boğa spermalarından çözüm sonu comet analiz yöntemiyle DNA hasarını $83.5 \pm 6,31$ AU bulduklarını bildirmişlerdir.

Hu ve ark. (2008) tris bazlı sperma sulandırıcısına 100 mM trehaloz ilave ederek dondurdukları domuz spermasında çözüm sonrası comet analiz yöntemiyle ortalama DNA hasarını 28.1 ± 3.9 AU olarak bildirmektedirler. Hughes ve ark. (1999) farklı yoğunluklarda X ışınlarına maruz kalmış insan spermasında meydana gelen DNA hasarı ve askorbik asit ile vitamin E (α -tekoferol)'in bu DNA bütünlüğünü ne derece koruduğunu comet analiz yöntemiyle araştırdıkları çalışmalarında 300 μ M askorbik asitin ve 30 μ M α -tekoferol'ün DNA bütünlüğünün korunmasında etkili olduğunu bildirmektedirler.

Wen-li ve ark. (2007) Rhesus maymunlarında alkalin comet analiz yöntemiyle dondurma-çözdürme sonrası DNA hasarını ortalama 36.33 ± 5.30 AU olarak tespit etmişlerdir. Li ve ark. (2007) Rhesus maymunlarında taze spermadaki DNA hasarını % 0-2.7 olarak bildirmelerine karşın rutin yöntemlerle dondurup sıvı nitrojende sakladıkları spermada DNA hasarını % 25.3 - 43.7 aralığında, kriyoprotektant kullanmadan dondurdukları spermada ise bu aralığın % 52.7 - 92.0 olduğunu bildirmişlerdir.

Kumar ve ark. (2011) tris bazlı sperma sulandırıcısı ile dondurdukları manda spermasında çözüm sonrası oluşan DNA hasarını nötral comet analiz yöntemiyle % 37.25 bulmuşlardır. Kadirvel ve ark. (2009) tris bazlı sperma sulandırıcısı ile dondurdukları manda spermasında çözüm sonu oluşan DNA hasarını nötral comet analiz yöntemiyle % 10.4 ± 0.9 bulmuşlardır. Nandre (2007) Surti mandalarda Comet analiz yöntemi ile yaptığı çalışmada spermanın dondurma-çözdürme sonrasında DNA hasarını % 9.11 ± 1.31 bildirmektedir.

Linfor ve Meyer (2002) aygırlarda yaptıkları çalışmada kontrol grubunda dondurma-çözdürme sonrası spermada Comet analiz yöntemi ile spermatozoon DNA hasarını % 63 ± 13.9 olarak bulmuşlardır. Coartes-Gutierrez ve ark. (2008) INRA 96 ile sulandırıp dondurdukları eşek spermasında çözdürme sonrası alkalın comet analiz yöntemiyle DNA hasarını % 18.2 ± 14.77 olarak bildirmektedirler.

Mehdi ve ark. (2009) insanlarda yaptıkları çalışmada kontrol grubunda dondurma-çözdürme sonrası TUNEL analiz yöntemiyle DNA hasarını % 8.19 ± 6.84 olarak tespit etmişlerdir. Gandini ve ark. (2006) dondurma-çözdürme sonrası insan spermatozoonlarındaki DNA hasarını araştırdıkları çalışmalarında SCSA yöntemiyle % 15.2 ± 8.7 hasar tespit etmişlerdir. Chi ve ark. (2008) farklı antioksidanlar ilave ederek dondurdukları insan spermasında comet analiz yöntemiyle Trevigen kit kullanarak DNA hasarını kontrol grubunda % 27.2 ± 0.8 olarak bulmuşlar. Antioksidan ilave edilen grubun DNA hasarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığını tespit etmişlerdir. Chohan ve ark. (2004) insan spermasında dondurma-çözdürme sonrası Acridine Orange (AO) yöntemiyle Carnoy's fiksasyon ve Diff Quik fiksasyon boyamaları kullanarak spermatozoon DNA hasarını sırasıyla ortalama % 30.8 ± 2.9 ve % 17.1 ± 2.5 olarak bulmuşlardır.

Fraser ve Strzezek (2005) domuz spermasında dondurma-çözdürme sonrası meydana gelen DNA hasarını nötral comet analiz yöntemi % 23 ± 1.9 saptamışlardır. Hernandez ve ark. (2006) domuz spermasında dondurma-çözdürme sonrası meydana gelen DNA hasarını SCSA yöntemi ile % 2.1 ± 1.0 bulmuşlardır.

Jiang ve ark. (2007) tris sulandırıcısına farklı konsantrasyonda LDL ilave ederek dondurdukları domuz spermasında çözüm sonrası nötral comet analiz yöntemiyle en az DNA hasarını % 9 ilave edilen grupta tespit etmişlerdir.

Rota ve ark. (2005) tris bazlı sulandırıcı ile dondurdukları köpek spermasında çözüm sonrası DNA hasarını AO yöntemiyle % 2.5 ± 0.9 olarak tespit etmişlerdir. Kim ve ark. (2010) tris bazlı sperma sulandırıcısı ile dondurdukları köpek

spermasında çözüm SCSA yöntemiyle DNA hasarını % 6.47 ± 3.06 bulduklarını bildirmişlerdir. Evenson ve ark. (2002) erkeklerde SCSA analiz yönteminde DNA fragmentasyon indexini % 27'nin üzerinde olması halinde in vitro fertilizasyon (IVF) ve intra stoplazmik sperm injeksiyon (ICSI) yöntemleri ile gebelik elde edilemeyeceğini bildirmişlerdir.

Baumber ve ark. (2003) dondurulmuş aygır sperması ile taze sperma örneklerinin karşılaştırdıkları araştırmalarında spermanın dondurulması ile spermatozoon DNA hasarı artışı arasında bir ilişki ($p < 0.01$) olduğunu bununda nedeni olarak donurma-çözdürme sırasında oluşan ROS ürünleri olduğunu, hidrojen peroksitin bu hasarda önemli bir rol oynadığını fakat süperoksit dismutazın herhangi bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Yine bu çalışmada antioksidan olarak alfa-tokoferol (0.1 mM) kullanıldığında dondurmayı takiben oluşan DNA hasarının azaldığını tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Çözüm sonrası DNA hasarında gözlenen farklılıklar arasında ırk, mevsim ve sperma alma metodu gibi faktörlerin yanı sıra dondurma işleminde kullanılan sulandırıcılar ile sulandırıcıların içerdiği komponentlerin miktar ve oranları ile sperma sulandırıcısının içerdiği yumurta sarısı oranları sayılabilir. Ayrıca sperma sulandırıcılarına katılan antioksidanların farklı olması, spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan tekniklerin farklılığı çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimler gibi etkenlerin de rolü olabilir.

Sunulan tez çalışmasında oksidatif stres parametreleri ile ilgili olarak elde edilen bulgular Çizelge 3.6'da ve Şekil 3.5'de verilmiş olup söz konusu parametreler bakımından gruplar arası farklılıklar gözlenmiştir. Özellikle, MDA açısından kontrol grubuna göre lipoik asit ve trolox içeren gruptaki azalma önemli ($P < 0.05$) bulundu. En yüksek katalaz aktivitesi kontrol ve lipoik asit içeren grupta en düşük trehaloz ve trolox içeren grupta elde edildi. Katalaz açısından taurin, trehaloz ve trolox içeren gruptaki düşüş önemli ($P < 0.05$) bulundu. GSH bakımından en yüksek değer kontrol ve taurin içeren grupta elde edilmiş ve diğer trehaloz, lipoik asit ve trolox grupları ile aralarındaki farklar istatistiki yönden önemli ($P < 0.05$)

bulunmuştur. Gerek SOD gerekse GSH-Px açısından kontrol ve antioksidan içeren gruplar arasında istatistikî açıdan fark bulunamadı.

Başpınar ve ark. (2011a) tris bazlı sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonlarda (1, 2, 4 mM) alfa lipoik asit ilave ederek dondurdukları Merinos koç spermalarında çözüm sonrası 1mM ilave edilen grupta ortalama LPO ($\mu\text{mol}\cdot 10^9$ hücre/mL), SOD ($\%inh\cdot 10^9$ hücre/mL), GSH-Px ($\text{mU}/\text{ml}\cdot 10^9$ hücre/mL) ve CAT ($\text{mU}/\text{ml}\cdot 10^9$ hücre/mL) aktivitelerini sırasıyla 16.3 ± 2.6 , 1.4 ± 0.1 , 15.6 ± 1.1 ve 102 ± 1.4 olarak bildirmektedirler. Sicherle ve ark. (2011) süt bazlı sperma sulandırıcısına 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ katalaz ve 100 μM trolox ilave ederek dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası trolox grubunda ortalama MDA ($\text{nmol}/10^8$) düzeyini 1.4 ± 0.20 olarak bildirmişlerdir. Andreea ve Stela (2010) tris bazlı sperma sulandırıcısına vitamin E ve sistein ilave ederek dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası vitamin E ilave edilen grupta MDA ($\text{nmol}/10^8\text{spz}$) düzeyini 13.60 ± 0.70 bulduklarını bildirmişlerdir.

Bucak ve ark. (2007) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonlarda ilave ettikleri trehaloz (50, 100 mM), taurin (25, 50 mM), cysteamine (5, 10 mM), hyaluronik asit (0,5, 1 mg/ml) araştırmalarında çözüm sonrası 100 mM trehaloz ve 50 mM taurin gruplarındaki MDA (nmol/ml), GSH (nmol/ml), GSH-Px (IU/g protein) ve CAT (kU/l) düzeylerini sırasıyla ortalama 8.6 ± 0.2 - 11.2 ± 0.9 , 2.6 ± 0.3 - 2.9 ± 0.1 , 9.6 ± 0.6 - 10.2 ± 1.4 ve 1064.8 ± 27.8 - 1037.5 ± 68.2 olarak bildirmektedirler.

Çoyan ve ark. (2011) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonda antioksidanlar ilave ettikleri çalışmalarında çözdürme sonrası kontrol grubunda elde ettikleri ortalama LPO ($\mu\text{mol}\cdot 10^9$ hücre/ml), SOD ($\%inh\cdot 10^9$ hücre/ml), GSH-Px ($\text{mU}/\text{ml}\cdot 10^9$ hücre/ml) ve CAT ($\text{mU}/\text{ml}\cdot 10^9$ hücre/ml) aktivitelerini sırasıyla 28.6 ± 3.3 , 1.6 ± 0.1 , 13.2 ± 2.1 ve 172.6 ± 37.1 olarak tespit etmişlerdir. Bucak ve ark. (2009) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına farklı antioksidanlar ilave ettikleri çalışmalarında dondurma-çözdürme sonrası kontrol

grubundaki ortalama MDA (nmolL), SOD (U/g protein) ve CAT (kU/g protein) değerlerini sırasıyla 4.1 ± 0.3 , 3.0 ± 0.1 ve 4.6 ± 0.4 bulduklarını bildirmişlerdir.

Başpınar ve ark. (2011b) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına DTE'nin farklı konsantrasyonlarını ilave ettikleri araştırmalarında çözdürme sonrası kontrol grubunda elde ettikleri ortalama LPO ($\mu\text{mol} \cdot 10^9$ hücre/ml), SOD ($\% \text{inh} \cdot 10^9$ hücre/ml), GSH-Px ($\text{mU/ml} \cdot 10^9$ hücre/ml) ve CAT ($\text{mU/ml} \cdot 10^9$ hücre/ml) düzeylerini sırasıyla 24.8 ± 2.7 , 1.7 ± 0.1 , 12.9 ± 2.6 ve 220.0 ± 26.7 olarak bulmuşlardır. Bucak ve ark. (2008) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına farklı antioksidanlar ilave ettikleri çalışmalarında dondurma-çözdürme sonrası kontrol grubunda elde ettikleri ortalama MDA (nmolL), GSH (nmol/ml), GSH-Px (IU/g protein) ve CAT (kU/I) değerlerini sırasıyla 9.20 ± 0.51 , 2.63 ± 0.05 , 7.00 ± 1.78 ve 738.81 ± 39.69 olarak tespit etmişlerdir.

Çözüm sonrası oksidatif stres parametrelerinde literatür bilgileri ile aralarında gözlenen farklılıklar ırk, mevsim, sperma alma metodu gibi faktörlerin yanı sıra dondurma işleminde kullanılan sulandırıcılar ile sulandırıcıların içerdiği komponentlerin miktar ve oranlarının özellikle sperma sulandırıcısının içerdiği yumurta sarısı oranlarının farklılığından ve sulandırıcının antioksidan ilave edilmeden önce santrifüj yapıp yapılmadığından kaynaklanmış olabileceği gibi spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan tekniklerdeki farklılıklara, çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimlere, analizin yapıldığı yöntem ve analizi yapan kişi gibi faktörlere bağlı olarak da meydana gelmiş olabilir.

5. SONUÇ

Spermanın başarılı bir şekilde dondurulması, birçok etkenin optimal şartlarını gerektiren karmaşık bir yöntemdir. Bir türün sperması için standardize edilen protokol başka türler için uygun olamayabilmektedir. Koç spermasının dondurulma işlemide bunun açık bir örneğidir. Koç sperması ile diğer evcil türlerin sperması arasında, sperma sulandırıcısı, kriyoprotektantlar, dondurma ve çözündürme hızları gibi ortak noktalar olmasına karşın, çözündürme sonrası maksimum canlılık elde edebilmek için türe özgü ayrı bir dikkate ve özene gereksinim vardır. Koç spermasının dondurulmasında, çözündürme sonrası spermatolojik parametreler, oksidatif stress ve DNA hasarı üzerine olumlu etkileri olabileceği düşünüldüğünden sperma sulandırıcılarına antioksidan maddeler katılmaktadır. Genel olarak olumlu etkileri olmakla beraber antioksidanların etkileri hayvan türüne, antioksidanların türüne, dozuna, sulandırıcı kompozisyonuna ve dondurma prosedürüne göre değişiklik göstermektedir.

Genel olarak motil hücre sayısı azaldığında fertilizasyonun düştüğü bununda, sperma kalitesi yönünden olumsuzluk işareti olduğu belirtilmektedir. Fertilizasyonun en önemli göstergelerinde olan motilite ve objektif motilite değeri olan CASA motilite değerlerinin çözüm sonrası mümkün olduğunca yüksek olması gerek fertilizasyon gerekse dölverimi açısından önemlidir. Bu bağlamda dondurma-çözündürme sonrası sperma örneklerinde subjektif motilite yönünden taurin içeren grubun kontrol grubuna göre olumlu etkisi gözlenmesinin yanı sıra CASA parametrelerinden progressif motilite yönünden kontrol grubu ile antioksidan katılan tüm gruplar arasındaki fark dikkat çekici bulundu.

Morfolojik bozukluğun lokalizasyonu, çeşidi ve miktarı ile fertilite arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Fertilizasyonda önemli rol oynadığından morfolojik incelemelerde akrozom ayrı bir öneme sahiptir. Dondurma-çözündürme sonrası sperma örneklerinde baş anomalileri yönünden kontrol grubuna göre trehaloz ve

trolox içeren gruplardaki azalma, orta kısım açısından kontrol grubuna göre antioksidan içeren tüm gruplardaki düşüş ve kuyruk kısmı ve toplam anormal spermatozoon oranı açısından ise trehaloz grubuna göre diğer tüm gruplardaki azalmaların önemli ($P<0.05$) olduğu görüldü. Bununla beraber anormal akrozom oranı açısından kontrol grubuna göre diğer tüm grupların içerdiği antioksidanların etkilerinin olumlu yönde olduğu ($P<0.05$) gözlemlendi.

Çözüm sonrası sperma örneklerinde gerçekleştirilen HE-test sonucu dikkate alınan membranı sağlam ve canlı (H+/E-) spermatozoonlar bakımından kontrol grubuna göre taurin, trehaloz ve lipoik asit gruplarındaki artışların önemli ($P<0.05$) olduğu gözlemlendi. HE testi aynı spermatozoon üzerinde hem kuyruk ve hem de baş membranlarının fonksiyonel bütünlüklerini belirleyen bir yöntem olması nedeniyle fertilizasyonun önemli bir göstergesidir. Bu nedenle sperma sulandırıcısına katılacak olan taurin, trehaloz ve lipoik asitin fertilité üzerine olumlu katkılar sağlayabileceği kanaatine varıldı.

Yüksek oranlarda DNA hasarının fertilizasyon kayıplarına neden olması nedeniyle dondurma-çözdürme sonrası spermatozoon DNA hasarının mümkün olduğunca az düzeyde tutulması fertilizasyon için en önemli faktörlerdendir. Çözdürme sonrası spermatozoon DNA hasarı üzerine trehaloz ve lipoik asit içeren grupların kontrol grubuna göre azaltıcı etkiye sahip olduğunun gözlenmesi trehaloz ve lipoik asitin dölveriminde olumlu etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Dondurma-çözdürme sonrası sperma örneklerinde oksidatif stres parametrelerinden kontrol grubuna göre MDA düzeylerinde lipoik asit ve trolox içeren gruplardaki azalma, CAT aktivitesindeki taurin, trehaloz ve trolox içeren gruplardaki düşüş, GSH değerlerinde ise trehaloz, lipoik asit ve trolox grubundaki azalmalar önemli ($P<0.05$) bulundu. SOD ve GSH-Px yönünden kontrol ve antioksidan içeren gruplar arasında ise fark gözlenemedi. Spermatozoonlarda oksidatif stres sonucu oluşan lipit peroksidasyonun azaltıcı etkisi nedeniyle

sulandırıcıya lipoik asit ve trolox ilavesinin yararlı olabileceği kanaati uyandırmaktadır.

Bununla birlikte bu tez çalışmasında kullanılan tüm antioksidanların farklı özelliklerinden dolayı sperma sulandırıcılarına katılmalarının faydalı olabileceği ve özellikle lipoik asitin gerek oksidatif stres parametreleri ve gerekse DNA hasarını azaltıcı etkinliği ve henüz bu alanda yeterli bilgi olmaması nedeniyle daha geniş kapsamlı araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

Sonuç olarak, koç spermasının dondurulmasında antioksidanların olumlu etkilerinin, antioksidanın türüne göre değişebileceği, antioksidan kullanımında sulandırıcı ve antioksidan etkileşiminin göz önüne alınması gerektiği ve antioksidanların farklı dozajlarda spermatolojik özellikler, CASA parametreleri, oksidatif stres parametreleri ve DNA hasarı üzerine etkisinin daha geniş hayvan materyali kullanarak dölverimi sonuçları ile birlikte değerlendirilmesinin daha yararlı olacağı kanaatine varılmıştır.

ÖZET

Koç spermasına katılan bazı antioksidanların dondurma ve çözündürme sonrası spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkileri

Bu çalışmada, dondurma çözündürme sonrası spermaya katılan antioksidanların spermatolojik, CASA, oksidatif stres parametreleri ve DNA hasarları üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Afyonkarahisar koşullarında yetiştirilen 2-3 yaşlı Pırlak ırkına ait toplam 10 koçtan alınan spermalar birleştirilip 5 eşit hacme bölünerek kontrol başta olmak üzere taurin, trehaloz, trolox ve lipoik asit içeren Tris bazlı sulandırıcılar ile sulandırıldı. Sulandırılan örnekler 0,25 ml'lik payetlerde 5 °C'de 3 saat ekilibrasyona tabi tutulduktan sonra sıvı azot buharında dondurularak sıvı azot içerisinde (-196 °C) saklandı.

Çözdürülen spermalarda subjektif motilite (% 54.6 ± 2.25) ve CASA motilitesi (% 24.2±1.84), VAP (98.2 ± 2.20 µm/s) ve VSL (80.1 ± 1.88 µm/s) açısından taurin grubunda en yüksek değerler tespit edildi. Anormal spermatozoon baş, orta kısım ve akrozom oranı açısından kontrol grubuna göre (% 1.2 ± 0.21, % 1.2 ± 0.21 ve % 13.3 ± 0.70) taurin (% 0.8 ± 0.15, % 0.2 ± 0.08 ve % 10.7 ± 0.51), trehaloz (% 0.5 ± 0.07, % 0.1 ± 0.04 ve % 5.2 ± 0.26), lipoik asit (% 1.0 ± 0.12, % 0.2 ± 0.07 ve % 7.1 ± 0.41) ve trolox (% 0.4 ± 0.08, % 0.1 ± 0.04 ve % 3.6 ± 0.21) gruplarında en düşük değerler elde edildi. Spermatozoon HE-test parametrelerinden H+/E- tip spermatozoonlarda kontrol grubuna göre (% 22.3 ± 0.72) taurin (% 32.6 ± 1.31), trehaloz (% 30.2 ± 1.52) ve lipoik asit (% 28.1 ± 1.25) gruplarındaki artışlar önemli (P<0.05) bulunmuştur. DNA hasarında en düşük değer yine kontrol grubuna kıyasla (68.7 ± 4.09 AU) trehaloz (43.5 ± 4.51 AU) ve lipoik asit (48.4 ± 5.27 AU) gruplarında gözlemlendi. Oksidatif stres parametrelerinden MDA yönünden lipoik asit (3.7 ± 0.21 nmol/ml) ve trolox (3.6 ± 0.24 nmol/ml) en düşük değeri göstererek koruma sağlamıştır.

Sonuç olarak koç spermasının dondurulmasında antioksidan olarak kullanılan taurin, trehaloz, lipoik asit ve trolox'un etkinliklerinin farklılık gösterdiği bunun yanında lipoik asitin gerek oksidatif stres ve gerekse DNA hasarını azaltıcı etkisinden dolayı diğerlerine nazaran üstünlük sağladığı ancak tüm antioksidanların farklı dozajlarda spermatolojik özellikler, CASA, oksidatif stres parametreleri ve DNA hasarı üzerine etkisinin daha geniş hayvan materyali kullanılarak dölverimi sonuçları ile birlikte değerlendirilmesinin yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, DNA Hasarı, H-E testi, Koç Sperması, Oksidatif stres

SUMMARY

The effects of some antioxidant additives on spermatological parameters, oxidative stress and DNA damage after frozen-thawed process in ram semen

The aim of this study was to determine the effect of the addition of antioxidants on the post thawed sperm, CASA, oxidative stress parameters and the DNA damage. Semen were collected from 2-3 years of age ten Pirlak rams under Afyonkarahisar conditions and these semen were divided in the five equal aliquots and diluted with the tris base extender containing with taurine, trehalose, trolox, lipoic acid and no antioxidant (control). Diluted samples were submitted to three hour equilibration at 5 °C and frozen 0,25 ml French straws in liquid nitrogen vapour and storage in liquid nitrogen (-196 °C).

In thawed semen according to subjective motility (54.6 ± 2.25 %) and CASA motility (24.2 ± 1.84 %), VAP (98.2 ± 2.20 $\mu\text{m/s}$) and VSL (80.1 ± 1.88 $\mu\text{m/s}$) taurine group indicated the highest value. Abnormal spermatozoon, head, middle piece and acrosome rate comparing with control group (1.2 ± 0.2 %, 1.2 ± 0.21 % and 13.3 ± 0.70 %) taurine (0.8 ± 0.15 %, 0.2 ± 0.08 % and 10.7 ± 0.51 %), trehalose (0.5 ± 0.07 %, 0.1 ± 0.04 % and 5.2 ± 0.26 %), lipoic acid (1.0 ± 0.12 %, 0.2 ± 0.07 % and 7.1 ± 0.41 %) and trolox (0.4 ± 0.08 %, 0.1 ± 0.04 % and 3.6 ± 0.21 %) in these groups the lowest value were found. In the increases H+/E- type spermatozoon which one of spermatozoon HE-test parameters compared with control group (22.3 ± 0.72 %) then taurine, (32.6 ± 1.31 %), trehalose (30.2 ± 1.52 %) and lipoic acid (28.1 ± 1.25 %) groups were found significantly ($P < 0.05$). In DNA damage, the lowest value trehalose (43.5 ± 4.51 AU) ve lipoic acid (48.4 ± 5.27 AU) were observed in compared control group (68.7 ± 4.09 AU). According to MDA which is one of the oxidative stress parameters, lipoic acid (3.7 ± 0.22 nmol/ml) and trolox (3.6 ± 0.24 nmol/ml) indicated the lowest value that provided preservation.

In conclusion that the effects of antioxidants such as taurine, trehalose, lipoic acid and trolox for frozen of ram semen is found to be significant at differences in effectiveness whereas lipoic acid is more effective on reducing oxidative stress and damage in DNA. However in order to understand the positive effects of antioxidants, it is essential to test in different dosages on spermatologic parameters, CASA, oxidative stress parameters ve DNA damage together with fertility result on large number of animals.

Key Words: Antioxidant, DNA damage, H-E test, Ram Semen, Oxidative stress

6. KAYNAKLAR

- ABDELHAKEAM, A.A., GRAHAM, E.F., VAZQUEZ, I.A., CHALONER, K.M. (1991). 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 method of dilution. *Cryobiol.*, **28**: 43-49.
- AGARWAL, A., NALLELLA, K.P., ALLAMANENI, S.S., SAID, T.M. (2004). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod. Biomed. Online*, **8**: 616–627.
- AGARWAL, A., PRABAKARAN, S., ALLAMANENI, S. (2006). What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology*, **67**: 2–8.
- AGARWAL, A., SALEH, R.A. (2002). Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol. Clin. N. Am.*, **29**: 817-827.
- AGARWAL, A., SALEH, R.A., BEDAIWY, M.A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.*, **79**: 829–843.
- AISEN E.G., MEDINA V.H., VENTURINO A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, **57**: 1801-1808.
- AISEN, E.G., ALVAREZ, H.L., VENTURINO, A., GARDE, J.J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*, **53**: 1053-1061.
- AISEN, E.G., QUINTANA, M., MEDINA, V., MORELLO, H., VENTURINO, A. (2005). Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiol.*, **50**: 239-249.
- AITKEN, J., KRAUSZ, C., BUCKINGHAM, D. (1994). Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol. Reprod. Dev.*, **39**: 268–279.
- AITKEN, R.J., BUCKINGHAM, D., HARKISS, D. (1993). Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, **97**: 441–50.
- AITKEN, R.J., CLARKSON, J.S., FISHEL, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol. Reprod.*, **41**: 183–197.

- AITKEN, R.J., RYAN, A.L., BAKER, M.A., MCLAUGHLIN, E.A. (2004). Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med.*, **36 (8)**: 994–1010.
- AKIYAMA, M. (1999). In vivo scavenging effects of ethylcysteine on reactive oxygen species in human semen. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*, **90**: 421–428.
- AKMAN, O. (2007) Swiss Albino Irkı Farelerde Sperma Kalitesinin Belirlenmesi Amacıyla Hos Testi Sonuçları ve Diğer Spermatolojik Parametreler Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Doktora Tezi Selçuk Ü. Sağ. Bil. Enst.
- AKSOY, M., ATAMAN, M.B., KARACA, F., KAYA, A., TEKELİ, T. (1994). Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'ne ait çeşitli ırklardan koçların spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar. *S.Ü. Vet. Fak. Derg.*, **10 (1-2)**: 111-112.
- AKSOY, M., TEKELİ, T., ÇOYAN, K., KARACA, F. (1993). Konya Merinosu Koçlarının Spermatolojik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar. *Hay. Araş. Derg.*, **3**: 126.
- ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O., LANDIM-ALVARENGA, F.C., MEDEIROS, A.S.L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Anim. Reprod. Sci.*, **89**: 105–113.
- ALVAREZ, J.G., STOREY, B.T. (1983). Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod.*, **29**: 548-555.
- ALVAREZ, J.G., TOUCHSTONE, J.C., BLASCO, L., STOREY, B.T. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.*, **8**: 338–348.
- ANDREEA, A., STELA, Z. (2010). Role of antioxidant additives in the protection of the cryopreserved semen against free radicals. *Rom. Biotechnol. Lett.*, **15 (3)**: 33-41.
- ANELA, L., DE PAZ, P., ALVAREZ, M., CHAMORRO, C.A., BOIXO, J.C., MANSO, A., GONZALEZ, M., KAABI, M., ANEL, E. (2003). Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology*, **60**: 1293–1308.
- ANGHEL, A., ZAMFIRESCU, S., COPREAN, D., SOGORESCU, E. (2010). The effects of cystein, bovine serum albumin and vitamin e on the calitative parameters of frozen-thawed ram semen. *Annals of RSCB.*, **16 (2)**: 26-32.

- ARAL, F., ARAL, S. (2004). Merinos Koçlarda Sperma Alma Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **28**: 47-53.
- ARAL, F., TEKİN, N. (1996). Koçlarda Sperma Kalitesi Üzerine Mevsimin Etkisi. *Hay. Araş. Derg.*, **6**: 15-20.
- ARI, U.C., KULAKSIZ, R., ÖZTÜRKLER., Y. (2011). Freezability of Tushin Ram Semen Extended with Goat or Cow Milk Based Extenders. *Reprod. Dom. Anim.*, **46 (6)**: 975-979.
- ARUOMA, O.I., HALLIVELL, B., HOEY, B.M., BUTTLER, J. (1998). The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem. J.*, **256**: 251-255.
- ATAMAN, M.B., KAYA, A., KARACA, F. (1996). Toklularda Testisin Sezon İçi ve Sezon Dışı Morfometrik Ölçüleriyle Spermatolojik Özellikler Arasındaki İlişkinin Belirlenerek Damızlık Seçiminde Kullanılabilirliğinin Araştırılması. *Hay. Araş. Derg.*, **6 (1-2)**: 1-7.
- ATAMAN, M.B., YILDIZ, C., KAYA, A., AKSOY, M., LEHİMCİOĞLU, N. (1998). Köpeklerde taze ve donmuş-çözünmüş spermada anormal spermatozoon tiplerinin ve oranlarının tespit edilmesinde farklı yöntemlerin kullanılması. *Vet. Bil. Derg.*, **14 (2)**: 121-129.
- ATMACA, G. (2003). Sarımsağın ve bazı tiol içeren bileşiklerin antioksidan etkileri. *Trakya Üniv. Tıp Fak. Derg.*, **20**: 1-3.
- AURICH, J.E, SCHONHERR, U., HOPPE, H., AURICH, C. (1997). Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, **48**: 185-192.
- AVDATEK, F., GÜNDOĞAN, M., YENİ, D., (2010). Functional tests in semen quality determination *J. Anim. Vet. Adv.*, **9**: 862-871.
- AWAD, M.M., GRAHAM, J.K. (2004). A new pellet technique for cryopreserving ram and bull spermatozoa using the cold surface of cattle fat. *Anim. Reprod. Sci.*, **84**: 83-92.
- BAILEY, J.L., BILODEAU, J.F. (2000). Cormeir Semen Cryopreservation in domestic animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon *J. of And.*, **21 (1)**: 1-7.
- BARAN, A., DEMİR, K., ŞAHİN, B.E., EVECEN, M., BACINOGLU, S., ALKAN, S., İLERİ, K. (2009). Short-Term Chilled Storage of Cat Semen Extended With

- and Without Taurin Containing Milk Extenders. *J. Anim. Vet. Adv.*, **8 (7)**: 1367-1371.
- BARNA, J., ASHIZAWA, K., BOLDIZSAR, H., INOUE, M. (1998). Effects of taurine on the motility and intracellular free Ca^{2+} concentration of fowl spermatozoa in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, **114**: 225-229.
- BAŞPINAR, N., ÇOYAN, K., BUCAK, M.N., ÖMÜR, A.D., ATAMAN, M.B., AKALIN, P.P., GÜNGÖR, Ş., ÖZTÜRK, C. (2011a). Koç spermasının ekilibasyon ve dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik ve biyokimyasal parametreleri üzerine lipoik asitin etkisi. *Eurasian J. Vet. Sci.*, **27 (2)**: 87-92.
- BAŞPINAR, N., ÇOYAN, K., BUCAK, M.N., TUNCER, P.B. (2011b). Effects of dithioerythritol on ram semen after the freze-thawing process. *Cryobiol.*, **63**: 152-156.
- BAUMBER, J., BALL, B.A., GRAVANCE, C.G., MEDINA, V., DAVIES-MOREL, M.C.G. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipit peroxidation. *J. Androl.*, **21**: 895-902.
- BAUMBER, J., BALL, B.A., LINFOR, J.J., MEYERS, S.A. (2003). Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J. Androl.*, **24 (4)**: 621-628.
- BENNETTS, L.E., AITKEN, J.R., (2005). A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, **71**: 77-87.
- BERGERON, A., MANJUNATH, P. (2006). New Insights Towards Understanding the Mechanisms of Sperm Protection by Egg Yolk and Milk. *Mol Reprod Dev*, **73**: 1338-1344.
- BERLINGUER, F., MADEDDU, M., PASCIU, V., SUCCU, S., SPEZZIGU, A., SATTA, V., MEREU, P., LEONI, G.G., NAITANA, S. (2009). Semen molecular and cellular features: these parameters can reliably predict subsequent ART outcome in a goat model. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **7**: 125-133.
- BERNSTEIN, A.D., PETROPAVLOVSKY, V.V. (1937) Effects on non-electrolytes on viability of spermatozoa. *Bjull. Eksp. Biol. Med.* **3 (1)**: 41-43.
- BILODEAU, J.F., BLANCHETTE, S., GAGNON, C., SIRARD, M.A., (2001). Thiols prevent H_2O_2 -mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, **56 (2)**: 275-286.

- BITTENCOURT, R.F., OBA, E., RIBEIRO FILHO, A.DE,L., VASCONCELOS, M.F.C., BISCARDE, E.A., ALMEIDA, D.C., SILVEIRA, V.F. (2009). Viability and Fertility of Ram Semen Cryopreserved with Dimethyl Acetamide and Trehalose. *Reprod. Fertil. Dev.*, **22 (5305)**: 201–202.
- BUCAK, M.N., ATESSAHIN, A., VARISLI, O., YUCE, A., TEKİN., AKCAY, A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stres parameters after freze-thawing process. *Theriogenology*, **67**: 1060-1067.
- BUCAK, M.N., ATEŞŞAHİN, A., YÜCE, A. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process *Small Rum. Res.* **75**: 128-134.
- BUCAK, M.N., TUNCER, P.B., SARIÖZKAN, S., BAŞPINAR, N., TAŞPINAR, M., ÇOYAN, K., BİLGİLİ, A., AKALIN, P.P., BÜYÜKLEBLEBİCİ, S., AYDOS, S., ILGAZ, S., SUNGUROĞLU, A., ÖZTUNA, D. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed bovine sperm oxidative stres parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiol.* **61**: 248-253.
- BUCAK, M.N., TUNCER, P.B., SARIÖZKAN, S., ULUTAŞ, P.A. (2009). Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipit peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Rum. Res.*, **81**: 13-17.
- BUDWORTH, P.R., AMANN, R.P., CHAPMAN, P.L. (1988). Relationships between computerized measurements of motion of frozen thawed bull spermatozoa and fertility. *J. Androl.*, **9**: 41-54.
- BUSSE, E., ZIMMER, G., SCHOPOHL, B., KORNHUBER, B. (1992). Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione *in vitro* and *in vivo*. *Arzneimittelforschung*, **42**: 829-831.
- CARDULO, R.A., FLORMAN, H.M. (1993). Strategies and methods for evaluating acrosome reaction. *Methods Enzymol.*, **225**: 137-153.
- CARREAU, J.P. (1979). Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. *Methods Enzymol.*, **62**: 152-158.
- CASEY, P.J., HILMAN, R.B., ROBERTSON, K.R., YUDIN, A.I., LIU. I.K.M., DROBNIS, E.Z. (1993). Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J. Androl.* **14 (4)**: 289-297.

- CHATTERJEE, S., DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C. (2001). Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol. Reprod. Dev.*, **60**: 498-506.
- CHATTERJEE, S., GAGNON, C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.*, **59**: 451-458.
- CHEN, T., FOWLER, A., TONER, M. (2000). Brief communication, Literature review: supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture, *Cryobiol.*, **40**: 277-282.
- CHEN, Y., FOOTE, R.H., BROCKETT, C.C. (1993). Effect of Sucrose, Trehalose, Hypotaurine, Taurine and Blood Serum on Survival of Frozen Bull Sperm. *Cryobiol.*, **30**: 423-431.
- CHI, H.J., KIM, J.H., RYU, C.S., LEE, J.Y., PARK, J.S., CHUNG, D.Y., CHOI, S.Y., KIM, M.H., CHUN, E.K., ROH S.I. (2008). Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, **23** (5): 1023-1028.
- CHOHAN, K.R., GRIFFIN, J.T., CARRELL, D.T. (2004). Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia*, **36**: 321-326.
- CLULOW, J.R., MAXWELL, W.M.C., EVAND, G., MORRIS, L.H.A. (2007). A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Aust. Vet. J.*, **85** (6): 232-235.
- COLAS, G., GUERIN, Y., CLANET, V., SOLARI, A. (1985). Influence of The Photoperiod on The Production and Fecundity Spermatozoa in the Adult Ile-De-France Ram. *Reprod. Nutr. Dev.*, **25**: 101-111.
- COLEMAN, M.D., EASON, R.C., BAILEY, C.J. (2001). The therapeutic use of lipoic acid in diabetes: a current perspective. *Environ Toxicol Pharmacol*, **10**: 167-172.
- COLLINS, A.R. (2004). The Comet assay for DNA damage and repair principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.*, **26**: 249-60.
- CORTES-GUTIERREZ, E.I., CRESPO, F., GOSALVEZ, A., DAVILA-RODRIGUEZ, M.I., LOPEZ-FERNANDEZ, C., GOSALVEZ, J. (2008). DNA fragmentation in frozen sperm of *Equus asinus*: Zamorano-Leone's, a breed at risk of extinction. *Theriogenology*, **69**: 1022-1032.

- CUMMINS, J.M., JEQUIER, A.M., KAN, R. (1994). Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress? *Mol. Reprod. Dev.*, **37**: 245-362.
- CURRY, M.R. (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod.*, **5**: 46–52.
- ÇOYAN, K., BAŞPINAR, N., BUCAK, M.N., AKALIN, P.P. (2011). Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. *Cryobiol.*, **63**: 1-6.
- D’ALESSANDRO, A.G., MARTEMUCCI, G. (2005). Post-thaw survival and acrosome integrity of spermatozoa of Lecce rams frozen in different seasons with a milkegg yolk extender. *Italian. J. Anim. Sci.*, **4**: 139-148.
- D’ALESSANDRO, A.G.D., MARTEMUCCI, G., COLLANNA, M.A., BELLINI, A. (2001). Post thaw survival of ram spermatozoon and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*, **55**: 1159-1170.
- DARIN-BENNETT, A., POULOS, A., WHITE, I.G. (1973). The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull, and boar spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, **26**: 1409–20.
- DAVIS, R.O., KATZ, D.F. (1993). Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.*, **14**: 385- 394.
- DEICHSEL, K., PALM, F., KOBLISCHKE, P., BUDIK, S., AURICH, C. (2008). Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. *Theriogenology*, **69**: 940–945.
- DEMİRÇİ, E. (1993). İvesi Koçların Spermatolojik Özellikleri ve Sperma Miktarının Hayvanın Yaşı ve Testis Hacmi ile İlişkisi. *U. Ü. Vet. Fak. Derg.*, **3 (12)**: 96-108.
- DEMİRÇİ, E. (2002). Evcil hayvanlarda reproduksiyon, Suni tohumlama ve androloji ders notları (*1nd ed*). *F.Ü.Vet.Fak., Ders Teksiri* No:53 Elazığ.
- DEVREKER, F., VAN DEN BERG, M., BIRAMANE, J., WINSTON, R.M.L., ENGLERT, Y., HARDY, K. (1999). Effects of taurine on human embryo development in vitro. *Hum. Reprod.*, **14 (9)**: 2350-2356.
- DONNELLY, E.T., MCCLURE, N., LEWIS, S.E. (1999). Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. *Fertil. Steril.*, **72**: 484–95.

- DONNELLY, E.T., STEELE, E.K., MCLURE, N., LEWIS, S.E.M. (2001). Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum. Reprod.*, **16**: 1191–99.
- DONOGHUE, A.M., WISHART, G.J. (2000). Storage of poultry semen. *Anim. Reprod. Sci.*, **62**: 213-232.
- DRAPER, H.H., HADLEY, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **186**: 421–430.
- DREVET, J.R. (2006). The antioxidant glutathione peroxidase family and sperm: A complex story. *Mol. Cell Endocrinol.*, **250**: 70 –79.
- DROBNIS, E.Z., CROWE, L.M., BERGER, T., ANCHORDOGUY, T. J., OVERSTREET, J.W., CROWE, J.H. (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.
- DUCCI, M., GAAZANO, A., VILLANI, C., CELA, V., ARTINI, P.G., MARTELLI, F., GENAZZANI, A.R. (2002). Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. *Eur. J. Obstet. Gynaecol. Reprod. Biol.*, **102**: 53–56.
- DUMOULIN, J.C.M., EVERS, J.L.H., BRAS, M., PIETERS, M.H.E.C., GERAEDTS, J.P.M. (1992). Positive effect of taurine on preimplantation development of mouse embryos in vitro. *J Reprod. Fert.*, **94**: 373-380.
- DUTY, S.M., SINGH N.P., RYAN L., CHEN, Z., LEWIS, C., HUANG, T., HAUSER, R. (2002). Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Hum. Reprod*, **17 (5)**: 1274-1280.
- DZIUK, P.T., LEWIS, J.M., GRAHAM, E.F., MOYER, R.H. (1972). Comparison between natural service and artificial insemination with fresh or frozen sperm at an appointed time in the ewe. *J. Anim. Sci.*, **35**: 572-575.
- EIMAN, M., ABOAGLA, E., TERADA, T. (2003). Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod.*, **69**: 1245-1250.
- ELLIOT, J.G. (1999). Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech.*, **53 (2)**: 46-48.
- EMMENS, C.W., BLACKSHAW, A.W. (1955). The Fertility of Frozen Ram and Bull Semen. *Aust. Vet. J.*, **31**: 76-79.

- ERENPREISS, J., HLEVICKA, S., ZALKALNS, J., ERENPREISA, J. (2002). Effect of leucocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J. Androl.*, **23** (5): 717-723.
- ESTRADA, D.E., EWART, H.S., TSAKIRIDIS, T., VOLCHUK, A., RAMLAL, T., TRITSCHLER, H., KLIP, A. (1996). Stimulation of glucose uptake by the natural coenzyme alpha-lipoic acid/thioctic acid: participation of elements of the insulin signaling pathway. *Diabetes*, **45**: 1798-1804.
- EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. (1987). Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goat, Ed. G Evans and WMC Maxwell, Butterworths Pty Limited, Australia.
- EVANS, R.C., BAUER, D.H., BANDEMER, S.L., VAGHELF, S.B., FLIGAL, C.J. (1973). Structure of egg yolk very low density lipoprotein: polydispersity of the very low density lipoprotein and the role of lipovitellenin in the structure, *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**: 493-500.
- EVENSON, D.P., LARSON, K.L., JOST, K. (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.* **23**: 25-43.
- FAHY, G.M. (1986). The relevance of cryoprotectant toxicity to Cryobiol. *Cryobiol.*, **23**: 1-13.
- FAYRER-HOSKEN, R., ABREU-BARBOSA, C., HEUSNER, G., JONES, L. (2008). Cryopreservation of stallion spermatozoa with INRA96 and glycerol. *J. Equine Vet Sci*, **28** (11): 672-676.
- FISER, P.S., FAIRFULL, R.W. (1984). The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoon frozen in straws. *Cryobiol.*, **21**: 542-551.
- FONTANA, M., PECCI, L., DUPRE, S., CAVALLINI, D. (2004). Antioxidant Properties of Sulfinates: Protective Effect of Hypotaurine on Peroxynitrite-Dependent Damage. *Neurochemical Res*, **29** (1): 111-116.
- FOOTE, R.H. (1962). Survival of bull sperm in milk and yolk extenders with added catalase. *J Dairy Sci*, **45**: 907-910.
- FOOTE, R.H., BROCKETT, C.C., KAPROTH, M.T. (2002). Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants *Anim. Reprod. Sci.*, **71**: 13-23.

- FORD, W.C.L. (2004). Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Update.*, **10** (5): 387–399.
- FRASER, L., PARDA, A., FILIPOWICZ, K., STRZEZEK, J. (2010). Comparison of Post-Thaw DNA Integrity of Boar Spermatozoa Assessed with the Neutral Comet Assay and Sperm-Sus Halomax Test Kit. *Reprod. Dom. Anim.*, **45** (5): 155-160.
- FRASER, L., STRZEZEK, J. (2004). The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5°C and 16°C. *Folia Histochem. Cytobio.*, **42** (1): 49-55.
- FRASER, L., STRZEZEK, J. (2005). Effects of freezing–thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reprod. Dom. Anim.*, **40**: 1–7.
- GANDINI, L., LOMBARDO, F., LENZI, A., SPANO, M., DONDERO, F. (2006). Cryopreservation and sperm DNA integrity. *Cell Tissue Bank*, **7**: 91-98.
- GAO, D.Y., CRISTER, J.K. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Ilar Journal (Online)*, **41**: 4.
- GARCIA-ALVAREZ, O., MAROTO-MORALES, A., MARTINEZ-PASTOR, F., GARDE, J.J., RAMON, M., FERNANDEZ-SANTOS, M.R., ESTESO, M.C., PEREZ-GUZMAN, M.D., SOLER A.J. (2009). Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: Electroejaculation and postmortem collection. *Theriogenology*, **72** (2): 160-168.
- GARRIDO, N., MESEGUER, M., SIMON, C., PELLICER, A., REMOHI, J. (2004). Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J. Androl.*, **6**: 59–65.
- GEVA, E., LESSING, J.B., LERNER-GEVA, L., AMIT, A. (1998). Free radicals, antioxidants and human spermatozoa. *Clinical Implications* **13** (6): 1422-1424.
- GIRAUND, M.N., MOTTE, C., BOUCHER, D., GRIZARD, G. (2000). Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, **15**: 2160–2164.
- GLIOZZI, T.M., ZANIBONI, L., CEROLINI, S. (2011). DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*, **75** (9): 1613-1622.

- GOMES, G.M., JACOP, J.C.F.,MEDEIROS, A.S.L., PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. (2002). Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the mangalarga marchador breed. *Theriogenology*, **58**: 277-279.
- GORDON, I.R. (2005). Artificial Insemination (Ed) In: Gordon I.R. *Reproductive Technologies in Farm Animals*. Cambridge. MA, USA.
- GÖKPINAR, Ş., KORAY, T., AKÇİÇEK, E., GÖKSAN, T., DURMAZ, Y. (2006). Algal Antioksidanlar. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, **23 (1)**: 85-89.
- GRAVANCE, C.G., CHAMPION, Z.J., CASEY, P.J. (1998). Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology*, **49**: 1219- 1230.
- GRIVEAU, J.F., DUMONT, E., RENARD, P., CALLEGARI, J.P., LE LANNOU, D. (1995). Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, **103**: 17–26.
- GRIVEAU, J.F., LE LANNOU, D., (1997). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int. J. Androl.* **20**: 61–69.
- GUTTERIDGE, J.M.C. (1995). Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical Chemistry*, **41 (12)**: 1819-1828.
- GÜÇTAŞ, A.Ö. (2006). Bilgisayar destekli semen snaliz sistemi (CASA) ile yapılan sperm morfolojisi incelemelerinin tekrarlanabilirliği, değişken analizleri ve laboratuvar içi manuel yöntemle karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
- GÜNAY, Ü., NUR, Z., DOĞAN, İ., BAŞPINAR, B., SOYLU, M.K. (2003). Sıfat Sezonuna Geçiş Döneminde ve Sıfat Sezonunda Koç Spermasının Dondurulabilirliğinin Araştırılması. *U. Ü. Vet. Fak. Derg.*, **22**: 81-85.
- GÜNDOĞAN, M. (1997). Koçlarda Scrotal Sıcaklık Artışının Spermatogenesis ve Diğer Spermatolojik Özellikler Üzerine Etkisi. Doktora Tezi F. Ü. Sağ. Bil. Enst.
- GÜNDOĞAN, M. (1999). Koçların Testis Ölçülerinin Spermatolojik Özellikler ve Kan Serum Testosteron Miktarları ile İlişkisi. *Hay. Araş. Derg.*, **9 (1-2)**: 49-52.
- GÜNDOĞAN, M. (2006). Some Reproductive Parameters and Seminal Plasma Constituents in Relation to Season in Akkaraman and Awassi Rams. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **30 (1)**: 95-100.

- GÜNDOĞAN, M. (2009). Short Term Preservation of Ram Semen with Different Extenders. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **15 (3)**: 429-435
- GÜNDOĞAN, M., AVDATEK, F., YENİ, D. (2011) Effect of extenders on motility, morphology and osmotic resistance parameters of ram sperm during liquid storage. *Revue Méd. Vét.*, **162 (11)**: 546-551.
- GÜNDOĞAN, M., TEKERLİ, M., UÇAR, M., TÜRKMENOĞLU, İ. (2003). Effect of diluent on motility of ram sperm during storage at 5°C. *Archives of Andrology.*, **49**: 69-75.
- GÜNDOĞAN, M., SERTESER, M. (2005). Some Reproductive Parameters and Biochemical Properties in Akkaraman and Awassi Rams. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **29 (3)**: 595-599.
- GÜNDOĞAN, M., UÇAR, M., TEKERLİ, M. (2002). Afyon Koşullarında Yetiştirilen Koçlarda Aşım Sezonu Öncesi, Esnası ve Sonrasında Testislerin Morfometrik Ölçümleri ile Diğer Spermatolojik Özellikler Arasındaki İlişkinin Araştırılması. *Lalahan Hay. Araş. Enst. Derg.*, **43 (1)**: 9-22.
- GÜNDOĞAN, M., YENİ, D., AVDATEK, F., FİDAN, A.F. (2010). Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.*, **122**: 200-207.
- HAFEZ, E. S. E. (1987). Semen Evaluation (5 Ed) In: Hafez, E. S. E. (Ed) *Reproduction in farm animals*. Philadelphia. Lea and Fabiger.
- HAGEN, T.M., INGERSOLL, R.T., LYKKESFELDT, J., LIU, J., WEHR, C.M., VINARSKY, V., BARTHOLOMEW, J.C., AMES, A.B. (1999). (R)-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J.*, **13**: 411-418.
- HALLIWELL, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet*, **344**: 721-724.
- HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what me ask them to survive. *J. Androl.*, **11 (1)**: 73-88.
- HARRISON, R.A.P., WHITE, I.G. (1972). Glycolytic enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull, boar and ram, and their leakage after cold shock. *J. Reprod. Fertil.*, **30**: 105-115.
- HATAMOTO, L.K., SOBRINHO, B.C.A., NICHİ, M., BARNABE, V.H., BARNABE, R.C., CORTADA, C.N.M. (2006). Effects of dexamethasone

- treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology*, **66**: 1610–1644.
- HENKEL, R. (2005). The impact of oxidants on sperm function. *Andrologia*, **37**: 205–206.
- HENKEL, R., MENKVELD, R., KLEINHAPPL, M., SCHILL, W.B. (2001). Seasonal changes in human sperm chromatin condensation. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **18 (7)**: 371-377.
- HERNANDEZ, M., ROCA, J., BALLESTER, J., WASQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A., JOHANNISSON, A., SARAVIA, F., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2006). Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability. *Int. J. of Androl.*, **29**: 583–591
- HOLT, W.T. (2000a). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, **62**: 3-22.
- HOLT, W.T. (2000b). Fundamental aspects of sperm Cryobiol.: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, **53**: 47-58.
- HOUNSA, C., BRANDT, E., THEVELEIN, J., HOHMANN, S., PRIOR, B. (1998). Role of trehalose in survival of *saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*, **144**: 671–680.
- HU, J.H., LI, Q.W., JIANG, Z.J., LI, W.Y. (2008). Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing *Cryobiol.*, **57**: 257–262.
- HUA LI, J., QIN LING, Y., JING FAN, J., PING ZHANG, X., CUI, S. (2006). Expression of cysteine sulfinatase decarboxylase (CSD) in male reproductive organs of mice. *Histochem. Cell. Biol.*, **125**: 607–613.
- HUGHES, C.M., LEWIS, S.E.M., MCKELVEY-MARTIN, V.J., THOMPSON, W. (1996). A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile men, using a modified comet assay. *Mol. Hum. Reprod.*, **2**: 613–619.
- HUGHES, C.M., LEWIS, S.E.M., MCKELVEY-MARTIN, V.J., THOMPSON, W. (1997). Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.*, **374 (2)**: 261–268.

- HUGHES, C.M., LEWIS, S.E.M., MCKELVEY-MARTIN, V.J., THOMPSON, W. (1998). The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum. Reprod.*, **13** (5): 1240–1247.
- HUGHES, C.M., MCKELVEY-MARTIN, V.J., LEWIS, S.E.M. (1999). Human sperm DNA integrity assessed by the Comet and ELISA assays. *Mutagenesis*, **14** (1): 71–75.
- HULL, M.G., NORTH, K., TAYLOR, H., FARROW, A., FORD, W.C. (2000). Delayed conception and active and passive smoking. The Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood Study Team. *Fertil. Steril.*, **74**: 725–733.
- IBRAHIM, S.F., OSMAN, K., DAS, S., OTHMAN, A.M., MAJID, N.A., RAHMAN, M.P.A. (2008). A study of the antioxidant effect of alpha lipoic acids on sperm quality. *Clinics*, **63**: 545-50.
- IJAZ, A., DUCHARME, R. (1995). Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C. *Theriogenology*. **44**: 1039-1050.
- IRVINE, D.S. (1996). Gluthatione as a treatment for male infertility. *Rev. Reprod.*, **1**: 6–12.
- IRVINE, D.S., TWIGG, J.P., GORDON, E.L., FULTON, N., MILNE, P.A., AITKEN, R.J. (2000). DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J. Androl.*, **21**: 33-44.
- JACOBSEN, J.G., SMITH, L.H. (1968). Biochemistry and physiology of taurine derivatives. *Physiol. Rev.*, **48**: 424.
- JAFAROGHLI, M., KHALILI, B., FARSHAD, A., ZAMIRI, M.J. (2011). The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Rum. Res.*, **96**: 58–63.
- JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H., PEREZ-PELAEZ, M., ZANEVELD, L.J. (1984). Comparison of gliserol and a ion buffer system as cryoprotective media for human spermatozoa. Effect on motility, penetration of zona-free hamster oocytes and acrosin/proacrosin. *J. Androl.*, **5** (1): 1-7.
- JIANG, Z.L., LI, Q.W., LI, W.Y., HU, J.H., ZHAO, H.W., ZHANG, S.S. (2007). Effect of low density lipoprotein on DNA integrity of freezing–thawing boar sperm by neutral comet assay. *Anim. Reprod. Sci.*, **99**: 401–407.
- JONES, A.R., CHANTRILL, L.A., COKINAKIS, A. (1992). Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoon. *J. Reprod. Fertil.*, **94**: 129-134.

- JONES, R., MANN, T. (1977). Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J. Reprod. Fert.*, **50**: 261-268.
- JONES, R.C., MARTIN, I.C.A. (1973). The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5 8C in the ultrastructure of ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, **35**: 311–320.
- JOSHI, A., BAG, S., NAQVI, S.M.K., SHARMA, R.C., MITTAL, J.P. (2005). Effect of post-thawing incubation on sperm motility and acrosomal integrity of cryopreserved Garole ram semen. *Small Rum. Res.*, **56**: 231–238.
- KADIRVEL, G., KUMARA, S., KUMARESAN, A. (2009). Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Anim. Reprod. Sci.*, **114**: 125–134.
- KAFI, M., SAFRADIAN, M., HASHEMI, M. (2004). Seasonal Variation in Semen Characteristics, Scrotal Circumference and Libido of Persian Karakul Rams. *Small Rum. Res.*, **53**: 133-137.
- KAGAN, V., SERBINOVA, E., PACKER, L. (1990). Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**: 851-857.
- KARAGIANNIDIS, A., VARSAKELI, S., ALEXOPOULOS, C., AMARANTIDIS, I. (2000). Seasonal Variation in Semen Characteristics of Chios and Fresian Rams in Greece. *Small Rum. Res.*, **37**: 125-130.
- KASIMANICKAM, R., PELZER, K.D., KASIMANICKAM, V., SWECKER, W.S., THATCHER, C.D. (2006). Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. *Theriogenology*, **65**: 1407–1421.
- KAWAI, H., SAKURAI, M., INOUE, Y., CHUJO, R., KOBAYASHI, S. (1992). Hydration of oligosaccharides: anomalous hydration ability of trehalose. *Cryobiol.*, **29**: 599–606.
- KAYA, A., YILDIZ, C., LEHİMCİOĞLU, N.C., ERGİN, A., AKSOY, M. (1999). Konya Merinos Koçlarında Sperma Kalitesi, Testis Ölçüleri ve Kan Testosteron Düzeylerine İlişkin Mevsimsel Değişikliklerin Araştırılması. *Hay. Araş. Derg.*, **9** (1-2): 1-5.
- KEMAL, D.N., MORSHEDI, M., OEHNINGER, S. (2000). Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, **74**: 1200–1207.

- KENDLER, B.S. (1989). Taurine: An overview of its role in preventive medicine. *Prevent Medicine*, **18**: 79.
- KILIÇ, N., YILDIRIM, Z. (2008). Effects of Taurine and Age on Liver Antioxidant Status and Protein Oxidation. *Turk. J. Biochem.*, **33** (4): 169-174.
- KIM, S.H., YU, D.H., KIM, Y.J. (2010). Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. *Theriogenology*, **73**: 282-292.
- KRAEMER, M., FILLION, C., MARTIN-PONT, B., AUGER, J. (1998). Factors influencing human sperm kinematic measurements by the celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Hum Reprod.*, **13**: 611-619.
- KULAKSIZ, R., ÇEBİ, Ç., AKÇAY, E., DAŞKIN, A. (2010). The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Rum. Res.*, **88**: 12–15.
- KUMAR, R., MOHANARAO, G.J., ARVIND., ATREJA, S.K. (2011). Freeze–thaw induced genotoxicity in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation to total antioxidant status. *Mol. Biol. Rep.*, **38** (3): 1499-1506.
- KUNDU, C.N., DAS, K., MAJUMDER, G.C. (2001). Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. *Cryobiol.*, **41**: 21–27.
- LABBE, C., MARTORIATI, A., DEVAUX, A., MAISSE, G. (2001). Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol. Reprod. Dev.* **60**: 397– 404.
- LANGDORF, G.A., SHRESTHA, J.N.B., SANFORD, L.M., MARCUS, G.J. (1998). Reproductive Hormone Levels of Early Postpubertal Ram Lambs in Relation to Breed, Adult Testis and Semen Quality. *Small Rum. Res.* **29**: 225-231.
- LASSO, J.L., NOILES, E.E., ALVAREZ, J.G., STOREY, B.T. (1994). Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation, *J Androl.* **15** (3): 225-265.
- LEAHYA, T., MARTI, J.I., MENDOZA, N., PÉREZ-PÉ, R., MUINO-BLANCO, T., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A., EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. (2010). High pre-freezing dilution improves post-thaw function of ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* **119** (1-2): 137-146.
- LEBOEUF, B., RESTALL, B., SALAMON, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* **62**: 113-141.

- LEEuw, F.E.D., LEEuw, A.M.D., DAAS, J.H.G., COLENBRANDER, B.V., ERKLEIJ, A.J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiol.*, **30**: 32-44.
- LENZI, A., GANDINI, L., PICARDO, M. (1998). A rationale for glutathione therapy. *Hum. Reprod.*, **13**: 1419.
- LI, M.W., MEYERS, S., TOLLNER, T.L., OVERSTREET, J.W. (2007). Damage to chromosomes and DNA of Rhesus monkey sperm following cryopreservation. *J. Androl.*, **24**: 601-609.
- LINFOR, J.J., MEYERS, S.A. (2002). Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. *J. Androl.*, **23** (1): 107-113.
- LOPES, S., JURISICOVA, A., SUN, J., CASPER, R. (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, **13** (4): 896-900.
- LOPEZ-FERNANDEZ, C., FERNANDEZ, J.L., GOSALBEZ, A. ARROYA, F., VAZQUEZ, J.M., HOLT, W.W., GOSALVEZ, J. (2008). Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. *Ram. Theriogenology*, **70** (6): 898-908.
- LOPEZ-SAAZ, A., ORTIZ, N., GALLEGRO, L., GARDE, J.J. (2000). Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. *Arch. Androl.*, **44**: 155-164.
- LOVE, C.C., KENNEY, R.M. (1998). The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology*, **50**: 955-72.
- LUVONI, G.C., KALCHSCHMIDT, E., LEONI, S., RUGGERIO, C. (2003). Conservation of feline semen Part I: Cooling and freezing protocols. *J. Feline Med. Surg.*, **5**: 203-208.
- MADRID-BURY, N., PÉREZ-GUTIÉRREZ, J.F., PÉREZ-GARNELO, S., MOREIRA, P., PINTADO SANJUANBENITO, B., GUTIÉRREZ-ADÁN, A., DE LA FUENTE MARTINEZ, J. (2005). Relationship between non-return rate and chromatincondensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology*. **64**: 232- 41.

- MAIA, M.D.S., BICUDO, S.D., AZEVEDO, H.C., SICHERLE, C.C., SOUSA, D.B.D., RODELLO, L. (2009). Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Rum. Res.*, 85: 85–90.
- MAIA, M.D.S., BICUDO, S.D., RODELLO, L., GALLEGGO, I.C.S. (2010). Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.*, 122: 118–123.
- MAKHLOUF, A.A., NIEDERBERGER, C. (2006). DNA Integrity Tests in Clinical Practice: It Is Not a Simple Matter of Black and White (or Red and Green) *J. of Androl.*, **27 (3)**: 316-23.
- MANN, T., WHITE, L.G. (1957). Glycerol metabolism by spermatozoon. *Biochem.*, **65 (4)**: 634-639.
- MANSOUR, M. (2009). Modification of Hypo-Osmotic Swelling Test to Evaluate the Integrity of Stallion Sperm Plasma Membrane. *Global Veterinaria*, **3 (4)**: 302-307.
- MARCO-JIMENEZ, F., PUCHADES, S., GADEA, J., VICENTE, J.S., VIUDES-DE-CASTRO, M.P. (2005). Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*, **64**: 1756–1765.
- MARQUES, A., SANTOS, P., ANTUNES, G., CHAVEIRO, A., MOREIRA, D.A., SILVA, F. (2010). Effect of a-Tocopherol on Bovine In Vitro Fertilization. *Reprod. Dom. Anim.*, **45**: 81–85.
- MARTINS-BESSA, A., ROCHA, A., MAYENCO-AGUIRRE, A. (2006). Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology*, **66 (9)**: 2047-2055.
- MASSIP, A. (2001). Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Dom. Anim.*, **36**: 49–55.
- MATHUR, A.K., SRIVASTAVA, R.S., KARLA, D.B.A. (1989). Comparison of Semen Quality Attributes in Exotic Rams During Summer and Autumn in Semi-Arid Tract of Rajasthan. *Int. J. Anim. Sci.*, **4**: 172-178.
- MATSUOKA, T., IMAI, H., KOHNO, H., FUKUI Y. (2006). Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of froze-thawed ram spermatozoa. *J. of Reprod. Dev.*, **52 (5)**: 675-683.
- MAXVELL, W.M.C., WATSON, P.F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, **42**: 55-65.

- MAXWELL, W.M.C., SALOMAN, S. (1993). Liquid storage of ram semen. *Reprod. Fertil. Dev.*, **5**: 613-638.
- MAXWELL, W.M.C., STOJANOV, T. (1996). Liquid storage of ram semen in the absence of some antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.*, **8**: 1013-1020.
- MAZUR, P., KATKOOV, I.I., KATKOVA, N., CRITSER, J.K. (2000). The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an Escherichia coli membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. *Cryobiol.*, **40**: 187-209.
- McKINNEY, K.A., LEWIS, S.E., THOMPSON, W. (1996). The effects of pentoxifylline on the generation of reactive oxygen species and lipid peroxidation in human spermatazoa. *Andrologia*, **28**: 15-20.
- MEDEIR, C.M.O., FORELL, F., OLIVEIRA, A.T.D., RODRIGUES, J.L. (2002). Current Status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology*, **57**: 327-344.
- MEHDI, M., KHANTOUCHE, L., AJINA, M., SAAD, A. (2009). Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. *Andrologia*, **41(6)**: 383-386.
- MERT, H., KARAKUŞ, K., YILMAZ, A., AYGUN, T., MERT, N., APAYDIN, B., SEYHAN, E. (2009). Effect of genotype on testis, quality and mineral composition of semen in various ram breeds. *Biol. Trace Elem. Res.*, **132**: 93-102.
- MOCE, E., VICENTE, J.S. (2009). Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Anim. Reprod. Sci.*, **110**: 1-24.
- MOLINIA, F.C., EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. (1994). Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*, **42**: 849-858.
- MØLLER, P. (2006). The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **98**: 336-345.
- MORREL, J.M., HODGE, J.K. (1998). Cryopreservation of non human primate sperm: priorities for future research. *Anim. Reprod. Sci.*, **53**: 43-63.
- MORTIMER, S.T., SWAN, M.A. (1995). Kinematics of capacitating human spermatozoa analysed at 60 Hz. *Hum. Reprod.*, **10**: 873-879.

- MOUSTACAS, V.S., ZAFFALON, F.G., LAGARES, M.A., LOAIZA-ECCHEVERRI, A.M., VARAGO, F.C., NEVES, M.M., HENEINE, L.G.D., ARRUDA, R.P., HENRY, M. (2011). Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, **75**: 300–307.
- MOUSTAFA, M.H., SHARMA, R.K., THORNTON, J., MASCHA, E., ABDEL-HAFEZ, M.A., THOMAS, A.J., AGARWAL, A., (2004). Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum. Reprod.*, **19** (1): 129–138.
- NANDRE, R.M. (2007). Effect of preservation of spermatozoa at sub-zero temperature on DNA integrity by Comet Assay. Master of Veterinary Science, Department Of Animal Biotechnology College Of Veterinary Science And Animal Husbandry Anand Agricultural University, Anand, Gujarat
- NAVARI-IZZO, F., QUARTACCI, M.F., SGHERRI, C. (2002). Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol. Biochem.*, **40**: 463-70.
- NEILD, D.M., GABELLA, B.M., CHAVES, M.G., MIRAGAYA, M.H., COLENBRANDER, B., AGUERO, A., (2003). Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, **59**: 1693–1705.
- NOROOZI, M., ANGERSON, W.J., LEAN, M.E.J. (1998). Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Amer. J. Clin. Nutr.*, **67**: 1210–1218.
- NUR, Z., ZIK, B., ÜSTÜNER, B., SAĞIRKAYA, H., ÖZGÜDEN, C.G. (2010). Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*, **73**: 267–275.
- NUR, Z., ZIK, B., ÜSTÜNER, B., TUTUNCU, Ş., SAĞIRKAYA, H., ÖZGÜDEN, C.G., GÜNAY, Ü., DOĞAN, İ. (2011). Effect of freezing rate on acrosome and chromatin integrity in ram semen. *A.Ü. Vet Fak. Derg.*, **58**: 267-272.
- OEHNINGER, S, DURU, N.K., SRISOMBUT, C., MORSHEDI, M. (2000). Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **169**: 3-10.
- OLIVE, P.L., BANATH, J.P. (2006). The Comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, **1** (1): 23–29.

- OLLERO, M., PEREZ-PE, R., MUINO-BLANCO, T., CEBRIAN-PEREZ, J.A. (1998). Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiol.*, **37**: 1-12.
- OMBELET, W., POLLET, H., BOSMANS, E., VEREECKEN, A. (1997). Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. *Hum. Reprod.*, **12**: 1015-1020.
- ONAT, T., EMERK, K., SOZMEN, E.Y. (2002). İnsan biyokimyası. Palme yayıncılık, Ankara.
- ORTLOFF, C., DEPPE, M., SCHILL, W.B., SANCHEZ, R. (2006). A new technique to evaluate the ability of cryoprotectors to prevent premature acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrologia*, **38**: 230-232.
- ORTMAN, K., RODRIGUEZ, M.H. (1994). Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. *Vet. Med. A-Zbl. Vet. A -Physiol.*, **41**: 37-47.
- OSTLING, O., JOHANSON, K.J. (1984). Microelectrophoretic Study Of Radiation-Induced DNA Damage In Individual Mammalian Cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **123**: 291-298.
- ÖZDEN, S., CATALGOL, B., GEZCİNCİ, S., ARDA, P., BOLKENT, S., ALPERTUNGA, B. (2009). Methiocarb-induced oxidative damage following subacute exposure and the protective effects of vitamin E and taurine in rats. *Food Chem Toxicol* 47: 1676-1684.
- ÖZTÜRKLER, Y., AK, K., İLERİ, İ.K. (1997). Kıvrık koçlarında donma ve eritme sonrası spermatolojik özellikler üzerine mevsimin etkisi. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **3 (1)**: 73-79.
- PACKER, L., WITT, E.H., TRITSCHLER, H.J. (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.*, **19**: 227-250.
- PARCELL, S. (2002). Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern. Med. Rev.*, **7**: 22-24.
- PATIST, A., ZOERB, H. (2005). Preservation mechanism of trehalose in food and biosystems, *Colloid. Surface. B.*, **40**: 107-113.
- PAULENZ, H., SODERQUIST, L., PEREZ-PE, R., BERG, K.A. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, **57**: 823-836.

- PENA, A.I., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M., RODRIGUEZ MARTINEZ, H. (2003). Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim. Reprod. Sci.*, **78**: 85–98.
- PERCY, M.E. (1984). Catalase: an old enzyme with a new role. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, **62**: 1006-1014.
- PEREZ, L.J., VALCARCEL, A., DE LAS HERAS, M.A., MOSES, D., BALDASSARR, E. (1996). Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*, **46**: 131–140.
- PERIS, S.I., BILODEAU, J.F., DUFOUR, M., BAILEY, J.L. (2007). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, **74**: 878–892.
- PHILLIPS, P.H. (1939). The preservation of bull semen. *J Biol Chem*, **130**: 415.
- PİRİNÇCİ, İ., KARAHAN, İ., BOZKURT, T., GÜLER, O. (2001). Koçlarda Prostaglandin F₂ α , Furosemid ve İndometasinin Sperma Özellikleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması. *Vet. Bil. Derg.*, **17**: 83-88.
- POLGE, C., SMITH, A.U., PARKER, A.S. (1949). Revival of spermatozoa after virification and dehydration at low temperatures. *Nature*, **16**: 666.
- PONTBRIAND, D., HOWARD, J.G., SCHIEWE, M.C., STUART, L.D., WILDT, D.E. (1989). Effect of Cryoprotective Diluent and Method of Freeze-Thawing on Survival and Acrosomal Integrity of Ram Spermatozoa. *Cryobiol.*, **26**: 341-354.
- PSENICKA, M., DIETRICH, G.J., WOJTCZAK, M., NYNCA, J., RODINA, M., LINHART, O., COSSON, J., CIERESZKO, A. (2008). Acrosome staining and motility characteristics of sterlet spermatozoa after cryopreservation with use of methanol and DMSO. *Cryobiol.*, **56**: 251–253.
- PURDY, P.H. (2006). A Review on goat sperm cryopreservation *Small Rum. Res.*, **63**: 215-225
- RAMILO, C.A., LEVEQE, V., GUAN, Y. (1999). Interrupting the hydrogen bond network at the active site of human manganese superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **274** (39): 27711-27716.

- REED, L.J., DEBUSK, B.G., GUNSALUS, I.C., HORNBERGER, C.S. (1951). Crystalline alpha-lipoic acid: A catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science*, **27**: 93-94.
- REGE, J.E.O., TOE, F., MUKASA-MUGERVA, E., TEMBELY, S., ANINDO, D., BAKER, R.L., LAHLOU-KASSI, A. (2000). Reproductive Characteristics of Ethiopian Highland Sheep. II. Genetic Parameters of Semen Characteristics and Their Relationships With Testicular Measurements in Ram Lambs. *Small Rum. Res.*, **37**: 173-187.
- RICE, D., KENNEDY, S. (1988). Vitamin E: function and effects of deficiency. *Br. Vet. J.*, **144**: 482-492.
- RICHARDS, A.B., KRAKOWKA, S., DEXTER, L.B., SCHIMD, H., WOLTERBEEK, A.P.M., WAALKENS-BERENDSEN, D.H., SHIGOYUKI, A., KURIMOTO, M. (2002). Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance and results of multiple safety studies. *Food Chem Toxicol*, **40**: 871-898.
- RITAR, A.J., BALL, P.D. (1993). The effect of freeze-thaw of goat and sheep semen at a high density of spermatozoon on cell viability and fertility after insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, **31**: 249-262.
- RITAR, A.J., MENDOZA, G., SALAMON, S., WHITE, I.G. (1992). Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). *J. Reprod. Fert.*, **95**: 97-102.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., EKWALL, H., LINDE-FORSBERG, C. (1993). Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **47**: 279-285.
- ROTA, A., ROTA, A., MARTINI, M., MILANI, C., ROMAGNOLI, S. (2005). Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod. Nutr. Dev.*, **45**: 29-37.
- ROY, S., PACKER, L. (1998). Redox regulation of cell functions by alpha-lipoate: biochemical and molecular aspects. *Biofactors*, **8**: 17-21.
- SAILER, B.L., JOST, L.K., EVENSON, D.P. (1995). Mammalian sperm DNA susceptibility to in-situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J. Androl.* **16**: 80-87.
- SAKKAS, D., MOFFAT, O., MANICARDI, G.C. (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol. Reprod.* **66**: 1061-1067.

- SAKKAS, D., MARIETHOZ, E., MANICARDI, G.C. (1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev. Reprod.*, **4**: 31-37.
- SALEH, R.A., AGARWAL, A., (2002). Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practise. *J. Androl.*, **23** (6): 737-752.
- SALOMAN, S., MAXWELL, W.M.C. (2000). Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, **62** (1-3): 77-111.
- SANCHEZ-PARTIDA, L.G., SETCHELL, B.P., MAXWELL, W.M.C. (1997). Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, **9** (7): 689-696.
- SANSONE, G., NASTRI, M.J.F., FABBROCINI, A. (2000). Storage of buffalo *Bubalus bubalis* semen. *Anim. Reprod. Sci.*, **62**: 55-76.
- SANTIANI, A., HUANCA, W., SAPANA, R., HUANCA, T., SEPULVEDA, N., SÁNCHEZ, R. (2005). Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J. Androl.*, **7** (3): 303-309.
- SCHAFFER, S., HOLZMANN, A. (2000). The use of transmigratorin and SpermacTM stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, **59**: 201-211.
- SEDLAK, J., LINDSAY, R.H.C. (1968). Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Anal. Biochem.*, **25**: 192-205.
- SELVAKUMAR, E., PRAHALATHAN, C., MYTHILI, Y., VARALAKSHMI, P. (2005). Beneficial effects of DL- α -lipoic acid on cyclophosphamide-induced oxidative stress in mitochondrial fractions of rat testis. *Chem. Biol. Interact.*, **152**: 59-66.
- SHARMA, R.K., AGARWAL, A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. Clinical review. *Urology*. **48** (6): 835-850.
- SHIVA, S.R.N., JAGAN, M., ATREJA, S.K. (2010). Effect of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm following cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* **119**: 183-190.
- SICHERLE, C.C., MAIA, M.S., BICUDO, S.D., RODELLO, L., AZEVEDO, H.C. (2011). Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. *Small Rum. Res.*, **95**: 144-149.

- SIEME, H., HARRISON, R.A.P., PETRUNKINA, A.M. (2008). Cryobiological determinants of frozen semen quality with special reference to stallion. *Anim. Reprod. Sci.*, **107**: 276-292.
- SIKKA, S.C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Bioscience*, **1**: 78–86.
- SILVA, E.C.B., CAJUEIRO, J.F.P., SILVA, S.V., VIDAL, A.H., SOARES, P.C., GUERRA, M.M.P. (2012). In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide. *Anim. Reprod. Sci.*, **132**: 155– 158.
- SILVA, M.S., BICUDO, S.D., SICHERLE, C.C., RODELLO, L., GALLEGO, I.C. (2010). Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.*, **122**: 118-123
- SIMPLICIO, A.A., RIERA, G.S., NELSON, E.A., PANT, K.P. (1982). Seasonal variation in seminal and testicular characteristics of Brazilian Somali rams in the hot semi-arid climate of tropical northeast Brazil. *J. Reprod. Fert.*, **66**: 735-738.
- SINGH, N.P., MULLER, C.H., BERGER, R.E. (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil. Steril.*, **80** (6): 1420-1430.
- SINHA, M.P., SINHA, A.K., PRASAD, R.L (1996). The effect of glutathione on motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Anim. Reprod. Sci.*, **41**: 237-243.
- SLAVIK, T. (1987). Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoon with zona-free hamster eggs. *J. Reprod. Fert.*, **79**: 99-103.
- SŁOWINSKA, M., KAROL, H., CIERESZKO, A. (2008). Comet assay of fresh and cryopreserved bull spermatozoa. *Cryobiol.*, **56**: 100–102.
- SODERQUIST, L., LUNDEHEIM, N., NILSSON, B. (1999). Assessment of fertility after using different procedures to thaw ram spermatozoon frozen in mini straw. *Reprod. Dom. Anim.*, **34**: 61-66.
- SOYLU, M.K., GÖKÇEN, H., TÜMEN, H., DOĞAN, İ. (1991). Değişik Irk İthal Koçların Bazı Androlojik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar. *Hay. Araş. Derg.*, **1** (1): 15-18.
- SPEIT, G., HARTMANN, A. (2005). The Comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods. Mol. Biol.*, **291**: 85-95.

- STRAUSS, G., SCHURTENBERGER, P., HAUSER, H. (1986). The interaction of saccharides with lipid bilayer vesicles: stabilization during freeze-thawing and freeze-drying. *Biochim. Biophys. Acta.*, **858**: 169–180.
- SU, L., LI, X., QUAN, J. YANG, S., LI, Y., HE, X., TANG, X. (2008). A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, **104**: 212–219.
- SULEIMAN, S.A., ALI, M.E., ZAKI, Z.M., EL-MALIK, E.M., NASR, M.A. (1996). Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J. Androl.*, **17**: 530–537.
- SUZUKI, Y.J., TSUCHIYA, M., PACKER, L. (1991). Thiocctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free. Rad. Res. Commun.*, **15**: 255-263.
- TAHA, T.A., ABDEL-GAWAD, E.L., AYOUB, M.A. (2000). Monthly variations in some reproductive parameters of Barki and Awassi rams throughout 1 year under subtropical conditions I. Semen characteristics and hormonal levels. *Anim. Sci.* **71**: 317-324.
- TAYLOR, C.T. (2001). Antioksidants and reactive oxygen species in human infertility. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **10**: 189-198.
- TEKİN, N. (1994). Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi. In: Alaçam, E. Ed. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Suni Tohumlama, Doğum ve İnfertilite. Dizgievi, Konya. 69-79.
- TEKİN, N., UYSAL, O., AKÇAY, E., YAVAŞ, İ. (2006). Farklı taurin dozlarının ve dondurma hızının koç spermasının dondurulması üzerine etkileri. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **53**: 179-184.
- TONIETO, R.A., GOULARTE, K.L., GASTAL, G.D.A., SCHIAVON, R.S., DESCHAMPS, J.C., LUCIA, T. (2010). Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Rum. Res.*, **93** (2-3): 206-209.
- TROUNSON, A.O. (1990). Cryopreservation. *Brit. Med. Bull.*, **147**: 427-433.
- TUNCER, P.B., BUCAK, M.N., BÜYÜKLEBLEBİCİ, S., SARIÖZKAN, S., YENİ, D., EKEN, A., AKALIN, P.P., KİNET, H., AVDATEK, F., FİDAN, A.F., GÜNDOĞAN, M. (2010a). The Effect of Cysteine and Glutathione on Sperm and Oxidative Stress Parameters of Post-Thawed Bull Semen. *Cryobiol.*, **61**: 303-307.

- TUNCER, P.B., BUCAK, M.N., SARIÖZKAN, S., SAKİN, F., YENİ, D., CİĞERCİ, İ.H., ATEŞŞAHİN, A., AVDATEK, F., GÜNDOĞAN, M., BÜYÜKLEBLEBİCİ, O. (2010b). The effect of raffinose and methionine on post-thawed Angora buck (*Capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. *Cryobiol.*, **61**: 89-93.
- TÜRK, G., DEMİRCİ, E. (2005). Akkaraman Koçların Serum Testesteron Düzeylerinde ve Spermatogenesisindeki Mevsime Bağlı Değişikliklerin Araştırılması. I. Spermatolojik Özelliklerle Testesteron Miktarı Arasındaki İlişki. *F. Ü. Sağ. Bil. Derg.*, **19** (1): 21-27.
- TWIGG, J., FULTON, N., GOMEZ, E., IRVINE, D.S., AITKEN, R.J. (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: Lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum. Reprod.*, **13**: 1429-36.
- UYVAL, O., BUCAK, M.N. (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.
- UYVAL, O., BUCAK, M.N. (2009). The role of different trehalose concentrations and cooling rates in freezing of ram semen. *Ankara Üniv. Vet. Derg.* **56**: 99-103.
- UYVAL, O., KİNİT, H., CEVİK, M., CETİNKAYA, S. (2000). Fertility obtained from frozen ram semen with different extenders containing varied antioxidants. *Ankara Üniv. Vet. Derg.* **47**: 177-189.
- UYVAL, O., TAŞDEMİR, U., KİNİT, H., ÖZCAN, İ. (2003). Akkaraman Irkı Koçlarda Başlıca Spermatolojik Özellikler. *Lalahan Hay. Araş. Enst. Derg.*, **43**: 23-28.
- VERMA, A., KANWAR, K.C. (1999). Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro *Asian J. Androl.*, **1**: 151-154.
- VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, **57**: 149-179.
- VISHWANATH, R., SHANNON, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.*, **62**: 23-53.
- VISSER, D., SALAMON, S. (1973). Fertility of ram semen frozen in a tris-based diluent. *Austr. J. Biol. Sci.*, **26**: 513-516.

- WATSON, P.F. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5⁰C by egg-yolk lipoprotein *J. Reprod. Fertil.*, **62**: 483-492.
- WATSON, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, **7**: 871-91.
- WATSON, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, **60**: 481-492.
- WEN LI, M., MEYERS, S., TOLLNER, T.L., OVERSTREET, W. (2007). Damage to Chromosomes and DNA of Rhesus Monkey Sperm Following Cryopreservation. *J. of Androl.*, **28 (4)**: 493-501.
- WHITAKER, B.D., CARLE, B., MUKAI, T., SIMPSON, A., VU, L., KNIGHT, J.W. (2008). Effect of exogenous glutathione supplementation on motility, viability, and DNA integrity of frozen-thawed boar semen. *Anim. Reprod.*, **5 (3/4)**: 127-131.
- WHITE, I.G. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation *Reprod. Fertil. Dev.*, **5 (6)**: 639-658.
- WOODS, E.J., GILMORE, J.A., LIU, J. (2000). Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation method. *Hum. Reprod.*, **15**: 335-343.
- YENİ, D. (2010) Koçlarda Bazı Androlojik Parametrelerin ve Biyokimyasal Özelliklerin Mevsimle İlişkisi. Doktora Tezi A.K.Ü. Sağlık Bil. Enst.
- YENİ, D., FİDAN, A.F., CİĞERCİ, İ.H., KONUK, M., AVDATEK, F., GÜNDOĞAN, M. (2012). Effect of α -lipoic acid on sperm quality, reproductive tract measures in thinner exposed rats. *Andrologia*, **44**: 74-80.
- YILDIZ, C., ATAMAN, M.B., KAYA, A., TEPELİ, C., LAHİMCİOĞLU, N. (2000) Köpek ve koçlarda akrozom bozukluklarının belirlenmesi amacıyla farklı tespit ve boyama yöntemlerinin karşılaştırılması. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.*, **11 (2)**: 7-11.
- YILDIZ, C., KAYA, A., AKSOY, M., TEKELİ, T. (2000). Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, **54**: 579-585.
- YILDIZ, S. (2004). Koç Spermasının Farklı Antioksidan İçeren Sulandırıcılarla Kısa Süreli (+5⁰C) Saklanması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

YOSHIDA, M. (2000). Conservation of sperm: current status and new trends *Anim. Reprod. Sci.*, **60-61**: 349-355.

YURDAYDIN, N. (1990). Spermanın Alınması, Saklanması ve Suni Tohumlama (1st Ed) In: Alaçam E. (Ed) *Theriogenoloji*. Ankara, Nural Matbacılık A.Ş.