



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**AKKARAMAN KOÇLARDA SPERMANIN
KOLESTEROL VE 7-DEHİDROKOLESTEROL İLE
DONDURULMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Muhammed Enes İNANÇ

**DÖLERME ve SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ogun UYSAL**

**ANKARA
2016**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKKARAMAN KOÇLARDA SPERMANIN
KOLESTEROL VE 7-DEHİDROKOLESTEROL İLE
DONDURULMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Muhammed Enes İNANÇ

**DÖLERME ve SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ongun UYSAL

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof.Dr. Ayhan ATA

Bu tez Tübitak-TOVAG tarafından 113O775 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
2016**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Akkaraman Koçlarda Spermanın Kolesterol ve 7-Dehidrokolesterol ile Dondurulması ve Değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak hazırlanmıştır. Tezimin fikir ve hipotezi tümüyle tez danışmanlarıma ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

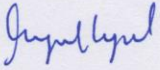
Tarih: 18.04.2016


İmza:

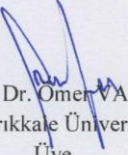
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalında Muhammed Enes İNANÇ tarafından
hazırlanan "Akkaraman koçlarda spermanın kolesterol ve 7-dehidrokolesterol ile
dondurulması ve değerlendirilmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA
TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

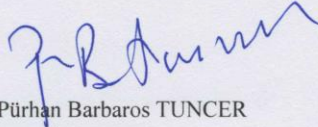
Tez Savunma Tarihi: 05.05.2016


Prof. Dr. Necmettin TEKİN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Ogun UYSAL
Ankara Üniversitesi
Raportör


Prof. Dr. Meltem SİRELİ
Ankara Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Ömer VARİŞLİ
Kırıkkale Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Pürhan Barbaros TUNCER
Aksaray Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	
Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	xii
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Akkaraman Irkının Genel Özellikleri	2
1.2. Koyunlarda Reprodüksiyon	3
1.3. Koyunlarda Seksüel Siklus ve Hormonal Mekanizması	3
1.4. Koçlarda Reprodüksiyon	4
1.4.1. Koçlarda Reprodüktif Organlar ve Fonksiyonları	4
1.4.1.1. Testisler	5
1.4.1.2. Kanallar	5
1.4.1.3. Eklenti Üreme Bezleri	6
1.4.1.3.1. Vezicüla Seminalis	6
1.4.1.3.2. Prostat	7
1.4.1.3.3. Cowper Bezi (Glandula Bulbourethralis)	7
1.4.1.4. Eksternal Üreme Organları	7
1.5. Çiftleşme Mevsimi	8
1.6. Koçlarda Ergenlik	9
1.7. Cinsel İstek (Libido Sexualis)	9
1.8. Hormonal Düzen	10
1.9. Spermatozoa Üretimi (Spermatogenezis)	11
1.10. Koç Spermmasının Özellikleri	12
1.11. Koyunlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama	13
1.12. Spermanın Saklanması	14
1.12.1. Kısa Süreli Saklama	14
1.12.2. Uzun Süreli Saklama	14
1.12.2.1. Koç Spermmasının Dondurulmasında Kullanılan Sulandırıcılar ve Kriyoprotektanlar	15
1.13. Spermanın Dondurulması	16
1.14. Spermanın Çözdürülmesi	18
1.15. Çözdürme Sonrası Spermatolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi	18
1.15.1 Computer Asisted Sperm Analysis (CASA) Sistemi Yardımıyla Spermatozoa Motilitesi, Hareket Özelliklerinin ve Anormal Spermatozoa Oranının Değerlendirilmesi	19
1.15.2. HipoOsmotik Swelling (HOS) Test	20
1.15.3. Ölü Spermatozoa Tespiti	20
1.15.4. Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi	21
1.15.5. Mitokondriyal Aktivitenin Belirlenmesi	22

1.15.6. Oksidatif Stres Parametreleri, Antioksidan ve Lipit Peroksidasyon Tayini	22
1.15.7. DNA Hasarının Belirlenmesi ve Apoptosis Tespiti	24
1.16. Sperma Sulandırıcılarına Kolesterol ile Doyurulmuş Siklodextrin Katılmasının Önemi	25
2. GEREÇ ve YÖNTEM	30
2.1. Hayvan Materyali	30
2.2. Hayvanların Bakım ve Beslenmesi	31
2.3. Spermanın Alınması	32
2.4. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması	33
2.4.1. Sulandırıcı Grupları	33
2.4.1.1. Standart Tris Sulandırıcısı	33
2.4.1.2. Siklodextrinlerin Hazırlanışı	34
2.4.1.3. Çalışmada Kullanılan Sulandırıcı Grupları	34
2.5. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi	35
2.5.1. Çözüm Sonu Spermatozoa Motilitesi ve Hareket Özelliklerinin Belirlenmesi	35
2.5.2. Anormal Spermatozoa Oranı	36
2.5.3. Ölü Spermatozoa Oranı (Viabilite)	37
2.5.4. HipoOsmotik Swelling (HOS) Test	38
2.5.5. Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi	39
2.5.6. Mitokondriyal Aktivitenin Belirlenmesi	40
2.5.7. Oksidatif Stres Parametreleri	41
2.5.7.1. Sperma Numunelerinin Hazırlanması	41
2.5.7.2. Lipit Peroksidasyon Derecesinin Belirlenmesi	42
2.5.7.3. Total Glutasyon (tGSH) Düzeyinin Analizi	42
2.5.7.4. Total Antioksidan Kapasite (AOP) Analizi	42
2.5.8. DNA Hasarının Belirlenmesi (COMET)	43
2.5.9. Apoptosis Tespiti	44
2.6. İstatistiksel Analiz	45
3. BULGULAR	46
3.1. Taze Spermanın Spermatolojik Özellikleri	46
3.2. Çözüm Sonu Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi	47
3.2.1. Spermatozoa Motilitesi ve Hareket Özelliklerinin Belirlenmesi	47
3.2.2. Anormal Spermatozoa Oranı	48
3.2.3. Ölü Spermatozoa Oranı	49
3.2.4. HipoOsmotik Swelling (HOS) Test	50
3.2.5. Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi	50
3.2.6. Mitokondriyal Aktivitenin Belirlenmesi	51
3.2.7. Oksidatif Stres Parametreleri	51
3.2.8. DNA Hasarının Belirlenmesi (COMET)	52
3.2.9. Apoptosis Tespiti	53
4. TARTIŞMA	54
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	74
ÖZET	78
SUMMARY	79
KAYNAKLAR	80
EKLER	
Ek-1. Etik Kurul Belgesi	91



ÖNSÖZ

Türkiye’de koyun yetiştiriciliği, tarımsal amaçla kullanılmayan mera ve otlaklardaki bitki örtüsünü et, süt, yapağı gibi ürünlere dönüştüren önemli bir etkinliktir. Bu yolla ekonomiye ve insan beslenmesine katkıda bulunan bir endüstri koludur. İnsan beslenmesinin temelini oluşturan ve ülkemizin tarımsal anlamda en önemli geçim kaynaklarından olan koyun yetiştiriciliğinde üretimin hızlandırılması, ortam etkilerinin geliştirilmesinin yanı sıra, gen kaynaklarının ıslahı da gereklidir. Islahın temelini hayvanların döl verimleri ile ilgili yapılan çalışmalar oluşturmaktadır. Döl verimleri ile ilgili çalışmalarda öne çıkan en önemli araç ise spermatolojik araştırmalar ve bunların önderliğinde yapılacak olan suni tohumlama çalışmalarıdır.

Suni tohumlama uygulamalarının geliştirilmesindeki en önemli etken değerli damızlık hayvanlardan alınan spermanın uygun olarak kullanılmasıdır. Koyunlarda dondurulmuş-çözdürülmüş sperma ile uygulanan biyokteknolojik yöntemlerde sığırlardaki kadar başarıya ulaşılamamaktadır. Bu yüzden koç spermasında kullanılan sulandırıcıların ve dondurma yöntemlerinin geliştirilmesi için araştırmalar yapılmalıdır.

Suni tohumlama koyun üretimi, yetiştiriciliği ve ıslahında önemli olmakla birlikte, dondurulmuş spermanın servikal tohumlamalarda kullanımı henüz tatmin edici sonuçlar vermemektedir. Tohumlamaların tatmin edici sonuçlar vermemesinin nedeni ise koyunlarda serviksin yapısının kateterin ilerlemesi için uygun yapıda olmaması yanında, in vitro mikroskopik sonuçların, sperma sulandırıcılarının, dondurma ve tohumlama tekniklerinin yeterli düzeyde gelişmemesinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte suni tohumlama çalışmaları ise, hayvanlardan daha fazla verim alınmasında (hayvansal üretimin artırılmasında) en önemli araçlardan biri olduğu düşünüldüğünde incelemeler suni tohumlama uygulamaları üzerine yoğunlaşmıştır.

Bu araştırma TÜBİTAK-TOVAG (113O775) tarafından desteklenmiştir.

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam boyunca yardımlarını her zaman hissettiğim danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Ogun UYSAL ve Prof. Dr. Ayhan ATA'ya, Anabilim dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ali DAŞKIN'a Anabilim Dalının tüm akademik ve idari personeline, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne bağlı Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü (Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi) personeline, çalışmamda yardımcı olan Araş. Gör. Koray TEKİN ve Araş.Gör. Kemal Tuna OLGAÇ'a, çalışmamın istatistik verilerinin incelenmesinde yardımcı olan Araş. Gör. Dr. Doğukan ÖZEN'e, akademik hayata adım atmamda yol gösterici bir rol üstlenen Prof. Dr. Ahmet Refik BAHADIR'a, hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu dönemde de bana her zaman destek olan aileme, eşime ve biricik kızım Ayşenur'a şükranlarımı sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

OH	: Hidroksil
7-DHC	: 7- Dehydrocholesterol (7- dehidrokolesterol)
7-DHCLC	: 7-DehydroCholesterol-Loaded Cyclodextrin (7- DehidroKolesterol ile Doyurulmuş Siklodextrinlerin)
ABP	: Adrogen Binding Protein (Androjen Bağlayıcı Protein)
AOP	: Total Antioksidant Potential (Toplam Antioksidan Potansiyeli)
ATP	: Adenosine Triphosphate (Adenozin Trifosfat)
Ca	: Calcium (Kalsiyum)
CASA	: Computer Aided Sperm Analyser (Bilgisayar Destekli Sperm Analiz Cihazı)
CAT	: Catalase (Katalaz)
CI	: Calcium Ionophore (Calsiyum İyonofor)
Cl	: Chloride (Klorür)
CH	: Cholesterol (Kolesterol)
CLC	: Cholesterol-Loaded Cyclodextrins (Kolesterol ile Doyurulmuş Siklodextrin)
CMA 3	: Chromatin A3 (Kromatin A3)
COMET	: Single-Cell Gel Electrophoresis Test (Tek Hücre Jel Elektroforezis Testi)
CTX	: Cerebrotendinous Xanthomatosis (Serebrotendinöz Ksanthomatozis)
DFI	: DNA Fragmentation Index (DNA Fragmentasyon İndeksi)
DMSO	: Dimethyl sulfoxide (Dimetil sülfoksit)
DNA	: Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
FITC-PNA	: Flurescein Isothiocyanate Conjugated Peanut Agglutinin (Floresan izosiyanata bağlı Aglutinin)
FSC	: Forward Scatter (Sitometresinde Işığın Dar Açılı ile Gelmesi)

FSH	: Follicle-Stimulating Hormone (Folikül Stimule Edici Hormon)
GnRH	: Gonadotropin-Releasing Hormone (Gonadotropin Salgılatıcı Hormon)
GSH	: Glutathione (Glutasyon)
H₂O₂	: Hidrogen Peroxide (Hidrojen Peroksit)
HOST	: HipoOsmotik Swelling Test (Düşük osmotik Basıncılı Şişme Testi)
ICSI	: Intra-Cytoplasmic Sperm Injection (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu)
kg	: Kilogram
LDL	: Low-Density Lipoprotein (Düşük Dansiteli Lipoprotein)
LH	: Luteinizing Hormone (Luteinleştirici Hormon)
LPC	: Lysophosphatidylcholine (Lizofosfotidilkolin)
LPO	: Lipid Peroxidation (Lipit peroksidasyon)
MDA	: Malondialdehyde (Malondialdehit)
Mg	: Magnesium (Magnezyum)
Na	: Sodium (Sodyum)
(NADH/ NADPH)	: Nicotinamide Adenine dinucleotide (Nikotinamid Adenin Dinükleotit)/ Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase (Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat-Oksidaz)
NO	: Nitric Oxide (Nitrik Oksit)
PBS	: Phosphate Buffer Saline (Fosfat Buffer Salin)
PI	: Propidium Iodide (Propidium İyodid)
PS	: Phosphatidylserine (Fosfatidil Serin)
R123	: Rhodamine 123 (Rodamin 123)
ROS	: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
SCSA	: Sperm Chromatin Structure Assay (Sperm Kromatin Strüktür Analizi)
SFM	: Sperm Freezing Medium (Sperma Dondurma Medyumu)
SOD	: Superoxide Dismutase (Süperoksit Dismutaz)

SSC	: Side Scatter (Dik Açı ile Kırılma)
tGSH	: Total Glutathione (Total Glutasyon)
Tro	: Trolox (Troloks)
TUNEL	: Terminal-Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) dUTP nick end-Labeling
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
°C	: Degree Celsius (Santigrat Derece)
µ/s	: Micron/Second (Mikron/saniye)
µl	: Microlitre (Mikrolitre)
O₂	: Superoxide (Süperoksit)
cm	: Centimetre (Santimetre)
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetate (Etilen Diamino Tetra Asetat)
gr	: Gram
LİN	: Linearity (Düzlük)
lt	: Litre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mOsmol	: Miliosmol
Na₂-EDTA	: Disodiumethylenediaminetetraacetic acid (Disodyum Etilen Diamino Tetra Asetat)
NaCl	: Sodium Chloride (Sodyum Klörür)
NaOH	: Sodium Hydroxide (Sodyum Hidroksit)
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojen Basıncı)
Prog. Motilite	: Progressive Motility (Progresif Motilite)
STR	: Straightness (Doğruluk)
S_x	: Standart Sapma
TL	: Tail Length (Kuyruk uzunluğu)
TM	: Tail Moment (Kuyruktaki hareket)
VAP	: Velocity Average Path (Katettiği Ortalama Yol)
VCL	: Velocity Curve Linear (Katettiği Kıvrımlı Yol)
VSL	: Velocity Straight Line (Katettiği Düz Yol)
WOB	: Wobble (Sallanmak)
X̄	: Aritmetik Ortalama

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Koç Üreme Organları	8
Şekil 1.2. Koçlarda Hormonal Siklus	11
Şekil 2.1. Akkaraman Irkı koçlar	30
Şekil 2.2. Spermanın Alınması ve Birleştirilmesi	32
Şekil 2.3. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması	35
Şekil 2.4. Spermatozoa Motilitesi ve Hareket Özelliklerinin Belirlenmesi	36
Şekil 2.5. Anormal Spermatozoa Oranının Belirlenmesi	37
Şekil 2.6. Ölü Spermatozoa Oranının Belirlenmesi	38
Şekil 2.7. HOS Test Oranının Belirlenmesi	39
Şekil 2.8. Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi	40
Şekil 2.9. Mitokondrial Aktivasyonun Değerlendirilmesi	41
Şekil 2.10. DNA Hasarının Belirlenmesi	44
Şekil 2.11. Apoptozisin Belirlenmesi	44

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Koçların rasyon programı	31
Çizelge 3.1. Birleştirilmiş nativ koç spermasında belirlenen başlıca spermatolojik parametreler	46
Çizelge 3.2. Çözüm sonu 7 grup arasındaki ortalama spermatozoa motilite ve hareket özellikleri değerleri	48
Çizelge 3.3. Çözüm sonu 7 grup arasındaki Anormal Spermatozoon değerleri	49
Çizelge 3.4. Çözüm sonu 7 grup arasındaki Ölü Spermatozoon değerleri	49
Çizelge 3.5. Çözüm sonu 7 grup arasındaki HOS test değerleri.	50
Çizelge 3.6. Çözüm sonu 7 grup arasındaki Akrozom Bütünlüğü değerleri	50
Çizelge 3.7. Çözüm sonu 7 grup arasındaki Mitokondriyal Aktivasyon değerleri	51
Çizelge 3.8. Çözüm sonu 7 grup arasındaki Biyokimyasal parametreler	51
Çizelge 3.9. Çözüm sonu 7 grup arasındaki DNA Hasarı değerleri	52
Çizelge 3.10. Çözüm sonu 7 grup arasındaki Apoptozis değerleri	53

1. GİRİŞ

Türkiye’de koyun yetiştiriciliği, hayvancılık sektörü içinde önemli bir paya sahiptir. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2015 verilerine göre Türkiye’de yaklaşık 31 milyon baş koyun bulunmaktadır. Meraların tahrip edilmesi, koyun ürünlerine rağbetin azalması, hayvancılığın zor bir iş olması, satış koşullarının üretici ve tüketicilerin çıkarlarına uygun şekilde düzenlenmemesi, örgütlenme eksikliği, anız yakma, kritik dönem besleme koşullarının gerilemesi gibi bir dizi nedenlerle Türkiye koyun mevcudunda önemli ölçüde azalma olmuştur (Ertuğrul ve ark., 2009). Ayrıca koyunculuk, hayvancılık sektörü içinde sayısal olarak önemli bir paya sahip olmasına rağmen verim yönünden benzerlik bulunmamaktadır. Koç spermasının etkin bir şekilde dondurulamaması verimin düşük olmasında temel sebeplerden biridir. Bunun yanı sıra sığırdaki olduğu gibi rutin olarak dondurulmuş spermalarla suni tohumlamanın yapılamıyor olması da sebepler arasında gösterilebilir (Tekin, 2000).

Koyun varlığımızın %93’ü yerli ıklardan %7’si ise kültür ırkları ve melezlerden oluşmaktadır. Büyük çoğunluğu yerli ıklardan oluşan ve son yıllarda hızlı nüfus artışına karşılık sayıları hızla azalan koyun popülasyonunun ıslah edilmesi ve verimlerinin artırılması kaçınılmaz bir zorunluluktur (Yavaş, 2008). Bunun da başlıca yolu, yüksek verimli ve sağlıklı koçların spermalarını sulandırarak, ya da dondurarak hacimlerini çoğaltmak, böylece bir koçtan tohumlanacak koyun sayısını artırmaktır (Yavaş, 2008). Söz konusu uygulamalarda en geçerli yöntem, koç spermasının dondurularak tohumlamada kullanılmasıdır. Bu tekniğin Türkiye’de başarıyla uygulanabilmesi, koç spermasının dondurulmasında ve tohumlamada kullanıldıktan sonra döl veriminde ortaya çıkan sorunların çözümlenmesine bağlıdır (Gökçen, 1983).

1.1. Akkaraman Irkının Genel Özellikleri

Türkiye koyun popülasyonunun % 44'ünü Akkaraman ırkı oluşturmaktadır (Öztürk, 2000). İç Anadolu'da Eskişehir ve Kütahya'da, doğuda Sivas dahil, sahil bölgeleri dışında Orta Anadolu'da ve Doğu Anadolu'da yetiştirilir (Kaymakçı ve Sönmez 1996). Akkaraman koyunları, bölge şartlarına uygun dayanıklı bir ırktır (Öztürk, 2000). Akkaraman koyunları geç gelişen bir ırk olup, yürüme kabiliyeti iyidir (Şireli, 1996).

Akkaraman ırkının değişik birden fazla tipi vardır. “Kangal” tipi Sivas ve Malatya illerinde, “Karakas” tipi Diyarbakır'da ve “Güney Karaman” denen renkli hayvanlar ise Toroslarda Orta Anadolu'ya bakan eteklerinde bulunur. Yetişkin koyunlarda canlı ağırlık 35–40 kilogram (kg), koçlarda canlı ağırlık 50–60 kg kadardır. Akkaraman ırkının kuyrukları üç parçalı, yuvarlak yapılı ve “S” harfi görünümündedir. Kuyrukları 4–6 kg kadardır. Fakat 12 kg'a ulaşan kuyruk ağırlıkları da vardır. Akkaramanlarda baş, boyun, karın altı ve bacaklarda yün bulunmamaktadır yani çıplak olarak gözükmektedir. Göz çevresi, burun, ağız, kulak ve ayak bölgelerinde siyah lekeler gözükmektedir. (Kaymakçı ve Sönmez, 1996). Yapılan melezleme çalışmalarında melez döllerde bu lekelerin vücuda yayıldığı görülmüştür (Şireli, 1996). Baş kısa, düz ya da hafif dışa doğru bükeydir, kulaklar sarkık şekildedir (Kaymakçı ve Sönmez 1996). Yapağları kaba ve karışık olup, vücut örtüsünün rengi beyazdır. Yapağları halı sanayisinde, kilim, keçe ve yatak yapımında kullanılır (Öztürk, 2000). Yıllık yapağı verimleri 1,5–2 kg'dır, lüle uzunluğu 8–12 cm, incelik 29–35 mikrondur. Laktasyon süt verimi 40–55 kg/ 150 gün, ikizlik oranı % 6–10 arasında olup 100 koyundan ortalama 100–110 kuzu alınmaktadır (Kaymakçı ve Sönmez, 1996). Etlerinin kalitesi düşüktür. Ancak bakım, çevre ve besleme olanakları düzeltilerek et verimleri artırılabilir (Öztürk, 2000). Sütten kesimden sonra 3 aylık besleme sonucu 20-22 kg kadar karkasa ulaşabilir (Şireli, 1996). Akkaraman koyunlarında normal aşım dönemi genellikle Eylül-Ekim aylarındadır (Hancı, 2006).

1.2. Koyunlarda Reprodüksiyon

Koyunların üreme özelliklerini koç etkisi, gün ışığı, kuzulama ve laktasyon dönemleri, beslenme, vücut kondisyon skoru, yağ metabolizması, çevre sıcaklığı, nem, yağış vb. faktörler etkilemektedir (Rosa ve Bryant, 2002). Koyunlar mevsimsel poliöstrik hayvanlar olup, yer kürenin 35. kuzey paralelinin kuzeyinde ve 34. güney paralelinin güneyindeki bölgelerde yaz sonu ve sonbahar başlangıcında üreme sezonuna girmektedirler. Bu paralellerin dışındaki bölgelerde (örneğin ekvator) gün uzunlukları fazla değişmediği için üreme sezonu tüm yıla yayılmakta ve bu faaliyetler ısı ve yağış gibi olaylardan etkilenmektedir (Yavaş, 2008).

Yukarıda sayılan faktörlere bağlı olarak değişmekle beraber koyunlar pubertaya 6-9 aylık olduklarında; yetiştirme olgunluğuna ise 9-15 aylık olduklarında erişirler. Pubertaya ulaşan ve çiftleşme mevsimine giren koyunların ilk östruslarında ovulasyon oluşmasına rağmen dıştan östrus belirtileri gözlenmeden sakın geçebilir (Sönmez, 2008). Ayrıca beslenme pubertaya ulaşma yaşını etkileyen en önemli faktörlerden bir tanesi olduğu için pubertaya ulaşma yaşını kısaltır. Bu etki, besinlerin içerdiği maddelerin yanı sıra, hayvanın ergin vücut ağırlığına ulaşmasında kendini gösterir. Çünkü ergin vücut ağırlığına erişme ile puberta yaşı arasında yüksek bir korelasyon bulunmaktadır. Dışide puberta yaşı aynı zamanda doğum aylarına da bağlıdır. Çünkü dişiler mevsime bağlı poliöstrik hayvan olduklarından, genital organlar gelişmelerini tamamlasa da ilk kızgınlıklarını göstermek için çiftleşme mevsimini beklemek zorundadırlar (Ak, 2008).

1.3. Koyunlarda Seksüel Siklus ve Hormonal Mekanizması

Koyunlarda seksüel siklus uzunluğu 16-17 gün olmakla birlikte, sıcak iklimlerde ve çiftleşme mevsiminin bitimine doğru daha da uzun olabilir. Mevsime bağlı poliöstrik hayvanlardan biri olan koyunlarda üreme faaliyetlerinin başlaması gün ışığı süresi ile ilişkilendirilmektedir. Gün ışığının bu etkisi pineal bezden salgılanan melatonin hormonu tarafından düzenlenir.

Koyunlarda seksüel sikluslar, günlerin kısalmaya başladığı yaz sonu ile sonbaharın ilk aylarında başlar. Günlerin kısalmasıyla birlikte ışık alma süresinin kısalması pineal bezden salgılanan melatonin süresini artırır. Koyunlarda kanda melatonin seviyesinin artması hipotalamustan Gonadotropin Relasing Hormone (GnRH) salgılanmasını stümüle eder. GnRH'ta hipofiz ön lobunda Folikül Situmulating Hormone (FSH) ve Luteinizing Hormone (LH) salgılanmasını uyarır. Üreme mevsiminin başlangıcında östrus davranışları olmadan birkaç östrusun ve ovulasyonun şekillendiği görülebilir. Ancak mevsim ilerledikçe bu durum normale döner. Artan GnRH salınımı, hipofiz ön lobuna gelerek FSH salgısını uyarır. FSH'da kan yoluyla ovaryumlara gelerek foliküler gelişmeleri başlatır. Koyunlarda seksüel siklus içerisinde üç foliküler dalgalanma görülür. Bunlardan ikisi diöstrus sırasında biri ise proöstrusta şekillenir. Proöstrus boyunca şekillenen hızlı bir foliküler gelişme sonucunda östrojen seviyesi gittikçe yükselir ve östrusun hemen öncesinde en yüksek düzeye (10-20 pg/ml) ulaşır. Östrojen salgısına bağlı olarak genital organ ve davranışlarda bazı değişiklikler şekillenir. Aynı zamanda hipofizde uyarılarak LH salgısı başlatılır. Siklus içerisinde ovulasyona yol açan LH'nin kuvvetli pik salınımı (70-80 ng/ml) östrusun ilk 8-12. saatleri arasında şekillenir. Ovulasyon ise, östrusun bitimine yakın LH'nin pik üretiminden yaklaşık 24 saat sonra oluşur. Ovulasyon yerindeki hücreler, LH etkisiyle hızla luteinize olarak korpus luteumu şekillendirmeye başlarlar. Koyunlarda diğer türlerden farklı olarak prolaktininde korpus luteumun gelişmesinde rol oynadığı sanılmaktadır. Korpus luteum, siklusun yaklaşık 2-3. günlerinde progesteron salgılamaya başlayarak hipotalamus ve hipofiz ön lobu üzerine negatif feedback bir etki oluşturur (Sönmez, 2008).

1.4. Koçlarda Reprodüksiyon

1.4.1. Koçlarda Reprodüktif Organlar ve Fonksiyonları

Koçlarda reprodüktif organlar cinsiyet hücrelerini üreten testisler, hücrelerin iletilmesinde görev alan kanallar, salgılarını bu iletişim yoluyla aktaran erkek eklenti bezleri, penis ve prepisyumdan oluşur.

1.4.1.1. Testisler

Testisler koçlarda embriyonik gelişim döneminde böbreklerin yakınında şekillenir ve koç da dahil olmak üzere birçok türde daha sonra skrotuma iner (Deveci, 1990). Skrotuma inme koçlarda gebeliğin ortalarına doğru gerçekleşmektedir (Sönmez, 2008). Duruşları ve yerleştikleri yer, türlere göre az çok farklılıklar göstermekle beraber, testisler inguinal ve perineal bölgede bulunurlar. Testislerde endokrin (testesteron) ve ekzokrin (sperma hücreleri, spermatozoonlar) faaliyet gösteren organ olarak görev yapmakta ve deriden torba olan skrotumunda, funiculus spermatikus ile asılı şekilde bulunur. Skrotum alt bölgesinde bağ doku bulunmaktadır. Bağ doku, iskelet kası yapısındadır ve *Muskulus (M) Cremaster*'i örter. *M. Cremaster* ve skrotumun, sperma üretimi için sıcaklık ayarlamasında, testisleri vücuda yaklaştırarak veya uzaklaştırarak testisleri vücut ısısından 4-7 derece aşağıda tutmaktadırlar. (Deveci, 1990). Yetişkin koçta bir testisin ortalama ağırlığı 250-300 gr arasındadır (Sevinç, 1979).

1.4.1.2. Kanallar

Tubulus rectus: Seminiferus contortusun, testise doğru açıldığı kanaldır.

Rete Testis: Tubulus rectuslar birleşerek boşluklar sistemi olan rete testisi teşkil eder (Deveci, 1990).

Epididimis: Kompakt fibröz bir yapıya ve baş (caput), gövde (corpus) ve kuyruk (cauda) olmak üzere üç ana bölüme sahip olan epididimis, testisin posterior ve süperior kısmında yer alır. Epididimisin başlıca dört önemli fonksiyonu vardır. Bunlar; spermatozoanın taşınması, yoğunlaşması, depolanması ve olgunlaştırılmasıdır (Birler, 2008).

Ductus deferens: Cauda epididimisten sonra gelen kanaldır. Üretraya açılırken genişleme yapar ve ampulla ductus deferens'i oluşturur. Bu yapının alt ucu üretraya açılırken ductus ejaculatorios'u oluşturur.

Üretra: İdrarın ve spermanın dışarı atıldığı ortak kanaldır. Pelvik üretra, arcus bulbus üretra ve esas üretra olarak üç kısımdan oluşur. Üretral kaslar, prostat bezinin bir kısmını örter. Bu kasın kuvvetli kasılması, orgazm sırasında ejakülasyonun oluşmasını sağlar. Ampulla ductus deferens'te toplanmış olan spermatozoonlar, eklenti bezlerinin salgıları ile birlikte, üretra pelvinada karışırlar. İdrar kesesi boynunun arka tarafında, fındık büyüklüğünde bir oluşum olan colliculus seminalis bulunur. Bu yapıda geniş kavernöz kan damarları bulunmaktadır. Bu yapılar vasıtası ile ejakülasyon anında, idrar kesesinin giriş bölgesini kapatılır ve spermatozoanın idrar kesesine geçişini engeller (Deveci, 1990).

1.4.1.3. Eklenti Üreme Bezleri

1.4.1.3.1. Vezicüla Seminalis

Pelvisin taban kısmında ampulla ductus deferenslerin yanında ve idrar kesesinin boyun bölgesinde "V" harfi gibi yer alır ve tubuloalveoler yapıda çift bir bezdir. Veziküler bezlerin boşaltıcı kanalları ampulla ile uretra birleştiği çatallaşma yerinin yakınında üretraya açılır. Bu bezler hemen hemen tüm türlerde seminal plazmanın hacmine önemli ölçüde katkıda bulunurlar. Vezicüla seminalisin salgısı özellikle spermatozoonlar için enerji kaynağı oluşturan fruktoz ve sorbitol yönünden de oldukça zengindirler. Bunun dışında vezicüla seminalisin salgılarında bulunan fosfat ve karbonat iyonları spermadaki pH (Power of Hydrogen) değişimlerini önlemede önemli rol oynarlar. Koçlarda vezicüla seminalisin uzunluğu 4 cm kadardır (Sönmez, 2008).

1.4.1.3.2. Prostat

Pelvisin tabanında, idrar kesesinin boyun kısmına yakın ve pelvik üretra ön kısmında bulunur. Uretraya kısmen sarılmış olarak bulunan prostat bezi bütün memeli hayvanlarda bulunmaktadır. Bez, kendisine has bir kokusu olan prostat salgısı yapar. Salgısı alkali özelliktedir. Bu salgı Sodyum (Na), Klorür (Cl), Kalsiyum (Ca) ve Magnezyum (Mg) inorganik iyonları yönünden oldukça zengindir. Bu salgılar içerisinde spermatozoonların hareket yetenekleri artar. Prostat salgısı küçük kanalcıklar vasıtasıyla üretra akıtılır (Sönmez, 2008).

1.4.1.3.3. Cowper Bezi (Glandula Bulboüretalis)

Pelvik üretranın çıkış noktası yakınında, her iki tarafta arkus isihadikus yakınlarına yerleşen bir çift bezdir. Genellikle şekilleri ovaldir. Koçlarda 2-3 cm uzunluğundadır. Müköz özellikte salgı yapar. Cowper bezinin salgıları spermanın sıvı kısmına çok az katkıda bulunur. Spermanın kıvamının oluşmasında etkisinin olmasının yanı sıra üretrayı idrardan temizler ve spermatozoonlar için uygun bir ortam sağlar. Çiftleşmeden hemen önce bu salgının prepisyumdan damla damla aktığı görülebilir (Sönmez, 2008).

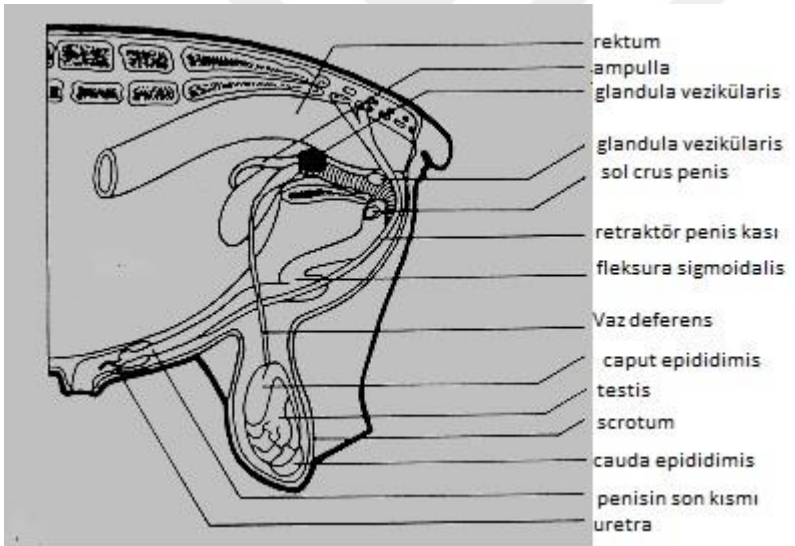
1.4.1.4. Eksternal Üreme Organları

Penis: Erkeklerde çiftleşme organı olarak görev yapan olan penis, idrar yapmak ve spermayı dişi genital kanala aktarmak gibi temel görevleri bulunmaktadır. İkinci görevini yapabilmesi için organın ereksiyon haline geçmesi gerekir. Penisin yüzeyi sinirler yönünden zengin olup oldukça hassas bir organdır. Manipülasyonlara ve sıcaklıklara karşı duyarlıdır. Koçta uzun, silindirik ve fibroelastik olan penis, ereksiyon durumu dışında oldukça sert bir yapıdadır. Kök, gövde ve baş olarak oluşmaktadır. Penisin kök kısmı, pelvise crura penis ile sıkıca bağlanmıştır. Bunların birleşmesiyle corpus penis oluşur. Gövde kısmı 'S' şeklinde oluşan bir yapı olan flexura sigmoidea'yı oluşturmaktadır. Böylece, ereksiyon durumu sonrası penis 1/3 oranında küçülmektedir. Ereksiyon sırasında, flexura sigmoidea düzleşir, penis uzar ve prepisyum'dan dışarı çıkar. Galea glandis ile sonlanan penisin serbest ucu sivri

ve kendi eksenini etrafında bükülü bir yapı göstermektedir. Koçta üretra penisten ayrı serbest bir uçla sonlanır. Burada orificium urethrae externa bulunur.

Musculus retraktor penis: İki bant şeklinde ejakülasyondan sonra penisin prepsiyuma geri çekilmesini, ereksiyon dışında ise bu durumu korumasını sağlar (Sönmez, 2008).

Prepsiyum: Derinin invaginasyonundan oluşan prepsiyum, istirahat durumundaki penisin serbest ucunu bir kılıf şeklinde tamamen sarar. Prepsiyum'un en önemli görevi penisi sararak dış etkenlerden korumaktır. Prepsiyum mukozasında yağlı bir salgı yapan bezler vardır. Bu yağlı sekresyon dökülen epitelyum doku ve mevcut bakteriyel flora ile karışarak smegma denilen kesif ve özel kokulu bir madde meydana getirir (Sönmez, 2008).



Şekil 1.1. Koç üreme organları (Anonim 2014)

1.5. Çiftleşme Mevsimi

Koçlar yıl boyunca her mevsimde aktivite göstermekle birlikte, güneş ışınlarının etkisine bağlı olarak değişimler gözlemlenmektedir. Gün ışığının azalmaya başladığı sıfat döneminde, testesteron ve LH hormonlarının kandaki düzeylerinde, testis ağırlığında ve buna bağlı olarak sperma aktivitesinde artışlar görülmektedir. Sezonal ırkların çiftleşme mevsimi

sonbahar ve erken kış dönemidir. Tersi olarak, tropik ve subtropik ırklarda tüm yıl boyunca görülür veya fotoperiyot dışındaki diğer faktörlerden etkilenirler (Kulaksız, 2009).

1.6. Koçlarda Ergenlik (Puberta)

Koçlarda eşeyssel olgunluk hem yaş hem de vücut ağırlığıyla ilişkili olmakta ve özellikle iklim ve beslenme olmak üzere çevresel faktörlerden etkilenmektedir (Yavaş, 2008). Belirli bir yaş dilimi arasında, ırklara göre değişmekle birlikte, ergin vücut ağırlığının %40 ile %60'ına ulaştığında eşeyssel olgunluk meydana gelmektedir. Erken gelişim gösteren koyun ırklarının geç gelişen ırklara göre daha önce eşeyssel olgunluğa eriştiği gibi, melezlerin ana-babalarına oranla daha erken olgunlaşması, ırk etkisi olarak belirtilmektedir (Kaymakçı ve Sönmez, 1992).

Doğum mevsiminin küçük ruminantlarda pubertaya ulaşma bakımından da etkisinin olduğu belirtilmektedir. (Foster ve ark., 1988).

1.7. Cinsel İstek (Libido Sexualis)

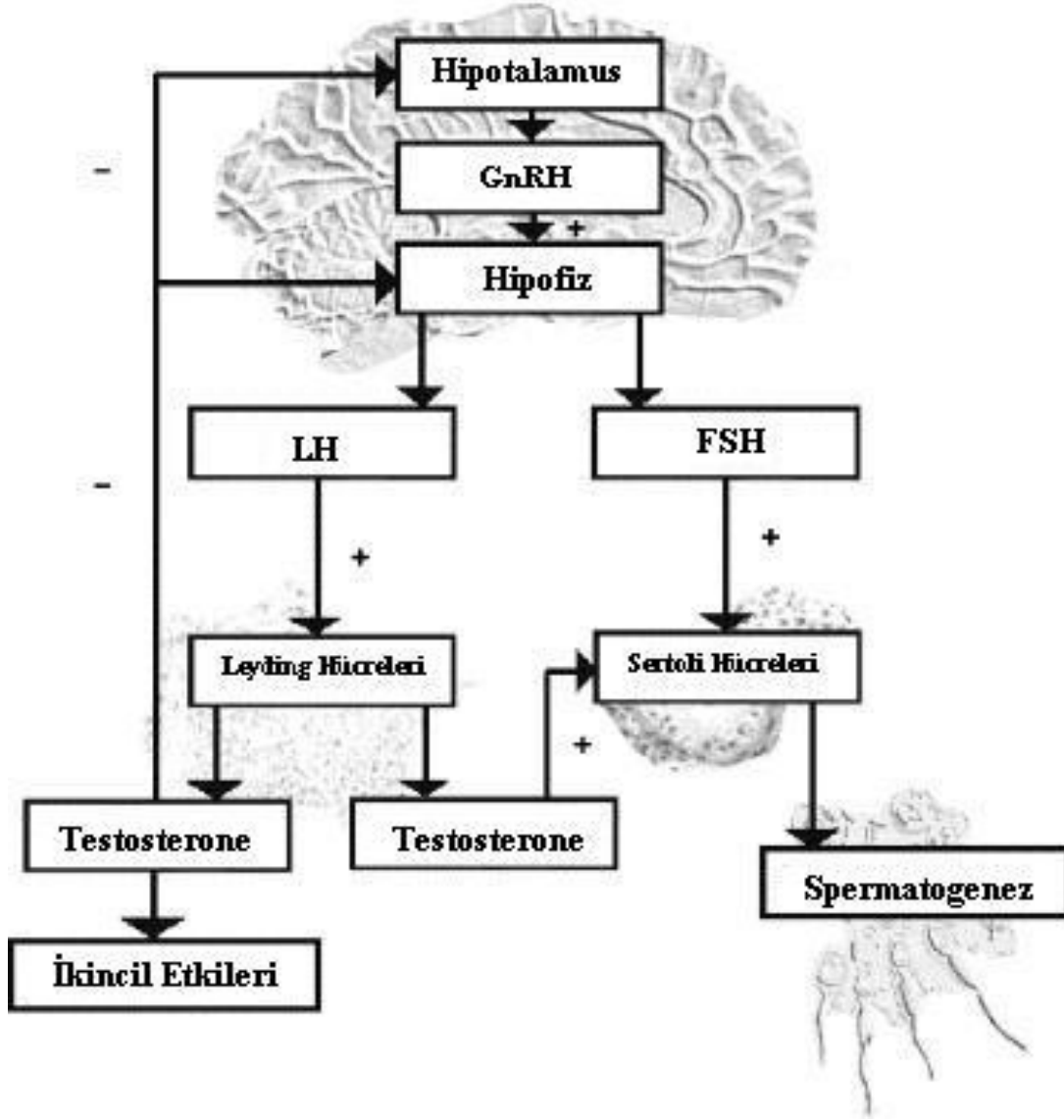
Cinsel davranışlar, nöroendokrin iletişimlerle yönetilirler ve hayvan türüne özgü hareket zincirleri şeklinde oluşurlar. Gelişmesini tamamlamış erkek hayvanlar karşıt cinsleri karşısında, değişik duyu organlarıyla uyarılarak, ses ve hareketlerle uyanım, yaklaşma ve aşım davranışları gösterirler. Erkeklerde gözlenen çiftleşme isteği ve davranışları androjenler tarafından meydana getirilir. Bu hareketlerin herhangi birinde oluşacak bozukluk ve eksiklikler aşımın tam gerçekleşmesine engel olur. Cinsel istek ve davranışlar türe özgü özelliklerine ve belirli zaman içinde gerçekleşmesine göre değerlendirilir. Örneğin boğalarda aşım kadar geçen sürenin 30 dakikanın üzerine çıkması, libido zayıflığı veya yokluğu şeklinde değerlendirilir. Sağlıklı ve cinsel isteği yerinde bir boğada bu süre 5 dakikayı geçmez (Tekin, 1990).

1.8. Hormonal Düzen

Erkek cinsiyet steroidleri androjenik ve anabolik aktiviteye sahiptirler. Androjenik aktivite eklenti üreme bezlerinin büyümesi ve fonksiyonu yanında özel cinsiyet karakterlerinin gelişmesini, anabolik aktivite ise yapısal metabolizma ve genel cinsiyet karakterlerini stümüle eder. Germinal epitelyum normal fonksiyonunu devam ettirmek için androjene duyarlı diğer dokulardan daha fazla testesterona ihtiyaç duymaktadır (Birler, 2008).

Puberta; hipotalamus, hipofiz ön lobu, gonadlar, hedef organların uygun kondisyona gelmesi ve beslenme gibi çevresel faktörlerin kompleks ilişkileri sonucu meydana gelmektedir. Pubertada öncelikle leyding hücreleri androjenleri salgılayarak tubulus seminiferusları gonadotropik stimülasyona hazır hale getirmekte ve böylece spermatazoonların oluşumu başlamaktadır. Reprodüktif kapasitenin tam olarak çalışması olan seksüel olgunluk pubertadan daha sonra meydana gelmektedir (Birler, 2008).

Hormon üretimi ve reprodüktif görevlerin takibi hipotalamo- hipofizeal-testiküler aksis adı verilen mekanizma ile yürütülmektedir. Hipotalamusdan üretilen GnRH adeno hipofize sinyal göndererek buradan FSH ve LH üretimini uyarmaktadır. LH testisdeki intersitsiyel hücrelerden testosteron salgılanmasını sağlarken, FSH sertoli hücreleri ve germinal epitelyum üzerine etki etmektedir. Sertoli hücreleri bu etki ile Androjen Binding Protein (ABP) ve inhibin hormonları salgılamaktadır. ABP, testosteronun tubulus seminiferuslara kabul edilmesini ve buradaki seviyesinin artırılmasında çalışmaktadır. Böylece spermatogenezis için zorunlu olan testosteron tubuller içine ve germinatif hücrelerine girmiş olur. İnhibin hormonu hipotalamus ve adenohipofiz üzerine negatif feedback etkisi ile FSH hormonunu kontrol altında tutmaktadır. Aynı şekilde testosteronun bu organlar üzerindeki negatif feed back etkisi LH salınımını kontrol altında tutar. Bu mekanizma erkek hayvanların ömrü boyunca devam etmektedir. Yaş ilerledikçe leydig hücre fonksiyonu da azalmaktadır (Birler, 2008).



Şekil 1.2. Koçlarda hormonal siklus (Hoesl ve ark., 2005)

1.9. Spermatozoon Üretimi (Spermatogenezis)

Seminifer tubulleri kaplayan seminiferus epitelleri temel olarak 2 tip hücreden oluşur. Bunlar, sertoli hücreleri ve germ hücreleridir. Germ hücreleri devamlı olarak bölünür ve değişiklikler periferden başlayarak tubulusun lumenine doğru devam eder. Spermatogonia diye adlandırılan kök hücreler, spermatozoon oluncaya kadar birkaç kez bölünürler. Spermatozoonlar daha sonra mayoz bölünme geçirirler böylece hücrelerin içerdiği DNA miktarı yarıya düşmüş olur. Spermatogoniaların proliferasyonunu ve mayoz bölünmeleri içeren

hücresel bölünmeler spermatositogenezis olarak adlandırılır. Bu bölünmeler sonrası oluşan haploit kromozomlu hücreye spermatid denir. Spermatidler daha sonra spermatozoaya dönüşmek için bir dizi yapısal değişikliğe uğrarlar. Bu metaformatik değişikliklere spermiyogenezis denir (Hafez, 2000). Spermatogenezis koçlarda 46-49 gün kadar sürmektedir.

1.10. Koç Spermasının Özellikleri

Koç ve tekede sperma üretiminin bir göstergesi olan testis ağırlığında yılın her döneminde önemli değişim göstermektedir. Testis ağırlığı, çiftleşme dönemi dışı olan ilkbaharda genel olarak en düşük iken, yaz mevsimi sonunda en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Genel olarak koçlarda Şubat – Mart'ta 200 g, Temmuz'da 350 g ve Alpin ırkı tekelerde geç Mayıs – erken Haziran'da 100 g, geç Ekim – Kasım ortasında ise 150g olarak belirlenmiştir (Delgadillo ve ark., 1991; Cheminau ve ark., 1992). Koç ve tekelerde testis ağırlığı bakımından görülen değişik bulgular mevsimsel farklılıklarla ilişkilidir. Örneğin, ilkbaharda testis parankimasının her bir gramı başına ortalama 8.5×10^6 spermatozoa üretilirken, sonbaharda $12,2 \times 10^6$ spermatozoa üretimi gerçekleşmektedir (Ömür, 2011).

Koçlarda sperma, suni vajen ve elektroejakulatör yöntemleriyle alınabilmektedir. Suni vajen yöntemi; basit, hızlı ve iyi kalitede sperma elde etme açısından daha çok tercih edilmektedir. Buna karşılık, sperma alınırken, kızgın koyuna ihtiyaç duyulması nedeniyle, çoğunlukla aşım sezonu ile sınırlanmaktadır. Ayrıca, koçun sağlıklı ve sun'i vajene sperma vermeye alışmış olması gereklidir. Bu şartların mevcut olmadığı durumlarda, sperma almak için suni vajina kullanılamamaktadır. Böyle durumlarda, elektroejakulatör yöntemiyle sperma alma kaçınılmaz olmaktadır. Ancak, hayvan açısından rahatsız edici olması ve daha fazla iş gücüne ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Aral ve Aral, 2004). Her iki yöntem karşılaştırıldığında, elektroejakulatör ile alınan spermalar hacimce daha fazla, kitle hareketi ve yoğunluk yönünden daha fakirdir (Türk, 2004).

1.11. Koyunlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama

Suni Tohumlamanın ilk bilimsel uygulamasını İtalyalı Fizyolojist Lazzaro Spallanzani 1780 yılında yapmıştır. Spallanzani evine aldığı bir dişi köpeğin bir süre sonra kızgınlık göstermesi üzerine, bir erkek köpekten aldığı spermayı dişi köpeğin uterusuna vermiştir. Bu tohumlamadan 62 gün sonra dişi köpek üç yavru doğurmuştur.

Koyunlarda suni tohumlamayı ilk uygulayan bilgin Veteriner Hekim E.I.Ivanoff olmuştur. Rus çarlığına ait çiftliklerde 1912 yılında atlarda suni tohumlamayı başarıyla uygulayan Ivanoff, bu tarihi izleyen yıllarda aynı metodu koyunlara uygulamış ve çiftlik hayvanlarında uygulanması için yaygınlaştırmıştır. Daha sonraki yıllarda ise suni tohumlama çalışmaları Avrupa ülkelerine geçmiştir. Yurdumuzda ise suni tohumlama çalışmalarının başlaması 1925 yılında Rusya'dan suni tohumlama uzmanı Prof. Mihailof'un öncülüğünde Merinos koyunlarında başlamıştır (Sevinç, 1979).

Koyunlar günümüze kadar servikal, transservikal intrauterin, laparotomik, intrauterin, laparoskopik intrauterin, laparoskopik intraoviduktal, vajinal tohumlama yöntemleri ile tohumlanabilmektedir (Yavaş, 2008). Tohumlamada kullanılan spermanın hacmi 0,05-0,2 ml'dir. Tohumlama dozunda 50 milyondan az spermatozoon bulunmamalıdır. Pratikte toplam 200 milyon spermatozoon içeren sulandırılmış sperma ile tohumlama gerçekleştirilir (Ak, 2008). Koyunlarda östrus ortalama 30-36 saat sürmekte ve ovulasyon ortalama 24-30 saat arasında yani kızgınlığın sonuna doğru meydana gelmektedir. Bu bakımdan koyunların ovulasyondan önce ve kızgınlığın sonuna yakın bir dönemde tohumlanması gerekir. Östrus başlangıcından sonraki 16-24.saatler arasında yapılan tohumlamalardan yüksek gebelik oranı elde edilmiştir. Östrusu uzun süren koyunlarda aynı östrus devresi içinde ikinci bir tohumlamanın yapılması döl veriminin yüksekliği açısından önem taşır. Bu nedenle yapılan ilk tohumlamadan 12 saat sonra ikinci bir tohumlamanın yapılması gebelik oranını artırır (Sönmez, 2008).

1.12. Spermanın Saklanması:

1.12.1. Kısa Süreli Saklama

Bu yöntem, alınan spermanın birkaç gün içinde kullanılması durumunda tercih edilir. Gerekli spermatolojik muayeneleri yapılmış olan spermanın tekniğe uygun şekilde sulandırıldıktan sonra 35°C'deki su dolu bir kap içerisine yerleştirilip genellikle 2-3 saatlik bir sürede buzdolabında sıcaklığın 5°C'ye düşürülmesi esasına dayanır. Bu yöntemle saklanan spermaların koçlarda 24 saate kadar kullanılması mümkündür. Spermanın kısa süreli saklanması amacıyla, sodyum sitrat-yumurta sarısı sulandırıcısı ve tris yumurta sarısı sulandırıcısı yaygın olarak kullanılmaktadır (Sönmez, 2008).

1.12.2. Uzun Süreli Saklama

Suni tohumlamanın faydalarından yararlanılmak istendiğinde uzun süre saklanabilen sperma gereklidir. Spermanın metabolik faaliyetlerinin durdurularak fertilizasyonda önemli bir kayba yol açmadan süresiz bir şekilde saklanması ancak spermanın dondurulması ile mümkündür (Lemma, 2011).

Bilimsel ve modern olarak canlı hücre dondurma işlemleri, 1949 yılında Polge ve arkadaşlarının gliserolün kriyoprotektan (soğuk şokuna karşı koruma sağlayıcı) özelliğini bulması ile başlamış ve ilk dondurulan hücre spermatozoon olmuştur (Leibo ve Brandley, 1999).

1.12.2.1. Koç Spermasının Dondurulmasında Kullanılan Sulandırıcılar ve Kriyoprotektanlar

Genel olarak sperma sulandırıcıları hücre dışı kriyoprotektanlar (süt veya yumurta sarısı), hücre içi kriyoprotektan (gliserol, etilen glikol, dimetil sülfoksit (DMSO) , buffer (Tris veya Test), bir veya birden fazla şeker (glikoz, laktoz, rafinoz sakaroz) ve antibiyotik (penisilin, streptomisin)'den oluşmaktadır (Evans ve Maxwell, 1987). Yağsız süt tozu ve tris-glikoz ile yapılan sulandırıcılar spermanın dondurulmasında en çok kullanılan sulandırıcılardır (Purdy, 2006).

Spermanın dondurulmasında kullanılacak sulandırıcılara fazla sayıda bileşenlerin girmesi doğal olarak osmotik basıncı etkilemektedir. Bunun yanı sıra spermanın metabolik aktivitesi hidrojen iyonlarının açığa çıkmasına neden olur. Açığa çıkan bu iyonların taşınması için bir mekanizmanın olmaması sulandırıcı pH'sının düşmesine ve dolayısıyla motilite ve fertilitate gücünün azalmasına yol açmaktadır. Bu nedenle tampon solüsyonların sperma sulandırıcılarında kullanılması zorunludur (England, 1993). Sperma sulandırıcıları izotonik veya izo-osmotik ve nötrale yakın veya hafif asidik olmalıdır (Herman ve ark., 1994; Kulaksız, 2009). Sulandırıcılarda osmotik basınç ve hidrojen iyon konsantrasyonunu ayarlamak için sitrat (2,9 trisodyum sitrat dihidrat), tris (hidroksimetil aminomentan), sitrik asit ve fosfat gibi tampon maddeleri yoğun olarak kullanılmaktadır. Tris (hidroksimetil aminomentan) yaygın olarak kullanılan tampon maddelerdendir (Kulaksız, 2009).

Sulandırıcılarda kullanılan şekerler dondurulma sırasında buz kristallerinin daha az olmasını sağlar ve hücre dehidrasyonlarını en aza indirerek osmotik basıncın sabit kalmasını sağlar (Purdy, 2006; Naing ve ark., 2010). Ayrıca, membran faz geçişlerini azaltır. Tüm bunların yanı sıra, motilite ve spermanın hareketi sırasında glikoliz ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sırasında enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır (Naing ve ark., 2010). Türler arasında şekerlerin kullanma oranları değişmekle birlikte, genel olarak spermatozoa glikoz, fruktoz, mannoz ve arabinoz gibi basit şekerleri enerji kaynağı olarak kolayca değerlendirebilmektedirler (Arthur ve ark., 1996).

Kulaksız (2009)'a göre; spermatozoayı soğğun zararlı etkinliğine karşı korumanın en başarılı yolu, sperma sulandırıcılarına süt veya bunların bileşiminde bulunan lipoprotein, yumurta sarısı, lesitin, safalin, ve protein benzeri maddelerin katılmasıdır. Yumurta sarısı birçok evcil hayvanda spermanın dondurulması sırasında sulandırıcı bileşeni olarak kullanılmaktadır. Sulandırıcıdaki diğer bileşenlerle birlikte dondurulma sırasında oluşan soğğmanın zararlı etkilerinden plazma membranını ve akrozomu koruduğı bilinmektedir (Amirat ve ark., 2004). Sulandırıcılara ilave edilen yumurta sarısı fosfolipit türevi olmakla birlikte spermatozoayı soğğk hasarlarından koruduğı ve rutin bir şekilde sulandırıcıya katılması gerektiğı yapılan bilimsel çalışmlarda belirtilmiştir (Kulaksız, 2009). Gerekli olan yoğunluğu türlere göre farklı olmakla birlikte %3-35 oranında sulandırıcıya katılmaktadır.

Kriyoprotektanlar hücrenin dondurulma esnasında oluşan soğğk hasarlarına, hücre içi kristal oluşumuna, çözüm sırasında kristalizasyonların tekrar yok olmasında ve oluşan membransel hareketliliğe karşı koruyucu olarak sulandırıcıya katılmaktadır. Genel olarak koruyucu etkilerini ortamdaki donmamış fraksiyonu artırarak ve ortamdaki iyon miktarını azaltarak gösterirler (Palasz ve Mapletopt, 1996). Hücrelerin uygun olarak dondurulması, plazma membranından suyun ve soğğktan koruyucu bileşenlerin basit hareketini ve hızlı aktarılmasını gerektirir (Edashige ve ark., 2003). Kriyoprotektanlar işlevsel olarak, internal kriyoprotektanlar ve external kriyoprotektanlar olarak ikiye ayrılır. İnternal kriyoprotektanlar (gliserol, etilen glikol, formamide, DMSO) hücre zarından içeriye girerek etkilerini gösterirler. Eksternal kriyoprotektanlar (Makromoleküller ve sakkalitler), membranların sıvı ve kanyonlara karşı permeabilitesinde artışa sebep olarak, ozmotik strese karşı hücreleri esnek bir duruma getirirler. Günümüzde en çok kullanılan kriyoprotektan gliseroldür. Ruminantlar ve primatların spermalarının dondurulmasında gliserol oranı %4-8 arasında değışmektedir (Holt, 2000; Bucak ve Tekin 2007).

1.13. Spermanın Dondurulması

Sperma dondurma teknolojisi, 1949 yılında Christopher Polge ve arkadaşlarının gliserolün spermatozoonlar üzerine kriyoprotektif etkisini tesadüfen keşfetmeleri ile büyük bir gelişme kaydetmiştir (Holt, 2000; Foote, 2002). Gliserolün kriyoprotektan olarak

kullanımının büyük başarısından sonra yumurta sarısı ve sodyum sitrat ile sulandırılmış ve dondurma öncesi gliserol ile ekilibre edilmiş boğa sperması ile gebelik elde etmişlerdir (Yoshida, 2000).

Hücresinin donması esnasında, sıcaklık donma noktasının altına düştüğünde, su kristalleşmeye başlar. Hücre dışında gelişen buz kristalleri, beraberinde hücre dışında bulunan tuz bileşiklerinin donmamış kısımda konsantre hale gelmesine ve ozmotik basıncın artmasına neden olur. Buz kristalleri, hücre zarının dışında yer aldığından bu aşamada hücreye ulaşmaları söz konusu değildir. Hücre içeriği de aşırı soğumaya maruz kalır. Hücre içindeki bir miktar su, ozmoz yoluyla, hücre dışı ortama akarak su kaybına neden olur ve hücre içi tuz yoğunluğu da artar. Meydana gelen bu su kaybı, hücre içi buz kristallerinin oluşumuyla son bulur. Hücre dışı ve hücre içi tuz yoğunluğu kritik seviyeye gelince (oda sıcaklığında 0,8 M), hücre zarındaki katyon kanalları açılarak, yıkılan potasyum-klor köprüsünden potasyum hücre dışına çıkar. Ortamdaki sodyum ise yoğunluğun fazla olduğu hücre içine doğru yönelir. Çözüm sırasında da hücre zarındaki katyon kanalları kapanır, hücre içi tuz yoğunluğu düşerken, hücre içinde proteinlerle bağlı haldeki potasyum-klor köprüleri yeniden oluşur. Bu durum hücre içine suyu geri çeker ve hücre yine ozmotik hacimde şişer (Arthur ve ark., 1996; Schuster ve ark., 2003; Yavaş Korkmaz, 2009). Spermaların dondurulması cam tüp, pelet, payet gibi materyal ve yöntemler yardımıyla olmaktadır. Günümüzde en çok kullanılan payet yöntemiyle dondurma protokolüdür. Sulandırılmış sperma, 4-5°C'de ekilibrasyona (1,5-4 saat) bırakıldıktan sonra, payetlere doldurulur. Normal koşullarda, sperma içeren payetler yatay olarak sıvı azotun 4-5 cm üzerinde, sıvı azot buharında 7-8 dakika tutulur ve bu sürenin sonunda sıvı azota daldırılır. Donma hızı payetlerin sıvı azot seviyesinden uzaklığı ve payetlerin hacimlerine göre değişebilir (Leboeuf ve ark., 2000; Kulaksız, 2009). Ayrıca programlanabilir dondurma makinaları kullanılarak spermanın sıcaklığını belli aralıklarda düşürmek suretiyle dondurma işlemleri yapılmaktadır. Bu yöntemde sırasıyla üç safhada +4 °C/ -5°C 4°/dakika, -5°C/-110°C 25°/dakika,-110°C/-140°C 35°/dakika toplamda 7 dakikada gerçekleştirilmektedir (Purdy, 2006).

1.14. Spermanın Çözdürülmesi

Spermanın çözdürülmesi dondurulması kadar önemli bir bölümdür. Sperma -196 °C'ye soğutulduktan sonra çözdürülene kadar yaşamına devam eder fakat çözdürülme sırasında kritik ısı derecelerini geçmesi gerekmektedir (-15/-60 °C). Spermanın soğutulması ve çözdürülmesi yaşamasını direkt etkilemektedir. Hızlı çözdürme hücre içi kristalizasyonu engellediği için tercih edilen bir yöntemdir. Payet yöntemi ile dondurulan koç spermalarının çözdürülmesinde birçok araştırmacılar 38-42°C'de spermayı çözdürmektedir. Bazı araştırmacılar ise yüksek sıcaklıklarda (60-75°C) çözdürme işleminin 38-42°C'de çözdürme işlemi ile akrozomal bütünlük ve fertilité yönünden benzer olduğunu belirtmişlerdir (Salamon ve Maxwell, 2000).

Yukarıda belirtildiği gibi, çözdürme sonrası en iyi in vivo başarıyı yakalamak için, çeşitli çözdürme sıcaklıkları ve süreleri bildirilmektedir. Saha koşulları göz önüne alındığında suni tohumlamalarda kullanılacak spermanın 37 °C'de 30 saniyede çözdürülmesi en uygun yöntem olacaktır.

1.15. Çözdürme Sonrası Spermatolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi

Reprodüktif biyoteknolojilerde rutin olarak kullanılan dondurulmuş spermalarla uygun bir fertilizasyon elde edilmesi için kaliteli spermanın bulunması şarttır. Spermanın kalitesini belirleyen yöntemler spermatozoanın makroskobik, mikroskobik ve fizikokimyasal yapısıdır. Spermanın hayvandan alınmasından işlenmesine, değerlendirilmesine ve biyoteknolojik yöntemlerde kullanılmasına kadar her manipülasyon spermatozoonlar için stres faktörüdür ve değişen oranlarda spermatozoada hasara neden olmaktadır. Spermatozoada meydana gelebilecek hasar neticesinde dölveriminde düşüşler görülebilmektedir. Spermatozoa hasarlarının belirlenmesi için konvansiyonel yöntemlerin kullanılmasının yanısıra, günümüzde bilimsel ve teknolojik gelişmelerin ışığı altında spermatozoanın mevcut yapısını ortaya koyacak yeni yöntemler hayata geçmiştir. Biyoteknolojik araştırmalar spermatozoonun fiziksel, kimyasal, histolojik, morfolojik ve fonksiyonel yapısına ilişkin yeni bilgilere

ulaşılmasını sağlamıştır. Spermatozoanın membran fonksiyonları, akrozom, DNA, kapasitasyon ve mitokondrial aktivite olguları daha açık ortaya konmuştur ve oldukça karmaşık olduğu görülmüştür. Böylece son yıllarda bilgisayar destekli analiz cihazları, Computer Assisted Semen Analysis (CASA), floresan mikroskop ya da flow sitometri cihazı ile son sistem boyama yöntem ve teknikleri ile spermatozoanın bugüne kadar az bilinen ya da bilinmeyen ve fertilitiyi başlıca etkileyen hasarları saptanabilmekte ve in vivo dölverimleri ile korelasyonları alınarak fertilitiyeye ne kadar yansıdığı belirlenebilmektedir.

1.15.1. CASA Sistemi Yardımıyla Spermatozoa Motilitesi, Hareket Özelliklerinin ve Anormal Spermatozoa Oranının Değerlendirilmesi

İlk olarak 1979' da Dott ve Foster'ın bilgisayar destekli bir programla motilitenin belirlenmesinden sonra kullanılan teknolojiler ve yapılandırılması sürdürülen yazılımlar ile spermatozojik özelliklerin tespit edilmesi hızlı ve hassas olarak belirlenebilmektedir. CASA sistemi, hareket halinde olan nesnelere fotoğraflama yaparak ve bilgisayar yazılımı kullanarak analiz edilebilmesi mantığı ile çalışmaktadır. (Tırpan, 2012).

CASA yazılımındaki kinetik parametrelerin değerlendirilmesinde; total motilite hareket yeteneğine sahip spermatozoonların bütünü olarak tabir edilebilir. Progresif motil olarak kabul edilen bir spermatozoon, başı yönünde güçlü ve özellikle düzgün doğrusal olarak yer değiştirir, progresif olmayan motil spermatozoon ise hareket yeteneğine sahiptir; ancak güçsüz, doğrusal olmayan ya da normal olmayan bir şekilde hareket eden spermatozoonlar olarak belirtilir. Motil olmayan spermatozoonların ise hareket kabiliyeti bulunmamaktadır. Spermatozoon ortalama hız parametreleri VCL (Velocity Curve Linear); spermatozoonun izlediği yol boyunca ortalama hızı $\mu\text{m/s}$ olarak; VSL (Velocity Straight Line); doğrusal bir eksen yönünde izlediği yolun başlangıcından sonuna kadar olan ortalama hızı $\mu\text{m/s}$ olarak, VAP (Velocity Average Path) ise, aldığı toplam yol süresince ortalama hızı $\mu\text{m/s}$ şeklinde belirtilmektedir. Ayrıca, spermatozoonların takip ettiği yol ve aldığı mesafe açısından parametreler ise, STR (Straightness %); spermatozoonun doğrusal bir yörünge boyunca aldığı mesafeyi (VSL/VAP X 100), LIN (Linearity %); spermatozoonun doğrusal yer değiştirmesini

(VSL/VCL X 100), WOB (Wobble %); aldığı toplam yol zamanı boyunca sola sağa sendeleme derecesini (VAP/VCL X 100) belirtmektedir (Verstegen ve ark., 2002; Foote, 2003; Malo ve ark., 2006).

Spermatozoonların mikroskopik bakıda morfolojilerinin incelenmesi spermanın potansiyel fertilitasını değerlendirilmesinde önemli testlerdendir. Anormal yapıdaki spermatozoonların fertilizasyon güçleri yoktur. Sağlıklı bir spermada her zaman için morfolojik bozukluğa sahip hücreler bulunabilir. Ancak bunların oranı önemlidir. Morfolojik bozuklukların sınıflandırılmasında değişik yöntemler kullanılmaktadır. Örneğin majör ve minör bozukluklar veya primer ve sekonder bozukluklar buna örnek olarak verilebilir. Günümüzde akrozoma ait bozukluklar, başa ait bozukluklar, orta bölüme ait bozukluklar ve kuyruk bozuklukları olarak sınıflandırma yapılmaktadır (Ak, 2008). Spermalar çeşitli boyalarla boyanıp mikroskop altında CASA sistemi yardımıyla fotoğraflama yapılarak spermaya ait bozukluklar objektif olarak belirlenmektedir.

1.15.2. HipoOsmotik Swelling (HOS) Test

Spermatozoonun fertilizasyonu gerçekleştirebilmesi, kapasitasyon, akrozom reaksiyonunu tamamlaması ve yumurta hücresinin yüzeyine bağlanabilmesi için fonksiyonel bir membrana ihtiyaç duymaktadır. Hypo-osmotik swelling test, spermatozoon plazma membranının fonksiyonel bütünlüğünü değerlendirir ve ayrıca spermatozoonun potansiyel fertilitesi için kullanışlı bir belirleyicidir. HOS test, membranların spermatozoon ve çevresi ile arasındaki dengeye bakarak membran bütünlüğünü tahmin etmektedir. Hypo-osmotik stresin sebep olduğu sıvı akışı kuyruğun kıvrılmasına, balonlaşmasına veya şişmesine neden olur. Bir preparatta yüksek oranda şişmiş sperma hücresinin bulunması, fonksiyonel ve sağlam bir plazma membranının göstergesidir (Sivamukumar ve Rajasingam, 2013).

1.15.3. Ölü Spermatozoa Tespiti

Taze ve dondurulmuş spermatozoonların canlılık testi için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu teknikler arasında en çok kullanılan tek veya çift renk veren yöntemlerdir. Bu yöntemler arasında kabul gören ise fertilité potensiyelini en iyi gösterendir. Uzun yıllar tek boyama prosedürüne bağlı olarak çalışan; ölü canlı ve morfoloji muayenelerinin birlikte yapılmasına imkân sağlayan eosin/nigrosin yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, ölü spermatozoonların membran geçirgenlik derecesine göre baş kısmının turuncu (eozinofilik); canlı spermatozoonların daha düşük membran geçirgenliği ile baş kısmının beyaza boyanması esasına göre çalışmaktadır.

Son yıllarda birkaç florasan boyası sperm kalitesini belirlemek için taze veya dondurulmuş çözdürülmüş spermada çeşitli türlerde yoğun olarak kullanılmaktadır (membran bütünlüğü, ölü canlı tespiti gibi). Bu dual boyalardan SYBR-PI veya Propidium iyodid membran bütünlüğünün belirlenmesinde kullanılmaktadır. SYBR-14 membran geçirgenliği olan nükleik asit boyası (uyarımı 488 nm; yayımı 516 nm) olup, sadece canlı Deoksiribonükleik asit (DNA) hücrelerini yeşil renkli floresan vererek işaretlemektedir. Propidium iyodid (PI), çekirdekleri kırmızı ile boyayan (uyarımı 530 nm, yayımı 617 nm) membran hasarlı spermatozoonların tespitinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ölü canlı ve morfoloji tespitinde aynı preparatta kullanılabilir (Chalah ve Brillard, 1998).

1.15.4. Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Golgi aygıtı ve endoplazmik retikulumdan üretilmiş asidik ve sekretorik bir organ olan akrozom, farklı enzim matrislerine sahip ve birçoğunun glikosilat yapıda olduğu hidrolitik enzimlerle doludur. Temel zona sperm birleşmesini akrozomun içinde bulunan enzimlerin salınarak aktivasyonu sonucu oluşan akrozom reaksiyonu tetiklemektedir. Bu birleşmeye spermatozoonun hiperaktivasyonunun eklenmesi spermatozoonun zona pellüsidaya bağlanması yardımcı olmaktadır. Spermatozoonun, dişi genital kanalında istmusa ilerlemesi öncesinde, sırasında ve zonaya bağlanana kadar, akrozomunun sağlam ve bütün olması gerekmektedir. Akrozom reaksiyonu esnasında plazma membranı ile diş akrozom membranının birleşmesi ve sonucunda ekzositoz için kalsiyum gerekli bir iyon olarak görülmektedir. Zona pellüsida ve progesteron ile etkileşim sonucunda öncelikle oluşan reaksiyon spermatozoonda Ca'nın ve alkaliliğin ve dolayısı ile pH'ın yükselmesidir. Akrozom

hasarının değerlendirilmesinde Flurescein Isothiocyanate Conjugated Peanut Agglutinin (FITC-PNA) yöntemi sıkça kullanılmaktadır. Akrozomal bütünlüğün ölçülmesinde kullanılan bir diğer yöntem ise Lyso Tracer™ Green DND-26 dır (Gillan ve ark., 2005).

1.15.5. Mitokondriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Spermatozoa motilitesi çoğu türde fertilité ile yakından ilişkilendirilmektedir. Spermatozoa motilitesi ve progresif motilitesi uzun yıllar geleneksel ama subjektif yöntem olan faz kontrast mikroskop değerlendirmelerle ortaya konmaktaydı. Son yıllarda daha objektif ve kesin bir yöntem olan CASA ile spermatozoa motilitesi ve progressif motilite ölçülmektedir. Hatta daha yeni yöntem olan flow sitometri sperma kalitesini değerlendirmek için kullanıma girmişse de yalnızca bu yöntemler bile yeterli olmamaktadır. Spermatozoa motilitesi ve flagellar hareketi sadece Adenozin trifosfat (ATP)'dan üretilen enerji sayesinde karşılanacağı için, sperma kalitesinin ve spermatozoonun fertilizasyon yeteneğinin belirlenmesinde yeni boyama ve değerlendirme tekniklerine gerek duyulmaktadır. Spermatozoonun orta kısmında bulunan mitokondrial aktivitede meydana gelebilecek değişiklikler (fiziksel veya kimyasal hasarlar vb. sonucu ATP üretiminin yapılamaması gibi) sonucunda spermatozoa motilitesi direkt etkilenmektedir (Hallap ve ark., 2005; Gravance ve ark., 1999). Dolayısıyla spermatozoonun mitokondrial fonksiyonlarının da ölçülmesi daha objektif bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır.

Mitokondrial fonksiyon florometrik tekniklerle ölçülmektedir. Mitokondrisi aktif spermatozoa floresan boya kullanılarak, rhodamine 123 (R123), JC-1 ve MITO Tracker Green FM (MITO), 3 farklı yöntemle boyanabilir. Bunlar; R123 veya MITO ile boyamalar sonucu tek çeşit yeşil renkli görüntü elde edilirken, bunun tam tersi olarak JC-1 ile mitokondrisi boyananlarda hem yeşil hem de kırmızı- turuncu spermatozoonlar bulunabilir (Garner ve ark., 1997).

1.15.6. Oksidatif Stres Parametreleri, Antioksidan ve Lipit Peroksidasyon Tayini

Lipid hidroperoksitleri, glikolipitler, fosfolipitler, kolesterolden ve doymamış yağ asitlerinden üremektedir. Bu hidroperoksitler enzimatik olan ya da olmayan reaksiyonlar neticesinde aktif hale geçer ve reaktif oksijen türevleri olarak adlandırılan kimyasal türevlere dönüşürler. Spermanın kısa süreli saklanması ve dondurulması-çözdürülmesi gibi in vitro manüplasyonlar sırasında oluşan reaktif oksijen türevleri antioksidan savunma sistemini yok eder ve oksidatif strese yol açar. Bunun sonucu olarak fertilizasyonu veya infertiliteyi etkilemektedir. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) minimum seviyeleri akrozom ve zona reaksiyonu, kapasitasyon, hiperaktivasyon gibi sperm fonksiyonlarında önemli etkilere sahiptir. Fakat, fazla miktarlarda üretilmesi spermatozoit penetrasyon ve füzyonunda azalmalara, motilite kaybına, DNA ve protein hasarına böylelikle hücre ölümlerine sebep olmaktadır. ROS, [nitrik oksit (NO), peroksinitril), hidrojen peroksit (H_2O_2), serbest radikaller (superoksit (O_2), hidroksil (OH^-)] olarak bilinir ve spermatozoa plazma membranı ile mitokondriasında üretimi gerçekleştirilmektedir. Hidrojen peroksit spermatozoa membranlarından geçerek metal iyonlarıyla reaksiyon geçirir ve spermatozoanın yapısında ve mikroskobik olarak çeşitli parametrelerinde bozukluklara sebep olan hidroksil radikallerine dönüşür. Bütün hücrelerde olduğu gibi spermatozoada da Nikotinamid Adenin Dinükleotit/ Nicotinamid Adenin Dinükleotit fosfat-oksidad (NADH/ NADPH) oksidad sistemi bulunmaktadır. (Sarıözkan, 2008).

ROS' un hasarlı etkilerine karşı spermatozoa ve seminal plazmada antioksidatif savunma sistemleri bulunmaktadır. Fakat, spermatozoanın sitoplazmasının küçük olmasından dolayı antioksidatif savunma sistemleri oldukça zayıftır. Spermanın dondurulması, spermatozoadaki hücre içi antioksidan seviyelerinin önemli ölçüde azalmasına sebep olur. Memeli spermatozoası lipid peroksidasyona oldukça duyarlıdır. Toksik serbest radikaller spermatozoada fiziksel ve kimyasal bozukluklara sebep olur, bunun sonucu olarak ise hücre yaşlanması oluşur.

Antioksidanlar, serbest radikallerin etkilediği oksidatif strese karşı spermatozoanın savunmasında görev alırlar. Antioksidan mekanizması, pek çok hücre dokusunda ve sekresyonun da bulunmaktadır. Bir kısmı ROS üretimini önleyerek, bir kısmı da mevcut ROS' u yok ederek görevini gerçekleştirmektedir. Seminal plazma ve spermatozoa içerisinde antioksidanlar (vitamin E, vitamin C, lactoferrin, seruloplazmin, karotenoidler, transferrin

vb.) spermatozoa plazma membranında gerçekleşen lipit peroksidasyonunu dengede tutmakta ve bütünlüğünü korumaktadır. Ayrıca seminal plazmada enzimatik olmayan antioksidanlar da (α -tokoferol, taurin ve hipotaurin ürat, askorbat, piruvat, glutatyon) bulunur. Oviduct sıvısında katalaz ve piruvat bulunur ve ROS varlığında spermatozoa motilitesinin düşmesini engellemektedir (Sarıözkan, 2008). Oksidatif stresin belirlenmesi için, seminal plazmada ya da santrifüj sonucu dipte kalan pellette ROS ve antioksidan enzimlere ayrı ayrı bakılır. ROS için, lipit peroksidasyon oluşumu spektrofotometrik yolla ölçülür. Spektrofotometrik yöntem ile ayrıca Malondialdehit (MDA) ve Glutatyon Peroksidaz (GPx) ölçümleri de yapılmaktadır.

1.15.7. DNA Hasarının Belirlenmesi ve Apoptosis Tespiti

Yakın zamana kadar geleneksel yöntemlerle spermanın kalitesi tayin edilmekteyken, son on yıldır çalışmalar spermatozoanın ince yapısı bir başka deyişle özellikle kromatin anomalileri üzerinde yoğunlaşmıştır. Erkek infertilitesini ortaya koymada, spermatozoanın kromatin yapısındaki bozuklukların primer önem taşıdığı son yıllardaki çalışmalarda ortaya konmuştur. Çalışmalar erkek gametinin genomik bütünlüğü, yardımcı üreme tekniklerinden özellikle Intra-Cytoplasmic Sperm Injection, intrasitoplazmik sperm injeksiyonu, (ICSI) için genetik hastalıkların transmisyonuna neden olacağından ayrı bir yer tutmaktadır. Genomik materyalin organizasyonundaki bozukluklar ile in vivo ve in vitro fertilité arasında negatif korelasyon olduğu ortaya konmuştur.

Spermatozoonda DNA hasarına fare, domuz, balık, insan ve at gibi pek çok hayvan türünde rastlanmaktadır. Eğer çeşitli nedenlerle organizmadaki DNA onarım (replikasyon) işlemi durursa, DNA tamiri gerçekleşmeyince apoptozla sonuçlanan olaylar serisi başlar. Apoptozun göstergelerinden biri olan DNA hasarlarının başlıcaları; kromatin yapısının bozulması, DNA yarıklanması, kırılması ve çözülerek fragmanlara ayrılması (DNA fragmentasyonu), DNA baz oksitlenmesi, hatalı eşleşme ve tubul polimerizasyonunun azaltılması, anomalileri, mutasyonlar DNA-protein ve DNA-DNA çaprazlaşmaları gibi bazı takım değişikliklerdir. Bazı yazarlar spermatozoadaki genetik materyalin hasarı ile spermanın kalitesi arasında bir etkileşim bulunduğunu, bazıları ise böyle bir ilişkinin bulunmadığını bildirmişlerdir. DNA fragmentasyon indeksi (DFI) % 15'in üzerine çıktığında yardımcı üreme

teknikleri ile elde edilen fertilitte düşmektedir. Dolayısıyla yardımcı üreme teknikleri ile başarılı bir fertilizasyon için DFI'nın belirlenmesi ve bilinmesi gerekmektedir (Larson ve ark., 2000). Spermatozoonların apoptozu, normal bir fertilitteyi elde etmek için gerekli spermatozoa sayısının düşmesine yol açarak infertiliteye sebep olmaktadır. Balıklarda, boğa, koç, fare ve insanlarda spermanın dondurulması DNA hasarına ve dolayısıyla normal olmayan embriyo gelişimine ve kısırlığa sebep olduğu belirtilmiştir. Hatta genetik materyali bozuk olan spermatozoonların gelişimi olumsuz etkilediği bildirilmektedir. Yine sigara kullanan babaların spermatozoonlarındaki DNA hasarına bağlı olarak çocuklarında doğuştan anomaliler, kusurlar ve çocukluk çağında kansere yakalanma olasılığında artışlar gözlemlenmektedir. (Türk ve ark., 2006). Özel boyalar ve yine DNA'ya bağlanabilen florokrom ile kromatin paketlenmesi hakkında fikir edinilebilir. Anilin mavisi ile histonlar boyanabilmektedir (Haidl ve Schill, 1994). Spermatozoa içerisindeki denatüre DNA miktarının anlaşılabilmesi için akrinin orange boyası kullanılabilir (Evanson ve ark., 1980). Kromamisin A3, Kromatin A3, (CMA 3) boyası ile de spermatozoa içindeki kötü kromatin paketlenmesi ve protamin eksiklikleri gösterilebilir (Bianchi ve ark., 1993).

Normal hücrelerde hücre membran yapısındaki lipitlerden olan fosfatidilserin, (PS) sitoplazmik yüzde bulunur. Eğer hücre apoptoza uğrarsa PS molekülleri hücre membranında iç taraftan dış tarafa doğru yer değiştirirler. PS'lerin dış yüze translokasyonu, FITC gibi floresan bir madde ile belirlenmiş Annexin V kullanılarak görülebilir hale getirilir. Annexin V 35-36 kD ağırlığında Ca^{+2} bağımlı, fosfolipit bağlayıcı bir proteindir ve PS için yüksek affiniteye sahiptir. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur. Annexin V yöntemi hem floresan mikroskopuyla hem de flow sitometri ile kullanılabilir (Aydiner, 2008).

1.16. Sperma Sulandırıcılarına Kolesterol ile Doyurulmuş Siklodextrin (CLC) Katılmasının Önemi

Spermatozoa membranları; iç tarafında hidrofobik, dış tarafında hidrofilik tarzda, lipitlerle proteinlerin oluşturduğu bir yapı halinde bulunmaktadır. Membranlarda en çok bulunan lipitler ise fosfolipitler ve kolesteroldür. Bunlara ek olarak integral ve periferik proteinler de membranlarda bulunmaktadır. Protein ve lipitlerin birlikteliği rastgele değildir;

lipitlerin bir proteinin etrafını çevirmesi kümelenmiş birimin (lipit-protein birleşmesi) fonksiyonel özelliklerini etkiler. Bu yüzden bazı lipitler tercihen integral membran proteinlerinin etrafında toplanır. Vücut sıcaklığında, membran fosfolipit ve proteinleri sıvı fazda oldukları için membranlardan geçebilirler. Membranlar soğutulduğunda ise, faz değişikliğinden dolayı fosfolipitler sıvı formdan kristal-jel formuna geçerler. Kristal- jel formunda fosfolipit yağ asit zincirleri düzenli bir halde bulunmaktadır ve bunun sonucu olarak daha düzenli bir şekilde membranların paketlenmesi sağlanmaktadır (Moce ve ark., 2010b).

Hem kolesterol (fosfolipit) hem de fosfolipitleri oluşturan doymamış yağ asiti zincirleri membranların akışkanlığını sağlamaktadır. Watson (2000), değişik türlerin spermalarını soğuk şokuna karşı direncine göre iki gruba ayırmaktadır. Bazı türlerin sperması soğuk şokuna karşı çok hassas (domuz, boğa, koç, aygır), bazıları daha az hassas (kedi, köpek), diğer türler ise soğuk şokuna karşı oldukça dirençlidir (tavşan, insan). Değişik türlerdeki spermatozoa farklılığı, membranların kompozisyonlarının farklılığından kaynaklanmaktadır. Membranlardaki farklılık ise; soğuk şokuna karşı dirençli türlerde hassas türlere göre; doymamış yağ asitlerinin ve kolesterol- fosfolipit oranının daha yüksek oranda olmasından kaynaklanmaktadır. Kolesterolün membran proteinlerinin ve antioksidanların taşınması için kimyasal veya fiziksel olarak uygun ortam sağlaması, membran faz değişikliklerinin gerçekleştirilmesi, hücre etkileşimlerinin sağlanması, morfolojik olarak membran karakteristiğinin kolaylaştırılması, membran geçirgenliğinin azaltılması ve stabilizasyonu gibi membranların üzerinde birçok etkisi bulunmaktadır. Kolesterol ve fosfolipit oranı, düşük sıcaklıklarda membran akışkanlığı ve bütünlüğü için önemli bir etkidir. Kolesterol fosfolipitlerdeki yağ asiti zincirleri ile etkileşime girerek membranların akışkanlığını ayarlar. Model membranlarda, kolesterol fosfolipit oranının artırılması faz geçiş aralığını genişletir ve böylece membranlardan sızmaları ve faz separasyonlarını azaltır. Bu etmenlerden dolayı, spermanın dondurma öncesinde kolesterolle muamelesi spermatozoon membranlarının soğuğa karşı hassasiyetini, lipitlerdeki lateral faz separasyonunu en aza indirerek veya ortadan kaldırarak azaltabilir (Moce ve ark., 2010b).

Yapılan çalışmalarda sulandırıcıya katılacak olan CLC'nin sperma ile muamelesi sonrası spermadaki kolesterol içeriğinin boğada, koçta, aygırda 2-3 kat artırdığı

bildirilmektedir (Purdy ve Graham 2004; Moore ve ark., 2005; Muller ve ark., 2008; Moce ve ark., 2010a). Kolesterol eklenmesi kolesterol- fosfolipit oranını da artırmaktadır; bu artışın sonucu olarak kolesterol- fosfolipit oranındaki değişim dondurulma sırasındaki sıcaklık değişimlerinden spermanın en az hasarla etkilenmesini sağladığı bildirilmektedir. (Morrier ve ark., 2004; Galantino- Homer ve ark., 2006). Genel olarak kriyoprezervasyon sırasında spermanın CLC muamelesi sonucu total motilite, plazma membran bütünlüğü veya hem motilite hem de canlılık oranında artışlar görüldüğü bildirilmektedir. Bu iyi gelişmelerde % 1-2 gibi küçük değişiklikler olduğu gibi %24 gibi yüksek oranda değişiklikler de olabilmektedir. Fakat yapılan birçok çalışmada bu oranın %10-20 olduğu bildirilmektedir. Ancak, CLC sonrası dondurulma başarısı tür farklılığı, farklı hayvanlar, spermanın farklı muamelesinden kaynaklandığı söylenebilir. Örneğin; Purdy ve Graham (2004)' ın boğalarda yaptığı çalışmada kolesterol ilavesi sonrası (1.5 mg/ 120x10⁶) kontrol grubunda % 42 motilite tespit edilirken kolesterol ilaveli grupta bu oran %60; plazma membran bütünlüğü kontrol grubunda %46 iken kolesterol ilaveli grupta %55 olarak tespit edilmiştir. Yine Moce ve ark. (2010a), koçlarda yaptığı çalışmada, motilitenin kontrol grubunda % 28, çalışma grubunda %45 olduğu, plazma membran bütünlüğü kontrol grubunda %24, çalışma grubunda %45-47 olduğu tespit edilmiştir. Barrera-Compean ve ark. (2005), tekelerde yaptığı çalışmada ise, kontrol ve çalışma grubunda motiliteyi sırasıyla sırasıyla %42, %52, plazma membran bütünlüğü ise sırasıyla %53, %57 olarak tespit edilmiştir. Spermanın CLC ile muamelesi sonrası yapılan dondurulma ile kolesterolün faydalı etkileri daha çok spermatozoon membranlarında akışkanlığı artırarak faz geçiş sıcaklık aralığını artırmasından kaynaklandığı gösterilmiştir (Moce ve Graham 2006; Purdy ve ark., 2005; Moore ve ark., 2005). Daha önce yapılan çalışmalarda spermanın plazma membranındaki kolesterol miktarının fazla olması, soğuk şokuna ve ozmotik strese daha dirençli olduğunu göstermiştir (Ladha, 1998). Aksoy ve ark. (2010) yaptığı çalışmada ise, kolesterolün sadece membran akışkanlığını sağlamadığı aynı zamanda, membranlardaki ozmotik toleransı da artırdığını bildirilmiştir (80-1500 mosm/L). Koçlarda yapılan başka bir çalışmada CLC ilavesi sonrası dondurulan spermanın çözündürüldükten sonra 38.5 derecede yaklaşık 3 saat motilitesini koruduğu bildirilmiştir (Moce ve ark., 2010a). Alınan bu sonuçlar, dişi genital sistemde spermanın daha uzun süre yaşaması kapasitasyon ve fertilizasyonunun daha başarılı olabileceğini düşündürmektedir (Fiser ve ark., 1991).

Kriyoprezervasyon, membran yapısında değişikliğe yol aarak protein ve lipit yapısını bozar ve bunun sonucu olarak membran seçiciliği kaybolarak membranların akıcı özelliği değişebilir. Kapasitasyon sırasında, plazma membranlarından kolesterol çıkışı olur; kolesterol membranlardan uzaklaştırıldığı zaman ise, membranlar hareketsiz kalır, dış akrozomal membranın bağlanma yeteneği artar ve bunların sonucu olarak akrozom reaksiyonu gerçekleşir. Spermatozoa kapasitasyonunun durdurulması veya dekapasitasyonunun sağlanması seminal plazma eklenerek veya lipit veziküllerinin oluşturduğu sentetik lipit lipozomlarını içeren kolesterol ile sağlanmaktadır. Bu sonuç, kolesterolün sulandırıcıya eklenmesi sperm membranlarının kapasitasyonu için gerekli olmadığını ancak, erken kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunun engellenmesini sağladığını göstermektedir (Purdy ve Graham, 2004).

Soğuk şokuna karşı membranların hassasiyeti, membranların fosfolipit kompozisyonu ile açıklanmaktadır (Holt, 2000). Spermasında yüksek miktarda kolesterol bulunduran yani fosfolipit oranı yüksek olan türler (insan, tavşan) membranlarında düşük kolesterol bulunduran türlere göre (aygır, boğa, koç) soğuk şokuna karşı daha dirençlidir (Watson, 2000; Konyalı, 2009). Bir başka değişle spermatozoa plazma membranında kolesterol-fosfolipid oranı yüksek olan (0.88–0.99) insan ve tavşan spermasının dondurulması, bu oranı düşük (0.38-0.45) olan boğa ve koç spermasına göre daha başarıyla dondurulabilmektedir (Darin-Bennett ve White, 1977). Kolesterol eklenmemiş spermanın kısa süreli saklanması, dondurulması ve çözündürülmesi sırasında spermatozoa kolesterol içeriğinin % 14'ünü kaybeder (Buhr ve Curtis, 1994; Cerolini ve ark., 2001). Taze spermanın kolesterol yüklenmiş siklodekstrinle sulandırılması, spermanın kolesterol içeriğini koç, boğa ve aygırda 1.93-2.7 katı arasında artırmaktadır (Purdy ve Graham, 2004; Moore ve ark., 2005).

Bu bilgilere göre, spermanın dondurulma öncesi kolesterol ile muamelesi kriyoprezervasyon öncesi dondurma çözündürme hasarlarını önlediği görülmektedir. Kolesterolün sperma sulandırıcılarına katılması ise, direkt mümkün değildir. Çünkü kolesterol direkt sulu çözeltilerde çözünmemektedir. Bunun için öncelikle siklodextrinler kolesterolle doyurulur daha sonra sulandırıcıya eklenir. Siklodextrinler; dış yüzü hidrofilik, iç yüzü hidrofobik özellik taşıyan, karbonhidratların temel ürünü olan ve 1-4 glycopyranoze içeren siklik oligosakkalitlerdir (Christian ve ark., 1997; Konyalı, 2009). Sonuç olarak

kriyoprezervasyon sırasında CLC kullanılması, dondurulma çözdürülme hasarlarını en aza indirdiği görülmektedir. Daha önce farklı türlerde yapılan çalışmalarda CLC'nin dondurulma çözdürülme sorması sperma kalitesini artırdığını göstermektedir.

Kolesterol ve konjugatlarından (kolesterolün oluşmasından önceki ara ürün) olan kolestenol ve desmosterolle boğa spermasını donduran Moraes ve ark. (2009), çözdürme sonrası spermatozoa motilitesinin ve canlılığının geliştiğini ifade etmişlerdir. Amorim ve ark. (2009), kolesterol ve kolesteril konjugatlarıyla (heptanoate, palmitate, pelargonate veya stearate ile konjuge edilen kolesterol) boğa spermasını dondurmuşlar, kolesterol ve pelargonatın spermatozoonların çözdürme sonrası spermatolojik özelliklerini geliştirdiğini, diğer kolesterol benzeri maddelerin etkilemediğini bildirmişlerdir. Ancak genel olarak hiçbir türde spermanın 7-dehidrokolesterol ile dondurulmasına yönelik çalışmaya rastlanmamıştır. 7-dehidrokolesterol, kolesterolün oluşumunda ara bir üründür, yani kolesterolün konjugatıdır. Bir başka deyişle kolesterol, 7-dehidrokolesterol üzerinden oluşmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, koç spermasına değişik oranlarda ch ve 7dhc eklenmesi ile kriyopreservasyon sırasında nasıl değişiklikler olabileceği; kolesterolün spermaya eklenmesi ile çözüm sonu canlılık oranına, sperma kalitesi ve fizyolojisine etkisi araştırıldı. Ayrıca, ch ve 7-dhc ile hücre membranlarının antioksidan bütünlüğünü sağlayarak, osmotik basıncın uygun sınırlar içinde tutmasının yanı sıra, DNA bütünlüğünün korunması, prematüre akrozom reaksiyonunun engellemesi gibi olumlu etkilerinden faydalanılarak koç spermasının dondurulması ve çözdürülmesi sonucu elde edilecek in vitro sonuçların değerlendirilmesidir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Çalışmada Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne bağlı Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü (Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi)'nde bulunan 1 yaş ve üzerindeki 3 baş Akkaraman koçlardan alınan toplam 27 ejakülat kullanıldı.



Şekil 2.1. Akkaraman ırkı koçlar

2.2. Hayvanların Bakım ve Beslemesi

Kullanılan koçlar, çalışma süresince Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsünde küçükbaş hayvan ünitesinden ayrı olarak barındırıldı. Koçların bakım ve yemlemesi kuruluşun küçükbaş ünitesi görevlileri tarafından gerçekleştirildi. Koçların günlük olarak kuru madde ihtiyacı 2.4 kg olarak belirlenmiştir. Günlük hazırlanan total mix ratio (TMR)'nin %40 kaba yem %60 konsantre yemden oluşmuştur. Kaba yem olarak yonca ve saman kullanılmıştır. Hazırlanan TMR'ın kg'ında 2.250 kcal/kg metabolik enerji ve 115 g ham protein bulunmaktadır. Konsantre yemin bileşimi çizelge 2.1. verilmiştir. Koçlar çalışma öncesinde sağlık kontrolünden geçirildi; çalışma materyali sağlıklı olan koçlardan seçildi.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan konsantre yemin bileşimi ve kimyasal kompozisyonu

Ham madde	%
Arpa	62
Buğday kepeği	12
Ayçiçeği küsgesi,28 HP	23,4
Kireç taşı	2
Tuz	0,5
Vitamin-Mineral Karması*	0,1
(Rovimix 302 Fm/30)	
Toplam	100
Kimyasal Kompozisyon	
Kuru Madde, %	86,88
Ham Protein, %	14,52
Ham Yağ, %	2,00
Nişasta, %	34,74
NDF, %	25,96
Ca, g/kg	8,11
P, g/kg	5,66
ME, kcal/kg	2,750

* Her 1 Kg Rovimix 302 - FM/30: 15.000.000 IU Vit A, 3.000.000 IU Vitamin D₃, 30.000 mg Vitamin E, 50 000 mg Manganez, 50 000 mg Demir, 50 000 mg Çinko, 10 000 mg Bakır, 150 mg Kobalt, 800 mg İyot, 150 mg Selenyum.

2.3. Spermanın Alınması

Spermanın alınması işlemi çiftleşme sezonunda, suni vagina kullanılarak gerçekleştirildi. Ejakülatlar, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne bağlı Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi'nde bulunan Suni Tohumlama laboratuvarında başlıca spermatolojik özellikler (Eylül-Aralık aylarında) ejakülat miktarı (ml), yoğunluk ($10^9/ml$), motilite (%), anormal spermatozoa oranı (%), ölü spermatozoa oranı (%) ve pH yönünden muayene edildi. Daha sonra normal spermatolojik özellik gösteren spermalar çalışmada pooling yapılarak kullanıldı.



Şekil 2.2. Spermanın alınması ve birleştirilmesi

2.4. Spermının Sulandırılması ve Dondurulması

Pooling yapılan ejakulatlar tekrar mikroskopik yünden değerlendirilmiş (spermatozoa motilitesi) ve yoğunluğu fotometrik yöntemle (Accucell Photometer, IMV, France) saptanmıştır. Daha sonra ejakulat 7 eşit gruba bölünmüş (split ejakulat); biri kontrol grubu olarak; üçü ch'nin¹, diğer üçü de 7-dhc'nin² farklı konsantrasyonlarını bulunduran Tris sulandırıcısı ile ml'de 500×10^6 sperma olacak şekilde sulandırıldı. Aşağıda adı geçen sulandırıcılar ile spermalar tek aşamada sulandırılarak 25°C'deki su küvetine konulup soğutma kabineye nakledildi. Sulandırılmış spermaların sıcaklığı 45 dakikada +4°C'ye düşürüldükten sonra 2 saat alışıma bırakıldı. Ekilibrasyon sonrası sulandırılmış spermalar 0.25 ml'lik mini payetlerin (IMV, France) içerisine otomatik payet doldurma makine yardımı ile (IMV, France) çekildi ve bu işlem sonrası otomatik dondurma makinasında (Digitcool 5300 ZB 250, IMV, France) sıvı azot buharında 7 dakika içerisinde -140°C'de donduruldu. Bu işlem sonrası toplanan dondurulmuş spermalar azot tankı içerisine (-196°C) alındı.

2.4.1. Sulandırıcı Grupları

2.4.1.1. Standart Tris Sulandırıcısı (Kontrol)

- 3,63 gr Tris³
- 1,82 gr Sitrik Asit⁴,
- 0,5 gr Glikoz⁵,
- Distile su ile 100 ml tamamlanmıştır.
- % 10 yumurta sarısı,
- % 5 gliserol⁶.

¹ Sigma C8667

² CAS Number: 434-16-2 SC 214398-A

³ Sigma T1503

⁴ Sigma C0759

⁵ Sigma G7528

⁶ Bioshop GLY 002

2.4.1.2. Siklodextrinlerin Hazırlanışı

200 mg ch ve 7-dhc, 1'er ml kloroformda ayrı ayrı çözdürülür. Başka tüplerde 1'er g metilβsiklodextrin⁷ 2'şer ml metanolde çözdürüldü. 0.45 ml ch ve 7- dhc solüsyonları siklodextrin solüsyonlarına eklendi ve solüsyonların rengi açık olana kadar karıştırıldı ve daha sonra, karışımlar petri kabına alınarak azot gazı ile muamele edilerek solventler uzaklaştırıldı. Oluşan kristal formların kuruması için oda sıcaklığında (22 °C'de) 24 saat kurutuldu. CLC ve 7-dehidrokolesterol ile doyurulmuş siklodextrinlerin (7-DHCLC) çalışma solüsyonu ise 1'er ml tris solüsyonuna ayrı tüplerde (250 mM tris, 83 mM sitrik asit monohidrat, 69 mM D+ glikoz, pH: 7, 300 m OsM) 50 mg CLC ve 7-DHCLC eklenerek 37 °C'de vorteksenerek hazırlandı (Purdy ve Graham, 2004).

2.4.1.3. Çalışmada Kullanılan Sulandırıcı Grupları

Gruplar	Sulandırıcı İçerikleri
K	Standart Tris sulandırıcısı
Ch 1,5	Standart Tris sulandırıcısı+1,5 mg/120x10 ⁶ CLC
Ch 2,5	Standart Tris sulandırıcısı+2,5 mg/120x10 ⁶ CLC
Ch 3,5	Standart Tris sulandırıcısı+3,5 mg/120x10 ⁶ CLC
7 dhc 1,5	Standart Tris sulandırıcısı+1,5 mg/120x10 ⁶ 7DHCLC
7 dhc 2,5	Standart Tris sulandırıcısı+2,5 mg/120x10 ⁶ 7DHCLC
7 dhc 3,5	Standart Tris sulandırıcısı+3,5 mg/120x10 ⁶ 7DHCLC

⁷ Sigma 30800-F



Şekil 2.3. Spermanın sulandırılması ve dondurulması

2.5. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

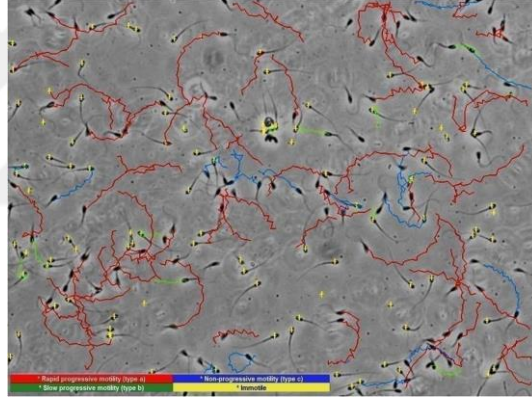
Yapılan incelemede koçların nativ ejakülatları miktarı (ml), motilite (%), yoğunluk (10^9 /ml), anormal spermatozoa oranı (%), ölü spermatozoa oranı (%) ve pH parametreleri değerlendirildi. Değerlendirmeler Tekin (1990) metodu kullanılarak yapıldı.

Payetlere çekilmiş ve sıvı azot buharında dondurulmuş sulandırıcı grupları, aşağıda belirtilecek olan yöntemler ışığında incelenmesi için 37 °C'deki su banyosunda 30 sn'de çözdürüldü.

2.5.1. Çözüm Sonu Spermatozoa Motilitesi ve Hareket Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Yedi farklı gruba ait dondurulmuş payetlerin çözüm sonu motilitelerinin ve hareket özelliklerinin değerlendirilmesinde CASA, Sperm Class Analyzer (SCA® v.4.2, Barcelona, Spain) kullanıldı. Spermatozoon motilite kinetik parametreleri hesaplanırken hız ayarları statik, yavaş > 60 µm/s, orta > 90 µm/s, hızlı > 120 µm/s olarak belirlendi. Her bir örnekten 5 µl alınarak lama damlatıldı ve üzerine 22x22'lik lamel kapatıldı. Sisteme bağlı faz-kontrast mikroskopunda x100'lük büyütmede 60 framelik kamera (Basler®) eşliğinde her bir örnek için 8 farklı alanda en az 230 en fazla 400 adet spermatozoon incelendi.

Yapılan analizde spermatozoa total motilitesi %, progressif motilite %, VCL µm/s, VSL µm/s, VAP µm/s, LIN %, STR %, WOB % parametreleri değerlendirildi.

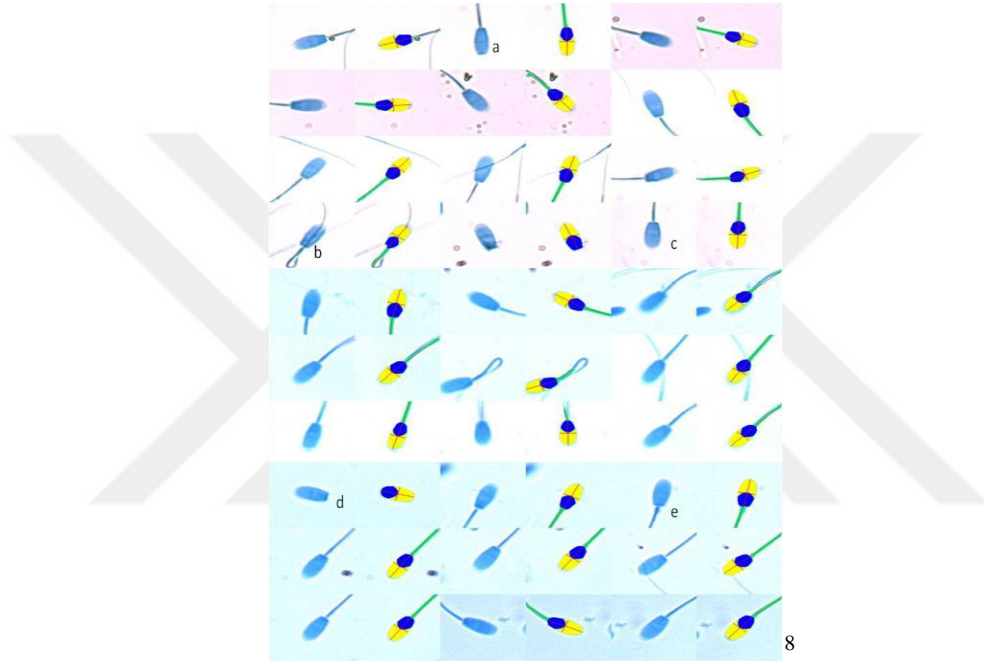


Şekil 2.4. Spermatozoon motilitesi ve hareket özelliklerinin belirlenmesi
Kırmızı: Hızlı Progressif motil (tip a), Yeşil: Yavaş progressif motil (tip b),
Mavi: Progressif olmayan motil (tip c), Sarı: İmmotil

2.5.2. Anormal Spermatozoa Oranı

Çözüm sonu anormal spermatozoa oranları değerlendirilirken sperma morfoloji kit'i (Sperm Blue®, Microoptics®, Spain) kullanıldı. İnceleme CASA, Sperm Class Analyzer (SCA® v.4.2)'da ışık mikroskopunda x600'lük büyütmede yapıldı. Her bir gruba ait çözdürülen payetlerden anormal spermatozoa incelemesi için 5 µl sperma bir lamın üzerine damlatılarak froti çekildi ve kurumaya bırakıldı.

Kurutulan preparat yatay olarak boyama tepsisine yerleştirildi üzerine fiksasyon solüsyonu damlatılarak 10 dakikada tespit edildi. Ardından fiksasyon sıvısı dikkatlice döküldü ve sperm blue ile 15 dakikada boyandı. Bu sürenin sonunda sperm blue boyası uzaklaştırılarak lamel kapatıldı. Hazırlanan preparat CASA sisteminde değerlendirildi. En az 150 spermatozoa incelenerek anormal spermatozoa oranı % olarak belirtildi.



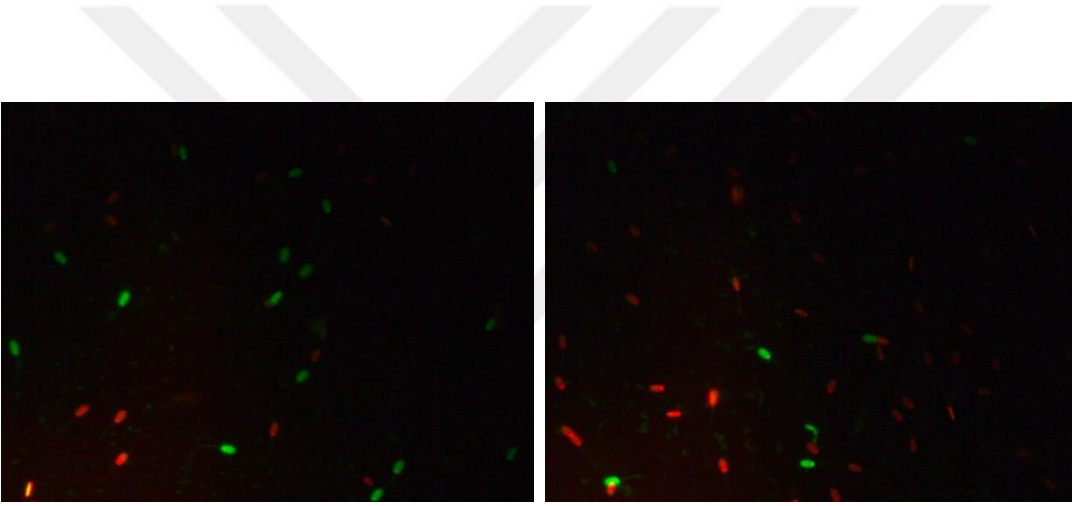
Şekil 2.5. Anormal spermatozoon oranının belirlenmesi

2.5.3. Ölü Spermatozoa Oranı (Viabilite)

Gruplardaki spermalar ölü canlı kiti (SYBR-14/PI Moleküler Probe: L7011 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ile boyandı. Boyama protokolü Garner ve Johnson (1995)'nin çalışmasının modifiye edilmesi ile oluşturuldu. SYBR-14 çalışma solüsyonu 1:10 oranında DMSO (Applchem A3006) ile sulandırıldı. 0.22- µml'lik Millipore Millex-GV filtre ile filtre edildikten sonra 30 µl'lik parçalara ayrılarak -20 °C'de saklandı. PI ml'de 2 mg olacak şekilde distile suda çözdürüldü, 0.22 µm'lik Millipore Millex-GV filtre ile filtre edildikten sonra 30

⁸ a, b, c, d: Anormal spermatozoa türleri

μl 'lik parçalara ayrılarak $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Çözdürülen spermalar, 1:2 oranında fosfat buffer saline (PBS) ile sulandırıldıktan sonra $30\text{ }\mu\text{l}$ alınan sperma $6\text{ }\mu\text{l}$ SYBR-14 ve $2.5\text{ }\mu\text{l}$ PI ile karıştırıldı. Hazırlanan solüsyon tekrar karıştırıldıktan sonra, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi ve daha sonra $10\text{ }\mu\text{l}$ Hancock solüsyonu Schafer ve Holzmann (2000) fiksasyon için eklendi. $2.5\text{ }\mu\text{l}$ lik bir damla sperma hazırlanan preparattan alınarak lama damlatıldı ve üzerine lamel kapatıldı. Her bir örnek için en az 200 spermatozoa floresan mikroskopta (Leica DM 3000 Microsystems GmbH, Ernst-Leitz-Straße, Wetzlar, Germany; dalga boyu $450\text{--}490\text{ nm}$) membran bütünlüğüne göre incelendi. Baş kısımları açık yeşille boyalı olanlar membranı sağlam (canlı) spermatozoonları, kırmızı boya alanlar ise membranı hasarlı (ölü) spermatozoonları temsil ettiği belirlendi.



Şekil 2.6. Ölü spermatozoon oranının belirlenmesi

2.5.4. HipoOsmotik Swelling (HOS) Test

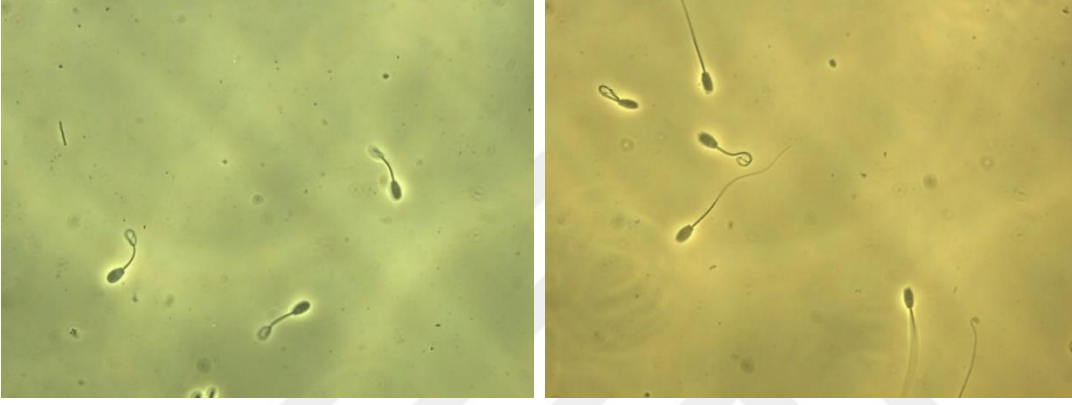
Numunelerdeki spermatozoon membran fonksiyonel bütünlüğün belirlenmesi amacıyla HOS test uygulandı. Su banyosunda $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki 100mOsm 'lük HOS sıvısından $100\text{ }\mu\text{l}$ alınarak üzerine sperma numunesinden $10\text{ }\mu\text{l}$ eklendi. Bu karışımın $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ta 60 dakika inkübasyonu sonrası, lam üzerine bu karışımdan bir damla alınıp lamel kapatıldı ve ısıtma tablası üzerine fikse edildi. Hazırlanan preparatlar mikroskop altında ($\times 400$) incelenerek 200 hücre sayılıp ve kuyruktaki kıvrımlar dikkate alınarak HOS teste yanıt veren spermatozoonlar % olarak belirlendi. Kuyruğu kıvrık olan spermatozoonlar membran bütünlüğü sağlam olarak değerlendirildi.

HOS test sıvısı hazırlanışı:

0,9g Fruktoz⁹

0,49 g Trisodyum sitrat¹⁰

100 ml'ye tamamlanarak (100 mOsm/kg) hazırlandı (Kulaksız, 2009).



Şekil 2.7. Hos test oranının belirlenmesi

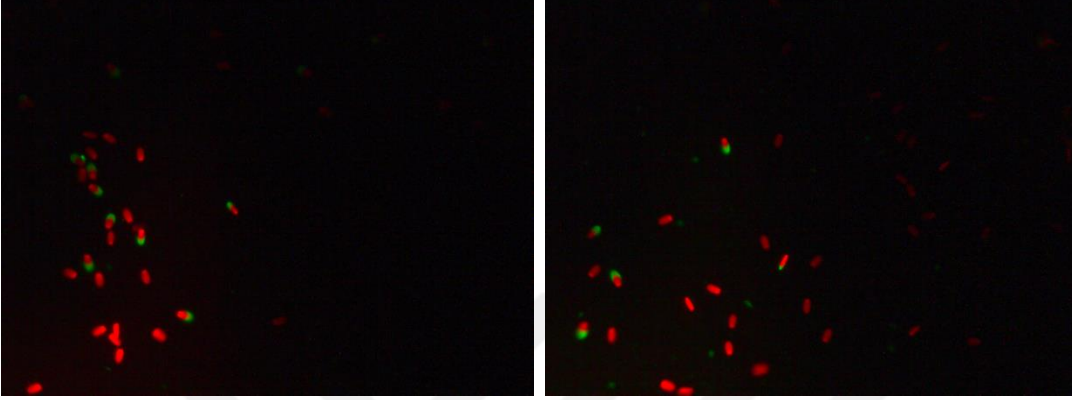
2.5.5. Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Sperma akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi için Florescen isosiyanat Arachis Hypogaea (peanut) (L7381 FITC-PNA, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA) ve PI boyası Nagy ve ark. (2003) protokolünün modifiye edilmesi ile kullanıldı. 120 µl FITC-PNA 1 ml PBS'e eklenerek boyama solüsyonu hazırlandı ve daha sonra filtre edilerek 100 µl'ik bölümlere ayrıldı ve -20 °C'de saklandı. Çözdürülen sperma 1:2 oranında PBS ile sulandırıldı ve daha sonra 60 µl sulandırılmış spermaya 10 µl FITC-PNA, 2.5 µl PI eklendi. Hazırlanan preparat iyice karıştırıldıktan sonra 37 °C'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi ve 10 µl Hancock solüsyonu (Schafer ve Holzmann, 2000) fiksasyon için eklendi. 2.5 µl lik bir damla sperm hazırlanan preparattan alınarak lama damlatıldı ve üzerine lamel kapatıldı. Her bir örnek için en az 200 spermatozoa floresan mikroskopta (Leica DM 3000 Micro systems GmbH, Ernst-Leitz-Straße, Wetzlar, Germany; 450–490 nm, dalga boyu) akrozomal

⁹Sigma F0127

¹⁰Sigma S1804

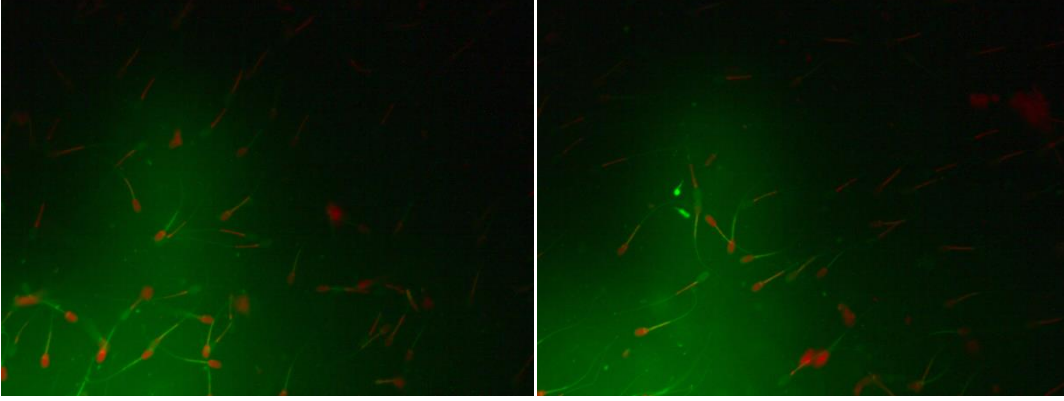
bütünlük açısından incelendi. Akrozomu yeşil boya alanlar hasarlı akrozoma sahip spermatozoonları, akrozomu boya almayanlar ise sağlam akrozoma sahip spermatozoonları gösterdi.



Şekil 2.8 Akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi

2.5.6. Mitokondriyal Aktivitenin Belirlenmesi

Sperma mitokondriyal aktivasyonun değerlendirilmesi Garner ve ark. (1997) protokolünün modifiye edilmesi ile uygulandı. Stok solüsyon, 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3' tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine iodide (1.53 mM) (T3168 JC-1, Invitrogen) DMSO solüsyonu ile hazırlandı ve filtre edildikten sonra 100µl'lik bölümlere ayrılarak -20 °C'de saklandı. Çözdürülen sperma 1:5 oranında Phosphate buffered saline (PBS) ile sulandırıldıktan sonra 300 µl sperma 2.5 µl JC-1 ve 2.5 µl PI ile karıştırıldı. Hazırlanan preparat iyice karıştırıldıktan sonra, 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi ve daha sonra fikzasyon için 10 µl Hancock solüsyonu (Schafer ve Holzmann, 2000) ile karıştırıldı. 2.5 µl'lik bir damla sperma hazırlanan preparattan alınarak lama damlatıldı ve üzerine lamel kapatıldı. Her bir örnek için en az 200 spermatozoa floresan mikroskopta (Leica DM 3000 Microsystems GmbH, Ernst-Leitz-Straße, Wetzlar, Germany; 450–490 nm, dalga boyu) mitokondriyal aktivasyon yönünden inceleme yapıldı. Mitokondrinin olduğu orta kısımda sarı/turuncu floresanın fazla olması mitokondriyal aktivitenin fazla olduğunu, yeşil rengin fazla olması mitokondriyal aktivasyonun düşük olduğunu gösterdi.



Şekil 2.9. Mitokondriyal Aktivasyon oranının belirlenmesi

2.5.7. Oksidatif Stres Parametreleri

2.5.7.1. Sperma Numunelerinin Hazırlanması

Spermatozoonları ayırmak için sulandırılmış ejakülat 3 kere +4 °C'de 800 x devirde, 15 dk süre ile santrifüj edildi, dipteki hücreler her seferinde süpernatant kısmı uzaklaştırılarak PBS ile yıkandı ve işlem bitiminde PBS ile 0,5 ml'ye tamamlandı. Homojenizasyon için sperm süspansiyonu buzlu su içerisindeki 2 ml'lik hazne içerisine konuldu ve soğuk ortamda 10 sn süreli sonikasyon (Bandelin Sonopuls, Bandelin Electronic Heinrichstraße, D-12207, Geräte-Typ:UW 2070, Pro-Nr. 51900037369.004, Berlin) uygulandı. Her uygulamanın sonunda örnekler 30 sn buz içerisinde bekletilmek suretiyle 5 kez işlem tekrarlandı. Lipit peroksidasyon (LPO) analizi için 120 µl homojenat alınıp üzerine 10 µl 0,5 mM BHT (bütil hidroksi toluen) ilave edildi, Total Glutasyon (tGSH) analizi için ise homojenattan 50 µL kullanıldı ve geriye kalan homojenat 12000 x devirde +4 °C de 15 dakika santrifüj edilip süpernatantlar ayrımlandı. Total antioksidan kapasite ölçümü için 20 µl süpernatant kullanıldı. Tüm örnekler analizler yapıncaya kadar -86 °C'de saklandı.

2.5.7.2. Lipit Peroksidasyonu (LPO) Derecesinin Belirlenmesi

Lipit peroksidasyon düzeyleri, ticari LPO-586TM Oxis Research (OxisResearchTM, Bioxytech, USA) kiti ile belirlendi. Ölçüm için 120 µl homojenat üzerine 650 µl asetonitril içerisinde N-metil-2-fenilindol eklendi ve vortexle karıştırıldı. Sonrasında 150 µl metansülfonik asit eklendi ve tekrar karıştırılıp 45 °C’de 60 dakika inkübe edildi. Son olarak 1500 devirde 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant ayrıldı. Sonuçlar temiz bir tüpe aktarılan süpernatant ile spektrofotometrik olarak (UV 2100 UV-VIS Recording Spectrophotometer Shimadzu, Japonya) 586 nm’ de ölçüldü.

2.5.7.3. Total Glutasyon (tGSH) Düzeyinin Analizi

Total Glutasyon düzeyleri GSH-420R Oxis Research kiti (OxisResearchR, Bioxytech, USA) kullanılarak ölçüldü. Homojenat üzerine 1/20 oranında çöktürücü madde (trikloroasetik asit) eklendi ve +4 °C de 10 dakika 3000 x devirde santrifüj edilip süpernatant kısmı ayrıldı. Süpernatant üzerine sırasıyla 200 µl buffer (potasyum fosfat, dietilentriaminpentaasetik asit, Lubrol, pH 7.8), 200 µl indirgeyici ajan (HCl içerisinde tris fosfin), 200 µl kromojen (HCl içerisinde 1-Methyl-4-chloro-7-trifluoromethylquinolinium methylsulfate) ve 200 µl renk geliştirici (NaOH) sırasıyla eklendi. Sonrasında karanlık ortamda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Total GSH düzeyi, spektrofotometre ile 420 nm’ de ölçüldü.

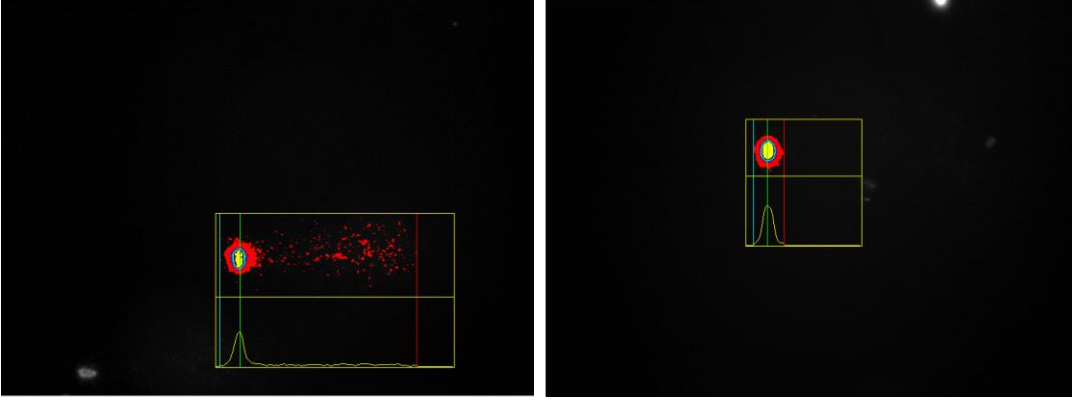
2.5.7.4.Total Antioksidan Kapasite (AOP) Analizi

Ölçüm için SIGMA Antioxidant Assay Kit (CS0790) ve ELISA yöntemi kullanıldı. Standardizasyon için ilk 6 pleyte 10 µl troloks standardı ve 20 µl myoglobin çalışma solüsyonu konuldu. Diğer pleytlere 10 µl süpernatant ve 20 µl myoglobin çalışma solüsyonu konuldu. Her bir pleyte 150 µl ABTS eklendi ve 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Son olarak 100’er ml stop solüsyonu ilave edildi ve karıştırıldı. Değerlendirme işlemi 405 nm dalga boyunda pleyt okuyucusunda yapıldı.

2.5.8. DNA Hasarının Belirlenmesi (COMET)

Sperm kromatin hasarı, yüksek alkali ortamda gerçekleştirilen tek hücre jel elektroforezi (comet) yöntemi kullanılarak yapıldı. Sperma örnekleri 37 °C’de 35 sn’de çözdürüldükten sonra oda sıcaklığında 600 g’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj tüpünün üst kısmında biriken seminal plazma dikkatlice uzaklaştırıldı ve tüpün alt kısmında birikmiş olan sperm sperma hücreleri buffer solüsyonu (PBS; Ca⁺² ve Mg⁺² ‘dan yoksun) ile iki kez yıkandı ve konsantrasyonu 1x10⁵ spermatozoa/cm³ olarak ayarlandı.

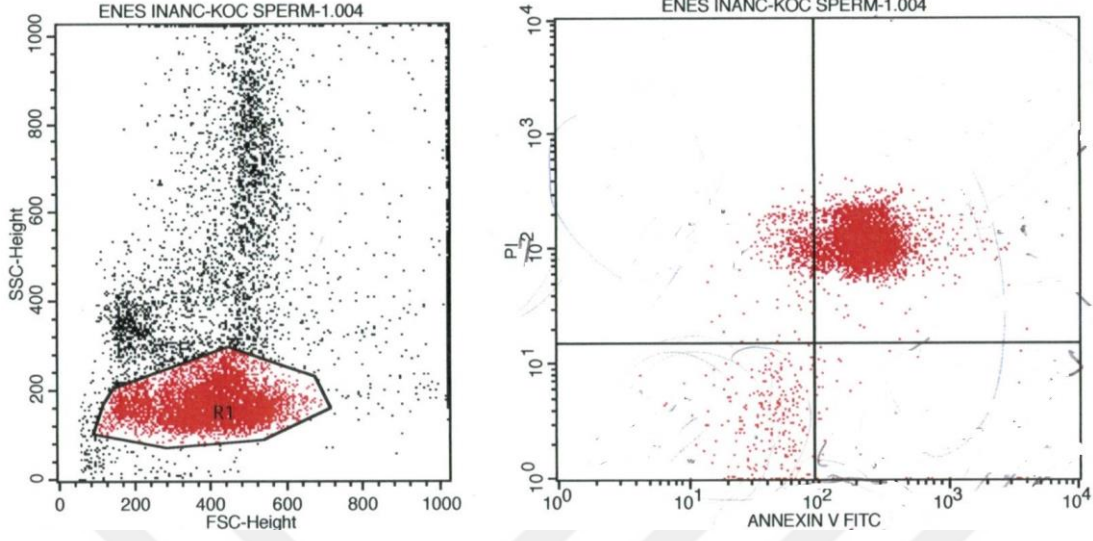
Distile su ile hazırlanmış %0.65’lik yüksek kaynama dereceli agarla kaplanmış mikroskop lamaları oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. 25 µl sulandırılmış sperma 50 °C’deki %0.65’lik düşük kaynama dereceli agarla karıştırıldı ve daha sonra bu karışımdan bir damla alındı ve agarla kaplanmış lama konarak lamel kapatıldı. Hazırlanan lamalar nemli bir kutunun içine alınarak +4 °C’de 10 dakika süresince sertleşmeye bırakıldı. Sonra lameller uzaklaştırıldı ve lamalar 2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 and 40 mM dithiothreitol (pH 10) içeren soğuk lizis buffera alınarak 4 °C’de 1 saat bekletildi. Daha sonra lizis bufferdan alınan lameller temizlenerek 300 mM NaOH and 1 mM EDTA (pH 13) içeren taze alkali elektroforezis solüsyonu bulunan horizontal elektroforez ünitesine alındı. Burada örnekler 20 dakika DNA’nın ayrılması için bırakıldıktan sonra elektroforezis işlemi oda sıcaklığında 25V 300 mA 20 dakika süreyle gerçekleştirildi. Daha sonra lamalar 0.4 M (ph 7.5) tris ile alkali ve deterjanların uzaklaştırılması için 20 µg/ml’lik 65 µl ethidium bromide ile boyandı ve lamel kapatıldı. Bütün bu aşamalar dışarıdan kromozom hasarı yaratmamak için karanlık ortamda gerçekleştirildi. Resimler x400 büyütme (Zeiss, Germany) floresan mikroskop kullanılarak rastgele 100 çekirdeğin analizi için seçildi. DNA nükleotidleri elektroforezis altında “kuyruklu yıldız” şeklinde görüldü ve DNA kırılma sıklığına bağlı olarak kuyruktaki DNA yoğunluğu belirlendi. Bunun sonucunda direkt DNA kırılma sıklığının ölçülmesi için kuruklu yıldızdaki total DNA yüzdesi belirlendi. DNA %’si 100 hücrenin Comet Assay III resim analiz sisteminde (Perceptive Instruments, UK) incelenmesi ile belirlendi. Analiz lamaların tek tek incelenmesi ile yapıldı (Taşdemir ve ark., 2014). Yapılan incelemede Kuyruk uzunluğu (TL µm), Kuyruktaki DNA yoğunluğu (DNA %), Kuyruktaki hareket (TM µm/s %) değerleri değerlendirildi. DNA hasarı belirlenirken kuyruktaki DNA yoğunluğu baz alındı.



Şekil 2.10. DNA hasarının belirlenmesi
Sol resim: DNA fragmentasyonu var,
Sağresim: DNA fragmentasyonu yok.

2.5.9. Apoptosis Tespiti

Spermatozoonlar; 1,5 ml'lik steril falkon tüpte toplanıp, 2 kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra 1x binding buffer ile sayısı $1 \times 10^6/\text{ml}$ olacak şekilde resüspanse edildi. Akabinde 5 ml Annexin V, 5 ml PI eklendikten sonra oda ısısında karanlıkta inkübe edildikten sonra (15 dk.) hazırlanan hücre süspansiyonu BD FACS™ Calibur akış sitometri cihazında okutulup, BD Cell Quest™ software programı kullanılarak akım sitometride apoptotik hücre analizi yapıldı. Böylece; deney sonrasında canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik (ölü) spermatozoa oranları sayısal olarak (%) belirlendi.



Şekil 2.11 Apoptozisin belirlenmesi

2.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler tüm değişkenler önemlilik testlerinden önce parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilks test ile, varyansların homojenliği yönünden ise Levene's testi ile incelendi. Normal dağılan değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü tek varyans analizi (ANOVA) ile, normal dağılmayan değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Tukey testi'nden yararlanıldı. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelendi. SPSS 14.01 paket programından yararlanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Taze Spermanın Spermatojik Özellikleri

İki yaş üzeri 3 Akkaraman koçundan suni vajen ile alınan spermalar, dereceli bir tüpte birleştirilerek karışım hale getirildikten sonra, taze spermanın spermatojik özellikleri değerlendirildi. Taze sperma verileri Çizelge 3.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Birleştirilmiş nativ koç spermalarında belirlenen başlıca spermatojik parametreler

N	Karışım Sperma Miktarı (ml)	Motilite(%)	Yoğunluk (10 ⁹ /ml)	Ölü (%)	Anormal (%)	pH
1	5,5	86,6	2,84	9,2	9,23	6,5-7
2	4,6	83,3	2,72	8,7	10,33	6,5-7
3	4,6	86,6	3,12	10,3	10,06	6,5-7
4	3,8	86,6	2,86	8,8	8,4	6,5-7
5	6,5	81,6	3,30	9,1	7,86	6,5-7
6	5,5	85,0	2,55	9,0	8,16	6,5-7
7	5,4	86,6	3,21	8,5	9,43	6,5-7
8	6,7	90,0	2,73	9,1	9,33	6,5-7
9	4,6	90,0	3,22	8,6	8,4	6,5-7
$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	5,241±0,947	86,21±2,735	2,951±0,267	9,03±0,54	9,021±0,863	*

*Tüm tekraralarda değerler 6,5-7 arasında bulunmuştur.

3.2. Çözüm Sonrası Spermatojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Dondurulmuş spermallerden her bir grup için 9 olmak üzere 7 sulandırıcı için toplam 63 payet 37 °C'lik su banyosunda 35 saniyede çözdürüldü. Spermatozoonun hareket özellikleri (spermatozoa total motilitesi %, progresif motilite %, VCL $\mu\text{m/s}$, VSL $\mu\text{m/s}$, VAP $\mu\text{m/s}$, LIN %, STR %, WOB %), anormal spermatozoa oranı (%), ölü spermatozoa oranı (%), hipo-osmotik swelling test (%), akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi (%), mitokondriyal aktivasyonun değerlendirilmesi (%), lipit peroksidasyon derecesinin değerlendirilmesi (%), DNA hasarının (COMET) değerlendirilmesi (%), apoptozis tespit (%) parametreleri yönüyle değerlendirildi.

3.2.1. Spermatozoon Motilitesi ve Hareket Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Yedi eşit gruba bölünmüş (split ejakulat); biri kontrol grubu olarak; üçü kolesterolün, diğer üçü de 7-dehidrokolesterolün farklı konsantrasyonlarını bulunduran tris ile dondurulan sulandırıcı gruplarının çözüm sonu motilite ve hareket özelliği değerleri Çizelge 3.2.'de gösterildi.

Çizelge 3.2. Çözüm sonu 7 grup arasındaki ortalama spermatozoon motilite ve kinetik parametre değerleri.

Spermatozoon Hareket Parametreleri	Grup						
	7 dhc 1,5	7 dhc 2,5	7 dhc 3,5	Ch 1,5	Ch 2,5	Ch 3,5	K
Total Motilite (%)	54,23 ± 0,09 ^a	54,0 ± 0,07 ^a	56,0 ± 0,06 ^a	53,0 ± 0,09 ^a	57,0 ± 0,08 ^a	56,0 ± 0,06 ^a	33,0 ± 0,09 ^b
Prog.Motilite (%)	13,0 ± 0,05	12,0 ± 0,03	13,0 ± 0,04	13,0 ± 0,04	15,0 ± 0,05	13,0 ± 0,03	8,0 ± 0,04
VCL (µ/s)	97,98 ± 9,73	97,07 ± 6,62	95,98 ± 6,14	100,23 ± 5,67	99,33 ± 4,61	95,36 ± 5,33	94,19 ± 3,10
VSL (µ/s)	49,43 ± 3,47	50,91 ± 2,74	51,63 ± 9,79	50,14 ± 9,14	52,53 ± 7,31	48,73 ± 5,70	49,73 ± 8,79
VAP (µ/s)	71,42 ± 8,79	71,99 ± 5,29	71,12 ± 8,92	69,76 ± 8,63	71,88 ± 6,70	68,34 ± 4,85	66,93 ± 9,56
LIN (%)	53,23 ± 5,92	53,87 ± 2,81	53,66 ± 8,53	49,86 ± 6,98	52,73 ± 5,47	51,26 ± 6,71	50,63 ± 4,49
STR (%)	72,88 ± 3,74	72,61 ± 2,31	72,09 ± 4,89	71,50 ± 4,06	72,82 ± 3,93	71,18 ± 4,53	74,01 ± 2,77
WOB (%)	72,89 ± 4,56	74,16 ± 1,55	74,03 ± 7,03	69,48 ± 5,79	72,16 ± 3,99	71,48 ± 5,03	68,36 ± 4,17

a,b: Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan değer ortalamaları arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,001).

3.2.2. Anormal Spermatozoa Oranı

Gruplara ait dondurulmuş payetlerin çözüm sonu anormal spermatozoa değerleri Çizelge 3.3.'de verildi.

Çizelge 3.3. Çözüm sonu 7 grup arasındaki anormal spermatozoon değerleri.

Grup	Anormal (%)*
7 dhc 1,5	18,0±0,08
7 dhc 2,5	20,0±0,05
7 dhc 3,5	17,0±0,08
Ch 1,5	25,0±0,09
Ch 2,5	17,0±0,05
Ch 3,5	20,0±0,04
K	20,0±0,07
*(p>0,05)	

3.2.3. Ölü Spermatozoon Oranı

Gruplara ait dondurulmuş payetlerin çözüm sonu ölü spermatozoon oranları aşağıda Çizelge 3,4.'de gösterildi.

Çizelge 3.4. Çözüm sonu 7 grup arasındaki anormal spermatozoon değerleri.

Grup	Ölü Spermatozoon Oranı (SYBR-PI) (%)
7 dhc 1,5	47,32±11,64 ^a
7 dhc 2,5	46,94±6,45 ^a
7 dhc 3,5	43,60±6,39 ^a
Ch 1,5	47,16±8,67 ^a
Ch 2,5	43,28±7,39 ^a
Ch 3,5	44,70±6,11 ^a
K	68,23±9,29 ^b

a,b: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değer ortalamaları arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,001).

3.2.4. HipoOsmotik Swelling (HOS) Test

Gruplara ait HOS test değerleri çizelge 3.5.'de gösterildi.

Çizelge 3.5. Çözüm sonu 7 grup arasındaki HOS test değerleri.

Spermatozoon Membran Bütünlüğü (HOS Test)	Grup						
	7 dhc 1,5	7 dhc 2,5	7 dhc 3,5	Ch 1,5	Ch 2,5	Ch 3,5	K
Düz (%)	44,33± 7,81 ^b	44,00± 15,2 ^b	41,78± 11,2 ^b	50,89± 16,8 ^b	39,89± 10,9 ^b	37,00± 11,0 ^b	63,56± 18,6 ^a
Kıvrık(%)	56,78± 7,61 ^a	56,00± 15,2 ^a	58,22± 11,2 ^a	49,11± 16,8 ^a	60,11± 10,9 ^a	63,00± 11,0 ^a	36,44± 18,2 ^b

a,b:Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değer ortalamaları arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,001).

3.2.5. Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Gruplara ait spermatozoonların akrozomları incelendi ve sonuçlar çizelge 3.6.'da gösterildi.

Çizelge 3.6. Çözüm sonu 7 grup arasındaki akrozom bütünlüğü değerleri.

Spermatozoon Akrozom Bütünlüğü (FITC-PNA)	Grup						
	7 dhc 1,5	7 dhc 2,5	7 dhc 3,5	Ch 1,5	Ch 2,5	Ch 3,5	K
Bozuk (%)	29,26 ± 13,4 ^b	19,70 ± 6,27 ^b	23,98 ± 8,42 ^b	19,71 ± 9,00 ^b	20,17 ± 6,23 ^b	21,14 ± 7,04 ^b	42,50 ± 10,8 ^a
Sağlam(%)	70,76 ± 13,4 ^a	80,30 ± 6,27 ^a	76,10 ± 8,60 ^a	80,32 ± 8,86 ^a	79,80 ± 6,24 ^a	78,33 ± 7,03 ^a	57,49 ± 10,8 ^b

a,b: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değer ortalamaları arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,001).

3.2.6. Mitokondriyal Aktivitenin Belirlenmesi

Gruplara ait mitokondriyal aktivasyon bulguları çizelge 3.7.'de gösterildi.

Çizelge 3.7. Çözüm sonu 7 grup arasındaki mitokondriyal aktivasyon değerleri.

Grup	Mitokondriyal Aktivasyon (%)*
7 dhc 1,5	77,9±11,04
7 dhc 2,5	71,9±12,07
7 dhc 3,5	69,9±16,03
Ch 1,5	76,7±8,05
Ch 2,5	70,7±15,07
Ch 3,5	70,6±18,02
K	61,9±21,08
*(p>0,05)	

3.2.7. Oksidatif Stres Parametreleri

Gruplara ait oksidatif stres parametreleri sonuçları çizelge 3.8.'de gösterildi.

Çizelge 3.8. Çözüm sonu 7 grup arasındaki biyokimyasal parametreler.

Grup	tGSH ($\mu\text{M}/1 \times 10^9 \text{ sp}$)*	AOP ($\text{mM}/1 \times 10^9 \text{ sp}$)*	LPO ($\mu\text{M}/1 \times 10^9 \text{ sp}$)*
7 dhc 1,5	945±283,8	12±0,76	20.37±1,18
7 dhc 2,5	758±144,7	13±0,94	20.98±1,27
7 dhc 3,5	718±214,9	13±0,32	26.66±2,97
Ch 1,5	976±214,4	13±0,60	22.15±5,18
Ch 2,5	602±50,7	14±1,14	32.06±8,68
Ch 3,5	676±176,7	13±0,64	25.91±2,02
K	861±357,7	14±1,57	23,72±2,57
*(p>0,05)			

3.2.8. DNA Hasarının Belirlenmesi

Gruplara ait DNA hasarı sonuçları çizelge 3.9.'da gösterildi.

Çizelge 3.9. Çözüm sonu 7 grup arasındaki DNA Hasarı değerleri.

Spermatozoon DNA Hasarı (COMET Test)	Grup						
	7 dhc 1,5	7 dhc 2,5	7 dhc 3,5	Ch 1,5	Ch 2,5	Ch 3,5	K
TL (μm)*	54,98± 22,57	54,21± 23,65	51,89± 21,72	53,89± 18,20	56,82± 23,98	56,78± 19,80	60,31± 23,57
DNA (%)*	11,52± 2,13	11,41± 2,29	10,25± 2,47	12,04± 1,75	12,00± 2,46	12,14± 3,06	11,84± 3,00
TM ($\mu\text{m/s}$ %)*	3,18± 1,72	3,00± 1,80	2,79± 1,57	3,41± 1,83	3,64± 2,92	3,68± 2,91	3,61± 2,94
*(p>0,05)							

3.2.9. Apoptosis Tespiti

Gruplara ait Apoptosis tespiti sonuçları çizelge 3.10.'da gösterildi.

Çizelge 3.10. Çözüm sonu 7 grup arasındaki apoptosis değerleri.

Spermatozoon Apoptosis Tespiti (Annexin V-PI)	GRUP						
	7 dhc 1,5	7 dhc 2,5	7 dhc 3,5	Ch 1,5	Ch 2,5	Ch 3,5	K
Sayılan Hücre (n)	5665,11 ± 44	5692,67 ± 52	5564,22 ± 63	5681,2 ± 42	5295,67 ± 62	5295,89 ± 72	6019,56 ± 44
Ölü (%)	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,03	0,002 ± 0,01
Geç Apoptosis (%)	90,46 ± 1,48	88,92 ± 1,62	88,92 ± 1,23	84,8 ± 2,16	85,65 ± 1,74	84,13 ± 1,87	87,89 ± 1,72
Canlı (%)	0,49 ± 0,14 ^{bc}	0,58 ± 0,16 ^{abc}	0,59 ± 0,24 ^{abc}	0,49 ± 0,19 ^{bc}	0,72 ± 0,29 ^{ab}	0,80 ± 0,41 ^a	0,45 ± 0,20 ^c
Erken Apoptosis (%)	9,52 ± 4,61 ^b	10,48 ± 4,77 ^{ab}	11,06 ± 3,50 ^{ab}	14,63 ± 6,48 ^b	13,3 ± 5,37 ^{ab}	16,64 ± 2,70 ^a	11,67 ± 4,99 ^{ab}

**a,b,c: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değer ortalamaları arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,001).

4. TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada koç spermasına değişik oranlarda ch ve 7dhc eklenmesi ile kriyoprezervasyon sırasında nasıl değişiklikler olabileceği; kolesterolün spermaya eklenmesi ile çözüm sonu canlılık oranına, sperma kalitesi ve fizyolojisine etkisi araştırıldı. Ayrıca, ch ve 7-dhc ile hücre membranlarının antioksidan bütünlüğünü sağlayarak, osmotik basıncın uygun sınırlar içinde tutmasının yanı sıra, DNA bütünlüğünün korunması, prematüre akrozom reaksiyonunun engellemesi gibi olumlu etkilerinden faydalanılarak koç spermasının dondurulması ve çözündürülmesi sonucu elde edilecek in vitro sonuçların değerlendirilmesini içermektedir.

Üç Akkaraman koçundan alınarak birleştirilen spermanın toplam miktarı en yüksek 6,7 ml en düşük 3,8 ml olarak belirlendi. Ortalama karışım sperma miktarı $5,24 \pm 0,94$ ml'dir. Koç başına düşen ortalama sperma miktarı ise yaklaşık $1,74 \pm 0,23$ ml'dir. Bu çalışmada elde edilen sperma miktarının Akkaraman koçlarda Uysal ve ark. (2003), 1,6 ml, Aral (1994), 1,08 ml, Yavaş (2008), 0,98 ml, Tekin ve ark.'ın (1991) Merinos, Dağlıç, Ramlıç ırkı koçlarda sırasıyla 1,0 ml, 1,0 ml, 1,3 ml olarak elde ettikleri ortalama sperma miktarından yüksek; Özkoca (1984)'ın Merinos ırkı koçlarda 1,9 ml, Yeni ve ark.'ın (2010) Pırlak ırkı koçlarda 1,9 ml olarak elde ettikleri sperma miktarından düşük olarak bulundu. Sperma miktarının yapılan çalışmalardan yüksek çıkmasında kullandığımız hayvanların genç olmasının etkili olmuş olabileceği düşünülmektedir. Diğer çalışmalardan düşük çıkması ise farklı ırktan hayvanların ve sperma alma şeklinden kaynaklanabileceği kanısına varıldı. Araştırmada 3 Akkaraman koçunun 9'ar ejakulatında saptanan nativ spermatozoa motilitesi en yüksek % 90, en düşük % 81,6 ve ortalama % $86,21 \pm 2,73$ olarak bulundu. Elde edilen bu değer, Akkaraman koçlarda çalışan araştırmacılarından Uysal ve ark.'ın (2003), %80, Aral'ın (1994) %83,27, Yavaş'ın (2008), %85, Tekin ve ark.'ın (2006) %75,5, Taşdemir ve ark.'ın (2003) %81,55, Yıldız'ın (2004) %77, Aral'ın (1994) İvesi ve Merinos ırkı koçlarda yaptığı çalışmada sırasıyla % 85,33,%81,53, Karagiannidis ve ark.'ın (2000), Chios ve Friesian ırkı koçlarda yaptığı çalışmada sırasıyla %72,17, %72,36 olarak belirlediği motilite oranlarından yüksek, Aisen ve

ark.'ın (2002) Pampinta ırkı koçlarda yaptığı çalışmada %95,6 olarak belirlediği motilite oranından düşük olarak bulundu. Motilite yönünden yapılan çalışmalarla tez çalışmamızda yukarıda da görüldüğü üzere farklılıklar görüldü. Bu farklılığa yetiştirme şartları, yaş, bakım ve besleme gibi birçok temel faktörler etki edeceği gibi sperma alırken uygulanan teknik ve yöntemlerin de etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Araştırmada saptanan nativ spermatozoa yoğunluğu en yüksek $3,30 \times 10^9/\text{ml}$ en düşük $2,55 \times 10^9/\text{ml}$ ve ortalama $2,95 \times 10^9/\text{ml} \pm 0,26$ ml olarak bulunmuştur. Mililitre bazında elde edilen bu değerler, Akkaraman koçlarda çalışan Türk ve Demirci'nin (2005) $2,55 \times 10^9$, Tekin ve ark.'ın (2006) $2,7 \times 10^9$, Günay ve ark.'ın (2003) Merinos ırkı koçlarda aşım sezonunda $2,52 \times 10^9$, Yılmaz'ın (2004) Sakız ırkı koçlarda $1,78 \times 10^9$, İnce ve Karaca'nın (2009) Çine Çapari ırkı koçlarda $1,86 \times 10^9$, Kaya ve ark.'ın (1999) Aralık-Ocak aylarında Merinos ırkı koçlarda $2,7 \times 10^9$ olarak belirlediği yoğunluk değerlerinden yüksek; Kaya ve ark.'ın (1999) Eylül-Kasım aylarında Merinos ırkı koçlarda $3,6 \times 10^9$, Günay ve ark.'ın (2003) sezona girişte Merinos ırkında $3,29 \times 10^9$, Kaya ve ark.'ın (1999) Haziran-Ağustos aylarında Merinos ırkında $3,3 \times 10^9$, Tekin ve ark.'larının (2006) Sakız ve Ramlıç ırkı koçlarda sırasıyla $3,1 \times 10^9$, $3,2 \times 10^9$ olarak belirlediği yoğunluk değerlerinden düşük olduğu belirlendi. Araştırmada bulunan nativ anormal spermatozoa oranı en yüksek %0,33, en düşük %7,86 ve ortalama $9,21 \pm 0,86$ olarak bulunmuştur. Elde edilen bu değer Türk ve Demirci'nin (2005) Akkaraman ırkı koçlarda %6,75, Aral'ın (1994) Akkaraman, İvesi ve Merinos ırkı koçlarda sırasıyla %2,73, %2,68, %5,53, Yavaş'ın (2008) Akkaraman ırkı koçlarda % 5,53, İnce ve Karaca'nın (2009) Karya ırkı koçlarda %7,84, Tekin ve ark.'ın (2006) Sakız ırkı koçlarda %5,8 olarak bulduğu değerlerden yüksek; yine Tekin ve ark.'ın (2006) Akkaraman ırkı koçlarda %16,5, Uysal ve ark.'ın (2003) %19,62 İnce ve Karaca'nın (2009) Çine Çapari ırkı koçlarda % 17,71 olarak bulduğu değerlerden düşük, Tekin ve ark.'nın (2006) Ramlıç ırkı koçlarda %9,5 olarak bulduğu anormal spermatozoa oranına benzerlik göstermektedir. Araştırmada bulunan nativ ölü spermatozoa oranı en yüksek %10,3, en düşük %8,5 ve ortalama $9,03 \pm 0,54$ olarak bulunmuştur. Elde edilen bu değer, Akkaraman koçlarda çalışmış olan Uysal ve ark.'ın (2003) %22,10, Yavaş (2008)'in ortalama olarak bulduğu $10,73 \pm 0,84$, Tekin ve ark.'ın (2006) ortalama olarak elde ettiği $14,3 \pm 5,4$ değerlerden düşük; Uysal ve ark.'ın (2003) Akkaraman koçlarda %9,6 olarak bulduğu ölü spermatozoa oranı ile benzer olduğu görüldü.

Çalışmada natif spermada elde edilen pH değeri tüm deneme gruplarında 6,5-7,0 arasında bulunmuştur. Yapılan birçok araştırma ile çalışmada elde ettiğimiz değer benzerlik göstermektedir.

Bu araştırmada elde edilen natif ko ejakulatlarında dondurma işleminden önce saptanan başlıca ortalama spermatolojik özellikleri  baş koçun birleştirilen ejakulatlarından elde edildi. Söz konusu değerlere ilişkin bulgular ile diğer araştırmacıların bildirdiği veriler arasında görülen farklılıklar, çalışmadaki koçların yaşlarına, ırkına, sayılarına, sperma alma aralığı, sıklığı ve zamanına bağlı olabileceği gibi, evre koşulları ve bakım-besleme farklılıklarından da kaynaklandığı dşnld. Ayrıca, in vitro spermanın değerlendirilmesinde kullanılan metotların değişkenliği elde edilen sonuçların farklı oluşması ile sonuçlanmış olabilir. Bunun yanı sıra elde edilen in vitro sonuçların, koçlarda ortaya konan sonuçlarla benzer bulunduğu ve alınan spermaların dondurulabilir olduğu belirlendi.

Araştırmada zdrme sonrası elde edilen ortalama total spermatozoa motilitesi oranları 7dhc 1,5, 7dhc 2,5, 7 dhc 3,5, ch 1,5, ch 2,5, ch 3,5 ve kontrol için sırasıyla % 54,23±13,93, %54,0±0,07, %56,0±0,06, %53,0±0,09, %57,0±0,08, %56,0±0,06 ve %33,0±0,09 olarak belirlendi. Çözdürme sonrası en yüksek motilite ortalaması ch 2,5 grubunda bulunurken en düşük motilite ise %33,0 ile kontrol grubunda bulunmuştur. Çalışmada 7dhc 1,5, 7dhc 2,5 ve 3,5 grupları ile ch 1,5, 2,5, 3,5 grupları arasında istatistiksel olarak aralarında bir fark bulunmazken ($p>0,05$); kontrol grubuna göre istatistiksel olarak fark bulunmuştur ($p<0,001$). Araştırmada progresif motilite ve spermatozoon hareket parametreleri [(VCL (μ/s), VSL(μ/s), VAP(μ/s), LIN (%), STR (%), WOB (%)] yönünden istatistiksel olarak bir fark bulunamadı ($p>0,05$).

Moce ve ark. (2010a), koç spermasına 2 mg/120x10⁶ oranında CLC ilave ettikleri ve tris sulandırıcılarıyla dondurdukları çalışmada, kontrol (0 mg/120x10⁶) grubununun motilitesini %28, CLC ilave ettikleri gruba ise %45-46 olarak bulmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlarla örtüşen bu alışma CLC ilavesinin olumlu etkileri belirgin bir Şekilde saptanmasına rağmen; Purdy ve ark. (2010), aynı miktarda CLC etkilerinin gruplar arasında istatistiksel bir fark tespit edilemediği grlmştur ($p>0,05$). Konyalı ve ark. (2013), Murciano-Granadina tekelerinde yaptığı çalışmada CLC'nin farklı oranlarını (1,1,5, 2, 4, 8 mg/120x10⁶) kontrol grubu (0 mg/120x10⁶) ile karşılaştırmıştır. Çalışma sonucunda CLC gruplarının motilite sonuçlarını sırasıyla %67,3, %57,0, %57,8, %59,5, %51,3 olarak tespit etmişlerdir.

Kontrol (0 mg/120x10⁶) grubu ile karşılaştırdıklarında ise (%59,4) aralarında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Ancak tris sulandırıcısına sadece siklodextrin ilave ettikleri grup ile karşılaştırıldığında (%37,3); CLC gruplarının tamamında siklodextrin grubuna göre çok daha yüksek motilite elde edilmiştir. Burada görüldüğü üzere sadece siklodextrin motilite üzerine direkt etki edememektedir. Siklodextrinlerin kolesterol ile doyurulup sperma sulandırıcılarına eklenmesi suretiyle etkisini gösterdiği bu çalışma ile açıkça gösterilmiştir. Konyalı (2009)'nın tekelerde yaptığı bir diğer çalışmada, 1 mg/120x10⁶ oranında CLC ile sulandırıcı hazırlanmıştır. Sperma dondurulurken ise bir grupta seminal plazma uzaklaştırılarak, diğer grupta ise seminal plazma uzaklaştırılmayarak dondurma işlemi yapılmıştır. Çözüm sonu kontrol grubu %55,5 seminal plazma uzaklaştırılmayan grupta total motilite %60,92 ve seminal plazma uzaklaştırılan grupta ise %68,65 olarak motilite tespit edilmiştir. Seminal plazmanın uzaklaştırılması %7-22 oranında motilite artışı sağladığı tespit edilmiştir. Seminal plazma ve CLC (%)'nin birlikte kullanıldığı sulandırıcılarda motilitenin düştüğü tespit edilmiştir. Bunun sebebi olarak ise erkek eklenti bezlerinde bulunan bazı seminal plazma proteinleriyle ch'nin etkileşime girdiği düşünülmektedir. Purdy ve Graham (2004) ve Moraes ve ark. (2009) boğa spermasını 1,5mg/120x10⁶ CLC ile dondurduklarında çözüm sonu sırası ile kontrol grubunu %42, CLC grubunu %60; %32 ve %56 olarak tespit etmişlerdir. Çalışmalar sonucunda yaptığımız çalışma sonuçlarının gösterdiği şekilde CLC'nin motiliteyi olumlu etkilediği görülmüştür. Oliveira ve ark. (2014) eşeklerde, Amidi ve ark. (2010) boğalarda, Crichton ve ark. (2015) develerde, Hussain ve ark. (2013) bizonlarda, Award (2011) koçlarda standart sulandırıcılara değişik oranlarda CLC ilave edip spermaları dondurduklarında, çözüm sonu progresif motilitenin kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak daha iyi olduklarını göstermesi sonucu motilite sonuçlarımızın literatürlerin neredeyse tamamı ile örtüştüğü gözlemlenmiştir. Yaptığımız çalışmada ch 2,5 grubunun kontrol grubuna göre anlamlı bir sonuç çıkması yukarıda bahsedilen çalışmalarla paralellik göstermektedir. Total motilite ve progresif motiliteyi birlikte ele aldığımızda, temel sulandırıcı bileşenlerine katılan ch ve 7dhc'nin farklı miktarlarının progresif ve total motiliteyi artırdığı görülmüştür. Motilite hareket parametreleri (VSL, VCL, VAP, LIN, STR, WOB) açısından istatistiksel olarak bir fark bulunmamasına rağmen sulandırıcıya ilave ettiğimiz bileşenlerin spermanın doğrusal yönde hareketine ve saniyede kat ettiği yoldaki hızına olumlu etki yaptığını göstermektedir. Çünkü CASA sisteminin temeli, belirli bir zamanda alınan yola dayanmaktadır. Artan ATP enerjisini sperma kullanarak daha hızlı hareket edecek ve birim zamanda alacağı yolda artacaktır. Total motilitede istatistiki bir

farklılığın çıkması, çalışmada elde edilen önemli veriler arasındadır. Koç spermasının dondurulmasında karşılaşılan güçlüklerin hala devam etmesi ve yapılan tohumlamaların istenen düzeyde olmaması sebebi ile elde edilen bu verilerin önemi artmıştır. Elde edilen bu veriler doğrultusunda yapılacak olan fertilizasyon çalışmaları ile suni tohumlamalarda elde edilecek başarı artacağı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, çözüm sonrası çalışmamızda elde edilen sonuçlarla literatürler arasında spermatozoa motilitesi açısından ortaya çıkan değişiklikler dondurma sırasında kullanılan sulandırıcılar ile sulandırıcının içerdiği bileşenlerin miktar ve oranlarının farklı oluşuna, sperma sulandırıcısına katılan CLC'nin farklı miktarlarda oluşuna bağlı olarak değişkenlik göstermiş olabilir. Ayrıca spermanın sulandırılması ve dondurulmasında kullanılan teknik ve yöntemlerin değişik olmasına, çözüm süresi ve sıcaklığındaki farklılıklara, analizi yapan görevli veya makinaya bağlı olarak oluşmuş olabilir. Bu cihazlarda kullanılan yazılımların (SCA, Hamilton Thorne gibi) farklı kinetik parametre değerlerinin bulunması farklı sonuçlar çıkmasındaki en önemli etkenlerden biridir.

Bu çalışmada çözüm sonrası elde edilen anormal spermatozoa oranları; 7dhc 1,5, 7dhc 2,5, 7 dhc 3,5, ch 1,5, ch 2,5, ch 3,5 ve kontrol için sırasıyla %18,0±0,08, %20,0±0,05, %17,0±0,08, %25,0±0,09, %17,0±0,05, %20,0±0,04 ve %20,0±0,07 olarak belirlendi. Çalışmada en düşük anormal spermatozoa oranı %17 ile 7 dhc ve ch 2.5 gruplarında tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada anormal spermatozoa yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamasına rağmen ($p>0,05$) Kulaksız ve ark. (2012), Akkaraman koçlarda sezon dışında aldıkları spermalarla yağsız süt tozu, sodyum sitrat, tris ve bioxell sulandırıcıları ile sulandırmış ve dondurmuşlardır. Çözüm sonu anormal spermatozoa oranlarını sırasıyla % 50,6±0,8, %60,0±0,4, %55,4±0,5, %65,0±0,4 olarak bulmuştur. Yağsız süt tozu ile dondurulan grupta diğer gruplara göre daha az anormal spermatozoa oranı (%50) tespit edilmiştir. Anormal spermatozoa oranlarının normal değerlerden aşırı yüksek olmasına sezon dışında libido seksüalisin düşük olmasının sebep olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca aynı ırkta çalışılmasına rağmen anormal spermatazoa oranlarının çok farklı olmasına kolesterolün olumlu etki yapmış olabileceği düşünülmektedir. Tekin ve ark. (2006), tris sulandırıcısına farklı taurin dozlarını ilave ederek Akkaraman, Sakız, Ramlıç ırkı koç spermalarını otomatik programlanabilir dondurma makinasında farklı dondurma hızlarında dondurmuş ve çözündürme sonrası anormal spermatozoa oranlarını sırasıyla % 16,5±7,9, % 5,8±1,25, % 9,5±4,2 olarak bulmuşlardır. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre, koç

spermasının dondurulmasında değişik taurin dozlarının ve dondurma hızlarının çözdürme sonrası in vitro spermatolojik parametrelerde farklı değerler elde edilmesine karşın, istatistiksel değerlendirmede önemli bulunmamıştır. Akkaraman ırkında çalışan diğer bazı araştırmacılar suni vagina ile spermaları almış ve taze olarak spermatolojik parametreleri incelediğinde %20'nin altında anormal spermatozoa oranı bulmuşlardır (Uysal ve ark., 2003; Taşdemir ve ark., 2003). Yaptığımız çalışmada gruplar arasında bir fark olmamasına rağmen çözüm sonucu yukarıda taze sperma ile çalışan araştırmacılarla benzer sonuçların elde edilmesi ch ve 7-dhc'nin morfolojik parametreler üzerine olumlu etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, Kulaksız ve ark. (2010) Karayaka koçlarında sezon dışı taze spermada anormal spermatozoa oranını $10,66 \pm 0,58$; Karakuş ve Cengiz (2007) Karakaş ve Norduz koçlarında bu değerleri sırası ile $7,40 \pm 0,31$, $9,89 \pm 0,26$ bulurken; Gülyüz ve Yıldız (1995) Akkaraman, Corriadale, Hampshire, Dorsetdown ırkı koçlarda bu değerleri sırasıyla $5,75 \pm 0,25$, $6,0 \pm 1,0$, $5,6 \pm 1,4$, $5,75 \pm 0,75$ olarak bulmuşlardır. Yapılan çalışmalarda elde edilen anormal spermatozoa oranları ile diğer çalışmalarda elde edilen oranlar arasında görülen farklılıklar koçların genotipik ve irksal farklılıklarından, çalışmanın sezon içi veya sezon dışında gerçekleştirilmesinden, sperma sulandırıcısının içeriğinden, dondurma ve çözdürme prosedürleriyle değerlendirmede kullanılan teknikler arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada çözdürme sonrası elde edilen ölü spermatozoa oranları 7dhc 1,5, 7dhc 2,5, 7 dhc 3,5, ch 1,5, ch 2,5, ch 3,5 ve kontrol için sırasıyla $47,32 \pm 11,64$, $46,94 \pm 6,45$, $43,60 \pm 6,39$, $47,16 \pm 8,67$, $43,28 \pm 7,39$, $44,70 \pm 6,11$ ve $68,23 \pm 9,29$ olarak belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada ch ve 7dhc grupları arasında bir fark bulunmazken ($p > 0,05$); bu gruplarla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark önemli bulunmuştur ($p < 0,001$). Motamedi-Mojdehi ve ark. (2014), Taleshi koçlardan üreme sezonunda suni vagina ile sperma alıp tris sulandırıcısına kriyoprotektan madde olan gliserolün farklı oranları (%3,%5,%7) farklı CLC miktarları (1,5mg, 3mg, 4,5 mg/120x10⁶)'na eklenerek dondurulmuştur. Çözüm sonu yapılan incelemelerde, bütün CLC gruplarında kontrol grubuna göre canlılık yüksek bulunmuş en yüksek canlılık oranı 1,5mg/120x10⁶ grubunda tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Benzer bir çalışma yapan Award (2011), 2-4 yaşlı Rahmani koçlarında farklı gliserol oranlarını (%3,%6) farklı CLC oranları (0mg, 2 mg/100x10⁶) ile birleştirerek tris sulandırıcısı hazırlamış ve dondurmuştur. Çözüm sonu canlılık yönünden en yüksek grup %3 gliserollü 2mg CLC grubu olduğu tespit edilmiştir. Koçlarda yapılan yukarıdaki

çalışmalarda elde edilen verilerin sonuçlarımızla örtüştüğünü ve Ch'nin viabilite üzerine olumlu etkisinin olduğunu göstermektedir. Blanch ve ark. (2012), domuzlarda yaptığı bir araştırmada iyi donan ve kötü donan spermaları katogerize etmiştir. Sulandırıcıları ise, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 6 mg, 12 mg CLC/120x10⁶ dozlarında hazırlayarak dondurma işlemi yapmıştır. Çözdürme sonrası ise canlı spermatozoon sonuçlarını sırasıyla %61±3, %58 ± 3, %53±3, %39±3, %21±3 bulmuştur. Sonuçta ise 1 mg CLC'nin canlı spermatozoon oranını artırdığı görülmesine rağmen Tomas ve ark. (2013), domuzlarda yaptığı bir diğer çalışmada ise tris sulandırıcısına 1mg/120x10⁶ oranında CLC ilave ederek spermaları dondurdukları ve spermalarda çözdürme sonrası gruplar arasında bir fark olmadığını tespit edilmişlerdir (p>0,05). Aynı ırk arasında oluşan bu farklılığın tür farklılığından olabileceği düşünülmektedir. Moce ve Graham (2006), boğalarda suni vagina ile sperma almış ve 2mg ve 4 mg/120x10⁶ CLC tris sulandırıcısına ekleyerek dondurmıştır. Çözdürme sonrası ölü spermatozoa oranı SYBR 14-PI yöntemi ile incelenmiştir. Çözüm sonu canlı spermatozoa oranını sırasıyla % 44, %30 bulmuştur. Bu sonuçlara göre 2 mg/120x10⁶ CLC grubu istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Yaptığımız çalışma sonuçları ile karşılaştırıldığında, elde ettiğimiz viabilitenin daha yüksek çıkmasında farklı türlerdeki hücre membranlarının fosfolipit-kolesterol içeriğindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Moore ve ark. (2005), aygır sperma sulandırıcısına CLC'nin farklı miktarlarını (0, 0,5, 1,5, 3,0, 4,5, 6,0, 7,5 mg/120x10⁶) ekleyerek dondurmıştır. Çözdürme sonrası canlılık muayenesini SYBR 14-PI ile yaparak sonuçları sırası ile %43, %52, %53, %52, %55, %54, %52 bulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde canlı spermatozoa oranı en düşük 0 mg/120x10⁶ grubunda tespit edilmiş (p<0,05) ve diğer gruplar arasında istatistiki bir fark bulunamamıştır. Elde edilen bu sonuçlar çalışmamızı doğrular niteliktedir. Çalışmada çözdürme sonrası gruplarda elde edilen ölü spermatozoa oranlarıyla diğer araştırmacıların elde ettiği veriler arasındaki farklılıklar sperma sulandırıcısının içeriğinden, özellikle yumurta sarısı oranlarının farklılığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, spermanın sulandırılmasında, dondurulmasında ve incelenmesinde kullanılan tekniklerdeki farklılıklara, çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimlere, değişik türlerin incelenmesine, koç ırklarının farklılığından, analizi yapan kişi veya cihaza bağlı olarak meydana gelmiş olabilir. Bunun yanı sıra türler arasındaki hücre membranlarında bulunan değişik orandaki kolesterol fosfolipit oranının çözüm sonu parametreler üzerine direkt etkisi olduğu düşünülmektedir. Kolesterol fosfolipit oranındaki değişim doymamış yağ asit oranını etkilediği için soğuk şokuna karşı dirençde değişmektedir.

Araştırmada HOS test sonucunda kuyruğu kıvrılan spermatozoonların oranları 7dhc 1,5, 7dhc 2,5, 7 dhc 3,5, ch 1,5, ch 2,5, ch 3,5 ve kontrol için sırasıyla; %56,0±15,24, % 58,22±11,22,%49,11±16,80, %60,11±10,95, 63,0±11,07 ve 36,44±18,2 olarak değerlendirildi. Çalışmada çözdürme sonrası en yüksek HOS test oranı % 63,0 ±11,07 ile ch 3,5 grubunda bulundu. En düşük çözdürme sonrası HOS test oranı ise 36,44±18,2 ile kontrol grubunda tespit edildi. Çalışmada 7dhc 1,5, 2,5 ve 3,5 grupları ile ch 1,5, 2,5, 3,5 grupları arasında istatistiksel olarak aralarında bir fark bulunmazken ($p>0,05$); kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak fark bulundu ($p<0,001$). Sunulan çalışmada, sulandırıcı gruplarının ortalama spermatozoa motilite ve viabilite oranları arasında paralellik olduğu görülmüştür. Motamedi-Mojdehi ve ark. (2014), Taleshi ırkı koçlarda yaptığı bir çalışmada spermayı tris yumurta sarısı sulandırıcısı ile hazırlamış; %3, %5, %7 oranında gliserol ilave etmiştir. Bunlara ek olarak farklı oranlarda CLC (0, 1,5, 3, 4,5 mg/120x10⁶) ilave ederek sıvı azotta dondurmuştur. Çözdürme sonrası membran bütünlüğü HOS testle incelenmiş ve en yüksek plazma membran bütünlüğü %32,2±1.6 ile %3 gliserol grubunda bulunan CLC 1,5 mg'da tespit edilmiştir ($p<0,05$). Rambouillet ırkı koçlarda çalışan diğer bir araştırmacı grubu ise (Moce ve ark., 2010a), mart ayında elektroejakulatör ile sperma almış ve tris yumurta sarısı gliserol sulandırıcısına ilave olarak 0 mg, 0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 4 mg/120x10⁶ oranlarında CLC ilave ederek dondurmuşlardır. Çözüm sonu plazma membran bütünlüğünü sırasıyla %24, %35, %45, %47, %36 bulmuştur. Sonuç olarak CLC 2mg/120x10⁶ grubu istatistiksel olarak en yüksek grup bulunmuştur ($p<0,05$). Suffolk ırkı koçlarda spermayı suni vagina yöntemi ile alarak tris yumurta sarısına ilave olarak 2 mg/120x10⁶ CLC ile hazırlayan Purdy ve ark. (2010), +5 °C'de 24 saat bekledikten sonra plazma membran bütünlüğü yönünden incelemiş ve kontrol grubunu (0 mg CLC) %41, çalışma grubunu %49 olarak bulmuşlardır. Sonuçta gruplar arasında bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir. Elektroejakulatör yöntemi ile Kıvırcık koçlarından spermayı alan Ahmad ve ark. (2013), spermayı eşit iki gruba ayrılmıştır. Daha sonra tris, sitrik asit, gliserol, yumurta sarısı sulandırıcısı ile ml'de 400x10⁶ spermatozoon olacak şekilde sulandırmıştır. Gruplardan biri kontrol, diğeri CLC (3 mg/120x10⁶) grubu olarak belirlenmiştir. Gruplar 20, 80, 290, 500, 1500 mOsm'lük fruktoz solüsyonu ile 35 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Osmotik değişikliklerden sonra eosin boyaması ile modifiye edilmiş HOS test ile plazma membran bütünlüğü incelenmiştir. CLC ile muamele edilen gruplarda plazma membran bütünlüğününün değişik osmotik basınç ile muamele edilen gruplarda iyi olduğu tespit edilmiştir. Aksoy ve ark. (2010), tavşan

spermasında osmotik tolerans yeteneğini incelemiştir. Yapılan çalışmada CLC eklenmiş (3 mg/120x10⁶) ve eklenmemiş olarak iki grup belirlenmiştir. Spermalar; 20, 80, 290, 500, 1500 mOsm/L fruktoz solüsyonu ile muamele edilmiştir. 800-1500 mOsm oranları arasında değişen oranlardaki CLC gruplarında HOS testine verilen cevap daha iyi olduğu görülmüştür (p<0,001). Farklı tür ve ırklarda çalışan bu araştırmacıların sonuçlarının bizim sonuçlarla benzerlik gösterdiği görülmüştür. Buna ek olarak, ch kullanımı membran bütünlüğünün korunmasına pozitif etki ettiği açıkça görülmüştür. Sperm membranlarındaki fosfolipit kompozisyonunun zenginleştirilmesi membran bütünlüğünün sağlanmasına katkı sağlamıştır. Tez çalışmasında elde edilen HOS test oranlarıyla diğer çalışmalarda elde edilen HOS test oranlarındaki sayısal farklılıklar ise, koçların genotipik ve irksal farklılıklarından, sperma sulandırıcısının içeriğinden, sulandırıcıda kullanılan değişik miktarlardaki CLC oranlarından, dondurma çözme prosedürleriyle değerlendirmede kullanılan teknikler arasındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Birçok yazar, plazma membran bütünlüğü ve motilite arasında pozitif korelasyonların olduğunu yaptıkları çalışmalarında tespit etmişlerdir (Neild ve ark., 2003; Mandal ve ark., 2003). Mandal ve ark. (2003), Murrah mandalarında yaptığı çalışmada çözüm sonu %50'nin altında HOS test tespit ettiklerinde motiliteyi de buna paralel olarak %50'nin altında tespit etmişlerdir. Stanger ve ark. (2010), düşük HOS test bulunan sperma örneklerinde TUNEL yöntemi ile yapılan DNA incelemelerinde hasarla HOS test arasında bir ilişki olduğunu tespit etmişlerdir. Zubair ve ark. (2013), Frisian, Sahiwal ve bu ırkların melezleri ile yaptıkları bir çalışmada, HOS test, motilite ve morfoloji parametreleri açısından önemli derecede pozitif korelasyonlar bulmuşlardır. Comercio ve ark. (2013), kedi spermasında yaptığı çalışmada progresif motilite, HOS test oranında pozitif bir ilişkinin olduğunu tespit etmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda total motilite, canlılık ve normal morfolojiyi korelasyonlu olarak tespit etmiştir (Love ve ark., 2003; Brinsko ve ark., 2003). Motilite ve ölü canlı açısından da ileri derecede korelasyon olduğunu bildirmişler ve ölü canlı boyamasının sperma motilitesinin iyi tespit edildiği çalışmalarda bilgi açısından çok az katkılar yaptığını göstermiştir. Zhu ve Liu (2000), ölü canlı boyaması ile HOS testin farklı değerler olduğunu ve bunların birlikte değerlendirilmemesi gerektiğini veya spermanın farklı bölümlerini değerlendirmiş olabileceğini bildirmektedirler. Yaptığımız araştırmada ise total motilite, progresif motilite, HOS test ve canlılık açısından pozitif korelasyonlar tespit edilmiştir. Bunu yanı sıra morfoloji açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anormal ve normal spermatozoon yüzdeleri açısından bir fark bulunamadığı için bu parametre ile diğer parametreler arasında bir ilişki tespit edilememiştir. HOS test ve ölü canlı oranı tamamiyle

plazma membran bütünlüğü esasına göre çalışmaktadır. Plazma membran bütünlüğü bozulmamış hücreler HOS sıvısı içerisinde ozmotik basınç kurallarına göre (az yoğun ortamdan çok yoğun ortama doğru su geçiş olacak) su alıp şişecek ve kuyruklar bu şişmeye cevap olarak kıvrılacaktır. Yine aynı mantıktan hareketle, plazma mebranı bozuk olan hücreler ölü/canlı testinde kırmızı floresan boyayı baş kısmına alarak boyanacak, sağlam olan hücrelere ise boya geçişi olamayacağı için yeşil renk ile boyanacaktır. Parametrelerin prosedürleri farklı olmasına rağmen sonuçların paralel çıkması gayet doğaldır ve bizi doğrular niteliktedir. Anormal spermatozoa oranı açısından pozitif veya negatif bir korelasyonun görülmemesi bu parametrelerin ayrı ayrı değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Her ne kadar yapılan bazı çalışmalarda (Zubair ve ark., 2013), HOS test ile morfolojik bozukluklar arasında bir ilişki olduğu söylene de yapılan araştırmada bu ilişki tespit edilememiştir.

Araştırmada çözündürme sonrası elde edilen bozuk akrozumlu spermatozoa oranı 7dhc 1,5, 7dhc 2,5, 7 dhc 3,5, ch 1,5, ch 2,5, ch 3,5 ve kontrol için sırasıyla % 29,26±13,4, %19,70±6,27, %23,98±8,42, %19,71±9,00, %20,17±6,23 %21,14±7,04 ve %42,50±10,8 olarak belirlendi. Çözündürme sonrası en düşük akrozom hasarlı grup %19,70 ile 7dhc 2,5 grubunda bulunurken; en yüksek akrozom hasarı olan grup ise %42,50 ile kontrol grubunda bulundu. Çalışmada 7dhc 1,5, 2,5 ve 3,5 grupları ile ch 1,5, 2,5, 3,5 grupları arasında istatistiksel olarak aralarında bir fark bulunmazken ($p>0,05$); kontrol grubuna göre istatistiksel olarak fark gözlemlendi ($p<0,001$). Award (2011), 2-4 yaşlı Rahmani koçlarında farklı gliserol oranlarını (%3,%6) farklı CLC oranları (0mg, 2 mg/100x10⁶) ile birleştirerek tris sulandırıcısı hazırlamış ve dondurmuştur. Çözüm sonu akrozomal bütünlük yönünden en yüksek grup %3 gliserollü 2mg CLC grubu olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Akrozom hasarın azaltılmasında 2 mg/100x10⁶ ve %3 gliserol yardımcı olmuştur. Ahmad ve ark. (2013), Kıvrıcık koçlarında elektroejakulatör yöntemi ile spermaları almıştır. Spermalar eşit iki gruba ayrılmış ve tris, sitrik asit, gliserol, yumurta sarısı sulandırıcısı ile ml'de 400x10⁶ spermatazoon alacak şekilde sulandırmıştır. Gruplardan biri kontrol, diğeri CLC (3 mg/120x10⁶) grubu olarak belirlenmiştir. İn vitro akrozom reaksiyonunu uyarmak için Lysophosphatidylcholine (LPC) ile muamele edilmiştir. Comassie Blue ile yapılan akrozomal incelemede CLC'nin akrozom reaksiyonunu engellediği görülmüştür. Yaptığımız çalışma ile bu çalışmalarda değişik ırklar ve yöntemler kullanılmasına rağmen benzer sonuçların alınması kolesterolün akrozom bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir. Oliveira ve ark. (2010), aygır

spermasını INRA 82 sulandırıcısı ile sulandırmış ve bu sulandırıcıya ilave olarak (kontrol), T₂ INRA+CLC, T₃ INRA+0,052 CLC/50x10⁶, T₄ 0,156 CLC/50x10⁶ olacak şekilde ayarlanmış ve dondurulmuştur. Çözüm sonu akrozomal bütünlük FITC-PNA ile incelenmiştir. Akrozom reaksiyon oranları sırasıyla %16,5±11, %9,3±5,9, %11,3±7,1, %11,8±9,9 olarak tespit edilmiştir. Yapılan incelemede, T₂ grubu ile kontrol grubu arasında görülen farklılık anlamlı bulunmuş (p<0,05); T₂ grubunda akrozom reaksiyonunun az gerçekleştiği belirtilmiştir. Bu araştırma ise çalışmamızın amaçlarından biri olan erken akrozom reaksiyonunu engellediğini açıkça göstermiştir. Aygırlarda çalışan diğer bir araştırmacı grubu Crespilho ve ark. (2013), suni vagina ile alınan spermayı 2 eşit parçaya ayırmıştır. Gruplardan birini kontrol (0 mg/120x10⁶), diğerini CLC 3 mg/120x10⁶ olarak ayarlamıştır. Hazırlanan sulandırıcı ile spermalar karıştırılarak 5 °C'de 48 saat incelenmiştir. İncelenirken 3., 6., 24. ve 48. saatlerde ölçümler yapılmış; 48 saatin sonunda CLC grubunun kontrol grubuna göre akrozom bütünlüğünü daha iyi koruduğu tespit edilmiştir (p<0,05). Eşeklerde yapılan diğer bir çalışmada, sperma S-MEDIUM sulandırıcısı ile sulandırılırken buna ilave olarak çalışma grupları 0 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg CLC/120x10⁶ olacak şekilde hazırlanmış ve dondurulmuştur. Çözüm sonu FITC-PNA ile akrozomal bütünlük incelenmiş ve sırasıyla %17,7, %34,4, %31,9, %36,1 olarak sonuçları bulmuşlardır (Oliveria ve ark., 2014). Tez çalışmamızla benzer sonuçlar bulunan bu çalışmada, CLC ile muamele edilen gruplarda akrozomal bütünlük kontrol grubuna göre daha iyi korunduğu tespit edilmiştir (p<0,05). Jian ve ark. (2010) 6 farklı boğa spermasına %7-%10 arasında değişen oranlarda düşük dansiteli lipoprotein [Low Density Lipoprotein, (LDL)] eklemiş ve spermayı dondurmuştur. Çözüm sonu akrozomal bütünlüğü FITC-PNA ile incelemiş ve %8 LDL grubunda en yüksek akrozomal bütünlük tespit edilmiştir. Serin ve ark. (2011), 2-4 yaşlı Yeni Zellanda tavşanlarından sperma almış ve 1:25 oranında 0 mg, 0,5 mg, 1,0 mg, 3,0 mg/120x10⁶ oranında CLC'yi tris sulandırıcısı ile sulandırarak 4 veya 35 °C'de 72 saat incelemiştir. Prematüre akrozom reaksiyonunun incelendiği çalışmada akrozom reaksiyonunun incelenmesi Comassie blue boyaması ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada 3 mg/120x10⁶ grubu prematüre akrozom reaksiyonunu engelleyen en iyi grup olduğu tespit edilirken (p<0,001); CLC doz seviyesi ile saklama periyodu arasında bir ilişki olduğu kanısına varılmıştır. Aksoy ve ark. (2010), tavşan spermasında osmotik tolerans yeteneğini incelemiştir. Yapılan çalışmada CLC eklenmiş (3 mg/120x10⁶) ve eklenmemiş olarak iki grup belirlenmiştir. Spermaları akrozom reaksiyonunu uyarmak için calsiyum iyonofor (CI), veya Lisofosfotidilcolin [Lysophosphatidylcholine (LPC)] ile muamele edilmiştir. Comassie Blue

ile yapılan akrozomal incelemede CI ve LPC'nin başarılı bir şekilde akrozom reaksiyonunu uyardığı ($p < 0,001$), CI'nın LPC'ye göre daha etkili olduğunu ve CLC uygulamasının akrozom reaksiyonu yeteneğini azalttığı tespit edilmiştir. Bu azaltma ise prematüre akrozom reaksiyonunu engellemesine katkı sağlayacağını göstermektedir.

Bu araştırmada elde edilen akrozomal bütünlüğü (FITC-PNA) oranlarıyla diğer çalışmalarda elde edilen oranlar arasındaki farklılıklar, koçların genotipik ve ırksal farklılıklarından, sperma sulandırıcısının içeriğinden, sulandırıcıda kullanılan değişik miktarlardaki CLC oranlarından, dondurma çözme prosedürleriyle değerlendirmede kullanılan teknikler arasındaki farklılıklardan, karşılaştırılmaların değişik türler üzerinde de yapılmasından kaynaklanıyor olabilir.

Araştırmada çözüm sonrası elde edilen mitokondriyal membran potansiyel oranı 7dhc 1,5, 7dhc 2,5, 7 dhc 3,5, ch 1,5, ch 2,5, ch 3,5 ve kontrol için sırasıyla $77,9 \pm 11,4$, $71,9 \pm 12,7$, $69,9 \pm 16,03$, $76,7 \pm 8,05$, $70,7 \pm 15,07$, $70,6 \pm 18,02$ ve $61,9 \pm 21,8$ olarak belirlendi. Çözme sonrası en yüksek mitokondriyal membran potansiyeli elde edilen grup $77,9$ ile ch 1,5 grubunda bulunurken en düşük mitokondriyal membran potansiyeli elde edilen grup ise $61,9$ ile kontrol grubunda bulunmuştur. Çalışmada gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). Spizziri ve ark. (2010), ağırlardan suni vagina ile sperma almış ve iki bölüme ayırmıştır. 1. kısmı kontrol 2. kısmı ise CLC ($1,5 \text{ mg}/120 \times 10^6$) ilave ederek dondurmuştur. Çözüm sonu mitokondriyal aktivasyonu flow sitometride 50.000 örnek sayarak incelemiş ve çalışmamızla örtüştüğü gibi CLC ilavesinin mitokondriyal aktivasyona bir etkisinin olmadığını tespit etmiştir ($p > 0,05$). Ch ve 7dhc'nin antioksidan özelliği de bulunduğu için antioksidan türevleri ile yapılan bazı çalışmalar incelenmiştir. Franco ve ark. (2013), ağırlarda tris sulandırıcısına antioksidan olarak α - tokoferol (0,5, 1, 2 mM) ve askorbik asit (0,45, 0,9, 1,8 g/L) ilave etmiş ve dondurmuşlardır. Çözüm sonu mitokondriyal aktivite incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamasına rağmen Çoyan ve ark. (2011), Merinos koçlarda yaptıkları çalışmada tris bazlı sulandırıcıya antioksidan olarak ergotonin (1, 2, 4 mM) ve sistein (1, 2, 4 mM) ilave ederek dondurmuşlardır. Çözüm sonu mitokondriyal membran bütünlüğü JC-1 boyaması ile yapılmış ve en iyi grubun $67,4 \pm 6,1$ ile sistein 2 mM'da tespit etmiştir ($p < 0,01$). Silvamaia ve ark. (2009), Santa Ines koçlarda aldığı spermayı 4 bölüme ayırmış ve katalaz (CAT), trolox (Tro) ve (Tro+cat) antioksidanlarını tris sulandırıcısına ilave ederek dondurmuştur. Çözüm

sonu mitokondrial aktivasyon incelendiğinde antioksidan ilavesinin mitokondrial aktiviteyi artırmadığı, tüm gruplarda düşük mitokondrial aktivitenin görüldüğü tespit edilmiştir. Silva ve ark. (2011), Santa Ines ırkı koçlarda çalışmış tris sulandırıcısına antioksidan olarak süperoksit dismutaz (SOD) (25, 50, 100 U/ml) ve glutasyon (GSH) (2 mM, 5mM, 7 mM) ilave ederek dondurmıştır. Çözüm sonu mitokondrial aktivite JC-1 ile incelendiğinde gruplar arasında bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Bucak ve ark. (2013), Merinos ırkı koçlarda tris sulandırıcısına Rafinoz (10mM), Hypotaurin (5 mM) ve 5 mM Rafinoz + 2,5mM Hipotaurin ilave etmiş ve dondurmıştır. Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çözürme sonrası Rafinoz ($27,3\pm 4,9$) ve Hypotaurin ($29,5\pm 5,4$) grupları yüksek mitokondrial aktivite gösteren gruplar olmuştur. Mohan ve Atreja (2014), Mandalarda (Bubalis Bubalis) yumurta sarısına alternatif olarak soya sütü ile spermayı dondurmıştır. Çalışmada kontrol (%20 yumurta sarısı ve standart tris sulandırıcısı) ve soya sütü (%25 soya sütü ve standart tris sulandırıcısı) ile suni vagina ile aldıkları spermayı sulandırmış ve dondurmışlardır. Çözüm sonu, yüksek mitokondrial membran potansiyeli soya sütünde $69,79\pm 0,68$, yumurta sarılı kontrol grubunda ise $63,26\pm 2,19$ bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde aralarında çıkan fark önemli bulunmuş ($p<0,001$), soya sütünün yumurta sarısına alternatif olabileceği düşünülmüştür. Zuge ve ark. (2008), yüksek mitokondriyal aktivite ve HOS test ile incelenen plazma mebran bütünlüğü arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirmiştir. Sperm hücrelerinin orta bölümünde mitokondriilerin içinde bulunan aksonemde yoğun fibril lifleri bulunmaktadır. Bu fibriller hücre içi ATP enerji kaynağı oluştururlar ve spermanın motilitesinden sorumludur (Garner ve Hafez, 1993). Dondurma çözürme sonucu aksonemal hasar oluşabilir; ATP'nin azalması sonucunda motilitede, mitokondriyal membran potansiyelinde ve morfolojik- fonksiyonel bütünlükte bozukluklar görülür (De Lamirande ve Gognon, 1999; Cummins ve ark., 1994). Sperma motilitesi kumulus hücrelerinde ve ovumdaki zona pellüsida penetrasyon için önemlidir (Garner ve Hafez 1993). Bazı araştırmacılar tarafından (Kasai vd., 2002; Martinez-Pastor ve ark., 2004) motilite ve yüksek mitokondriyal aktivasyon arasında güçlü bir korelasyon olduğunu bildirilmektedir. Yapılan çeşitli antioksidan çalışmalarında motilite ve mitokondriyal aktivasyonun paralel çıktığı araştırmalarda oksijenden yoksun radikallerin nötralizasyonu ile hücrelerin hasarının önlenmesi mantığına dayandırılmaktadır (Bucak ve ark., 2015). Yapılan bir çalışmada ise, motilite ve mitokondriyal aktivasyonda elde edilen sonuçlar daha önceden dondurulmuş çözürülmüş koç ve boğa spermasında çeşitli antioksidanlarla çalışanlardan farklı olarak mitokondriyal aktivasyona bir katkı sağlamamıştır. Diğer parametrelerle karşılaştırıldığında

aralarında bir korelasyona rastlanmamıştır. Her ne kadar yukarıda bazı çalışmalarda motilite ve mitokondriyal aktivasyon arasında paralellik gösteren çalışmalar olmasına rağmen bizim çalışmamızda bu ilişkiye rastlanmamıştır. Ancak araştırma kurgulanma aşamasında iken (hipotez kurma) motilite, ölü canlı, HOS test arasında bir ilişkinin ortaya çıkması gerektiği beklenmişti. Çünkü motilitesi yüksek çıkan grupların hız değerleri fazla çıktığı için mitokondriyal aktivasyonu da buna paralel olarak farklı çıkması beklenmişti. Bu ilişki aynı zamanda diğer parametreler için de geçerli olacaktı. Ancak çalışmamızda mitokondriyal aktivasyon ile diğer parametreler arasında bir ilişkiye rastlanmamıştır. Bunun sebepleri; koçların genotipik ve ırksal farklılıklarından, sperma sulandırıcısının içeriğinden, sulandırıcıda kullanılan değişik miktarlardaki CLC oranlarından, dondurma çözme prosedürleriyle değerlendirmede kullanılan teknikler arasındaki farklılıklardan, karşılaştırılmaların değişik türler üzerinden yapılmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada çözme sonrası oksidatif stres parametreleri tGSH ($\mu\text{M}/1 \times 10^9$ sp), AOP ($\text{mM}/1 \times 10^9$ sp), LPO ($\mu\text{M}/1 \times 10^9$ sp) parametreleri yönünden değerlendirilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). Graff ve ark. (2007), koçlarda yaptıkları bir çalışmada antioksidan (katalaz), CLC ve seminal plazma ayrı ayrı kullanılarak flow sitometri ile cinsiyet ayrımı yapılmış ve dondurulmuştur. Çözüm sonu CASA parametreleri açısından antioksidan olan katalazlı grupta istatistiksel olarak bir fark bulunmazken; CLC'li grupta motilitenin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Amin ve ark. (2011), domuzlarda yaptıkları çalışmada, sperma motilitesi normal ($> \%60$) veya düşük ($< \%60$) olan iki grup belirlemiş ve bu iki gruptan sperma almıştır. Seminal plazmaları ayrılıp incelendiğinde total lipit, kolesterol ve fosfolipitin sperma motilitesi, canlılık ve normal morfoloji ile pozitif bir korelasyonunun olduğu görülmüştür. Bunun sebebi olarak ise domuz spermasının düşük antioksidan kapasitesinin olması ve radyoaktif ajanlara bağlı olarak lipitperoksidasyonun domuz spermasını etkilediği gösterilebilir. Naseer ve ark. (2015), Kıvrıcık koçlarında yaptıkları çalışmada, CLC'nin hidrojen peroksit (H_2O_2) veya donma hasarına etkisini araştırdıkları çalışmada peroksidasyon değerini malondialdehit (MDA)'e bakarak incelemişlerdir. Fakat gruplar arasında MDA seviyesi açısından bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). Bu sonucun çalışmamızın sonuçları ile örtüştüğü görülmektedir. Lopez-Revuelta ve ark. (2005), kolesterolün artması ve azalması somatik hücre membranlarında ROS aracılığı ile lipitperoksidasyonu provoke ettiğini bildirmişlerdir.

Yapılan güncel çalışmalarda somatik hücrelerin CLC ve değişik ajanlarla (quarctin ve rutin) muamele edilmesi ile in vitro olarak oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (Lopez-Revuelta ve ark., 2006; Sanchez-Gallego ve ark., 2010). Hücre membranlarındaki kolesterol modifikasyonu antioksidan enzimlerini koruduğu ve ROS'un yayılmasını engellediği bildirilmesine rağmen (Lopez-Revuelta ve ark., 2007) gruplar arasında bir farklılık tespit edilememiştir. Oluşan bu farklılığa koçların antioksidan kapasitelerinin farklı oluşuna genotipik ve irksal farklılıklara, antioksidan kapasitelerinin belirlenmesindeki farklılıklardan sperma sulandırıcısının içeriğinden, sulandırıcıda kullanılan değişik miktarlardaki CLC ve antioksidan oranlarından, dondurma çözündürme prosedürleriyle değerlendirmede kullanılan tekniklerin sebep olabileceği düşünülmektedir.

Araştırmada çözüm sonrası elde edilen DNA hasarı değerleri 7dhc 1,5, 7dhc 2,5, 7 dhc 3,5, ch 1,5, ch 2,5, ch 3,5 ve kontrol için COMET test parametreleri olan TL (%), DNA (%), TM (%) açısından sırasıyla TL (%); 54,98±22,57, %54,21±23,65, %51,89±21,72, %53,89±18,20, %56,82±23,98, %56,78±19,80 ve %60,31±23,57, DNA (%); 11,52±2,13, 11,41±2,29, 10,25±2,47, 12,04±1,75, 12,00±2,46, 12,14±3,06, 11,84±3,00, TM (%); 3,18±1,72, 3,00±1,80, 2,79±1,57, 3,41±1,83, 3,64±2,92, 3,68±2,91, 3,61±2,94 olarak belirlendi. Kuyruktaki DNA yüzdesine baktığımızda DNA (%) en yüksek DNA hasarı 12,14±3,06 ile ch 3,5 grubunda; en düşük DNA hasarı 10,25±2,47 ile 7dhc 3,5'da tespit edilmiştir. Çalışmada istatistiksel olarak gruplar arasında bir fark bulunamamıştır (p>0,05). Katanbegzadeh ve ark. (2014), epididimal teke spermasını cauda epididiminden disekte ederek almış ve Tris-BSA solüsyonu ile sulandırarak 15 dakika bekletmiştir ve swim up ile spermatozoonları seçerek kontrol, sükrözün farklı konsantrasyonları (0,1M, 0,2 M) ile CLC (1mg/60x10⁶) grupları hazırlanarak sulandırılmış ve dondurulmuştur. Çözüm sonu DNA fragmentasyonu COMET test ile yapılmıştır. Sonuçta çözündürme sonrası CLC ve 0,2M sükrözlü grubunun DNA fragmentasyonunu azalttığı görülmüştür. Sunulan tez çalışmamızda gruplar arasında bir farklılık olmamasına rağmen 7dhc grupları en düşük DNA hasarını yansıması yönüyle çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Tomas ve ark. (2013), domuz spermasını aldıktan sonra kontrol ve CLC (1 mg/120x10⁶) olarak iki grup oluşturmuş ve spermayı dondurmıştır. Çözüm sonu DNA bütünlüğünü flow sitometride Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) yöntemi ile incelemiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığını tespit etmiştir (p>0,05). Yapılan çalışmamızda DNA hasarının tespitinde farklı yöntemler kullanılmasına rağmen benzer sonuçlar elde edilmiştir. Domuzlarda çalışan diğer

bir araştırıcı, Yorkshire ve Duroc ırkı domuzlarda çalışmış ve spermaya araştırma grubu olarak yumurta sarısından elde ettiği LDL'nin farklı oranlarını (%6, %7, %8, %9, %10) temel sulandırıcıya (tris, sitrik asit, glukoz, fruktoz, %20 yumurta sarısı) kriyoprotektan madde olarak ilave etmiştir ve dondurmuştur. özüm sonu DNA fragmentasyon incelemesi COMET test ile yapılmış ve %9 LDL grubunun DNA bütünlüğünü en iyi koruyan grup olduğunu bulmuşlardır (Jiang ve ark., 2007). Ch ve 7dhe'de düşük yoğunluklu lipoprotein olarak değerlendirildiğinde çalışmamızla farklı sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Bunun sebebi olarak farklı türden hayvanların kullanılması ve DNA hasarının değerlendirilmesinde değişik yöntemlerin kullanılması sebep olmuş olabilir. Domuzlarda aynı ırkta alışan Jiang ve ark. (2008), spermayı üçe ayırarak soğuktan koruyucu maddeler olan LDL (%9), Trehaloz (100mM) ve yumurta sarısı (%20)'nı sulandırıcıya eklemiş ve dondurmuşlarıdır. özüm sonu DNA bütünlüğünü SCSA yöntemi ile incelemiş ve %9 LDL'nin DNA bütünlüğünü diğer gruplara göre daha iyi koruduğunu tespit etmişlerdir. Jiang ve ark. (2007), Durac ve Yorkshire ırkı domuzlarda tris, sitrik asit, glukoz, fruktoz ve %20 yumurta sarısı ile hazırlanmış kontrol sulandırıcısına ilave olarak farklı oranlarda LDL (%6, %7, %8, %9 ve %10) ve %3 gliserol içeren 3 grup sulandırıcı oluşturarak spermayı dondurmuşlardır. Çözdürme sonrası DNA bütünlüğü COMET test ile incelenmiş ve DNA bütünlüğü açısından en iyi grubun %9 LDL içeren grup olduğu tespit edilmiştir. Jung ve ark. (2008), infertilite şikâyeti ile tedaviye gelen 9 kişiden masturbasyon ile spermayı almış ve dondurma için gliserol içeren sperm freezing medium (SFM) kullanmıştır. SFM medyumuna ilave olarak (kontrol) 0,1 mg, 0,5 mg, 1,0 mg x10⁶ CLC ilave ederek grupları oluşturmuşlardır. özüm sonu DNA hasarı için flow sitometride SCSA yöntemi ile DNA hasarı incelenmiş ve en yüksek DNA hasarının kontrol grubunda yani CLC eklenmeyen grupta olduğunu görmüşlerdir. CLC'li gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Sperm DNA bütünlüğü; fertilizasyon, normal embriyo ve fötal gelişim için çok önemlidir. Rutin sperma analizleri spermatozoonun fonksiyonel özelliklerini gösterir. Fakat her zaman DNA'nın kalitesini göstermez. Böylece bu yöntem ile (COMET), rutin sperma analizlerine ilave olarak kaliteli spermatozoon hakkında daha fazla bilgi sahibi olunur ve erkeklerin reproduktif potansiyelleri artar. Sheikh (2008), insanlar üzerinde yaptığı bir araştırmada, fertil erkeklerde sperma motilitesi ile DNA hasarı arasında güçlü bir negatif korelasyon bulunurken; infertil erkeklerde bunlara ilave olarak morfoloji arasında da negatif bir korelasyon tespit etmiştir. Varghese ve ark. (2009), insanlarda Acridine orange test ile DNA incelemesi yaptığında; sperma yoğunluğu, motilite ve morfoloji arasında iyi bir korelasyon olduğunu görmüşlerdir. Alçay ve ark. (2014), İvesi ve

Kıvırcık koçlarında yaptığı bir çalışmada, taze spermada spermatolojik parametreleri ve DNA bütünlüğünü incelemişlerdir. Yaptıkları araştırmada DNA fragmentasyonunun sperma hacmi, konsantrasyonu, mass aktivite, motilite, akrozomal bozukluk, HOS test ile negatif korelasyonlarının olduğunu görmüşlerdir. Bu çalışmada değerlendirilen çoğu parametrenin DNA fragmentasyonu ile ilişkili olduğunu açıkça göstermiştir. Dolayısı ile, DNA yapısının incelenmesi her bir koç ejakulatının fertilesinin doğru olarak tespit edilmesi konusunda katkılar sağlayabileceği düşünülmüştür. Yapılan bazı çalışmalarda ise, sperma motilitesi ve DNA hasarı arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur (Pichardo ve ark., 2000). Bazı çalışmalarda ise bunun tam tersine motilite ve DNA fragmentasyonu arasında negatif korelasyon bulunmuştur (Piasecka ve ark., 2007; Sheikh ve ark., 2008). Plazma membran hasarının artmasıyla DNA bütünlüğünün azaldığı yönünde bazı çalışmalar bulunmasına rağmen (Fernandez-Santos ve ark., 2007), bazı çalışmalar da ise DNA hasarlı hücrelerin fonksiyonel olarak membran bütünlüğüne ve motiliteye herhangi bir etkisinin olmadığı yönünde veriler de vardır (Fatehi ve ark., 2006). Bu araştırmada elde edilen DNA hasarı (COMET) oranları incelendiğinde ise gruplar arasında bir farklılık bulunmamasının yanında DNA hasarı ile diğer spermatolojik parametreler arasında da bir ilişki tespit edilememiştir. Bunun nedenleri, koçların genotipik ve ırksal farklılıklarından, sperma sulandırıcısının içeriğinden, sulandırıcıda kullanılan değişik miktarlardaki CLC oranlarından, dondurma çözündürme prosedürleriyle değerlendirmede kullanılan teknikler arasındaki farklılıklardan ve değişik türler üzerinde yapılmasından da kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca yapılan birçok çalışmada DNA hasarı ile diğer parametreler arasında bir ilişki ile karşılaşılmamasına rağmen bu araştırmada korelasyonun bulunmaması dikkat çekici bir sonuç olabilir. Çünkü yapılan son çalışmalar incelendiğinde DNA hasarının standart metotlara ilave olarak fertilizasyonun belirlenmesinde kullanışlı olabileceği bildirilmektedir. Proje hedefleri arasında DNA hasarı ile diğer parametreler arasında bir ilişkinin olup olmadığı bulunmaktaydı. Elde edilen bu sonuç yukarıda açıklanan bazı çalışmalarla paralellik gösterirken birçok çalışma ile de çelişmesi sebebi ile bu konu hakkında çalışmaların artarak devam etmesi gerektiği düşünülmektedir.

Araştırmada çözüm sonrası elde edilen apoptosis değerleri 7dhc 1,5, 7dhc 2,5, 7 dhc 3,5, ch 1,5, ch 2,5, ch 3,5 ve kontrol için Annexin V-PI test parametreleri olan sayılan hücre, nekrotik (ölü) hücre (%), geç apoptosis (%), canlı (%), erken apoptosis (%) açısından

değerlendirilmiştir. Veriler incelendiğinde canlı ve erken apoptosis hücrelerinde istatistiksel farklılıklar görülürken diğer veriler arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadı. Canlı hücreler incelendiğinde en yüksek canlı hücre $0,80 \pm 0,41$ ile ch 3,5 en düşük canlı hücre $0,45$ ile kontrol grubunda bulunurken; gruplar arasında istatistiksel olarak fark önemli bulunmuştur ($p < 0,001$). Erken apoptozis hücrelerinde ise en yüksek erken apoptosis $16,64 \pm 2,70$ ile ch 3,5 en düşük apoptosis $9,52 \pm 4,61$ ile 7 dhc 1,5 grubunda bulunurken gruplar arasında istatistiksel olarak fark önemli bulundu ($p < 0,001$). Sayılan hücre, nekrotik (ölü), geç apoptosis parametreleri açısından gruplar arasında bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). Inoue ve ark. (1999) lipid depolama hastalığı olan ve genetik olarak aktarılan, hiperclotremia, cerebellar ataksi ve katarakt ile karakterize olan Cerebrotendinous Xanthomatosis (CTX) hastalığı üzerine yaptığı bir çalışmada; CTX hastalarında serumdaki kolestanol seviyesinin artışı cerebellumdaki nöronal hücre ölümünü artırdığını ve çoğunlukla cerebellar ataksiye sebep olduğu hipotezini kurmuşlardır. Buradan yola çıkarak, Wistar ratlarının günlük rasyonlarına %1 kolesterol veya %1 kolestanol yedirerek hiper kolestanolemia yapmışlardır. Daha sonra hayvanlar nekropsi yapılarak apoptozisin tespit edilmesi için Terminal-Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) dUTP nick end-Labeling (TUNEL) metodu uygulanmış ve in vitro olarak cerebellumdan hazırlanan hücre kültürlerinde kolesterol uygulanan gruplarda uygulanmayanlara göre apoptosis oranında artışlar olduğu tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada da tüm gruplarda geç apoptozisin yüksek oranda görülmesi bu çalışmayı destekler niteliktedir. Son zamanlarda yumurta sarısı tris sulandırıcısına (EYT) alternatif olarak kullanılan soya sütü tris sulandırıcısı (SMT) manda spermasında kullanılmış ve apoptosis incelenmiştir (Mohan ve Atreja 2014). Manda sperması iki kısma ayrılmış ve EYT ve SMT ile sulandırılarak dondurulmuştur. Çözdürme sonrası, apoptotoik proteinlerin ekspresyonunun değerlendirilmesi incelenmiştir. Boyama prosedürü incelendiğinde, canlı, erken apoptozis, geç apoptozis ve nekrotik (ölü) olarak 4 prosedür incelendi. Dondurulmuş spermada taze spermaya göre ($3,98 \pm 0,66$) istatistiksel olarak artış görülmesine rağmen ($p < 0,001$); SMT sulandırıcısında geç apoptozis ($34,13 \pm 1,8$) EYT sulandırıcısı ile karşılaştırıldığında ($42,54 \pm 2,57$) istatistiksel olarak aralarında bir fark olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Buradan hareketle ilerideki çalışmalarda da yumurta sarısı yerine ch veya 7dhc kullanılabileceği bu çalışma ile gösterilmektedir. Çünkü soya sütü ch ve 7dhc gibi doymamış yağ asitinden zengin olması, yumurta sarısının hayvansal ürün olduğu için mikroorganizma taşınması gibi sebeplerle yakın gelecekte ch ve 7dhc'nin yumurta sarısı yerine soğuktan koruyucu madde olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Nur ve ark.

(2010) İvesi koçlarında kriyoprotektan olarak kullanılan gliserol, 1,2 propanediol, sükröz ve trehaloz'un dondurma çözdürme sonrası spermatolojik parametrelere etkisini incelenmiş ve apoptozis için TUNEL tekniği kullanılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde akrozom defekti ve apoptotik hücre arasında pozitif; motilite, defektif akrozom ve TUNEL arasında da negatif korelasyonun olduğu görülmüştür. Yapılan çalışma tez çalışmamızla örtüşmüş, dondurma çözdürme işleminin koç sperması için apoptotik bir etken olduğu, kullanılan bütün kriyoprotektanların DNA bütünlüğünü negatif yönde etkilediğini göstermiştir. Sharbatoghli ve ark. (2012), infertil erkeklerde yaptığı bir çalışmada, DNA hasarı, apoptozis, mitokondriyal membran potansiyel bozukluğu ile sperm parametreleri (sperma yoğunluğu, motilite ve morfoloji) arasındaki ilişkiyi incelemiş ve bu etkilerin yardımcı üreme tekniklerine etkisini intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ile incelemiştir. Çalışma sonucunda, DNA fragmantasyonu ile motilite ve morfoloji arasında; apoptozis ile sperma yoğunluğu, motilite ve normal morfoloji arasında negatif korelasyon olduğunu görmüşlerdir. Yapılan bu çalışmada, DNA fragmantasyonu ile, apoptozis, mitokondriyal membran potansiyel yetersizliği arasında negatif bir korelasyon olduğu fakat; erken apoptozis ve gebelik oranında da negatif korelasyon olmasına rağmen; bu parametrelerle ICSI sonuçları arasında bir ilişki bulunamamıştır. Aziz ve ark. (2007), sağlıklı erkeklerde yaptığı çalışmada, sperma morfolojisi ve deforme indeksini caspase-3'ün aktivasyonuna ve sperm mitokondriyal membran potansiyeline göre apoptozisle olan ilişkisini değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda, hücreler karşılaştırıldığında, apoptotik olmayan hücrelerin sağlam morfoloji profilleri yüksek; deforme indekslerinin (akrozomal, orta bölüm hasarları, sitoplazmik damlacık ve kuyruk hasarları) ise düşük olduğu görülmüştür. Sperm morfolojisi ile apoptotik belirleyici olan caspase-3 ve mitokondriyal membran potansiyel arasında önemli bir korelasyonun olduğu tespit edilmiştir. Anzar ve ark. (2002) boğalarda yaptığı araştırmada, taze ve dondurulmuş spermada TUNEL ve Annexin V yöntemi ile apoptozis ve fertilité arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Her iki yöntemde de %10-20 oranında taze spermada apoptotik hücre tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda taze spermada bulunan apoptotik spermatozoa fertilité kaybının en önemli sebepleri arasında olduğunu göstermiştir. Chen ve ark. (2006) erkeklerde yaptığı bir çalışmada ise, apoptozis ile sperma parametreleri arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Yapılan incelemede, apoptozis ile total motilite, progresif motilite, morfoloji arasında negatif bir ilişki; kuyruk hasarı ile pozitif bir ilişki olduğu görülmüştür. Yukarıda da çeşitli araştırmacılar tarafından açıklandığı üzere birçok çalışmada apoptozis ile diğer sperma parametreleri arasında özellikle de spermatozoon hasarını ortaya çıkaran parametreler

yönünden bir ilişki bulunmuştur. Bu araştırmada ise Annexin V-PI yöntemi sonucunda erken apoptozis ve canlı parametreleri açısından farklılık bulunurken diğer parametreler açısından bir fark bulunamamıştır. Veriler incelendiğinde erken apoptozis yönünden gruplar arasında sadece ch 3,5 ile 7dhc 1,5 arasında anlamlı bir fark bulunmasına rağmen; en düşük erken apoptozis 7dhc 1,5 grubunda bulunması bizim için çok önemli bir sonuçtur. Çünkü, çalışma planlanırken kurduğumuz hipotezlerden biri de daha önce hiç kullanılmamış olan 7 dhc'nin ch yerine kullanılabilmesidir. Erken apoptozis parametreleri açısından bu değerler hipotezimizi destekler niteliktedir. 7 dhc 1,5 grubu diğer parametrelerde de (motilite, HOS test, ölü canlı) kontrol grubuna göre pozitif anlamda iyi çıktığı için bu parametreler açısından bir ilişkidenden bahsetmek mümkündür. Apoptozis yönünden farklılık çıkan diğer bir parametre ise apoptoza uğramamış olan canlı hücrelerdir. Bu parametrede en yüksek canlılık ch 3,5 en düşük ise kontrol grubunda bulunmuştur. Veriler detaylı olarak irdelendiğinde kontrol grubuna göre apoptoza uğramamış hücrelerin diğer grupta farklı çıkması belirli korelasyonların olduğuna işaret etmektedir. Çünkü sperma analizlerinde ch 3,5 grubunda motilite, HOS test, ölü canlı yönünden kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. Bu sonuç ise bize pozitif bir ilişkinin olduğunu açıkça göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hayvancılık endüstrisinde, dondurulmuş spermalar suni tohumlama programlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Kriyoprezervasyon tekniklerinde önemli ilerlemeler olmasına rağmen; dondurma işlemi sırasında fazla sayıda spermatazoon hasar görmekte veya ölmektedir. Kriyoprezervasyon sırasında, spermatozoa hasarının oluşma mekanizması hâla tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat genel olarak hasarın sıcaklık değişiminden, buz formasyonlarından, oksidatif hasardan, spermatozoa membranlarına kriyoprotektanların toksik etkisinden ve ozmotik streten kaynaklandığına inanılmaktadır. Hücreler, dondurulma ve çözündürülme sırasında osmotik strese maruz kalmaktadır. Hücre membranları dondurulduğunda, hücre dışı solüsyonlar ve kriyoprotektif ajanlar kademeli olarak daha yoğun hale gelirler. Bunun sonucu olarak hiperozmotik bir çevre oluşur ve pH değişimi gözlemlenebilir; hızlı dehidrasyon sonucu hücreler arası organellerde dehidrasyona sebep olur, hücre membranlarının zayıflamasına veya fosfolipitlerin kaybına yol açar.

Bütün bu muhtemel mekanizmalar özellikle kolesterol-fosfolipit oranı düşük ve dondurma çözündürme işlemlerine daha duyarlı koç spermalarının spermatozoa motilitesinin, canlılığının, membran ve akrozom bütünlüğünün bozulmasına, DNA fragmentasyonlarına, apoptozise ve bunun sonucu olarak dondurulmuş- çözündürülmüş spermanın fertilizasyon kapasitesinin azalmasına sebep olur. Sperma kriyoprezervasyonu, sperma sulandırıcılarını, türlere göre sulandırıcı protokollerini, yetiştirme şartlarını ve sürü yönetimini içeren çok faktörlü bir sorundur; başarılı bir dondurma işlemi için ise bu birçok faktörün uygun bir şekilde bir araya getirilmesi gerekmektedir.

Yapılan çalışmada, çözüm sonrası motilite yönünden 7dhc grupları ile ch grupları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmazken ($p>0,05$); kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak fark bulunmuştur ($p<0,001$). En yüksek motilite ortalaması ch 2,5 grubunda bulunurken en düşük motilite ise % 33,0 ile kontrol grubunda bulunmuştur. Araştırmada progresif motilite ve spermatazoon hareket parametreleri yönünden istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Anormal spermatozoa yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamasına rağmen, en düşük anormal spermatozoa oranı 7 dhc ve ch 2.5 gruplarında tespit edilmiştir ($p>0,05$).

Ölü/Canlı spermatozoa yönünden ch ve 7dhc grupları arasında bir fark bulunmazken ($p>0,05$); bu gruplarla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark önemli bulunmuştur ($p<0,001$). Sunulan çalışmada, sulandırıcı gruplarının ortalama spermatozoa motilitesi oranları ile ölü/canlı spermatozoa yüzdesi yönünden paralellik olduğu görülmüştür.

Çalışmada çözüm sonu en yüksek HOS test oranı ch 3,5 grubunda bulunmuştur. En düşük çözüm sonrası HOS test oranı ise kontrol grubunda tespit edilmiştir. Çalışmada 7dhc 1,5, 2,5 ve 3,5 grupları ile ch 1,5, 2,5, 3,5 grupları arasında istatistiksel olarak aralarında bir fark bulunmazken ($p>0,05$); kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak fark bulunmuştur ($p<0,001$). Sunulan çalışmada, HOS test sonuçları ile sulandırıcı gruplarının ortalama spermatozoa motilitesi oranları arasında paralellik olduğu görülmüştür.

Çözüm sonrası en düşük akrozom hasarlı grup 7dhc 2,5 grubunda bulunurken en yüksek akrozom hasarı olan grup ise kontrol grubunda bulunmuştur. Çalışmada 7dhc ve ch grupları arasında istatistiksel olarak aralarında bir fark bulunmazken ($p>0,05$); kontrol grubuna göre istatistiksel olarak fark bulunmuştur ($p<0,001$).

Mitokondrial aktivasyon yönünden en yüksek mitokondriyal membran potansiyeli grup ch 1,5 grubunda bulunurken; en düşük mitokondriyal membran potansiyeli ise kontrol grubunda bulunmuştur. Çalışmada gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Kuyruktaki DNA yüzdesine baktığımızda ise, en yüksek DNA hasarı ch 3,5 grubunda; en düşük DNA hasarı ise 7dhc 3,5'da tespit edilmiştir. Çalışmada istatistiksel olarak gruplar arasında bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Apoptosis yönünden veriler incelendiğinde canlı ve erken apoptosis hücrelerinde istatistiksel farklılıklar görülürken diğer veriler arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Canlı hücreler incelendiğinde en yüksek canlı hücre ch 3,5; en düşük canlı hücre kontrol grubunda bulunurken gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,001$). Erken apoptozis hücrelerinde ise en yüksek erken apoptozis ch 3,5; en düşük apoptozis ise 7 dhc 1,5 grubunda bulunurken gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Sayılan hücre, nekrotik (ölü), geç apoptozis parametreleri açısından gruplar arasında bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

ÖNERİLER

Elde edilen verilere göre:

1- Kolesterol ve 7-dehidrokolesterolün koç spermasını dondurma (soğuk şoku) ve çözündürme prosedürlerine karşı koruduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar ışığında yeni araştırmaların kurgulanarak çalışmalara devam edilmesi gerekir. Ayrıca koç spermasını dondurmak için hazırlanan sulandırıcılara kolesterol veya 7-dehidrokolesterol uygun oranlarda katılmalıdır.

2- 7-dehidrokolesterolün, kolesterolün yerine koç spermasının sulandırılması ve dondurulmasında kullanılabileceği görüldü. 7-dehidrokolesterolün biyokimyasal yapısı kolesterol ile karşılaştırılarak diğer hayvan türlerinde de etkinliğinin araştırılmalarının yapılması ülke hayvancılığı için önemli bir etkinlik olabileceği düşünülmektedir.

3- Kolesterol ve 7-dehidrokolesterolün erken apoptozisi beklenen ölçüde önlemediği, ancak 7-dehidrokolesterol'ün kolesterolden daha iyi olduğu ortaya kondu. Apoptozis yönünden incelemelere devam edilmeli ve farklı apoptozis tespit yöntemleri ile (TUNEL) bulunan sonuçların sağlanması yapılmalıdır.

4- Kolesterol ve 7-dehidrokolesterol ile elde edilen in vitro sonuçların, in vivo dölverimleri de alınarak sağlamanın yapılması gerektiği sonucuna varıldı. Yapılacak olan

tohumlamalar sonrasında, laboratuvar sonuçları ile saha sonuçlarının birbirleri ile olan ilişkileri net bir şekilde ortaya konacaktır.



ÖZET

Akkaraman Koçlarda Spermanın Kolesterol ve 7-Dehidrokolesterol ile Dondurulması ve Değerlendirilmesi

Bu araştırmada, ülkemize özgü bir ırk olan Akkaraman koç spermasının dondurulması ve çözündürülmesinde, kolesterol (ch) ve kolesterolün oluşumunda ara ürün olan 7- dehidrokolesterolün (7-dhc) tris sulandırıcısına eklenerek hazırlanmış solüsyonlarla elde edilecek in vitro sonuçların değerlendirilmesi amaçlandı. Araştırmada üç baş koç kullanıldı. Koçlardan haftada iki defa suni vajen yardımıyla sezon içinde sperma alındı. Her bir koçtan alınan nativ ejakülatlar birleştirildi. Birleştirilen ejakülatlar 7 eşit gruba bölündü (split ejakulat); biri kontrol grubu olarak ayrıldı; üçü ch'nin; diğer üçü de 7-dhc'nin farklı konsantrasyonları (1,5, 2,5, 3,5 mg/120x10⁶) ile hazırlanarak tris sulandırıcısı oluşturuldu.

Deneydeki sulandırıcı grupları ile dozlanan spermalar + 4 derecede 2 saat alışıma bırakıldı. Alışım süresi sonunda payetler sıvı azot buharında – 120°C 'de 15 dakikada dondurulduktan sonra sıvı azot içinde saklandı. Dondurulduktan 2 ay sonra her deneydeki gruplar için payetler 37°C'deki su banyosunda 35 saniyede çözündürüldü. Çözdürme sonrası spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa oranı sperma analiz cihazında (CASA) değerlendirildi. Plazma membran bütünlüğünün değerlendirilmesi için HOS test, DNA fragmentasyonu için COMET, spermatozoa canlılığı SYBR-14/PI, akrozom bütünlüğü FITC-PNA/PI, mitokondriyel aktivasyon JC-1/PI; apoptozisin tespiti için Annexin V/PI yöntemi uygulandı. Ayrıca, antioksidan etkisinin değerlendirilmesi için lipit peroksidasyona (LPO) bakıldı.

Çözüm sonrası motilite, ölü/canlı, akrozom hasarı, ve HOS test yönünden 7dhc grupları ile ch grupları arasında istatistiksel olarak aralarında bir fark bulunmazken; kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak fark bulunmuştur (p<0,001). Anormal spermatozoa oranı, lipit peroksidasyon, DNA hasarı ve mitokondriyal aktivasyon yönünden gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır (p>0,05). Ayrıca, apoptozis yönünden veriler incelendiğinde canlı ve erken apoptozis hücrelerinde istatistiksel farklılıklar görülürken (p<0,001); diğer veriler arasında (sayılan hücre, geç apoptozis, nekrotik hücre) istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır (p>0,05).

Sonuç olarak; Ch ve 7-dhc'nin koç spermasını dondurma (soğuk şoku) ve çözdürme prosedürlerine karşı koruduğu, 7-dhc'nin ch yerine koç spermasının sulandırılması ve dondurulmasında kullanılabileceği; ayrıca, ch ve 7-dhc ile elde edilen in vitro sonuçların dölverimlerinin de alınarak sağlamlasının yapılması gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Dondurma, Koç, Kolesterol, Sperma, 7-Dehidrokolesterol.

SUMMARY

Evaluation and Cryopreservation of Akkaraman Ram Semen with Cholesterol and 7-Dehydrocholesterol

In this research the evaluation of in vitro results of cholesterol (ch) and 7-dehydrocholesterol (7-dhc) which intermediates formation of cholesterol added to tris extenders in freezing-thawing of Akkaraman ram semen, a particular breed in our country, was aimed. In this research 3 rams were used. Semen was collected from the bucks by artificial vagina, twice a week, during the breeding season. The native ejaculates from each ram were mixed. The mixed ejaculates were divided into seven groups (split ejaculates). One of these was separated as control, three were diluted with tris which have different concentrations of ch, and the other three were diluted with tris which have different 7-dhc concentrations (1,5, 2,5, 3,5).

Extender groups in the experiment were equilibrated in +4°C. Straws were frozen in liquid nitrogen vapour (-120 °C) and kept in liquid nitrogen at the end of equilibration period. 2 months after the straws were frozen, they were thawed in 37°C water bath for 35 seconds. Post-thaw spermatological parameters (motility, abnormal spermatozoa) were evaluated with the sperm analyser (CASA). HOS test for evaluating plasma membrane integrity, COMET for detecting DNA fragmentation, SYBR-14PI for detecting live/dead spermatozoa ratio, FITC-PNA/PI for evaluating acrosomal integrity, JC-1 with fluorescent stains for determining mitochondrial activity and Annexin V/PI method with flow cytometry for detecting apoptosis were performed. Besides, antioxidant effect was examined by lipid peroxidation.

After thawing, there was no significant difference between 7-dhc and ch groups in terms of motility, live/dead spermatozoa ratio, acrosome defect, mitochondrial activation, and HOS tests; however statistically significant difference was detected when these were compared with control groups ($p < 0,01$). No statistical difference was determined in terms of abnormal spermatozoa rate, lipid peroxidation and DNA fragmentation between groups. Although statistical differences were seen in live and early apoptotic cells when the apoptosis data was analysed ($p < 0,01$); there was no statistical difference within the other data (counted cells and late apoptotic cells) ($p > 0,05$).

As a result, it was concluded that ch and 7-dhc protect ram semen from freezing (cold shock) and thawing procedures; 7-dhc can be used instead of ch for extending and freezing ram semen. In vitro results obtained with ch and 7-dhc should be double-checked with fertility results.

Keywords: Cholesterol, Cryopreservation, Ram, Semen, 7-Dehydrocholesterol

KAYNAKLAR

- AHMAD E, AKSOY M, SERİN İ, KÜÇÜK N, CEYLAN A, UÇAN U (2013). Cholestreol loaded cyclodextrin pretreatment of ram spermatozoa protects structural integrity of plasma membrane during osmotic challenge and reduces their ability to undergo acrosome reaction in vitro. *Small Ruminant Research*, **115**: 77– 81.
- AISEN EG, MEDIANO VH, VENTURINO A (2002). Cryopreservation and post-thawed of ram semen frozen in different trehalose consantration. *Theriogenology*, **57**: 1801-1808.
- AK K (2008). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'î Tohumlama. *İ Ü Vet Fak Yayını. Ders Notu*, s: 69-70, 80-81, 189-198.
- AKSOY M, AKMAN O, LEHİMCİOĞLU NM, ERDEM H (2010). Cholesterol- loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatazoa. *Animal Reproduction Science*, **120**: 166-172.
- ALÇAY S., TOKER B, ÜSTÜNER B, NUR Z, SAĞIRKAYA H, SOYLU MK (2014). Investigation of relationships between DNA integrity and fresh semen parameters in rams. *Kafkas Üniv.Vet.Fak.Derg*, **20 (5)**: 793-798.
- AMIDI F, FARSHAD, KHOR AK (2010). Effects of cholesterol-loaded cyclodextrin during freezing step of cryopreservation with TCGY extender containing bovine serum albumin on quality of goat spermatozoa. *Cryobiology*, **61(1)**: 94-99
- AMIRAT L, TAINTURIER D, JEANNEAU L, THORIN C, GERARD O, COURTENS JL, ANTON, M (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: A comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, **61**: 895–907.
- AMIN N, KIRKWOOD RN, TECHAKUMPHU M, TANTASUPARUK W (2011). Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. *Theriogenology*, **75 (5)**: 897–903.
- AMORIM EA, GRAHAM JK, SPIZZIRI B, MEYERS M, TORRES CA (2009). Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm, *Cryobiology*, **58(2)**: 210-214.
- ANONİM (2014).Koç üreme organları Erişim adresi: [http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/chap3.html]. Erişim Tarihi: 13/08/2014.
- ANZAR, M, HE L, BUHR MM, KROETSCH TG, PAULS KP (2002). Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biology of Reproduction*, **66**: 354–360.
- ARAL F (1994). Koçlarda sperma kalitesi üzerine mevsimin etkisi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- ARAL F, ARAL S (2004). Merinos koçlarda sperma alma yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Journal Veterinary Animal Science* **28**: 47-53.

- ARTHUR GH, NOAKES DE, PEARSON H, PARKINSON T J (1996). Veterinary Reproduction and Obstetrics, s: 621-654.
- AWARD MM (2011). Effects of sub-optimal glycerol concentration and cholesterol-loaded cyclodextrin in a Tris-based diluent on cryopreserved ram sperm longevity and acrosomal integrity. *Small Ruminant Research*, **100**: 164-168.
- AYDINER F (2008). Sperm Kriyoprezervasyonu Sonrasında Apoptozun Değerlendirilmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, İZMİR.
- AZIZ N, SAID T, PAASCH P, AGARWAL A (2007). The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Human Reproduction*, **22 (5)**: 1413-1419.
- BARRERA-COMPEAN MH, PURDY PH, DZAKUMA JM, NEWTON G R, NUTI L C (2005). Cholesterol-loaded cyclodextrin improves post-thawgoat sperm motility. *J. Anim. Sci.* **83 (1)**: abstract T91.
- BIANCHI PG, MANICARDI GC, BIZZARO D (1993). Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human spermatozoa. *Biology Reproduction*, **49**: 1083-1088.
- BİRLER S (2008). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. *İ.Ü Vet. Fak. Yayını*. İstanbul, s: 19-26.
- BLANCH E TC, GRAHAM JK, MOCE E (2012). Response of boar sperm to the treatment with cholesterol loaded cyclodextrins added prior to cryopreservation. *Reproduction Domestic Animal*, **47**: 959-964.
- BRINSKO SP, BLANCHARD TL, RIGBY SL (2003). Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen. *Theriogenology*, **59**: 735-742.
- BUCAK MN, KESKİN N, TAŞPINAR M, ÇOYAN K, BAŞPINAR N, CENARİU MC, BİLGİLİ A, ÖZTÜRK C, KURŞUNLU AN (2013). Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. *Cryobiology*, **67**: 34-39.
- BUCAK MN, TEKİN N (2007). Kriyoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kriyoprotektif etki. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **54**: 67-72.
- BUCAK MN, ATAMAN MB, BAŞPINAR N, UYSAL O, TAŞPINAR M, BİLGİLİ A, ÖZTÜRK C, GÜNGÖR Ş, İNANÇ ME, AKAL E (2015). Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. *Andrologia*, **47**: 545-552.
- BUHR MM, CURTIS N (1994). Somnapan Kakuda composition and behavior of head sperm lipids of fresh and cryopreserved boar sperm, *Cryobiology*, **31**: 224-238.
- CEROLINI S, MALDJIAN A, PIZZI F, GLIOZZI TM (2001). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*, **121**: 395-401.
- CHALAH T, BRILLARD JP (1998). Comparison of Assessment of Fowl Sperm Viability by Eosin-Nigrosin and Dual Fluorescence (sybr-14/pi). *Theriogenology*, **50**: 487- 493.
- CHEMINAU P, MALPAUX B., DELGADILLO J, GUERIN Y, RAVAUULT JP, THIMONIER J, PELLETIER J. (1992). Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science*, **30**: 157-184.

- CHEN Z, HAUSER R, TRBOVICH AM, SHIFREN JL, DORER DJ, GODFREY-BAILEY L, SINGH NP (2006). The Relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *Journal of Andrology*, **27** (1): 112-120.
- CHRISTIAN AE, HAYNES MP, PHILLIPS MC, ROTHBLAT GH (1997). Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal Lipid. Research*, **38**: 2264-2272.
- COMERCIO EA, MONACHESI NE, LOZA ME, GAMBAROTTA M, WANKE MM (2013). Hypo-osmotic test in cat spermatozoa. *Andrologia*, **45**: 310–314.
- CRESPILHO AM, SPIZZIRI B, MEYERS M (2013). The effect of cholesterol addition, buffer and pH on equine sperm stored at 5 °C. *Journal of Equine Veterinary Science* **33**: 663-666.
- CRICHTON EG, PUKAZHENTHI BS, BILLAH M, SKIDMORE JA. (2015). Cholesterol addition aids the cryopreservation of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) spermatozoa. *Theriogenology*, **83**(2): 168-174.
- CUMMINS JM, JEQUIER AM, KAN R (1994). Molecular biology of the human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. *Molecular Reproduction Development*, **37**: 345–362.
- ÇOYAN K, BAŞPINAR N, BUCAK MN, AKALIN PP (2011). Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. *Cryobiology*, **63**: 1–6.
- DARIN-BENNETT A, WHITE IG (1977). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, **14**: 466–470.
- DE LAMIRANDE E, GAGNON C (1999). Reactive oxygen species and human spermatozoa, Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal Andrology*, **13**: 368–378.
- DELGADILLO JA, LEBOEUF, B, CHEMINEAU P (1991). Decrease in seasonality of sexual behavior and sperm reproduction in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology*, **36**: 755- 769.
- DEVECİ H (1990). Reprodüktif Anatomi. *Theriogenology*. Nurol Matbaacılık A.Ş, Ankara, s: 3- 15.
- DOTT, H.M., FOSTER, G.C. (1979). The Estimation of Sperm Motility in Semen, on a Membrane Slide, by Measuring the Area Change Frequency with an Image Analyzing Computer. *J. Reprod. Fertil.*, **55**: 161-166.
- EDASHIGE K, YAMAJI Y, KLEINHANS FW, KASAI M (2003). Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biology Reproduction*, **68**: 87-94.
- ENGLAND GCW (1993). Cryopreservation of dog semen. *Journal Reproduction*, **47**: 243-255.
- ERTUĞRUL M, DELLAL G, SOYSAL İ, ELMACI C, AKIN O, ARAT S, BARITÇI İ, PEHLİVAN E, YILMAZ O (2009). Türkiye Yerli Koyun Irklarının Korunması. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **23**(2): 97-119.
- EVANS G, MAXWELL WMC (1987). Salamon's artificial insemination of sheep and goats: *Butterworths*. s: 8-21;107-141.
- EVENSON DP, DARZYNKIEWICZ Z, MELAMED M.R (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, **240**: 1131-1133.

- FATEHI AN, BEVERS MM, SCHOEVERS E, ROELEN BAJ, COLENBRANDER B, GADELLA BM (2006). DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *Journal Andrologia*, **27**: 176-188.
- FERNANDEZ-SANTOS MR, MARTINEZ-PASTOR F, GARCIA-MACIAS V, ESTRSO MC, SOLER AJ, PAZ P, ANEL L, GARDE JJ (2007). Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and nonenzymatic antioxidants. *Journal Andrology*, **28**: 294-305.
- FISER PS, HANSEN C, UNDERHILL H, MARCUS GJ (1991). New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, **28**: 454-459.
- FOOTE RH (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal Animal Science*, **80**: 1-10.
- FOOTE RH (2003). Fertility estimation: A Review of Past Experience and Future Prospects. *Animal Reproduction Science*, **75**: 119-139.
- FOSTER DL, EBLING FJP, CLAYPOOL LE (1988). Timing of puberty by photoperiod. *Reproduction Nutrition Development*, **38**: 349.
- FRANCO JSV, ANTÓNIO CHAVEIRO MS, GÓIS A, MOREIRA DA, SILVA F (2013). Effects of α -tocopherol and Ascorbic Acid on Equine Semen Quality after Cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, **33**: 787-793.
- GALANTINO-HOMER HL, ZENG WX, MEGEE SO, DALLMEYER M, VOELKL D., DOBRINSKI I (2006). Effects of 2-hydroxypropyl beta- cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. *Molecular Reproduction and Development*, **73**: 638-650.
- GRAFF SP, EVANS G, GILLAN L, GUERRA MMP, MAXWELL WMC, O'BRIEN JK (2007). The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the *in vitro* quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology*, **67(2)**: 217-227.
- GARNER DL, JOHNSON LA (1995). Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology Reproduction* **53**: 276-284.
- GARNER DL, THOMAS CA, JOERG HW, DEJARNETTE JM, MARSHALL C.E (1997). Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology Reproduction*, **57**: 1401-1406.
- GARNER DL, HAFEZ ESE (1993). Spermatozoa and seminal plasma. In: *Reproduction in Farm Animals*. Hafez ESE (ed). Lea & Febier, Philadelphia, PA, s: 165-187.
- GILLAN L, EVANS G, MAXWELL WMC (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, **63**: 445-457.
- GÖKÇEN H. (1983). Koç Spermasının dondurulması ve dölveriminde kimi sorunlar ile bu sorunların çözümüne ilişkin araştırma bulguları ve öneriler. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* **2(2)**: 9-14.
- GRAVANCE CG, GARNER DL, BAUMBER J, BALL BA (1999). Assessment of Equine Sperm Mitochondrial Function using jc-1. *Theriogenology*, **53**: 1691-1703.

- GÜLYÜZ F, YILDIZ C (1995). Değişik ırktan koçların spermatolojik özellikleri ve döl verimleri üzerine aştırmalar. *Yüzüncüyıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **6**: 60-63.
- GÜNAY Ü, NUR Z, DOĞAN İ, BAŞPINAR B, SOYLU MK (2003). Sıfat Sezonuna Geçiş Döneminde ve Sıfat Sezonunda Koç Spermasının Dondurulabilirliğinin Araştırılması. *Uludağ Üniversitesi Journal Faculty Veterinary Medicine* **22**: 81-85.
- HAFEZ B (2000). *Reproduction in Farm Animal*. Seven Edition, Vol:5, Philadelphia: *Lea and Febiger*.
- HAIDL G, SCHILL WB (1994). Assesment of sperm chromatin condensation: an important test for prediction of IVF outcome. *Andrologia*, **32**: 263-266.
- HALLAP T, NAGY S, JAAKMA U, JOHANNISSON A, MARTINEZ HR (2005). Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Theriogenology*, **63**: 2311-2322.
- HANCI H (2006). Kızgınlığı toplulaştırılmış Akkaraman koyunlarında sulandırılmış sperma ile yapılan tohumlamada oksitosin kullanımının döl verimine etkisi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Ankara.
- HERMAN HA, MITCHELL J, DOAK GA (1994). The artificial insemination and Embryo Transfer Of Dairy and Beef Cattle. 8. Baskı, Interstate Publishers, Inc., Danville, Illinois. s: 3-137.
- HOESL, C.E., SAAD, F., PÖPPEL, M., ALTWEIN, J.E. (2005). A Review: Reversible, Non-Barrier Male Contraception: Status and Prospects. *European Urology*, **48**:712- 723
- HOLT WT (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, **53**: 47-58
- HUSSAIN SA, LESSARD C, ANZAR M (2013). A strategy for improvement of postthaw quality of bison sperm. *Theriogenology*, **79** (1): 108-115.
- INOUE K, KUBOTA S, SEYAMA Y. (1999). Cholesterol induces apoptosis of cerebellar neuronal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **256**: 198-203.
- İNCE D, KARACA O (2009). Çine Çapanı ve Karya koçlarında testis ve sperma özelliklerinin mevsimsel değişimi. *Hayvansal Üretim*, **50**: 9-15.
- JIAN HH, QING-WANG L, LIN-SEN Z, ZHONG-LIANG J, JUN-HUI A (2010). The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science*, **117**: 11-17.
- JIANG Z, LI Q, JIANG A, LI W. (2008). Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology*, **57**: 257-262.
- JIANG Z, LI Q, JIANG A, LI W, HU J, ZHAO H, ZHANG S (2007). Effect of low density lipoprotein on DNA integrity of freezing-thawing boar sperm by neutral comet assay. *Animal Reproduction Science*, **99**: 401-407.
- JUNG L, SU S, KYE K, SEUNG S, WOO L, TAE Y, DONG L (2008). Effect of cholesterol supplementation in freezing medium on the survival and integrity of human sperm after cryopreservation. *Korea Journal of Reproductive Medicine*, **35**: 203-212.
- KARAGIANNIDIS A, VARSAKELI S, ALEXOPOULOS C, AMARANTIDIS I (2000). Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Ruminant Research*, **37**: 125-130.

- KARAKUŞ K, CENGİZ F (2007). Ergin Norduz ve Karakaş Koçlarında Spermatolojik Özelliklerin Döl Verimine Etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, **17**: 7-15.
- KASAI T, OGAWA, K, MIZUNO, K, NAGAI S, UCHIDA Y, OHTA S, FUJIE M, SUZUKI K, HIRATA S, HOSHI K (2002). Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Journal Asian Andrology*, **4**: 97–103.
- KATANBEGZADEH H, FARID B, MOHAMMADREZA T (2014). Cryoprotectant- Free Freezing of the Goat Epididymal Sperm. *Cryoletters*, **35**: 293-298.
- KAYA A, YILDIZ C, LEHİMCİOĞLU NC, ERGİN A, AKSOY M (1999). Konya merinosu koçlarında sperma kalitesi, testis ölçüleri ve kan testosteron düzeylerine ilişkin mevsimsel değişikliklerin araştırılması. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, **9**: 1-5.
- KAYMAKÇI M, SÖNMEZ R (1992). Koyun Yetiştiriciliği. Hasat Yayıncılık. *İstanbul Hayvancılık Serisi 3*.
- KAYMAKÇI M, SÖNMEZ R(1996). İleri koyun yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir.
- KONYALI C (2009). Effect of cholesterol- loaded cyclodextrins on buck sperm quality after cryopreservation with different extenders, masterinteruniversitario en mejoragenéticaanimal y biotecnología de la reproducción, Tesis de Master Valencia, Septiembre.
- KONYALI C, TOMAS C, BLANCH E, GOMEZ EA, GRAHAM JK, MOCE E (2013). Optimizing condition for trating goat semen with cholesterol-loadedcyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Criyobiology*, **67**:124-131.
- KULAKSIZ R (2009). Farklı Antioksidanlar eklenmiş sulandırıcılarla dondurulmuş Saanen teke spermasının in vitro değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi.
- KULAKSIZ R, ÇEBİ Ç, AKÇAY E (2012). The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4 °C. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science* **36**: 177-182.
- KULAKSIZ R, DAŞKIN A, AKÇAY E (2010). Karayaka koçlarında üreme sezonu dışında testislerin morfometrik ölçümleri ile spermatolojik özellikler üzerine bir araştırma. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **57**: 263-265.
- LADHA S (1998). Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, membrane spermatozoon. *Journal Membrane Biology*, **165**: 1-10.
- LARSON KL, DEJONGE CJ, BARNES AM, JOST LK, EVENSON D (2000). Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Human Reproduction*, **15**: 1717-1722.
- LEBOUEF B, RESTALL B, SALOMON S (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, **62**: 113-141.
- LEİBO SP, BRANDLEY L (1999). Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. 502-515. In: C Gagnon (Ed), *The Male Gamet*. Cache River Press, St Louis.
- LEMMA A (2011). Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility, Artificial Insemination in Farm Animals. Dr. Milad Manafi (Ed.), ISBN: 978-953-307-312-5.

- LOPEZ-REVUELTA A, SANCHEZ-GALLEGO JI, HERNANDEZ-HERNANDEZ A, SANCHEZ-YAGQE J, LLANILLO M (2005). Increase in vulnerability to oxidative damage in cholesterolmodified erythrocytes exposed to t-BuOOH. *Biochim. Biophys. Acta* **1734**: 74–85.
- LOPEZ-REVUELTA A, SANCHEZ-GALLEGO JI, HERNANDEZ-HERNANDEZ A, SANCHEZ-YAGQE J, LLANILLO M (2006). Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chem. Biol. Interact.* **161**: 79–91.
- LOPEZ-REVUELTA A, SANCHEZ-GALLEGO JI, HERNANDEZ-HERNANDEZ A, SANCHEZ-YAGQE J, LLANILLO M (2007). Membrane cholesterol in the regulation of aminophospholipid asymmetry and phagocytosis in oxidized erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **42**: 1106–1118.
- LOVE CC, THOMPSON JA, BRINSKO SP (2003). Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology*, **60**: 1127-1138.
- MALO AF, GOMENDI M, GARDE J, LANG-LENTON B, SOLER AJ, ROLDAN ERS (2006). Sperm Design and Sperm Function. *Biology Letters*, **2**: 246-249.
- MANDAL DK, NAGPAUL PK, GUPTA AK (2003). Motion characteristics of murrh buffalo bull spermatozoa in various seasons and its relationship with functional integrity of the plasmalemma. *Theriogenology*, **60**: 349–358.
- MARTINEZ-PASTOR F, JAHANNISSON A, GIL J, KAABI M, ANEL L, PAZ P (2004). Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, **84**: 121–133.
- MOCE'E, GRAHAM JK (2006). Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *Journal Animal Science*, **84**: 826–833.
- MOCÉ E, PHILLIP H, PURDY B, JAMES K (2010a). Grahama Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, **118**: 236–247.
- MOCE' E, BLANCH E, TOMAS C, GRAHAM JK (2010b). Use of cholesterol in sperm cryopreservation: Present moment and perspectives. *Reproduction Domestic Animal*, **45**: 57–66.
- MOHAN R, ATREJA SK (2014). Soya Milk Tris-based Phytoextender Reduces Apoptosis in Cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) Spermatozoa. *Reproduction Domestic Animal*, **49**: 797–805.
- MOORE, A.I, SQUIRES, E.L, GRAHAM, J.K (2005). Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, **51**: 241–249.
- MORAES EA, GRAHAM JK, TORRES CA, MEYERS M, SPIZZIRI B (2009). Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, **118**: 148-54.
- MORRIER A, THERIAULT M, CASTONGUAY F, BAILEY J (2004). Effect of cholesterol loaded methyl-b-cyclodextrin on ram sperm during cryopreservation, cold-shock and artificial insemination. Proceedings of the Society for the Study of Reproduction Meeting, Vancouver, Canada, (Abstract 636).

- MOTAMEDI-MOJDEHI R, ROOSTAEI-ALI MEHR M, RAJABI-TOUSTANI R (2014). Effect of different levels of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on cryosurvival of ram spermatozoa. *Reproduction Domestic Animal*, **49**: 65–70.
- MULLER K, MULLER P, PINCEMY G, KURZ A, LABBE C (2008). Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. *Biology Reproduction*, **78**: 390–399.
- NAGY S, JANSEN J, TOPPER EK, GADELLA BM (2003). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma and acrosomemembrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology Reproduction*, **68**: 1828–1835.
- NAING SW, WAHIDA H, MOHD AZAMC K, ROSNINAA Y, ZUKIB AB, KAZHALA S, BUKARA MM, THEIND M, KYAWE T, SANE MM (2010). Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, **122**: 23–28.
- NASEER Z, AHMAD E, AKSOY M., KÜÇÜK N, SERİN İ, CEYLAN A, BOYACIOĞLU M, KUM C (2015). Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment against hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm. *Cryobiology*, **71(1)**: 18–23.
- NEILD D, CHAVES G, FLORES M, MORA N, BECONI M (2003). Hypo-osmotic Test in equine characteristics and membrane integrity of live spermatozoa. *Theriogenology*, **51**: 721-727.
- NUR Z, ZİK B, ÜSTÜNER B, SAĞIRKAYA H, ÖZGÜDEN CG (2010). Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*, **73**: 1267-1275.
- OLIVEIRA CH, VASCONCELOS AB, SOUZA FA, MARTINS-FILHO OA, SILVA MX, VARAGO FC, LAGARES MA (2010). Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, **118(2-4)**: 194–200.
- OLIVEIRA RR, RATES DM, PUGLIESI G, KER PG, ARRUDA RP, MORAES, EA, CARVALHO GR (2014). Use of Cholesterol-Loaded Cyclodextrin in Donkey Semen Cryopreservation Improves Sperm Viability but Results in Low Fertility in Mares. *Reproduction Domestic Animal*, **49**: 845–850.
- ÖMÜR AD (2011). Sezon içi ve sezon dışında koç spermasının dondurulmasında antioksidanların etkisi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- ÖZKOCA A (1984). Çiftlik hayvanlarında Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İ.Ü Vet. Fak. Yayınları, İstanbul.
- ÖZTÜRK A (2000). Pratik koyunculuk. Lalahan Hayvancılık Merkezi Araştırma Enstitüsü Lalahan, Ankara.
- PALASZ AT, MAPLETOPT RJ (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advantages*, **14**: 127-149.
- PIASECKA M, GACZARZEWICZ D, LASZCZYŃSKA M, STARCZEWSKI, A, BRODOWSKA A (2007). Flow cytometry application in the assessment of sperm DNA integrity of men with asthenozoospermia. *Folia Histochem Cytobiology*, **45**: 127-136.
- PICHARDO AI, ARAGÓN-MARTINEZ A, AYALA-ESCOBAR ME, DOMINGUEZ- VARA IA (2000). Viability tests, active caspase-3 and -7, and chromatin structure in ram sperm selected using the swim-up procedure. *Journal Andrologia*, **31**: 169-176.

- PURDY PH (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, **63**: 215–225.
- PURDY PH, GRAHAM JK (2004). Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm, *Cryobiology*, **48**: 36–45.
- PURDY PH, FOX MH, GRAHAM JK (2005). The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. *Cryobiology*, **51**: 102–112.
- PURDY PH, MOCE E, STOBART R, MURDOCH WJ, MOSS GE, LARSON B, RAMSEY S, GRAHAM JK, BLACKBURN HD (2010). The fertility of ram sperm held for 24h at 5 degrees C prior to cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, **118**: 231–235.
- ROSA HJD, BRYANT MJ (2003). The ‘ram effect’ as a way of modifying the reproductive activity in the ewe. *Small Ruminant Research*, **45**: 1–16.
- SALAMON, S, MAXWELL WMC (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, **62**: 77–111.
- SÁNCHEZ-GALLEGO JI, LÓPEZ-REVUELTA A, SARDİNA JL, HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ A, SÁNCHEZ-YAGÜE J, LLANİLLO M (2010). Membrane cholesterol contents modify the protective effects of quercetin and rutin on integrity and cellular viability in oxidized erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **48(10)**, 1444–1454.
- SARIÖZKAN S (2008). Spermada lipid peroksidasyon ve antioksidanların rolü. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, **79**: 19-22.
- SCHAFFER S, HOLZMANN A (2000). The use of transmigration and spermac stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, **59**: 201–211.
- SCHUSTER TG, KELLER, L.M., DUNN, R.L., OHL, D.A., SMITH, G.D. (2003). Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryolops. *Human Reproduction*, **8**: 788-795.
- SERİN İ, AKSOY M, CEYLAN A (2011). Cholestreol-Loade Cyclodextrin inhibits premature akrosomal reactions in liquid-stored rabbit spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, **123**: 106–111.
- SEVİNÇ A (1979). Dölerme ve Suni Tohumlama. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara.
- SHARBATOGHLI M, VALOJERDI MR, AMANLOU M, KHOSRAVI F, JAFAR- ABADI, MA (2012). Relationship of sperm DNA fragmentation, apoptosis and dysfunction of mitochondrial membrane potential with semen parameters and ART outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, **286(5)**: 1315-22.
- SHEIKH N, AMIRI I, FARIMANI M, NAJAFI R, HADEIE J. (2008). Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Iranian Journal Reproduction Medicine*, **6**: 13-18.
- SILVA SV, SOARES A, BATISTA AM, ALMEIDA FC, NUNES JF, PEIXOTO CA, GUERRA, MMP (2011). In Vitro and In Vivo Evaluation of Ram Sperm Frozen in Tris Egg-yolk and Supplemented with Superoxide Dismutase and Reduced Glutathione. *Reproduction Domestic Animal*, **46**: 874–881.

- SILVAMAIA M, BICUDO SD, AZEVEDO HC, SICHERLE CC, SOUSA DB, RODELLO L (2009). Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Ruminant Research*, **85**: 85–90.
- SIVAKUMAR R, RAJASINGAM SJ (2013). The Hypo-osmotic Swelling Test for evaluation of sperm embrane integrity. *Spermatogenesis Methods in Molecular Biology*, **927**: 21-25.
- SÖNMEZ M (2008). Reprodüksiyon&Suni Tohumlama&Androloji ders notları Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi yayınları. İkinci ön basım.
- SPIZZIRI BE, FOX MH, BRUEMMER JE, SQUIRES EL, GRAHAM JK (2010). Cholesterol-loaded cyclodextrins and fertility potential of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, **118**: 255–264.
- STANGER JD, LONG V, YOVICH JL, ALMAHBOBI G (2010). Hypo-osmotic swelling test identifies individual spermatozoa with minimal DNA fragmentation. *Reproductive BioMedicine Online*, **21** (4): 474–484.
- ŞİRELİ HD (1996). Tüm Yönleri ile Akkaraman Koyunları. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- TAŞDEMİR U, KİNİT H, ÖZCAN İ, YURTSEVEN R, TUNCER PB (2003). Farklı sulandırıcılar kullanılarak dondurulmuş çözdürülmüş koç sperması ile laparoskopik intrauterin tohumlama. *Lalahan Hayvancılık Aratırma Enstitüsü Dergisi*, **43**: 1-8.
- TAŞDEMİR U, TUNCER PB, BÜYÜKLEBLEBİCİ S, ÖZGÜRTAŞ T, DURMAZ E, BÜYÜKLEBLEBİCİ O. (2014). Effects of Various Antioxidants on Cryopreserved Bull Sperm Quality. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **20**: 253-258.
- TEKİN N (1990). Erkek Üreme Organlarının Muayenesi; Reprodüktif Anatomi. *Theriogenology*, Nurol Matbaacılık A.Ş, Ankara, s: 59-67;241.
- TEKİN N (2000). Yetiştiricilikte suni tohumlamanın önemi. *Hayvancılık Kongresi*, 57-60 Kızılcıhamam-Ankara.
- TEKİN N, ROSE AGA, YURDAYDIN N, YAVAŞ Y, DAŞKIN A, KESKİN O, ETHEM H (1991). Östrusları sinkronize edilen koyunlarda sun'i tohumlama yöntemiyle elde edilen dölvürimi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **38**: 60-73.
- TEKİN N, UYSAL O, AKÇAY E, YAVAŞ İ (2006). Farklı taurin dozlarının ve dondurma hızının koç spermasının dondurulması üzerine etkileri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **53**: 179-184.
- TIRPAN MB (2012). Ankara Tekesinin Spermasında Tris Sulandırıcı Bileşenleri Yerine Katılan Borun (Sodyumpentaborat) Çözüm Sonu Sperma Kalitesi Üzerine Etkisi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- TOMAS C, BLANCH E, FAZELI A, MOCE E (2013). Effect of a pre-freezing treatment with cholesterol-loaded cyclodextrins on boar sperm longevity, capacitation dynamics, ability to adhere to porcine oviductal epithelial cells in vitro and DNA fragmentation. *Dynamics Reproduction, Fertility and Development*, **25**: 935–946.
- TÜRK G (2004). Akkaraman koçların serum testosteron düzeylerinde ve spermatogenesisindeki mevsime bağlı değişikliklerin araştırılması. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi. Elazığ.
- TÜRK G, DEMİRCİ E (2005). Spermatolojik Özelliklerle Testosteron Miktarı Arasındaki İlişki. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **19**: 21-27.

- TÜRK G, AKSU EH, BOZKURT T (2006). Spermatozoon DNA'sı hasarı. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **20**: 85-95.
- UYSAI O, TAŞDEMİR U, KİNET H., ÖZCAN İ (2003). Akkaraman ırkı Koçlarda başlıca spermatolojik özellikler. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **43**: 23-28.
- VARGHESE AC, BRAGAIS FM, MUKHOPADHYAY D, KUNDU S, PAL M, BHATTACHARYYA AK, AGARWAL A (2009). Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics. *Andrologia*, **41**: 207-215.
- VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, ONCLIN K (2002). Computer Assisted Semen Analyzers in Andrology Research and Veterinary Practice. *Theriogenology*, **57**: 149-179.
- WALENSKY LD, SNYDER SH (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *Journal Cell Biology*, **130**: 857-69.
- WATSON PF (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, **60**: 481-492.
- YAVAŞ KORKMAZ T (2009). Alternatif Dondurma yöntemlerinin boğa sperması üzerine etkisi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi. Ankara.
- YAVAŞ İ (2008). Koç spermasının farklı oranlarda sükröz içeren sulandırıcılar ile gliserollü ve gliserolsüz sulandırılması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. Ankara.
- YENİ D, AVDATEK F, GÜNDOĞAN M (2010). An Investigation on Certain Andrological and Biochemical Parameters in Rams under Afyonkarahisar Conditions. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, **3**:1-6
- YILDIZ, S. (2004). Koç spermasının farklı antioksidanlar içeren sulandırıcılarla kısa süreli (+5°C) saklanması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. Ankara.
- YILMAZ O (2004). Sakız ve Karya Tipi koçların sperma kalitesinde meydana gelen mevsimsel değişimler üzerine bir araştırma. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- YOSHIDA M (2000). Conservation of Sperm: Current Status And New Trends. *Animal Reproduction Science*, **60-61**: 349-355.
- ZHU WJ, LIU XG (2000). Cryodamage to plasma membrane integrity in head and tail regions of human sperm. *Asian Journal Andrologia*, **2 (2)**: 135-138.
- ZUBAIR M, LODHI LK, AHMAD E, MUHAMMAD G. (2013). Hypo osmotic swelling test as screening for evaluation of semen of bull. *Journal entomology and zoology studies*, **1 (6)**: 124-128.
- ZUGE RM, BERTOLLA RP, NICHI TBS, CORTADA CNM, BOLS PEJ (2008). Correlation between bovine sperm membrane integrity and mitochondrial activity in *Bos taurus* bulls. *16th International Congress on Animal Reproduction*, Budapest, Hungary, abstract no: 172.

EKLER**Ek-1: Etik Kurul Belgesi**


HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ


TOPLANTI TARİHİ :08/05/2013
TOPLANTI NO :2013-10
DOSYA NO :2013-61
KARAR NO :2013-10-72

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Ongun Uysal'ın yaptığı ve araştırmacı olarak Araş.Gör.Muhammed Enes İnanç'ın katıldığı "Akkaraman koçlarda spermanın Kolesterol ve 7-Dehidrokolesterol ile dondurulması ve değerlendirilmesi" başlıklı araştırma projesinin içeriği kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Koyun
Hayvan Sayısı : 3
Geçerlilik Süresi : 01/09/2013 – 01/09/2014

ASLININ AYNIDIR
08/05/2013


Prof.Dr.Oguz SARİMEHMETOĞLU
A.Ü. HADYEK Başkanı





T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :08/05/2013
TOPLANTI NO :2013-10
DOSYA NO :2013-61
KARAR NO :2013-10-72

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Ongun Uysal'ın yaptığı ve araştırmacı olarak Araş.Gör.Muhammed Enes İnanç'ın katıldığı "Akkaraman koçlarda spermamın Kolesterol ve 7-Dehidrokolesterol ile dondurulması ve değerlendirilmesi" başlıklı araştırma projesinin içeriği kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Koyun
Hayvan Sayısı : 3
Geçerlilik Süresi : 01/09/2013 – 01/09/2014

ETİK KURUL ÜYELERİ

Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Uzm.Vet.Hek.Attıla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Muhammed Enes
Soyadı : İNANÇ
Doğum yeri ve tarihi :Erzincan /31.10.1986
Uyruğu : T.C
Medeni durumu : Evli
Askerlik durumu : yaptı
İletişim adresi ve telefonu : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
Ankara 0312 317 0315/4407

II- Eğitimi

2011- 2016 : Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
Doktora Programı/Ankara
2005 – 2010 : Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi/Ankara
2000 – 2004 : Sebhat Hanım Süper Lisesi /Erzincan
1998 –2000 :Cumhuriyet Ortaokulu/Erzincan
1993 – 1998 : Selehattin Demircioğlu İlkokulu /Erzincan
Yabancı dil : İngilizce

III- Ünvanları

2010 : Veteriner Hekim
2010 : Araştırma Görevlisi

IV- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimler Derneği

Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Derneği

V- Bilimsel İlgi Alanları

Makaleler

1. BUCAK, M.N., ATAMAN, M.B., BAŞPINAR, N., UYSAL, O., TAŞPINAR, M., BİLGİLİ, A., ÖZTÜRK, C., GÜNGÖR, Ş., İNANÇ, M.E., AKAL, E. (2015). Lcopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. *Andrologia*, 47,545-552.
- 2- İNANÇ, ME., DAŞKIN, A. (2015). Sığırlarda Suni Tohumlama Uygulamaları Yönünden Genomik Seleksiyonun Önemi, Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 10 (2), 137-143.
- 3- ATA, A., İNANÇ, M.E., KANKAV, İ O., GÜLAY, Ö.Y., GÜLAY, M.Ş. (2014). Epididimal ve dondurulmuş çözülmüş Holstain boğa spermasında farklı boyama yöntemlerinin karşılaştırılması. *MAKÜ Sağ. Bil. Enst. Derg.* 2(1): 1-12.
4. İNANÇ, M.E., UYSAL, O., GÜRCAN, İ.S. (2014). Farklı ırklardan tekelerde başlıca spermatolojik parametreler. *MAKÜ Sağ. Bil. Enst. Derg.* 2(1): 13-19.
5. UYSAL, O., DEMİR, Z., ÇEBİ, Ç., ERDOĞAN DEMİRTAŞ, Ş., TIRPAN, M.B., TUNCA, M., TEKİN, K., KAMANLI, S., İNANÇ, M.E. (2014). Saf hat horoz spermalarında in vitro ve in vivo dölveriminin değerlendirilmesi. *MAKÜ Sağ. Bil. Enst. Derg.* 2(1): 20-27.
6. OLĞAÇ, K.T., TEKİN, K., İNANÇ, M.E., TIRPAN, MB., DAŞKIN, A., AKÇAY, E. (2014). Alageyiklerde (Dama Dama Dama) başlıca androlojik değerlendirmeler, *Vet. Hekim. Derg.* 85 (2): 12-19.

Sözlü Bildiriler

1. ÇEBİ, Ç., İNANÇ, M.E., UYSAL, O., AKÇAY, E. (2013) Koç spermasının dondurulması üzerine santrifüjün etkisi. 7. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama kongresi. 1-4 Temmuz 2013. Kars.

Poster Sunumları

1. ATA, A., İNANÇ, M.E., KANKAVİ, O., YILDIZ GÜLAY, Ö., GÜLAY, M.Ş. (2011). Holstein Boğa Spermasında Farklı Boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması. 6. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi. 18-21 Mayıs 2011 Belek/ ANTALYA.

2. ATA, A., İNANÇ, M.E., KANKAVİ, O., YILDIZ GÜLAY, Ö., ve GÜLAY, M.Ş. (2011) Comparison of different staining methods on sperm from Holstein bulls". ADSA-ASAS Joint Annual Meeting. J. Dairy Sci. Vol. 94, E-Suppl. 1. 10-14 Temmuz 2011. New Orleans/ USA.

3. İNANÇ, M.E., UYSAL, O., ATA, A. (2013). Spermatozoa Hasarları ve İleri tespit Yöntemleri, 7. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama kongresi. 1-4 Temmuz 2013. Kars.

4. BUL, A.K., ÇEBİ, Ç., BUL, D., İNANÇ, M.E., UYSAL, O. (2013) Döl verimi düşen iki İngiliz aygıra GnRH uygulaması, 7. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama kongresi. 1-4 Temmuz 2013. Kars.

5. TEKİN, K., TIRPAN, M.B., İNANÇ, M.E., OLĞAÇ, K.T., AKÇAY, E. (2013). Ala Geyiklerde (Dama Dama) bazı androlojik ve spermatolojik parametreler. 7. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama kongresi. 1-4 Temmuz 2013. Kars.

6. İNANÇ M.E., UYSAL O., GÜRCAN İ.S. (2013). Principle spermatological Parameters in Goat from different breeds, 6. International Balkan Animal Conference. 3-5 Ekim 2013. Tekirdağ.

7. UYSAL, O., DEMİR, Z., ÇEBİ, Ç., ERDOĞAN DEMİRTAŞ, S., TIRPAN, M.B., TUNCA M., TEKİN, K., KAMANLI, S., İNANÇ, M.E. (2013). Evaluation of

in vivo and in vitro fertility in semen in pure lines of cocks, 6. International Balkan Animal Conference. 3-5 Ekim 2013. Tekirdağ..

8. İNANÇ, M.E., OLĞAÇ K.T., TEKİN K., ÖZEN, D., UYSAL, O. (2014). Effect of Different Glycerol Levels on Cryopreservation of Bull Semen Loaded With Cholesterol or 7-Dehydrocholesterol. *Mac.Vet.Rev. Vol 37;Supplement 1;Pages 61-62.* 5th International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine. 5-7 Ekim 2014. Ohrid/Macedonia.

9. İNANÇ, M.E., TEKİN, K., OLĞAÇ K.T., ÖZEN, D., UYSAL, O. (2014). Effect of Cholesterol and 7-Dehydrocholesterol Loaded Cyclodextrin on Simmental Bulls Sperm Motility Stored at 4 C°. *Mac.Vet.Rev. Vol 37;Supplement 1;Pages 61-62.* 5th International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine. 5-7 Ekim 2014. Ohrid/Macedonia.

10. TEKİN, K., İNANÇ, M.E., OLĞAÇ, .T., YILMAZ, B., AKKURT, M.Y., TEMİZKAN,M.C., KAYA, U., TUNCER, P.B., TAŞDEMİR, U., BÜYÜKLEBLEBİCİ, S., ÇINAR KUL, B., DURMAZ, E., UYSAL, O., ERTUĞRUL, O. (2015). Effect of Age on semen Freezability of Aksaray Malaklı Shepherd Dog Breed (Turkish Mastiff). 52nd Cryo2015 Annual Meeting of the Society for Cryobiology Abstracts Brochure; Pages 65, 26-29 July 2015, Ostrava/Czech Republic.

11. İNANÇ, M. E., TEKİN, K, DAŞKIN, A. (2015). Relationship Between Casa Motility and Kinetic Parameters on Bull Fertility 52nd Cryo2015 Annual Meeting of the Society for Cryobiology Abstracts Brochure; Pages 63, 26-29 July 2015. Ostrava/Czech Republic.

12. İNANÇ, M.E TEKİN, K., OLĞAÇ, .T., YILMAZ, B., AKKURT, M.Y., TEMİZKAN,M.C., KAYA, U., TUNCER, P.B., TAŞDEMİR, U., BÜYÜKLEBLEBİCİ, S., ÇINAR KUL, B., DURMAZ, E., UYSAL, O., ERTUĞRUL, O. (2015). Tekin N. Some Spermatological Characteristics of Aksaray Malaklı Dog (Turkish Mastiff), 18.EVSSAR Congress; Pages 173, 11-12 September 2015, Hannover/Germany

13. DAŞKIN, A., İNANÇ, M.E., TEKİN, K., OLĞAÇ, K.T., TIRPAN, M.B., ALEMDAR, H., ÇİL, B., KAYA, U. (2015). Effects of Region and Individualism on Sperm Freezeability of Angora Goat, 32.World Veterinary Congress, 13-17 September 2015, İstanbul/Turkey.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeler:

Akkaraman Koçlarda Spermanın Kolesterol ve 7-Dehidrokolesterol ile Dondurulması ve Değerlendirilmesi (Tübitak- Proje No: 113O775 - Bursiyer) 2013-2015.

Aksaray Malaklısı Çoban Köpeği ırkında (Türk Mastifi) androlojik ve spermatolojik özelliklerin SNP ile genom boyu ilişkilendirilmesi (Tübitak – Proje No: 114O636 - Bursiyer) 2014-Devam ediyor.

Verdiği Seminerler:

Spermatozoanın Oluşumu, Erkek ve Dişi Reprodüktif Sistemde Taşınması (Doktora Semineri 1)

Spermatozoa Hasarları ve İleri Tespit Yöntemleri (Doktora Semineri 2)

Katıldığı Çalıştaylar:

Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) ve Diğer Tip Moleküler Markerler: Method ve Uygulamaları Çalıştayı 1-2 Ekim 2013, Tekirdağ (Kursiyer)

Hayvan Populasyonlatında Bireyler Arasındaki Genetik İlişkiler ve Samızlık Değer Tahmin Yöntemleri Çalıştayı 1-2 Ekim 2013, Tekirdağ (Kursiyer)

Flow Sitometri İlkeleri ve Veteriner Androlojide Kullanımı Çalıştayı 10 Mart 2014,
Bursa (Kursiyer)

VIII- Diğer Bilgiler

Aldığı Kurslar:

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası: Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi
26 Aralık 2011/06 Ocak 2012, Ankara (Kursiyer)

Hayvan Refahı, Kontrolü ve Danimarka Uygulamaları 21 Mart 2013, Ankara
(Kursiyer)

Küçük Ruminantlarda Laporoskopik İntrauterin Suni Tohumlama Workshop (1-4
Temmuz 2013, Kars (kursiyer)

İngilizce Akademik Yayın Hazırlama Eğitimi, Tübitak 14 Mart 2014, Ankara
(Kursiyer)

Sığırlarda Recto-Vaginal Metotla Suni Tohumlama Kursu 24-28 Mart 2014,Ankara
(Kursiyer)