

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOÇ SPERMASI SULANDIRICISINA FARKLI DOZLARDA
KATILAN LİPOZOM VE TREHALOZUN ÇÖZÜM SONU
SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ**

Talha Burak ERTEM

DOKTORA TEZİ

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN

KONYA-2024

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOÇ SPERMASI SULANDIRICISINA FARKLI DOZLARDA
KATILAN LİPOZOM VE TREHALOZUN ÇÖZÜM SONU
SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ**

Talha Burak ERTEM

DOKTORA TEZİ

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 20212027 Proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2024

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

(Adayın Adı Soyadı) tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından
..... Anabilim Dalında Yüksek Lisans / Doktora Tezi olarak oy birliği / oy
çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Ünvanı Adı SOYADI

İmza

.....Üniversitesi

Danışman:

Ünvanı Adı SOYADI

.....Üniversitesi

İmza

Üye:

Ünvanı Adı SOYADI

.....Üniversitesi

İmza

Üye:

Ünvanı Adı SOYADI

.....Üniversitesi

İmza

Üye:

Ünvanı Adı SOYADI

.....Üniversitesi

İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Unvanı

Adı SOYADI

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Koç Sperması Sulandırıcısına Farklı Dozlarda Katılan Lipozom ve Trehalozun Çözüm Sonu Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkisi” adlı bu çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak hazırlanmıştır. Aynı zamanda Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 20212027 Proje numarası ile de desteklenmiştir.

Doktora eğitimim boyuca bilgi ve birikimleri ile sürekli destek olan, ihtiyacım olan her anımda bana yol gösteren kıymetli hocam, danışmanım sayın Prof. Dr Mehmet Bozkurt ATAMAN’a teşekkürü bir borç bilirim. Yine sayın hocalarım, Prof. Dr Mustafa Numan Bucak’a, Dr. Öğretim Üyesi Musafa BODU’ya tüm destekleri, yardımları, bilgi ve birikim paylaşımları adına teşekkür ederim. Aynı zamanda Tez İzleme Komitesinde bulunan sayın Doç. Dr Hasan ALKAN’a teşekkür ederim.

Tanıdığım ilk andan beri gerek hayat tecrübesiyle gerekse bilisel anlamda tüm bilgi ve deneyimlerini paylaşmayı esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr Numan AKYOL’a, can dostum kıymetli kardeşim Dr İlker ÜNAL’a, tez projem boyunca desteklerini esirgemeyen UHAEM Müdürü Sayın Dr. Sezer ÖZ’e, Suni Tohumlama şubesinde görevli personellere ve koyunculuk şubesi personellerine teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük emeği olan, bana inanan ve her koşulda kayıtsız şartsız beni destekleyen duaların esirgemeyen en kıymetlim anneme, sırtımı yasladığım, gölgesinde dinlendiğim ve yaşantısının her anına imrendiğim babama; canımın canı, anne babamın bana en büyük mirası sevgili kardeşime; hayat arkadaşım, can yoldaşım biricik eşim ve sevgili oğluma minnet ve şükranlarımla...

Talha Burak ERTEM

Temmuz / 2024

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
-------------------------------------	-----------

ÖZET.....	viii
------------------	-------------

SUMMARY.....	x
---------------------	----------

1.GİRİŞ.....	1
---------------------	----------

1.1 Koçlarda Pubertas	3
-----------------------------	---

1.2 Spermatogenezis	5
---------------------------	---

1.3 Koçlarda Spermatolojik Özellikler	6
---	---

1.4 Koçlarda Sperma Alıma Yöntemleri	7
--	---

1.4.1 Suni vajen yardımıyla sperma alma.....	7
--	---

1.4.2 Elektroejakülatör yardımıyla sperma alma.....	8
---	---

1.4.3 Aşım sonrası spermanın suni vajenden toplanması.....	10
--	----

1.5 Koçlarda Spermatolojik Muayeneler ve Önemi	10
--	----

1.5.1 Makroskopik muayeneler	10
------------------------------------	----

1.5.2 Mikroskopik muayeneler.....	12
-----------------------------------	----

1.5.3 Hipoozmotik şişme testi (HOST)	17
--	----

1.5.4 Gelişmiş spermatolojik muayene yöntemleri	18
---	----

1.5.5 Spermanın kriyoprezervasyonu	23
--	----

1.5.6 Sperma sulandırıcısına ilave edilen kriyoprotektanlar	27
---	----

2.GEREÇ VE YÖNTEM.....	48
-------------------------------	-----------

2.1 Çalışmada Kullanılan Hayvan Materyali	48
---	----

2.2 Ana Sulandırıcının Hazırlanması.....	48
2.3 Deney Grupları.....	50
2.4 Spermanın Alınması.....	51
2.5 Spermatolojik Muayeneler.....	52
2.5.1 Spermanın hacmi	52
2.5.2 Spermada kitle hareketi	52
2.5.3 Sperma yoğunluğu.....	53
2.5.4 Sperma motilitesi.....	53
2.6 Sperma Dondurulması	54
2.7 Spermaların Çözdürülmesi.....	55
2.8 Çözüm Sonu Spermatolojik Parametrelerin Belirlenmesi	55
2.9 CASA Değerlendirmesi	56
2.9.1 Kinetik hareket parametreleri (KHP)	56
2.10 Flow Cytometri (Akış sitometri) Analizleri.....	57
2.10.1 Canlılık muayenesi (Membran bütünlüğü)	58
2.10.2 Plazma membran ve akrozom bütünlüğü.....	58
2.10.3 Mitokondriyal membran potansiyeli.....	59
2.11 İstatistik Analizler	59
3.BULGULAR	61
4.TARTIŞMA	68
5.SONUÇ ve ÖNERİLER.....	87

6.KAYNAKLAR.....	89
7.EKLER.....	102
EK-A Etik Kurul Onayı	102
8.TURNİTİN RAPORU	103
9. ÖZGEÇMİŞ	108



SİMGELER VE KISALTMALAR

-	Eksi
+	Artı
±	Artı-Eksi
%	Yüzde
°	Derece
/	Bölme
°C	Santigrat derece
100x	100'lük büyütme
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mM	Milimol
ABP	Androjen bağlayıcı protein
CASA	Bilgisayar destekli sperm analizi
cm ³	Santimetre küp
DNA	Deoksiribo nükleik asit
FITC	Fluoresan iso tyo siyanat
FSH	Folikül geliştirici hormon
HMMP	Yüksek mitokondriyal membran potansiyeli
HOST	Hipoosmotik şişme testi
K	Kontrol
LH	Lüteinleştirici hormon
LIN	Doğrusallık (linearity)
LIP100	Lipozom 100
LIP50	Lipozom 50
mm ³	Milimetre küp
PEG	Polietilen glikol
PG	Propilen glikol
PI	Propidium iodid
PM	Progresif motilite
PMAI	Plazma membran ve akrozom bütünlüğü
PNA	Peanut agglutinin
PVP	Polivinil pirrolidon
STR	Doğrusallık (straightness)
TAS	Tris ana sulandırıcı
TM	Total motilite
TR50	Trehaloz 50

TR50-LIP50	Trehaloz 50 - Lipozom 50
TR75	Trehaloz 75
TR75-LIP100	Trehaloz 75- Lipozom 100
VAP	Ortalama yol hızı (average path velocity) ($\mu\text{m/s}$)
VCL	Eğri çizgisel hız (curvilinear velocity) ($\mu\text{m/s}$)
VSL	Doğrusal hız (rectilinear velocity) ($\mu\text{m/s}$)
YS	Yumurta Sarısı



ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Koç Sperması Sulandırıcısına Farklı Dozlarda Katılan Lipozom ve Trehalozun Çözüm Sonu Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkisi

Talha Burak ERTEM

Danışman

Prof. Dr.Mehmet Bozkurt ATAMAN

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2024

Sunulan tez çalışmasında fertil özelliği bilinen ergin 5 baş Kıvrıcık x Akkaraman G1 koçuna ait ejakülatlar kullanıldı. Çalışmanın hayvan materyali, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü (UHAEMM) koyunculuk şubesinden temin edildi. Ejakülatlar, Lalahan şartlarında aşım sezonu içerisinde Eylül ve Ekim aylarında haftada 2 kez olmak üzere suni vajen yardımıyla toplandı. Kullanıma uygun bulunan ejakülatlar 7 tekrar olarak istatistiksel değerlendirmeye alındı. Koçlardan alınan ejakülatlardan %80'in üzerinde motiliteye, 2×10^9 spermatozoon/ml'nin üzerinde yoğunluğa sahip olanları miks yapılarak 35°C'lik su banyosuna aktarıldı. Numuneler daha sonra 7 eşit hacime bölünerek katkı maddeleri içeren sulandırıcı gruplar ile sulandırılarak donduruldu. Gruplar; kontrol, Trehaloz50, Trehaloz75, Lipozom50, Lipozom100, Trehaloz50-Lipozom50 ve Trehaloz75-Lipozom100 olarak belirlendi. Kontrol grubu ve deneme grupları için tris bazlı temel sperma sulandırıcı (Trizma 27.1 gr/L, Sitrik asit 14.0 gr/L, Fruktöz 10.0 gr/L, %20 yumurta sarısı, %3 gliserol, 1 ml penislin-streptomisin) kombinasyonu kullanıldı. Çalışmada Trehaloz ve Lipozom'un farklı dozları kullanılarak koç spermasının dondurma - çözündürme sonrası spermatolojik parametrelere olan etkilerinin araştırılması amacıyla CASA ve Flow Sitometri yardımıyla yararlanıldı.

Çalışmada elde edilen çözüm sonu motilite bulguları incelendiğinde K, TR50, TR75, LIP50, LIP100, TR50-LIP50 VE TR75-LIP100 gruplarında Total Motilite değerleri sırasıyla $40,00 \pm 1,26$, $45,22 \pm 0,99$, $42,77 \pm 0,68$, $39,11 \pm 0,61$, $35,11 \pm 0,42$, $40,55 \pm 0,58$ ve $34,33 \pm 0,52$ olarak belirlendi. HMMP değerleri sırasıyla $26,49 \pm 1,25$, $32,12 \pm 1,41$, $25,51 \pm 0,91$, $24,16 \pm 2,83$,

%19,72±0,98, %24,45±1,10 ve %23,39±0,92 olarak tespit edildi. SYBR14 + sırasıyla %40,87±0,93, %52,33±3,19, %41,90±2,69, %38,34±1,42, %39,28±1,07, %31,29±1,45 ve %31,43±2,55 olarak, PMAI (FITC-Pf) sırasıyla %25,72±0,66, %31,13±1,27, %25,79±1,56, %16,40±0,87, %15,32±2,13, %18,01±3,02 ve %20,36±2,75 olarak bulundu.

Bulgular genel olarak değerlendirildiğinde LIP50 ve LIP100 gruplarının istatistiksel olarak kontrol gruplarına göre istatistiki açıdan anlamlı bir fark göstermediği ($P>0,05$) TR50 grubunun çözüm sonu spermatolojik parametreler bakımından diğer gruplardan istatistiki açıdan önemli derecede yüksek sonuçlar verdiği görüldü ($P<0,05$).

Sonuç olarak sunulan tez çalışmasında LIP50 grubunun dondurulmuş-çözdürülmüş koç sperması üzerine istatistiki olarak kontrol grubuna benzer özellikler gösterdiği, LIP100 grubunun ise istatistiki olarak önemli ölçüde olumsuz etki gösterdiği tespit edildi ($P<0,05$). Trehalozun ise koç spermasının çözüm sonu spermatolojik parametreler bakımından istatistiki olarak önemli olumlu etkileri olduğu ve koç spermasının dondurulabilirliğinde kullanılabileceği kanısına varıldı ($P<0,05$).

Anahtar Sözcükler: Koç; Lipozom; Sulandırıcı; Trehaloz; Sperma

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Effect of Liposome and Trehalose Added to Ram Semen Extender in Different Doses on Spermatological Parameters After The Thawing of Semen

Talha Burak ERTEM

Department of Reproduction and Artificial Insemination

PhD THESIS/ KONYA- 2024

In the presented thesis study, ejaculates from five adult Kıvrıkcık x Akkaraman G1 rams known for their fertility characteristics were used. The animal material used in the project was provided by the Sheep Branch of the International Livestock Research and Training Center (ILRTC). Ejaculates were collected using artificial vagina, twice a week, in September and October, which corresponds to the breeding season under Lalahan conditions. The seven ejaculates were evaluated statistically. Ejaculates with over 80% motility and a sperm concentration exceeding 2×10^9 spermatozoa/ml were mixed for use in sperm processing and transferred to a 35°C water bath.

The samples were then divided into seven equal volumes, diluted with diluent groups containing additives before freezing. Groups were designated as follows: C, Tr50, Tr75, Liposome50, Liposome100, Trehalose50-Liposome50, and Trehalose75-Liposome100. For the control and experimental groups, a trisma- based basic semen extender was used (Trisma 27.1 g/L, Citric acid 14.0 g/L, Fructose 10.0 g/L), 20% egg yolk, 3% glycerol, 1 ml penicillin-streptomycin combination. In the study, different doses of trehalose and liposomes were used to investigate their effects on spermatological parameters of ram sperm after freezing-thawing, utilizing CASA and flow cytometry.

When examining the post-thaw motility findings obtained in the study, the Total Motility values were found as follows for the C, TR50, TR75, LIP50, LIP100, TR50-LIP50, and TR75-LIP100 groups: 40.00 ± 1.26 , 45.22 ± 0.99 , 42.77 ± 0.68 , 39.11 ± 0.61 , 35.11 ± 0.42 , 40.55 ± 0.58 , and 34.33 ± 0.52 , respectively. The HMMP values were found as follows: 26.49 ± 1.25 , 32.12 ± 1.41 , 25.51 ± 0.91 , 24.16 ± 2.83 , 19.72 ± 0.98 , 24.45 ± 1.10 , and 23.39 ± 0.92 , respectively. The SYBR14+ values were found as follows: 40.87 ± 0.93 , 52.33 ± 3.19 , 41.90 ± 2.69 , 38.34 ± 1.42 ,

%39.28±1.07, %31.29±1.45, and %31.43±2.55, respectively. The PMAI (FITC-PI-) values were found as follows: %25.72±0.66, %31.13±1.27, %25.79±1.56, %16.40±0.87, %15.32±2.13, %18.01±3.02, and %20.36±2.75, respectively.

When the findings were evaluated overall, it was observed that the LIP50 and LIP100 groups did not show a statistically significant difference compared to the C groups ($P>0,05$) while the TR50 group yielded significantly higher results in terms of post-thaw spermatological parameters compared to the other groups ($P<0,05$).

As a result, it was found that the LIP50 group exhibited statistically similar characteristics to the control group on frozen-thawed ram sperm, while the LIP100 group showed statistically negative effects. It was observed that trehalose has statistically significant positive effects on spermatological parameters of ram sperm and can be used in the cryopreservation of ram sperm ($P<0.05$).

Key Words: Extender; Ram; Liposome; Trehalose; Trisma

1. GİRİŞ

Modern küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinde hayvansal verimliliğin sürdürülebilirliği ve reproduktif olarak performanslarının yükseltilmesi en önemli amaçtır.

Günümüzde dondurulmuş çözdürülmüş boğa spermalarının embriyo transferi ve suni tohumlama çalışmalarında kullanılması ile katedilen yol malesef koç ve teke spermalarında aynı sonucu gösterememiş, yapılan çalışmalardaki başarı oranları istenilen seviyelere gelememiştir. Bu durumun temel nedeni, koç ve teke spermatozoonlarının plazma membran yapılarının donmaya karşı daha duyarlı olması ve buna bağlı olarak dondurma-çözdürme sonrası spermatozoonların kalitesinin istenen seviyeye ulaşmamasıdır (Watson 1981).

Dünyada ve Türkiye genelinde aşım sezonunda koçlar ile koyunların elde sıfat yöntemi ile çiftleştirilmesi tercih edilmektedir. Koçların bakım ve beslemesine bağlı olarak gebelikle sonuçlanan çiftleşme sayısı ise ortalama 20 ile 25'i civarındadır. Üstün verimli koçların elde sıfat yöntemiyle kullanımı, genetik açıdan üstün verimli sürülerin oluşturulmasında yavaş bir yöntemdir. Buna bağlı olarak koçlarda sperma dondurma ve çeşitli suni tohumlama çalışmaları yapılmış, eldeki üstün verimli baba hattından çok daha fazla sayıda yavru elde edilmesi amaçlanmıştır. Dolayısıyla üstün verimli ırkların geliştirilmesi, mevcut sürülerin sayı ve nitelik yönünden iyileştirilmesi ve koruma programlarının da devam etmesi için, küçükbaş hayvancılık yetiştiriciliğinde ileri üreme teknikleri önem arz etmektedir. Sperma kriyoprezervasyonu da bunun bir basamağıdır (Jiménez-Rabadán ve ark 2016).

Sperma dondurma yöntemlerinde; spermanın kriyoprotektana verdiği cevap aynı türlerin kendi aralarında ya da farklı türler arasında değişiklikler göstermektedir. Genel olarak küçük ruminantların spermatozoonlarının dondurma çözdürme işlemlerine hassasiyetleri diğer hayvanlara oranla yüksektir (Aisen ve ark 2002). Sperm fertilitésinin düşük olmasının nedenlerinden biri de hücre bileşenlerine zarar veren dondurma çözdürme işlemleridir ve etkilenen ilk bölge plazma membranıdır (Quinn ve ark 1980).

Yapılan araştırma ve çalışmalarda sperm hücrelerinde (akrozom, çekirdek, mitokondri, aksonem, plazmatik membran) dondurma ve çözündürme süreci; canlılık, motilite, Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) yapısal bütünlüğü ve oksidatif strese sebep olan faktörler, ısı değişiklikleri, osmotik stres ve buz kristalleri oluşumundan kaynaklanan biyokimyasal ve yapısal hasarlardan dolayı bugüne kadar standardize etmek mümkün olmamıştır (Amirat ve ark 2004, Gürler ve ark 2016). Tüm bu nedenlerden dolayı, spermanın dondurma çözündürme işlemlerinde hücre içi buz kristallerinin oluşumunu önlemek ve kriyoprezervasyon sırasında ve sonrasında membrana verilen zararı en aza indirmek için farklı içerikte sulandırıcılar denenmiştir (Amirat ve ark 2004). Bunlardan en yaygın olanı, içeriğindeki yüksek moleküler ağırlıklı ve düşük yoğunluklu lipoprotein varlığından dolayı tercih edilen, aynı zamanda spermanın soğuk şokuna karşı başarılı bir şekilde korumasını sağlayan yumurta sarısıdır. İçeriğindeki proteinlerin %66'lık bir kısmı düşük yoğunluklu olduğundan akrozomal enzimlerin kaybını azaltır ve sıvı içerisinde dondurma sırasında (-196°C sıvı azot) akrozomdaki dejeneratif değişiklikleri önler (Salisbury ve ark 1941). Her ne kadar yumurta sarısının bileşimi bakım ve besleme şartlarına göre değişiklik gösterse de mikrobiyal kontaminasyon riski yüksektir (Kumar ve ark 2015, Ansari ve ark 2016). Bu nedenle yumurta sarısı bazlı sulandırıcılar, zaman zaman hayvansal kökenli proteinlerle ya da lipozomlardan oluşan hayvansal kökenli protein içermeyen diğer sulandırıcılara tercih edilmiş ya da birbirlerine sinerjistik etki yapmak amacıyla kombine şekilde kullanılmıştır (Ansari ve ark 2016).

Lipozomlar, dondurma işleminde sperma için plazmatik membranın suya karşı yapısını ve geçirgenliğini değiştirebilen özelliğe sahiptir (Röpke ve ark 2011). Bu nedenle hayvansal kökenli protein içermeyen ve kimyasal olarak da lipozomlardan oluşan sulandırıcılar geliştirilmiş ve denemeler yapılmıştır. Bu lipidlerin yumurta sarısındaki hayvansal proteinden farkı mikrobiyal kontaminasyon riskinin olmamasıdır. Yine bu proteinler boğa, manda ve aygır spermasının soğuk şokuna karşı korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Kumar ve ark 2015). Yapılan tüm çalışmalar ile sulandırıcılara katılan antioksidan ve protein içeriklerinin dondurma öncesi eklendiğinde membran bileşimini dengeleyebileceğini ve kriyoprotektan olarak bilinen maddelere lipoproteinleri ekleyerek bu hasarın azaltılabileceğini bildirmektedir (Pillet ve ark 2012, Wu ve ark

2013). Kriyoprotektanların kombinasyonunun hücre içi ozmotik basıncını stabilize ettiği ve oksidatif stresi azalttığı bilinmektedir (Corcuera ve ark 2007).

Manda boğalarında yürütülen bir çalışmada içeriğinde lipozom olan sulandırıcının toplam motilite, progresif motilite, plazma membran bütünlüğü gibi ölçütlerde istatistiki olarak daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Singh ve ark 2018). Aygır sperması üzerine yürütülen bir çalışmada kontrol sulandırıcısı (INRA Freeze®) + lipozom ve kontrol + lipozom+trehaloz gruplarının DNA bütünlüklerinin istatistiki olarak daha iyi korunduğu, kapasitasyon öncesi akrozomal bütünlüklerinin daha iyi olduğu, çözündürme sonrası motilitede lipozom katkılı grubun daha iyi motiliteye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Medina- Leon ve ark 2019). Köpek sperması üzerinde yürütülen başka bir çalışmada tris bazlı sulandırıcıya farklı yoğunluklarda eklenen lipozom'un çözüm sonu sperma motilitesini istatistiki olarak olumlu olarak etkilediği; membran ve akrozom bütünlüklerinde ise istatistiki olarak önemli bir fark oluşturmadığı bildirilmiştir. Optimal dozajlama konusunda %2'lik konsantrasyonun diğer gruplara oranla (%4,%6,%8,%10,%15 ve %20) en iyi sonuçları verdiği vurgulanmıştır (Belala ve ark 2016).

Tüm yapılan bu çalışmalar neticesinde kriyoprezervasyon sırasında yumurta sarısı bazlı tris sulandırıcısına trehaloz ve lipozom ilavesinin, dondurma çözündürme sonrası koç sperması kalitesi üzerine etkisi henüz bildirilmemiştir. Bu nedenle Trehaloz ve Lipozomun koç sperması sulandırıcısında dondurma çözündürme sonrası spermatolojik parametreleri üzerindeki etkinliğini belirlemek önemlidir.

1.1 Koçlarda Pubertas

Puberta genel olarak, hayvanın istenen reproduktif yeterliliğine fizyolojik, morfolojik ve davranışsal olarak ulaşmaya kadar geçen ve aşamaları olan bir süreç olarak ifade edilmektedir. Cinsiyete bağlı olarak da farklılık gösterebilen pubertasın bu özelliği erken seksüel farklılaşmanın hormonal geribildirim sistemleri üzerindeki kontrolü ve etkisi olarak ortaya çıkar (İleri 1994, Birlir 2008).

Koçlarda cinsel olgunluğa erişme (puberta) dönemi 5-8 aylık yaş aralığında gerçekleşmekle birlikte ırk, yaş, vücut ağırlığı, sütten kesme ağırlığı, bakım, besleme, genotip, doğum mevsimi, iklim ve çevresel faktörlerin etkisiyle bu süreler değişiklik göstermektedir (Ak 2008, Sönmez 2008, Yavaş 2008). Ayrıca, erken gelişim gösteren koyun ırkları, geç gelişim gösteren ırklara kıyasla daha önce pubertas'a erişirler. Melez yavruların ebeveynlerine oranla daha erken zamanda pubertase eriştiği ve bu durumun ırk etkisinden kaynaklandığı vurgulanmaktadır (Kaymakçı ve Sönmez 1992).

Pubertas genellikle hayvanlarda, özellikle memelilerde, cinsel organların büyümesi, üreme sistemlerinin aktive olması ve cinsiyet karakteristiklerinin belirginleşmesiyle karakterizedir. Genel olarak koçlarda pubertasi etkileyen faktörler hayvanın genetik özellikleri, çevresel faktörler ve beslenme gibi etmenlerle ilişkilidir (Ak 2008).

- a. Genetik özellikler; koçların genetik mirası, pubertal gelişimlerini etkiler. Aile içindeki genetik faktörler, koçların pubertase ne zaman gireceklerini belirleyebilir.
- b. Cinsiyet; erkek koçlar genellikle dişilere göre biraz daha erken pubertase girer. Cinsiyet hormonları bu sürecin başlamasında önemli bir rol oynar.
- c. Beslenme; koçların sağlıklı bir şekilde büyüyüp gelişebilmeleri için uygun beslenme önemlidir. Yetersiz beslenme veya vitamin-mineral eksiklikleri, pubertal gelişimi etkileyebilir.
- d. Çevresel Koşullar; çevresel stres, iklim koşulları, barınma şartları ve sosyal etkileşim gibi faktörler koçların gelişimini etkileyebilir.
- e. Fiziksel Aktivite; koçların fiziksel aktivite düzeyi, genel sağlıkları ve dolayısıyla pubertal gelişimleri üzerinde etkili olabilir.
- f. Hormonal Denge; koçların endokrin sistemleri ve cinsiyet hormonlarının dengesi, pubertal gelişimi düzenleyen önemli faktörlerdir.

- g. Stres Düzeyi; yüksek stres seviyeleri, hormonal dengesizliklere neden olarak pubertal gelişimi etkileyebilir.
- h. Genel Sağlık Durumu; koçların genel sağlık durumu pubertal gelişimlerini etkileyebilir. Hastalıklar veya sağlık sorunları pubertal gelişimi geciktirebilir.

Bu faktörlerin bir veya birkaçı, koçların pubertal gelişiminin başlamasını etkiler. Ayrıca her bir koçun gelişimlerinin farklı olabileceği gerçeğiyle de bu faktörlerin etkisi bireyden bireye değişebilir (Kaymakçı ve Sönmez 1992).

1.2 Spermatogenezis

Testislerin ana görevlerinden biri spermatozoon ve testosteron hormonu üretmektir. Üretilen bu testosteron hormonu spermatogenezisin embriyo ve fetal gelişim gösterdiği süreçte cinsel değişimlerde ve gonadotropin salgınlığında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Chowdhury 1979).

Spermatogenezis, endokrin sistem kontrolü altında, hücre bölünmeleri ve yapısal farklılaşmalar sonucunda erkek gamet hücresinin (spermatozoon) oluştuğu evreleri tanımlar. Spermatositogenezis ve spermiogenezis (olgunlaşma) adı verilen iki faz dönemden oluşan karmaşık bir süreçtir (Birler 1999). Spermatogenezis sürecinde testosteron, folikül stimulan hormon (FSH), luteinize hormon (LH) ve androjen bağlayıcı proteininin (ABP) aktif rolü vardır. Puberta dönemine girilmesiyle hipofiz ön lobundan salgılan LH, testis tubulusları arasındaki bağ dokuda bulunan Leydig hücrelerinden testosteron salgılanmasını indüklemektedir. Sistemik dolaşım yolu ile tubulus seminiferusa gelen testosteron hormonu, ABP ile birleşerek spermatogonyumlarda mitozun başlamasını tetikler. FSH spermatogenezisin stimüle edilmesinde, LH ve testosteron ise devamlılığında rol almaktadır (Chowdhury 1979).

Testisin tubulus seminiferus epitelleri; sertoli hücreleri ve germ hücrelerinden oluşmaktadırlar. Germ hücreleri (spermatogonium) sürekli bölünerek farklılaşırlar. Aynı zamanda kendilerini yenileme özelliklerine sahiptirler. Spermatogonyumlar, mitotik bölünmeleri takiben yeni spermatogonyumların ve primer spermatositlerin oluşmasını

sağlarlar. Mitotik bölünmeleri mayotik bölünmeler takip eder ve primer spermatositler sekonder spermatositleri onlar da spermatidleri meydana getirirler. Böylelikle hücrenin sahip olduğu diploid (2n) kromozom sayısı haploid (n) kromozom sayısına indirgenir ve olgun olmayan spermatid hücreleri oluşur. (Castrillejo ve ark 1995, Birler 1999).

Spermiogenezis döneminde epididimal göç adı verilen, spermatid hücrelerinin seminifer tubul lumeninden ayrılarak rete testis boyunca ilerlemesi ve epididimise ulaşması gerçekleşir. 12-14 gün kadar süren bu göç esnasında, hücrenin çekirdeğinde, sitoplazmasında ve morfolojisinde birtakım değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişimler neticesinde hücrelerin olgunlaşması ve motil yeteneklerini kazanması sağlanır. Ejakülasyon sürecinde eklenti üreme bezlerinin sıvıları spermatozoonlarla birleşir ve sperma adı verilen ejakülatı oluştururlar (Çoyan ve ark 2002).

Koçlarda ortalama süreci 46-49 gün olarak bildirilen spermatogenezisin başlangıcı, doğumdan sonra 2-2,5 aylar arasında görülebilir ancak tam bir spermatogenezisten söz edilebilmesi için 6-7 aylık sürecin geçmesi gerekmektedir (Schanbacher 1974).

Spermatogenezis ırk ve yaş ile doğrudan ilişkili olmakla birlikte ortam ısısı, nemi, bakım ve beslenme şartları ile gün ışığının uzunluğu gibi çevresel faktörlere bağlıdır. Radyoaktif elektromanyetik radyasyon, östrojen analogları, dioksinler, ağır metaller, pestisitler gibi faktörler sperma üretim sürecine zarar verir. Selenyum, çinko, vitamin A, E, C, arginin, koenzim Q10, karnitin, L karnitin, glutatyon içeren maddelerin ise spermatogenezis üzerine olumlu etki yapar (Saleh 1997).

1.3 Koçlarda Spermatolojik Özellikler

Koçlarda spermatolojik özellikler yaş, ırk, beslenme, mevsim, sperma alma yöntemi ve sıklığına bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte ejakülat hacmi düşüktür (Evans ve Maxwell 1987). Genel olarak, sağlıklı ve ergin bir koçun sperma rengi beyazdan krem rengine kadar değişiklik gösterebilmektedir. Ortalama 1 ml hacminde olan spermanın pH değeri 6,2-6,9 arasındadır. Spermatozoon konsantrasyonu $2-3 \times 10^9$ /ml, mass (kitle) aktivite +++++, motilite %80-90, anormal spermatozoon oranını %5-15 ve ölü

spermatozoon oranı %10 civarındadır (Ak 2005a). Koçlarda spermatozoonların toplam uzunluğunun 60 µm, hacminin 31 µm³, yüz ölçümünün 42 µm² olduğu; baş uzunluğu, genişliği ve kalınlığının sırası ile 8,3 µm, 4 µm ve 1 µm olduğu bildirilmektedir (Curry ve ark 1994).

1.4 Koçlarda Sperma Alıma Yöntemleri

Koçlardan farklı yöntemler kullanarak sperma almak mümkündür. Ancak genel olarak, diğer ruminantlarda olduğu gibi suni vajen ve elektroejakülatör yardımı ile sperma alınmaktadır. Bu yöntemlerin yanı sıra, günümüzde pek tercih edilmeyen normal aşım sonrası vajinaya bırakılan spermanın geri toplanmasıyla da sperma almak mümkündür (Moore 1985).

1.4.1 Suni vajen yardımıyla sperma alma

Suni vajen, koçlarda sperma toplama amacıyla sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu amaçla tercih edilen suni vajen; 5-6 cm iç çapında ve 18-20 cm uzunluğunda silindirik bir yapıda, dışı sert plastikten, içi kauçuk yapıya sahip yumuşak iç lastikten oluşan, bağlantıyı sağlayan bir huni ve ucunda da dereceli bir toplama tüpünden oluşmaktadır. Sperma alma işleminde kullanılacak olan suni vajenin iç sıcaklığının 41-44 °C olması tercih edilir. Aynı zamanda uygun basıncı sağlamak için üzerinde bir vana/valf bulunmaktadır (Hafez ve Hafez1993). Suni vajen hazırlanırken iç lastiğinin 2/3 sıcak su ile doldurulur ve iç lastiğin “Y” formunu alması sağlanır. Bu durum basıncın uygun olduğunu göstermektedir. Yeterli basınç sağlanamaz ise ya da sıcaklık ayarlanamamış ise koçlardan sperma alma güçleşmektedir. Suni vajen kayganlığı için kullanılacak kayganlaştırıcılar spermatozoonların yapısına ve penis mukozasına zarar vermeyecek yağsız içerikler ihtiva etmelidir. Bunun için günümüzde genelde steril vazelin ya da sperma sulandırıcısı kullanılmaktadır (Çoyan ve ark 2002).

Koç, hareketi kısıtlanmış veya bir yardımcı tarafından tutulan koyunun bulunduğu ortama serbest bırakılır ve koyuna yaklaşmasına, genital bölgesini koklamasına izin verilir. Libidosu uyarılan koç aşım öncesi kendine özgü sesler çıkartır ve flehmen hareketi yapar. Koyunun arkasına geçen koçun, bel bölgesi ve kuyruğunda gözlemlenen tik benzeri

hareketler aşım yapmaya hazırlandığının göstergesidir. Bu aşamada, sperma alacak kişinin koçu izlemesi ve hazır bir şekilde beklemesi gerekmektedir. Aşım çok seri gerçekleşir ve koçlarda kopulasyon esnasında friksiyon hareketi gerçekleşmez. Bu sebepten dolayı uygulamayı yapan kişi, penisin vajene girmesini fırsat vermeden prepisyumdan tutmalı ve suni vajene yönlendirmelidir. Tekniğine uygun olarak hazırlanmış suni vajen glans penise temas ettiği anda koç yüklenme hareketini yapar ve ejakülasyon gerçekleşir. Yüklenme hareketi sonrası suni vajen penisten hemen çıkartılmaz, koçun koyunun üzerinden inmesi beklenir. Koçun koyundan inmesi sonrası suni vajen penisten çıkartılır ve içerisindeki spermanın geri akmaması için yere vertikal pozisyonda birkaç saniye tutulur. Ardından, suni vajen'in vanası açılarak içerisindeki basınç azaltılır ve spermanın toplama kadehine daha hızlı akması sağlanır (Ak 2005a).

Bu yöntem doğal aşım en yakın yöntem olup aynı zamanda kullanımı basit bir yöntemdir. Aynı zamanda uygulama diğer metotlara göre hızlı ve pratiktir. Bu nedenle elde edilecek spermaların kalitesinin iyi olması bakımından tercih sebebidir. Bir ya da iki yardımcı ile sperma alımının mümkün olması, hayvanı yormadan birden fazla sayıda sperma alınması açısından avantajlı, ancak sperma alınırken kullanılan koyunun kızgın olması, dolayısıyla çoğunlukla aşım sezonunda kullanımına uygun bir yöntemdir. Ayrıca, kullanılacak koçun sağlıklı ve sun'i vajene alışkın olması da gereklidir. Tabi ki kızgın hayvan kullanılıyor olması olası bir dikkatsizlikte istenmeyen bir çiftleşmeye neden olabileceği de unutulmamalıdır.

1.4.2 Elektroejakülatör yardımıyla sperma alma

Sperma alma işleminde kullanılacak koç herhangi bir sebepten dolayı aşım yeteneğini kaybetmiş (arka ekstremite problemleri vb.), suni vajen ile sperma alma işlemini kabul etmiyor ya da mevsim dışı bir sperma toplanması söz konusu olduğunda kullanılan bir yöntemdir. Yöntemin prensibi, rektal yolla elektrik akımı verilerek ejakülasyon merkezinin stimüle edilmesi ve ereksiyon olmaksızın spermanın toplanmasına dayanmaktadır (Ak 2005a).

Elektroejakülatör ile düşük voltajlarda elektrik akımı verilerek bel ve kuyruk omurları (L5-S1) arasındaki ejakülasyon merkezinin uyarılması sağlanır. Bu sayede

genital organlara giden sinirlerin uyarılması vasıtasıyla sperma alınması sağlanır (Yurdaydın 1990). Uygulanacak hayvanlarda strese neden olacağı için sperma verecek hayvanın dikkatlice seçilmesi ya da ksilazin ya da türevleri gibi sedatif maddeler kullanılarak sakinleştirilmesi önerilmektedir (Marco-Jiménez ve ark 2005). Elektroejakülator vasıtası ile sperma toplanması ilk etapta güç gibi görünse de uygulama yapıldıkça koçlardan rahatlıkla sperma alındığı, ek olarak bu yöntemde ortamda kızgın bir dişinin varlığına ihtiyaç olmadığından yılın her döneminde uygulanabilmektedir (Ak 2005a).

Uygulama esnasında hayvan elektrik akımı nedeniyle kasılacağı için dikkatli bir şekilde yatırılıp hem kendisine hem de uygulayıcıya zarar vermeyecek şekilde zapturapt altına alınması gerekir. Elektriksel uyarımları ileten prob, vazelin gibi kayganlaştırıcılar ile ince bir tabaka halinde kayganlaştırılır ve rektumdan yavaşça 8-10 cm kadar içeri sokulur. Verilecek akımların düşük voltajdan başlayarak (5-8V) 2-3 saniye kadar akım verilmesi sonra 8-10 saniye dinlendirilmesi şeklinde yapılması gerektiğinde voltajı artırmak ya da azaltmak yoluna gidilmesi tavsiye edilmektedir (Shipley ve ark 2007). Ancak bazı araştırmacılar akım uygulanan süre ile uygulanmayan latent dönemin eşit olması gerektiğini savunmaktadırlar (Çoyan ve ark 2002). Bu işlemin devamında spermalar damlama şeklinde veya fışkırma şeklinde sperma toplama kadehine alınır (İleri ve ark 2000, Ak 2005a).

Suni vajen yöntemi ile kıyaslandığında elektroejakülatörle alınan sperma hacminin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bunun sebebinin uygulanan elektrik akımının erkek eklenti bezlerinin salgılarını artırmasıdır. Ancak, sperma hacminin artması ile alınan toplam spermatozoon sayısının doğru orantılı bir şekilde artmadığı ve spermatozoon yoğunluğunun suni vajen yardımı ile alınan spermaya göre elektroejakülatör yönteminde daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Malejane 2014). Yine suni vajen yöntemi ile toplanan spermanın, elektroejakülatör yardımı ile toplanan spermaya kıyasla soğuk şoku hassasiyetinin düşük olduğu bildirilmektedir (Marco-Jiménez ve ark 2005).

1.4.3 Aşım sonrası spermanın suni vajenden toplanması

Bu yöntem koçların, östrus göstermeyen koyunlara atlatılması ve ejakülatların vajinadan özel pipetler ya da kaşık yoluyla geri alınması temeline dayanmaktadır. Toplanılacak sperma vajen kaynaklı her türlü kontaminasyona açık olduğundan ve ejakülatın tam olarak toplanmasının mümkün olamayacağından dolayı günümüzde tercih edilmeyen bir yöntemdir (İleri ve ark 2000).

1.5 Koçlarda Spermatolojik Muayeneler ve Önemi

Spermatolojik muayeneler, bir hayvanın damızlık olarak kullanılabilir olup olmamasının reprodüktif organ muayeneleri vasıtasıyla kontrol edilmesi, olası hastalık ya da bozukluklar ile üreme kabiliyetinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilir (Chenoweth ve Lorton 2014). Dölleme yeteneği ile ilgili spermatolojik parametrelere odaklanmadan önce, hayvanın dölleme kapasitesini belirlemek amacıyla fiziksel muayene, libido ve çiftleşme yeteneği, iç ve dış reprodüktif organların incelenmesi gibi birtakım muayenelerden geçmesi şarttır (Hafez ve Hafez 1993, İleri ve ark 2000).

Koç spermasının farklı kriterlere göre değerlendirilmesine yönelik çok sayıda test bulunmaktadır. Bunları makroskopik muayeneler, mikroskopik muayeneler ve ileri teknikler olarak sınıflandırabiliriz.

1.5.1 Makroskopik muayeneler

Spermanın değerlendirilmesinde mikroskop veya başka bir cihaza gerek duyulmaksızın görsel olarak gerçekleştirilen muayenelerdir. Hacim, renk, vizkozite (kıvam), koku koç spermasının makroskopik olarak incelenebilen muayene çeşitleridir. Koç spermasında kitle hareketi muayenesi bir mikroskoba gerek duymadan gözle görülebildiği için bazı araştırmacılar tarafından makroskopik muayeneler içerisine dâhil edilmiştir (İleri ve ark 2000).

Hacim

Bir ejakülasyonda elde edilen sperma miktarı olarak adlandırılan hacim, erkek kuzularda 2-2,5 aylık yaştan itibaren üretilmeye başlar ve hayvanın 18 aylık olmasından sonra 4 yaşına kadar olan süreçte artarak devam eder. Sağlıklı ergin bir koçtan alınan sperma hacmi değişkenlik göstermekle birlikte 0,5-2,0 ml civarında, ortalama 1 ml'dir. (Maxwell ve Salamon 1993). Koçların sperma hacimleri genel olarak mevsime, hayvanın yaşına, bakım ve beslenmesine, hastalık durumuna, sperma alma yöntemine, sperma alma sıklığına, spermayı alan kişiye, ortamda dişi varlığı olup olmamasına ve koçun performansına bağlı olarak değişmektedir (Evans ve Maxwell 1987, Gökçen 1990). Koç spermasının hacmi diğer birçok çiftlik hayvanının hacmine oranla düşüktür.

Elde edilen ejakülatın sperma içermemesi aspermi, olması gereken hacimden daha düşük olması hipospermi ve olması gereken hacimden daha yüksek olması durumu ise hiperspermi olarak adlandırılır (İleri ve ark 2000).

Renk

Spermatozoon yoğunluğu, eklenti bezlerinin salgısı ve spermanın kıvamı ile ilişkili olarak sağlıklı bir koç spermasının rengi yoğunluktaki düşüğe bağlı olarak açık kremden koyu kreme kadar değişiklik gösterebilmektedir. (İleri ve ark 2000, Sevinç 1977). Bahsi geçen bu renklerin dışında görünen renk değişimleri hastalık kaynaklı olarak değerlendirilirler. Spermanın kırmızı-kahverengi bir renkte görünmesi ejakülatın kan ile (hemospermie), sarı renkte görünmesi idrar ile (ürospermie), sarı-yeşilimsi bir renkte görünmesi de irin ile (pyospermie) kontamine olduğunun göstergesidir. Sperma içerisinde görünen diğer yabancı maddeler tortu veya partiküller şeklinde gözlemlenebilir (Sevinç 1977, Hafez ve Hafez 1993, İleri ve ark 2000).

Koku

Spermanın kendine has bir kokusu vardır. Bu koku dışındaki kokuların varlığı patolojik bir durum olarak değerlendirilmektedir (Sönmez 2013).

Vizkozite (Kıvam)

Tanım olarak vizkozite sıvıların akmaya karşı gösterdiği direnç olarak adlandırılmaktadır. Spermanın kıvamı vizkozimetre ile ölçülebileceği gibi kıvam muayenesini vizkozimetre cihazı kullanmadan 0-5 arası skaladan da subjektif olarak değerlendirebilmektedir (Mert ve ark 2016). Yani bir başka deyişle deneyimli araştırmacılar kıvamın subjektif değerlendirmesi ile spermanın içerdiği spermatozoon konsantrasyonu hakkında fikir sahibi olabilirler (İleri ve ark 2000).

Yoğun spermatozoon içeriğinden dolayı normal bir koç sperması koyu kıvamlıdır (Çoyan ve ark 2002). Kıvam akışkanlıkla ters, yoğunlukla doğru orantılıdır. Vizkozitenin yüksek olduğu sperma içerisinde, progresif motil spermatozoonların ilerleme hızları daha düşüktür (Alçay 2015).

Kitle Hareketi

Kitle hareketi genel olarak, spermatozoonların toplu halde dalgalanma şeklindeki hareketleri olarak tanımlanmaktadır. Spermatozoon konsantrasyonu yoğun olan koç ejekülatları mikroskopun yanı sıra çıplak gözle de incelenebilir. (Çoyan ve ark 2002). Sperma toplama kadehine alınan spermalar hafifçe ışığa tutulur ve dalgalanma hareketinin varlığı gözlemlenir. Değerlendirmede ++++ puanlama sistemi (+, ++, +++, ++++) kullanılır. +++ ve ++++ geçer kriter olarak kabul edilir. Şayet spermada yoğun dairesel hareketler ve kaynama şeklinde bir hareket mevcutsa spermatozoon yoğunluğunun fazlalığından bahsedilebilir. Kitle hareketinin derecesi ile spermatozoon yoğunluğu arasında pozitif bir korelasyon vardır (Evans ve Maxwell 1987, İleri ve ark 2000).

1.5.2 Mikroskopik muayeneler

Sperma kalitesinin değerlendirmesinde ayrı bir öneme sahip olan bu testler genellikle spermatozoonların canlılığı ve morfolojisinin mikroskop vasıtasıyla değerlendirilmesine dayanmaktadır.

Kitle Hareketi

Kitle hareketi koç, teke, horoz gibi yoğun spermatozoon içeren ejakülatlarda gözle görülebileceği için bazı araştırmacıların da belirttiği üzere makroskopik muayenelerde de bahsedilmiştir. Spermanın kitle hareketine bakarak motilitesi, yoğunluğu ve fertilitesi hakkında bilgi sahibi olabiliriz, zira aralarında önemli bir ilişki vardır. Bu nedenle kitle hareketinin gözlemlendiği koç, teke gibi bazı türlerde bu muayenenin önemi büyük rol oynamaktadır (İleri ve ark 2000).

Mikroskopik muayenede taze ve sulandırılmamış sperma örneği kullanılır. Alınan bir damla örnek (5 µl) önceden ısıtılmış ve takribi 37 °C olan lam üzerine damlatılarak ısıtma tablalı ışık mikroskobu ya da faz kontrast mikroskop üzerinde 100x büyütme kullanılarak incelenir. Damlacıkta gözlemlenen dalgalanma, kaynama veya girdap benzeri hareketler derecelendirilerek puanlanır. Puanlama yöntemi araştırmacılara göre değişiklik göstermekle birlikte 0-5 ya da 0-10 arası puanlama kullananlar ve ++++ değerlendirme sistemini kullananlar mevcuttur (Hafez ve Hafez 1993, İleri ve ark 2000, Ak 2005b) Hangi sisteme göre değerlendirilirse değerlendirilsin spermanın kitle hareketi muayenesi ile spermatozoon motilitesi, yoğunluğu ve potansiyel fertilité yeteneği hakkında bilgi sahibi olunur (Hafez 1993).

Yoğunluk

Spermatozoon yoğunluğu, birim hacimde yer alan (ml) spermatozoon sayısını ifade etmektedir. Spermada yoğunluk tayini hemositomerik yöntem, fotolometrik yöntem ve elektronik sayaç yöntemi gibi farklı yöntemlerle yapılabilmektedir. Nativ koç spermasının yoğunluğu $2-3 \times 10^9/\text{ml}$ 'dir. Spermada konsantrasyon tayinin yapılması kullanılacak sulandırıcı dozunun ayarlanması için önem taşımaktadır (Hafez 1993).

Koçların spermatozoon yoğunlukları genel olarak mevsime, hayvanın yaşına, bakım ve beslenmesine, hastalık durumuna, sperma alma yöntemine, sperma alma sıklığına, spermayı alan kişiye, ortamda dişi varlığı olup olmamasına ve koçun performansına bağlı olarak değişmektedir (Evans ve Maxwell 1987, Gökçen 1990). Yine elektroejakülatör kullanılarak alınan koç spermasının seminal plazma hacminin yüksek

olmasından dolayı birim hacimdeki spermatozoon yoğunluğu düşük olmaktadır (Marco-Jiménez ve ark 2005).

Genel olarak bir spermanın yoğunluğu hemositometrik yöntem kullanılarak belirlenmektedir. Bu amaçla pratikte en çok bu alanda kullanılan özel lamalar (Thoma, Neubauer, Petroff-Hauser, Improved Neubauer, Makler® chamber, Burker vb.) tercih edilmektedirler. Spermanın yoğunluğunu belirleyebilmek için canlı spermatozoonları öldürmek/hareket etmelerini engellemek gerekmektedir. Bu amaçla farklı tampon çözeltiler (glutaraldehit, formol sodyum sitrat, formol-saline vb.) 1/200 oranında kullanılmaktadır. Hareketleri durdurulan spermalar homojen bir şekilde karıştırılıp mikroskopta 100x-200x'lik büyütme kullanılarak baş kısımları sayılarak muayeneye tabi tutulur. Sayım için kullanılan lamlarda iki ayrı sayım alanında 25 büyük, 16 küçük kare mevcuttur (Thoma Lamı 16 büyük 25 küçük kareden oluşur). Sayım işleminin sağlıklı sonuç vermesi adına en az 5 büyük karenin sayılması tavsiye edilir.

$$\text{Sperma yoğunluğu} \left(\frac{\text{Hücre}}{\text{ml}} \right) = \frac{A}{\frac{1}{B} + \frac{N}{25} + \frac{1}{10}}$$

A = İki farklı alanda sayılan sperma sayısı

$$B = \text{Sulandırma Oranı} \left(\frac{1}{200} \right)$$

N = Sayılan büyük kare sayısı

$$\frac{1}{10} = \text{Kullanılan lam hücresinin derinliği}$$

Şekil 1.1. Yoğunluk hesaplama

Formül ile mm³ hacminde mevcut olan spermatozoon sayısı belirlenmektedir. Elde edilen sayının ml'deki (cm³) spermatozoon sayısının ifade etmesi için 1x10³ ile çarpılması gerekmektedir. Bulunan sonucun ejakülat hacmi ile çarpılması sonucu ejakülattaki toplam spermatozoon sayısı hesaplanmış olur (Hafez ve Hafez 1993).

Günümüzde gelişen teknolojik süreçlerle birlikte, spermatozoon yoğunluğunu belirlemek amacıyla kolorimetreler, fotometreler ve spektrofotometreler gibi otomatik aygıtların kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu aygıtlar, kolaylık ve zaman tasarrufu sağlamakla birlikte, belirli zamanlarda düzenli olarak kontrol ve kalibrasyona ihtiyaç duymaktadırlar.

Hemositometrik yöntemle kıyasla, bu aygıtlar daha çabuk ve tekrar edilebilir doğrulukta sonuçlar sunmaktadır. Spermanın yoğunluğu ayrıca flow sitometri aygıtları kullanılarak da değerlendirilebilmektedir. Bu cihazlarda sperma sıvı hâlinde bir akışla yabancı maddeler ve partikülleri önemsemeden bireysel olarak değerlendirilmektedir (Evenson ve ark 1993). Ayrıca, günümüzde bilgisayar destekli sperm analiz cihazları (CASA) kullanılarak da yoğunluk tespiti mümkündür. Bu yöntem, daha önceki hemositometri gibi kullanılan yöntemlere göre daha hızlı bir şekilde sonuç alınmasının yanı sıra, daha objektif verilere ulaşma imkânı tanımaktadır (Amann ve Waberski 2014).

Motilite

Spermatozoon hareketleri genel olarak dörde ayrılmaktadır. Bunlar ileriye/progresif hareket, dairesel/sirküler hareket, yerinde titreşme/vibratör hareket ile geriye/revers hareket olarak tanımlanmaktadır (Hafez 1993). Spermatozoonların başı yönünde ileri ve doğrusal hareket edenlerinin tüm spermatozoonlara oranına motilite, bu yeteneğe sahip olan spermatozoonlara da motil spermatozoonlar denmektedir.

Spermanın dişi genital kanalında ilerleyerek fertilizasyonun gerçekleştiği oviduktun ampullasına ulaşabilmesi, özellikle oosit yüzeyinde yer alan kumulus hücreleri ve zona pellucida bariyerini başarıyla geçmesine bağlı olarak, gebeliğin başarılı bir şekilde elde edilmesinde kritik bir öneme sahiptir (İleri ve ark 2000, Sönmez 2013). Sadece baş yönünde ileri yönlü düzgün doğrusal hareket eden spermatozoonların fertilizasyon bölgesine ulaşabilmesi, potansiyel fertilitenin belirlenmesinde motilite muayenesinin büyük bir önem taşıdığını ve bu ikili arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermektedir (Çoyan ve ark 2002, Hafez ve Hafez 1993, İleri ve ark 2000, Sönmez 2013).

Motilite muayenesinde yoğun ejakülatlar özellikle birkaç kat sulandırılarak seyreltikten sonra muayene edilmelidir. Kullanılacak seyrelticinin tampon özellikli ve (sodyum-sitrat, izotonik sodyum klorür gibi) sperma ile aynı sıcaklıkta olması, önceden ısıtılmış lam üzerinde muayene edilmesi önem arz etmektedir. Sulandırılan örnekten alınan bir miktar (3-5 µl) sperma lam üzerin alınarak lamel ile kapatılır. Isıtma tablalı faz kontrast mikroskopta ve 400'lük büyütmede değerlendirilir. Her ne kadar subjektif bir değerlendirme yapılmış olsa da doğruluğun en üst seviyede olması için lamel

kapatıldıktan sonra titreşim kaynaklı akışın durması beklenmelidir. En az 3 ayrı alan incelenerek ileri doğru düzgün doğrusal hareketi tespit edilen spermatozoon oranı yüzde olarak hesaplanır (İleri ve ark 2000, Sönmez 2013).

Spermatozoon motilitesi, sulandırıcının içeriği, sulandırma yöntemi, ortam sıcaklığı, ozmotik basınç, süre, metabolit artıklar, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve hijyen koşulları gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Hafez 1993).

Ölü/Canlı Spermatozoon Oranı ve Morfolojik Bozukluklar

Her ejakulat içerisinde belli oranda morfolojik bütünlüğü bozulmuş ve/veya canlılığını kaybetmiş spermatozoonlar bulunmaktadır. Ancak damızlık olarak kullanılacak bir koç spermasında bu oranın %15-20'yi geçmemesi beklenir (Ak 2005b).

Ölü/canlı oranı veya yapısal bozuklukların tespitinde faz kontrast ve ışık mikroskopunun yanı sıra detaylı morfolojik muayene için elektron mikroskobu da kullanılabilir. Ölü spermatozoonların ayırt edilmesinde, hücre zarı geçirgenliği ile ilgili eozin-nigrozin, propidyum iodid ve karboksifluoresin diasetat gibi vital boyalar kullanılmaktadır. Ölü spermatozoonların tespitinde en yaygın olarak kullanılan yöntem ise eosin-nigrosin boyama yöntemidir. Vital bir boya olan eosin, ölü spermatozoonun membranını geçerek sitoplazmayı pembe-kırmızı renkte boyarken, canlı spermatozoonun hücre membranı eosin boyasını geçirmediği için sitoplazma boyanmaz. Nigrosin lam üzerinde negatif kontrast oluşturmak için kullanılan fon (zemin) boyasıdır. Membran bütünlüğüne göre farklı tepkiler veren bu boyaların etkileri, kullanılan boya miktarı, lamın ıslığı, frothinin kalınlığı, kuruma sıcaklığı, sperma sulandırıcısının yapısı ve spermatozoon sayısı gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Ayrıca, uygulama yöntemleri ve farklı uygulayıcılar arasında da sonuçlarda farklılıklar görülebilmektedir (Nur ve ark 2011). Hareketli spermatozoonlar canlı olarak değerlendirilse de, membran geçirgenliği bozuk olabilir. Bu nedenle, ejakülatındaki canlı spermatozoon oranı, fertilitenin değerlendirilmesinde motiliteyi destekleyen bir önem taşır. Ejakülatındaki tüm spermatozoonların ölü olduğu duruma "nekrozoospermia" denir. Sağlıklı bir koç ejakülatında olması beklenen canlı spermatozoon oranı en az %80'dir. Yüksek oranda ölü spermatozoon içeren ejakülatların, tohumlama amaçlı kullanılmasının uygun olmadığı

çünkü bu durumun sperm membran yapısını bozan serbest oksijen radikallerinin artışına neden olabileceği ifade edilmektedir (Tekin 1994, Tümen ve ark 1991).

Morfolojik bozuklukların belirlenmesinde farklı sınıflandırmalar kullanılmaktadır. Bazı araştırmacılar primer bozukluk olarak spermatogenezis sırasında meydana gelen bozuklukları tanımlamış (armut başlı, dar başlı, çift başlı, abaksiyal, paraksiyal, retroaksiyal bağlanma, keskin kıvrık, fibrilli kuyruk vb), sekonder bozukluk olarakta spermatozoonların epididimal kanal sisteminden geçiş esnasında meydana gelen bozuklukları tanımlamışlardır (kuyruksuz baş, proksimal ve distal damlacıklık, kıvrılmış kuyruk vb). Yine bir başka değerlendirmede bazı araştırmacılar morfolojik bozukluğun derecesine göre majör ve minör bozukluk olarak sınıflandırma yapmışlardır (Morrow 1986). Diğer bir sınıflandırma yönteminde spermatogenezis sırasında meydana gelen bozukluklara birincil, epididimal kanal sistemi geçişinde meydana gelen bozukluklara ikincil ve ejakülasyon sırasında veya sonrasında meydana gelen bozukluklara da üçüncül bozukluklar denilmektedir (Hafez 1993).

Günümüzde ise morfolojik bozuklukların sınıflandırılmasında genel olarak bozukluğun yer aldığı bölge dikkate alınmaktadır. Bu sınıflandırma akrozom, baş, implantasyon çukurluğu, başın ortaya bağlanması ile ilgili, orta ve kuyruğa ait şeklindedir (Ak 2005b). Tüm bu farklı sistemlerde morfolojik olarak bozukluk oranını belirlemek amacıyla rose bengal, çini mürekkebi, giemsa, metilviolet, opal mavisi gibi çeşitli boyama teknikleri ve Hancock Solüsyonu gibi tespit solüsyonlarının da kullanımı söz konusudur (Ak 2005b).

1.5.3 Hipoozmotik şişme testi (HOST)

Hipoozmotik şişme testi spermatozoonlarda fonksiyonel membran bütünlüğünün tespitinde kullanılmaktadır. Spermatozoonlar, düşük ozmotik basınca sahip ortamlara maruz kaldıklarında, hücre içi ve çevresindeki ozmotik basınçları düzenlemeye yönelik membransel reaksiyonlar sergilerler. Spermatozoonların membran yapıları yarı geçirgendir ve hipoozmotik bir ortamda hücre içerisine sıvı alarak şişmektedirler. Özellikle baş bölümleri şişerek kuyruk kısımları kıvrılmaktadır. Bu test temelde canlı spermatozoonun membran bütünlüğünün sağlam olup olmaması testidir.

1.5.4 Gelişmiş spermatolojik muayene yöntemleri

Zaman içerisinde değişen ve gelişen biyoteknolojik cihazlar sayesinde daha güvenilir ve detaylı sonuçlar verebilen spermatolojik analiz yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan en bilineni bilgisayar destekli sperma analiz cihazı CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) ve Akış sitometri (Flowcytometri) cihazıdır.

Bilgisayar Destekli Sperm Analiz Cihazı (CASA)

1979 yılında Dott ve Foster tarafından ilk kez CASA cihazının geliştirilmesine kadar (Verstegen ve ark 2002) sperma kalitesinin belirlenmesinde klasik yöntem olarak mikroskop kullanılmıştır. Sahada yaygın olarak kullanılan ve göz vasıtasıyla yapılan ilk motilite analizi olarak kabul edilen bu yöntemde değerlendirmenin subjektif olması, analiz edilen hücre sayısının düşük olması, düşük yinelenebilme özelliği, sperma hareketlerinin dış faktör etkilerine açık olması ve analiz için uzun zamana ihtiyaç duyulması gibi dezavantajlar mevcuttur (Foote 2002).

CASA önce Rothschild ve daha sonra da Elliott tarafından basit bir düzenele spermanın objektif olarak muayene edilebilmesi amacıyla mikroskopta görünen spermatozoonların iki saniye aralıklarla fotoğraflarının çekilmesi temeline dayanmaktadır. Çekilen bu fotoğraflarla hareketli ve duran spermatozoonları ilk kez belirlenmiştir (Elliott ve ark 1973). “Elliot Fotografik Prosedürü” adı verilen bu prosedür modifiye edilerek birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır (Makler 1978, Revell ve Wood 1978). Sonraki yıllarda analog kameralar vasıtasıyla sperma hareketleri 15 saniye boyunca kayda alınmıştır. Televizyon ekranlarında birkaç kişi tarafından ayrı ayrı muayene edildiği bildirilmiştir (Foote ve ark 1978).

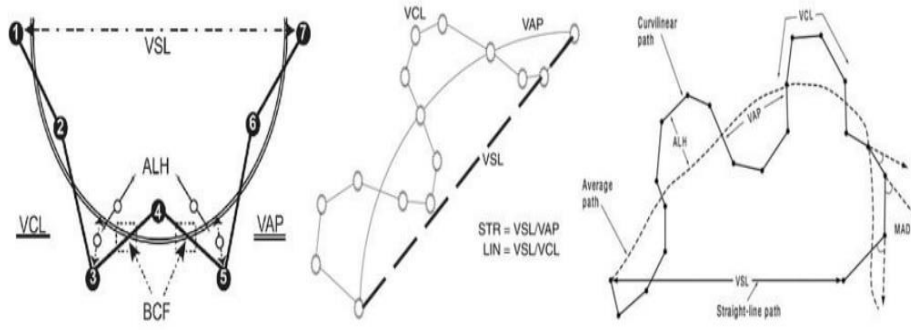
CASA'nın temeli olan bu sistemler bilgisayar sistemlerinin gelişmesi ile spermatozoonların real-time motilite ve kinematik değerlerinin belirlenmesine olanak vermiştir (Katz ve ark 1985). Genel olarak sistem içeriği bir bilgisayar birimi, bir kamera düzeneği ve ısıtma tablası ihtiva eden faz kontrast mikroskobunu içermektedir. Bu sistem sayesinde spermanın motilitesinin yanında hareketle ilişkili olarak kinematik hareket parametreleri de değerlendirilmektedir (Hafez ve Hafez 1993). CASA kontrollerinin

gerçekleştirilmesi için sisteme uygun olarak tasarlanmış lamalar (Leja vb.) bulunmaktadır. Lamaların farklı alanlarında değişen bulguların elde edilebileceği, lamın gözlerinin az doldurulması durumunda yoğunluk verilerinin farklılık gösterebileceği rapor edilmiştir (Douglas ve ark 2005a, 2005b).

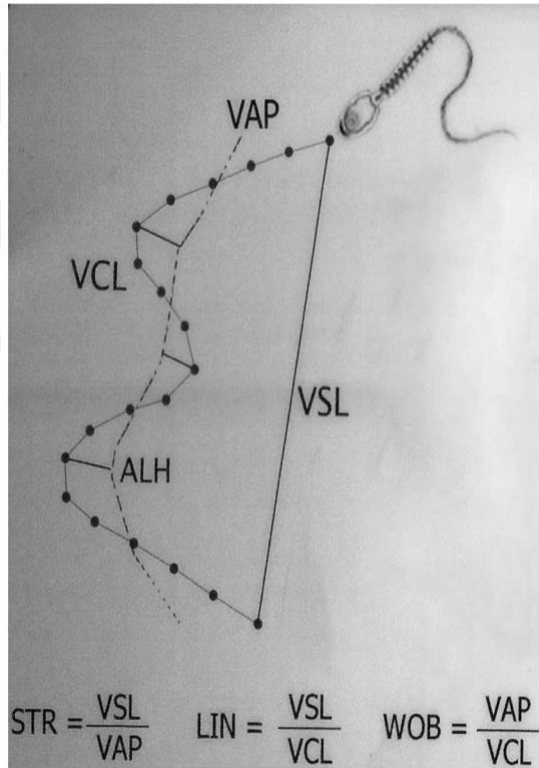
Bilgisayar destekli analizlerde total motilite (TM); hareket yeteneği olan spermatozoonların tüm spermatozoonlara oranıdır. Progresif motilite (PM); başı doğrultusunda ileriye yönlü hareket gösteren spermatozoonların tüm spermatozoonlara oranını ifade etmektedir. Nonprogresif motil spermatozoon hareket yeteneği olan ancak kuvvetli olmayan, doğrusal yolu takip etmeyen ya da olağandışı hareket eden spermatozoonları, immotil spermatozoonlar ise hiçbir şekilde hareketlilik göstermeyen spermatozoonları ifade etmektedir (Verstegen ve ark 2002, Foote 2002).

CASA cihazında analiz edilen parametreler, spermanın nativ ya da donmuş-çözülmüş olmasına, kullanılan sistemin özelliklerine, bağlı olan kamera sisteminin görüntü frekansına, analizler tercih edilen lamın türüne, inceleme sıcaklığına, cihaz parametrelerinin kalibrasyonuna, cihazın bakım ve kontrollerinin zamanında yapılup yapılmamasına ve uygulamayı yapan araştırmacının uzmanlığı gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilir Özellikle kullanılan lamın türü ve kameranın frekansı (25, 50, 100, 200 Hz) oldukça önem taşımaktadır (Mortimer 2000, Verstegen ve ark 2002, Castellini ve ark 2011). Bu sistemler, morfometrik analizleri kısa süre içinde yüksek doğruluk ve yinelenebilme düzeyinde analiz edebilme özelliğine sahiptir.

CASA cihazı, total motilite (%); progresif motilite (%); spermatozoon kinematik hız parametreleri olan (VCL) spermatozoon başının 2-boyutlu gerçek eğrisel bir yoldaki hareketi sırasında katettiği hızı $\mu\text{m/s}$; (VSL) spermatozoon başının iki nokta arasındaki doğrusal mesafeyi $\mu\text{m/s}$; (VAP) spermatozoon başının katettiği ortalama mesafedeki hızı $\mu\text{m/s}$ olarak göstermektedir. Ayrıca spermatozoonların izlediği yol ve gittiği mesafe hakkında bilgi veren (STR) ortalama yolun doğrusallığını (%) yani $(\text{VSL}/\text{VAP} \times 100)$; (LIN) eğrisel yolun doğrusallığını (%) oranını yani $(\text{VSL}/\text{VCL} \times 100)$ ifade etmektedir (Verstegen ve ark 2002).



Şekil 1.2. CASA hareketleri ve terminoloji görselleri



Şekil 1.3. Spermatozoon hareket özellikleri

Akış Sitometri Cihazı (Flowsitometre)

Akış (flow) sitometrisi yöntemi temelde cihazın kapillar kanal sistemine yönlendirilen çok sayıdaki spermatozoonun muayene türüne özgü floresan boyalar ile işaretlenmesi ve kısa sürede yüksek doğrulukla değerlendirilmesi prensibine dayanmaktadır (Gillan ve ark 2005).

Floresan ataçmanlı faz kontrast mikroskobu ve akış sitometrisi canlılık, mitokondriyal aktivite, kapasitasyon, akrozom membranı, spermatozoon membranı, DNA fragmentasyonu ve oksidatif stres gibi pekçok spermatolojik analizin yapılmasında kullanılmaktadır. Günümüzde sperma değerlendirme konusunda çalışan her araştırmacının zaman ve doğruluk bakımından en büyük yardımcısı olarak kullandığı akış sitometrisinin önemli bir avantajı da yüksek düzeyde deneysel tekrarlanabilirliktir. Aynı zamanda başka yöntemlerle tespit edilemeyen spermatozoon popülasyonları arasındaki küçük nüansların tespiti için de hassas bir yöntemdir (Gillan ve ark 2005).

Bilindiği üzere spermatozoonlarda plazma membranı, akrozom membranı ve mitokondri kriyoprezervasyon esnasında en çok etkilenen hücre yapıları arasındadır (Watson 2000). Yine çözüm sonu spermatozoonların plazma membran ve akrozom bütünlüğü (PMAI) ve mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) değerleri başarılı bir fertilizasyonun önemli kriterleridir. Membranda oluşan fiziksel ve fonksiyonel bütünlük hasarları, spermatozoonun fertilizasyon yeteneğinin azalmasının bir göstergesidir (Silva ve Gadella 2006). Tüm hücresel fonksiyonlar için gerekli enerji kaynağı olan mitokondri aynı zamanda spermatozoon motilitesi için de büyük önem taşımaktadır. Hal böyleyken plazma veya akrozom membranındaki hasarlar erken akrozom reaksiyonunu tetikleyerek fertilitede önemli düşüslere neden olabilmektedir (Garner ve ark 1997, Wassarman 1999).

Membran Bütünlüğü

Spermatozoon membran bütünlüğü floresan ışık altında direkt olarak ışıma yapan (Hoechst 3358, PI, YoPro-1 vb.) ya da tek başlarına floresan ışık altında yansıma göstermeyen boyalar (CFDA, SYBR-14 vb.) olmak üzere ikiye ayrılır. Bu boyaların ışıma yapabilmeleri hücre içerisinde bulunan enzimler tarafından hidrolize edilmelerine bağlıdır.

Koç spermatozoonlarının membran bütünlüğünün tespitinde ikili boyama yöntemi CFDA-PI (5(6)-carboxyfluorescein diacetate-propidium iodide) kombinasyonu yaygın olarak tercih edilmektedir. CFDA hücre içinde yeşil renkte ışıma yapar, PI ise membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücrelerin mebranlarından geçerler. Spermatozonun DNA'sına bağlanarak kırmızı renkte ışıma yaparlar CFDA-PI boyaması ile hücre canlılığı ve

membran bütünlüğü muayenesinin yanında, hücre içi enzimatik aktivite kontrolü de sağlanmış olur (Garner ve ark 1986).

Akrozom Bütünlüğü

Spermatozoon akrozom bütünlüğü, fertilizasyon için esastır. Çeşitli floresan olmayan boya veya tespit solüsyonları ile akrozom bütünlüğünün muayenesi gerçekleştirilebilse de günümüzde floresan boyama teknikleri araştırmacılar tarafından daha çok tercih edilmektedir. Bu amaçla; FITC-PNA (fluorescein isothiocyanate labeled peanut agglutinin) (Marco-Jiménez ve ark 2005) ve FITC-PSA (fluorescein isothiocyanate labeled pea plant agglutinin) (Collodel ve ark 2012) floresan boyaları daha çok tercih edilmektedir. Bu boyalar da PI ile kombine olarak kullanılmakta ve akrozomu “sağlam-canlı”, “akrozomu hasarlı-canlı”, “akrozomu sağlam-ölü” ve “akrozomu hasarlı-ölü” spermatozoon oranları tespit edilmektedir (Alvarez ve ark 2012).

Mitokondriyal Aktivitenin Belirlemesi

Spermatozoon mitokondriyal aktivitesinin belirlenmesinde Rhodamine 123 (R123), MitoTrackerTM (MITO) ve 5,50,6,60-tetrachloro-1,10,3,30-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) floresan boyaları kullanılmaktadır. JC-1 boyasının avantajı; mitokondriyal aktivite gösteren spermatozoonların tespitinin yanı sıra aktivitenin derecesini de (düşük ve yüksek aktivite) belirleyebilmesidir (Garner ve ark 1997).

Kapasitasyon

Spermalarda erken kapasitasyon ya da kapasitasyon benzeri olumsuz değişimlerin sebepleri arasında spermanın sulandırılması, sulandırıcıdaki kimyasal maddelerin kompozisyonu, membrandaki lipid oksidasyonu, ekilibrasyon - dondurma ve çözdürme aşamaları esnasında oluşan oksidatif stresler sayılabilir.

Kapasitasyonun mekanizması tam olarak açıklanamamış olmasına karşın spermatozoon membranındaki kolesterol kaybını takiben permeabilitenin bozulması ve hücre içi Ca^{++} iyonu girişine neden olması şekliyle kabul görmektedir (Harrison ve ark

1992). Bu nedenle kapasitasyonun tespiti membrandaki Ca^{++} iyonlarının işaretlenmesi ile yapılabilmektedir. Bu amaçla kullanılan ve Ca^{++} iyonu şelatörü olan klortetrasiklin (CTC) (Saling ve Storey 1979), kalsiyumla birleşince aktive olarak floresan ışımaya özelliği kazanmakta ve membran üzerindeki Ca^{++} iyonlarının lokalizasyonu belirlenerek kapasitasyon durumu değerlendirilebilmektedir. Spermatozoon baş kısmının tamamen boyanması “F patern” (F: full, non-kapasite), post akrozomal bölgenin boyanması “B patern” (B: banded, kapasite) ve ekvatoryal bölgenin boyanması “AR patern” (AR: akrozom reaksiyonu) olarak isimlendirilir (Fraser ve ark 1995).

1.5.5 Spermanın kriyoprezervasyonu

Günümüzde sıklıkla kullanılan reproduktif biyoteknolojilerin başında suni tohumlama yöntemi gelmektedir. Başarılı bir suni tohumlamanın anahtarı ise başarılı bir sulandırıcı ve kriyoprotektan kullanılarak dondurma-çözdürme işleminin gerçekleşmesidir. Kriyoprezervasyon işlemi ana hatlarıyla spermanın türe özgü bir sulandırıcı kullanılarak sulandırılması, 5°C’ye soğutulması, uygun metot seçilerek dondurulması ve çözündürülmesi aşamalarından oluşmaktadır.

Spermanın Sulandırılması

Koç sperması, membranında bulunan doymamış yağ asitlerince (fosfolipit) zengin olmasına bağlı olarak donma-çözünme işlemlerinin zararlı etkilerine karşı oldukça hassastır (Watson 1981). Yapısındaki bu farklılık, dondurma çözündürme gibi ani sıcaklık değişimlerinde ve faz geçişlerinde spermatozoonun membranında telafisi olmayan hasarlara yol açmaktadır (Watson 1995).

İyi bir sperma sulandırıcısı spermatozoon için yaşamsal öneme sahip gerekli olan enerji gereksinimini karşılamalı, spermatozoonu soğuk şokuna karşı korumalı, ortam pH dengesini sağlamalı ve ozmotik basıncını dengelemeli, optimal elektrolit dengesine sahip, mikrobiyal kontaminasyonu ve üremeyi engellemelidir. Tüm bunların yanı sıra spermatozoon kaynaklı metabolit artıkları ve serbest radikalleri elimine edebilmeli, aynı zamanda da dişi genital kanalda zararlı etki oluşturmamalıdır (Hafez 1993, İleri ve ark 2000).

Koç spermasının sulandırma oranı çoğunlukla hacim/hacim (v/v) oranında belirlenir, tercihen de tohumlama dozu göz önünde bulundurularak ayarlanmaktadır (Colas 1975, Fiser ve ark 1987). Düşük oranlarda sulandırıcı tercih edildiğinde, payetteki spermatozoon miktarı artacağı için fertilite şansının artacağı, ancak dondurma aşamalarında spermatozoonları donmanın zararlı etkilerine karşı koruyamayacağı ve çözüm sonu sperma kalitesini düşüreceği de bir gerçektir. Tam tersi durumda yüksek oranda sulandırmanın da spermatozoonların fertilizasyon kapasitesini düşüreceği ve akrozom bozuklukları oranını arttığı bildirilmiştir. (Gil ve ark 2000, Salamon ve Maxwell 2000, Ak ve ark 2010).

Spermatozoon metabolizması, içerisinde bulunduğu ortamda pH değişikliklerine neden olmaktadır. Bu sebepten dolayı sulandırıcı içerisinde Tris, Na sitrat vb. pH tampon maddelerinin bulunması elzemdir. Tris bazlı sulandırıcılarla kombine kullanılan yumurta sarısı, taşıdığı düşük yoğunluktaki lipoproteinler (LDL) sayesinde spermatozoon membranındaki fosfolipit bütünlüğünü korur ve hücrenin soğuk şokuna karşı direncini artırır (Evans ve Maxwell 1987).

Genel olarak koyunlarda uygulanan tohumlama tekniği dikkate alındığında, vaginal tohumlama için $100-400 \times 10^6$, laparoskopik tohumlama için $25-50 \times 10^6$ spermatozoon olacak şekilde sulandırma oranı gerekliliği bildirilmiştir (Fiser ve ark 1987, D'Allessandro ve ark 2001).

Spermanın Soğutulması

Spermanın soğutulması işleminin başlıca amacı spermatozoon metabolizma hızını yavaşlatmak ve hücreleri donma sürecine hazırlamaktır. Bu sayede, spermatozoonlar sahip oldukları enerji kaynaklarını daha uzun süre muhafaza edebilmekte ve daha az metabolit oluşumu sağlanmaktadır. Spermanın soğutulması süreci koçtan alındığı andan itibaren başlamaktadır. Sperma ejakülasyon sonrası vücut ısısına yakın bir sıcaklığa sahiptir. Soğutma için tercih edilen 5°C sıcaklığa erişme süresi genellikle 1-3 saat olarak uygulanmaktadır (Salamon ve Mawvell 1995b). Spermanın ısısının 30°C'den 15°C'ye düşürme hızının yüksek olması (2°C/dakika) spermatozoon üzerinde önemli ölçüde olumsuz etkiye sebep olmamaktadır. Ancak 10°C, 5°C ve 0°C gibi daha düşük sıcaklıklara

ulaşmak amacıyla uygulanan hızlı soğutma oranları çözüm sonu spermatozoon motilitesine zarar vermektedir (Fiser ve Fairfull 1986).

Hücrelerdeki dehidrasyon kaynaklı hiperozmotik şoka karşı yapılacak soğutmanın hızı, hücrelerin yeterince dehidre olmasına müsaade edecek kadar yavaş olmalı ancak hücre içindeki kalan sıvıyı donduracak kadar hızlı olmalıdır (Watson 2000). Aynı zamanda yapılacak yavaş bir soğutma, hücre içi suyun ozmoz ile dışarı çıkmasına müsaade ederek hücre içinde zarar veren ve letal etkili buz kristallerinin oluşumuna engel olur (Mazur 1984). Drobnis ve ark (1993), 15°C ile 5°C arası sıcaklıklarda spermatozoonun soğuk sokuna karşı oldukça hassas olduğunu ve soğutmaya bağı membransal yapı elemanlarında yıkımların oluştuğunu bildirmişlerdir. Holt ve North (1986), membran yapısında gelişen letal faz değışimlerin çoğunlukla 17-22°C arası sıcaklıklarda oluştuğunu, Wolf ve ark (1990), ise aynı etkinin 26°C sıcaklıktan itibaren başladığını rapor etmişlerdir. Fiser ve Fairfull (1986), özellikle 17°C ve daha düşük sıcaklıkların spermatozoonlar için kritik olduğunu vurgulamışlardır. Bu sebeplerden dolayı spermanın kriyoprotektan içermeyen medyumlar ile sulandırılması sonrası 5°C'ye soğutulma sürecinin yavaş ve kademeli bir şekilde, 2 saatten uzun bir sürede olması önerilmektedir (Evans ve Maxwell 1987, Salamon ve Maxwell 1995a).

Spermanın Dondurulması

Spermanın dondurulması, hücre veya dokulardaki canlılığın hasarsız ya da en düşük hasar ile ve fonksiyonelliklerini yitirmeden çok düşük sıcaklıklarda muhafazası işlemidir (Wetzels ve ark 1996, Akyol ve ark 2019). Spallanzani, 1776 yılında insan, kurbağı ve aygır spermasının kar içerisinde soğutulabildiğini ve ısıtma sonrasında motilite yeteneğinin tekrar kazanıldığını fark etmiştir. Sonraki yıllarda yürütölen çalışmalarda spermanın dondurularak saklanması düşüncesi giderek kuvvetlenmiştir. Ancak, kriyobiyoöji bilim alanının gerçek anlamda önem kazanması ve bu alanda yürütölen çalışmaların hız kazanması, gliserolün kriyoprotektif etkisinin keşfedilmesi ile başlamıştır (Polge ve ark 1949).

Spermatozoonların 5°C sıcaklığı düşürölmesiyle metabolik aktiviteleri azaltılmakta ve böylece daha uzun süre yaşamalarına olanak sağlanmaktadır. Yine de

kısıtlanan ama devam eden metabolik aktiviteler, hücrenin yaşlanmasını ve ölmesini engelleyememektedir. Yapılan araştırmalar, spermatozoonların -110°C ile -130°C arasında azot buharında dondurulması ve -196°C 'de depolanmasıyla yaşlanma sürecinin büyük ölçüde önüne geçilebileceğini göstermiştir (Medeiros ve ark 2002, Akyol ve ark 2019). Donma süreci, spermatozoonlar üzerinde fiziksel, biyokimyasal ve fonksiyonel hasarlara neden olmaktadır. Koç spermatozoonlarında daha çok akrozom, hücre membranı ve mitokondriyal heliksin bulunduğu orta kısımda fiziksel hasarlar meydana gelmektedir (Bailey ve ark 2000). Donma sürecinde hücre içinde oluşan dehidrasyon, büyük çaplı kristalleşme, yoğunluk artışı ve hücre dışı ortamın donması ile oluşan ozmotik basınç değişimleri nedeniyle hücre membranı ve akrozomda protein ve lipoprotein yapıları zarar görür (Hafez 1993). Donma hızı yavaş uygulanır ise; hücre uzun süre hipertonik solüsyona maruz kalır, hücre lipit ve protein kayıpları meydana gelir ve ROS üretimi artar. Donma hızının yüksek olması durumunda ise, termal şok şekillenir, hücre dehidrasyon yeterince gelişemez ve hücre içi letal kristal oluşumları meydana gelir (Hafez 1993). Donma sırasında oluşan kristalin yapısı; soğutma hızına, hücre içi ve dışındaki süspansiyonlara, sulandırıcı viskozitesine, membran geçirgenliğine ve meydana gelen ilk kristallere bağlı olarak değişir. Hücre hasarları minimize etmek için kristallerin küçük hacimde ve çok sayıda olması gerektiği bildirilmektedir (Ak ve ark 2010). Spermatozoonların membranlarındaki hasarların öncelikle dondurma- çözme işlemleri esnasında ısısının -15°C ile -60°C arasında iken meydana geldiği ve muhafaza ısısında (-196°C) aşırı bir hasar almadığı vurgulanmaktadır (Mazur 1984). Kristallenme çoğunlukla -6°C ile -10°C aralığında oluşurken (Morris ve Farrant 1972), koç spermatozoalarında kristallenmenin ve hasarların -10°C ile -25°C civarında şekillendiği gözlemlenmiştir (Salamon ve Maxwell 1995b).

Spermanın Çözdürülmesi

Spermatozoonların dondurulma aşamaları yaşama yetenekleri ve morfolojik bütünlüklerini koruması açısından ne kadar önemliyse çözme teknikleri de o derece önemlidir. Bir payet içerisindeki sperma için, -196°C 'den çözündüğü sıcaklığa ulaşmaya kadar geçen 30 saniyelik süre içerisinde -60°C ve -15°C arası çok kritik bir zamandır. Bu süreçte spermatozoonlarda ani sıcaklık değişimleri gelişmekte ve buna bağlı olarak hücre

içinde fiziksel, biyokimyasal ve fonksiyonel hasarlar oluşmaktadır (Salamon ve Maxwell 1995b). Spermanın çözündürülmesi esnasında hücre içinde mikrotorik rekristalizasyon adı verilen olay meydana gelir. Bu olay esnasında tekrar oluşan kristalize yapılar hücrelerde donma sürecinde olduğu gibi hasarlara yol açar. Yeniden oluşan bu kristalizasyonla oluşabilecek hasarları önlemek amacıyla spermanın hızlı bir şekilde çözündürülmesi gerekmektedir. Bu hızlı çözünme sürecinde hücre içi ve hücre dışı ortam arasındaki ekilibasyon hızlı bir şekilde sağlanmakta ve böylece spermatozoonların hücre dışı hiperozmotik ortama maruz kalma süreleri kısalmaktadır (Salamon ve Maxwell 2000). Konu hakkında spermanın farklı sıcaklık ve sürelerde çözündürülmesine dair pek çok çalışma mevcut olup, sıklıkla kullanılan yöntem 30 saniye süre ile 37°C sıcaklıkta çözdürme işlemine tabi tutulmasıdır (Pontbriand ve ark 1989, Salamon ve Maxwell 2000).

1.5.6 Sperma sulandırıcısına ilave edilen kriyoprotektanlar

Kriyoprotektanlar, genel olarak düşük molekül ağırlığına sahip, belirli oranlarda kullanıldıklarında toksik etki yapmayan, hücreleri donma esnasında meydana gelen ani sıcaklık değişimlerine, hücre içinde oluşan kristalizasyon ve dekristalizasyon oluşumlarına ve hücre membranının destabilizasyonuna karşı koruyan maddeler olarak tanımlanabilir. Bu koruyuculuklarını ortamda bulunan donmamış fraksiyon miktarını artırarak ya da iyon konsantrasyonunu azaltarak gösterirler (Payne ve ark 1994). Kriyo hasarların etkelediği başlıca nokta hücre membranı olarak kabul edilir. Dondurma işlemi spermatozoon membranının sıvı kristalizasyon fazdan jel fazına geçişlerinden dolayı bozulmasına neden olarak membran stabilizasyonunu etkileyerek soğuk şokunun gelişmesine ve kriyohasarlara yol açar (Quinn 1985, Watson 2000, Öztür ve ark 2019). Kriyoprotektanların koruyucu etkilerine rağmen dondurma çözdürme işlemleri sırasında spermatozoonlarda motilite, viabilite gibi parametrelerde azalma, dölleme yeteneklerinde kayıplar ve oksidatif hasarlar görülebilir (Sarıözkan ve ark 2010, Ofosu ve ark 2021, Monteiro ve ark 2022). Hücrenin kendi antioksidan sistemleri ile dondurma süreci sırasında oluşan serbest radikaller arasındaki dengesizlik olarak açıklanabilecek olan oksidatif stres bu hasarların en büyük sebebi olarak gösterilmektedir. Serbest radikallerin ortamda aşırı derecede bulunması membranlarda peroksidasyona yol açabilir ve membran hasarına, DNA ile ilişkili yaşlanmaya, apoptoz ve spermatozoonların hareketi için gerekli

olan enerjiyi sağlayan mitokondrilerin işlev bozukluklarına sebep olabilir (Watson 2000, Öztürk ve ark 2019). Yine de sulandırıcılara katılan antioksidan maddeler oksidatif hasarın etkilerini azaltmada ve dondurma sonrası sperm kalitesini iyileştirmede önemli rol oynarlar (Bucak ve ark 2020, 2021).

Kriyoprotektanlar sınıflandırılırken moleküler ağırlıklarına göre düşük ya da yüksek moleköl ağırlıklı kriyoprotektanlar, hücre zarını geçebilme yeteneklerine göre permeabl ya da non-permeabl protektanlar olarak adlandırılmaktadırlar. Moleküler ağırlığına göre sınıflandırıldıklarında düşük moleköl ağırlıklı kriyoprotektanlar dimetilsülfoksit (DMSO), etanol, metanol, propilen glikol (PG), etilen glikol (EG); yüksek moleküler ağırlıklı kriyoprotektanlar ise polivinil pirrolidon (PVP), polietilen oksit (PEO), hidroksietil nişasta (HES), polietilen glikol (PEG), polimerler, polisakkaritler, proteinler ve dextran şeklinde kategorize edilmektedir (Nash 1966).

Kriyoprotektan olarak tercih edilen maddeler hücre zarına girebilme özelliklerine göre hücre içine giren (permeabl) ve girmeyen (nonpermeabl) şeklinde ayrılırlar (Meryman 1971).

Hücre İçine Girebilen (Permeabl/ İnternal) Kriyoprotektanlar

Metil formamid, perseitol, adenitol, asetamid, metanol, DMSO, 1,2 propanediol, etilen glikol, gliserol gibi maddeler, çoğunlukla ufak yapıda, düşük derecelerde yüksek çözünme yeteneğine sahip, hücre içerisine penetre olabilen iyonik olmayan kriyoprotektanlardandır (Gao ve Crister 2000).

Kriyoprotektanlar, koruyuculuklarını, hücredeki sıvı kaybını düzenleyerek sağlarlar. Böylelikle protein yapılarını korur ve donma esnasında etraflarındaki elektrolit yüklerini düşürerek hücrelerde sıcaklık azalmasına bağlı olarak gelişen ozmotik büzüşmeyi indirgerler (De Leeuw ve ark 1993, Holt 2000).

Dimetil Sülfoksit (DMSO)

Dimetil sülfoksit, kimyasal formülü (C_2H_6OS) olan bir bileşiktir ve polar bir grup ile iki apolar gruba sahip olması sayesinde amfipatik özellik gösterir, yani hem hidrofilik

hem de hidrofobik özelliklere sahiptir. Bu özelliği, DMSO'nun su bazlı ve organik çözücüler içinde kolayca çözünebilmesine olanak tanır. Ayrıca, düşük moleküler ağırlığı sayesinde hızla plazma membranından geçebilir. Spermanın dondurulmasında DMSO'nun kriyoprotektif etkinliği çeşitli çalışmalarda incelenmiş ve türler arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Gliserol

Gliserol, yüksek hidrofilik özellikli bir poliol bileşiğidir. Yapısındaki üç hidroksil grubu sayesinde her bir gliserol molekülü üç su molekülüne bağlanabilme yeteneğine sahiptir. Molekül çapları küçük olduğu için hücresel porlardan rahat geçerler. Karbon ve hidroksil (C/OH) oranının denge içinde olması, donmanın spermatozoonlar üzerindeki olumsuz etkilerine karşı koruyucu bir etkinlik gösterir (Salamon ve Maxwell 1995b). Sıcaklık azaldıkça her bir su molekülü arasında oluşan hidroksil bağları sertleşir ve katı bir hal alır. Gliserol yapısındaki bu üç hidroksil grubu sayesinde sudaki hidrojen moleküllerine bağlanarak hücre içinde dehidrasyona yol açar ve büyük çaplı kristal oluşumunu engeller. Bazı araştırmacılar gliserolün extrasellüler ortamda etki ettiğini bildirmiş olsalar da (Amann ve Pickett 1987), intrasellüler olarak donma sürecinde plazma membranında bulunan fosfolipid gruplarına bağlandığı ve membran faz geçiş ısını düşürerek membranı stabil hale getirdiği, ozmotik basınç değişikliklerine karşı membranın esnekliğini artırdığı, membran füzyonunu başlatarak ve su geçirgenliğini artırarak çeşitli faz geçişlerinde avantaj sağladığı bildirilmiştir (Anchordoguy ve ark 1987, Noiles ve ark 1995, Katkov ve ark 1998). Bu özellikleri ile hücre içindeki protein ve enzimlerin donma sırasında denatüre olmasını önler, daha sağlıklı bir donma süreci sağlar; ancak bu etki koç sperması dondurulurken belirgin değildir (Mann ve White 1957). Gliserol ayrıca membran yapısının büyük ölçekli yeniden düzenlenmesine yol açarak, membran elektriksel kapasitansını azaltır ve böylece hücreler arası küçük bağlantı kanalları (Gap Junction) gibi yapıların oluşumunu sağlar (Kachar ve Reese 1985).

Gliserolün hücre üzerindeki çeşitli koruyucu etkilerinin yanı sıra toksik etkisi de bilinmektedir. Bu etki, gliserolün metabolize olması sonucu ortaya çıkan methlglycosal'un hücre membranı biyoenerji dengesini değiştirmesi ve ozmotik strese neden olmasıyla

meydana gelir. Bu etki, türe bağılı olarak değişebilir ve özellikle aygır, kanatlı, balık ve tavşanda oldukça belirgindir. Gliserol, bu türlere ait spermaların dondurulmasında kontraseptif etki göstererek fertilizasyonu engelleyebilir (Katkov ve ark 1998).

Gliserolün zararlı etkileri;

- Proteinleri denatüre eder (Alvarenga ve ark 2005).
- Sitozolün viskozitesini artırır.
- Spermatozoon kuyruğunda bulunan mikrotubullerin temel proteini olan α ve β tubulinlerin polimerizasyonu ve depolimerizasyonunda değişikliklere neden olur.
- Mikrotubuluslarda yapısal değişimlere neden olur.
- Biyoenerjetik dengeler üzerine etki eder.
- Plazma membranı ve glikokaliks üzerine direkt etki eder (Hammerstedt ve Graham 1992).
- Hücre membranına diğer kriyoprotektanlardan daha yavaş nüfuz ederek ozmotik stres oluşturur (Gilmore ve ark 1995).

şeklinde sıralanabilir.

Ayrıca, gliserolün dişi genital kanal mukozasında irritasyona sebep olduğu ve fertilizasyon oranını düşürdüğü bildirilmiştir (Abdelhakeam ve ark 1991). Gliserole ait olumsuz etkilerin, dondurma medyumunun içeriğine, gliserolizasyon yöntemine ve soğutma-dondurma hızına bağılı olarak değişebildiği belirtilmiştir (Fahy 1986, Salamon ve Maxwell 1995b).

Gliserolün kriyoprotektif özelliğinin keşfedilmesinden bu yana sperm kriyobiyolojisi alanında bir dizi araştırmaya konu olmuştur. Bu çalışmaların bir sonucu olarak, farklı türler için özelleştirilmiş birçok sulandırıcı çeşidi geliştirilmiştir. First ve ark (1957) tarafından koçlar üzerinde yürütülen çalışmada, süt bazlı yumurta sarılı sulandırıcıya farklı oranlarda (%6, %9, %12, %15) gliserol ilave edilerek spermalar dondurulmuş ve en yüksek spermatozoon canlılığı oranları %6 ve %9 gliserol içeren gruplarda belirlenmiştir. Ak (1990), boğa sperması üzerinde yaptığı çalışmada, süt bazlı

yumurta sarılı sulandırıcıya ilave edilen %5, %7 ve %9 gliserol oranlarının eritme sonrası spermatolojik özelliklerine etkisini inceleyerek %5 ve %7 gliserol oranlarını daha başarılı bulmuştur. Angora, Kilis ve Saanen ırkı tekeler üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise, %3, %5, %7 ve %9 gliserol konsantrasyonları ilave edilerek karşılaştırılmış ve optimal konsantrasyonun Angora ırkı için %5, Kilis ırkı için %5-9 ve Saanen ırkı için de %7 olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar aynı tür içinde farklı ırklar arasında gliserol oranının değişebileceğini ve farklı etkilere sahip olabileceğini vurgulamışlardır (Kulaksız ve ark 2013).

Koç spermasını dondurma sürecinde kullanılan gliserol oranı genellikle %4-6 aralığında optimal olarak belirlenmiştir. Ancak bu oranın sulandırıcıdaki ozmotik basınca bağlı olarak değişebileceği ifade edilmektedir (Gökçen ve ark 1983, Fiser ve Fairfull 1984). Ak ve ark (2010); koç spermasını dondurma işleminde gliserol eklenmemiş yüksek ozmotik basınca sahip sulandırıcılar kullanarak elde ettikleri başarılı motilite oranları ile gliserol içermeyen sulandırıcıların in vitro fertilizasyon çalışmalarında etkili olabileceğini göstermişlerdir. Birçok bilim insanının yaptığı çalışmalar gösteriyor ki gliserol ile spermatozoon etkileşimi, metabolizmanın yavaşladığı düşük sıcaklıklarda (5°C) daha sağlıklı olmaktadır (Colas 1975, Soylu ve ark 2007, Nur ve ark 2010, Ak ve ark 2010).

Metanol

Birçok mikroorganizmanın dondurulmasında kriyoprotektan olarak sıklıkla metanol ile çalışılmaktadır (Hubalek 2003). Metanolün pisi balığı, istiridye ve planktonik deniz larvaları gibi sucul türlerde gamet ve embriyo dondurma işlemlerinde tercih edildiğine dair pek çok literatür olmasına rağmen (Zhang ve ark 2005, Tervit ve ark 2005, Nascimento ve ark 2005), memelilerin üreme organ dokularında denendiğine dair çok az sayıda araştırma bulunmaktadır. Embriyo dondurma sürecinde atlarda gliserol ile benzer sonuçların elde edildiği ve kriyoprotektan olarak denenebileceği bildirilmiştir (Bass ve ark 2004)

Etilen Glikol (EG)

Etilen glikol, çoğunlukla anti-freeze olarak değerlendirilmektedir. Farelerde iskelet kaslarında ve oositlerinde kısıtlı etkileri olduğu bildirilmiştir (Hotamışlıgil ve ark. 1996). Sığırlarda 1,6 mol/L etilen glikol karışımı ile 30 dakika süreyle muameleye tabi tutulmasının embriyo gelişimlerine zararlı bir etkisinin görülmediği rapor edilmiştir (Takagi ve ark 1993a, 1993b). Farelerde yüksek oranda etilen glikolün geçirgenliğinin tespit edilmesinden dolayı, bu türe ait epididimal sperma, oosit ve embriyoların dondurulma protokollerinde kullanımına rastlanmaktadır (Shaw ve ark 1997).

Asetamid

Asetik Asit Amid ya da diğer adıyla Asetamid, embriyo dondurulmasında tercih edilen kriyoprotektanlardandır (Rall ve Fahy 1985). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, asetamidin embriyo membranından geçim hızının özellikle 8 hücreli aşamada bariz bir şekilde artırır (Pedro ve ark 2005), at spermasında ise yeterli canlılığı sağlayamadığına dair bulgular mevcuttur (Squires ve ark 2004).

Asetamid, farklı kriyoprotektanlarla birlikte denendiğinde tavşanlarda (Hochi ve ark 2001), farelerde oosit, ovaryum dokusu ve 2 hücreli embriyolarda (Nakagata 1989, Migishima ve ark 2003), domuz ve kobaylarda (Kono ve ark 1988, Yoshino ve ark 1993) olmak üzere pek çok farklı tür ve hücre çeşidinin dondurulmasında başarılı olmuştur. Ancak, ortama kriyoprotektif madde amaçlı katılacak asetamidin oransal uygulaması aşamasına özen göstermek gerekmektedir. Yüksek oranlardaki (%30-40) asetamid içerikli sulandırıcılar kullanıldığında fare embriyolarının dondurulmasının başarısız olduğu, çözündürme sonrasında morfolojik bozuklukların arttığı ve blastosist'e geçemediği bildirilmiştir (Mukaida ve ark 1998). Ek olarak, farelerde 1,5 mol/L asetamid bulunan sulandırıcıda kısa zaman işleme tabi tutulan embriyoların zararlı etkilerden çok az etkilendiği tespit edilmiştir (Pedro ve ark 2005).

Formamid

Formamid (metanamid), kriyoprotektan olarak nadiren tercih edilen bir maddedir. Moleküler ağırlığının ve vizkozitesinin düşük olması nedeniyle gliserol yerine alternatif olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir (Chian ve Quinn 2010). Formamid ve türevleri ile yapılan bazı çalışmalarda Metilformamid ve dimetilformamidin at spermasında gliserole eşit ya da daha iyi sonuçlar gösterdiği, dimetilformamidin aynı zamanda kaz spermasında çok iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Medeiros ve ark 2002, Lukaszewicz 2002, Squires ve ark 2004). Yine metil formamid ve dimetilformamidin diğer amidlere göre tavşan spermasında başarılı olduğu da bildirilmektedir (Hanada ve Nagase 1980). Metil formamidin, köpek spermasının dondurulmasında kriyoprotektan olarak iyi sonuçlar verdiği bildirilirken dimetilformamidin kriyoprotektan olarak kullanılmadığı vurgulanmıştır (Futino ve ark 2010). Farklı türler üzerinde başarılı olarak denenen formamid ve türevlerinin fare spermasında (metil formamid) kullanımının başarısız sonuçlar verdiği Sztein ve ark (2001) tarafından rapor edilmiştir.

Adonitol

Adonitoller alkoloid etkisine sahiptirler ve içerdikleri OH⁻ grupları sayesinde su ve plazma membranı ile sıkı hidrojen bağları kurarak kriyoprotektif etki gösterirler. Yapılarındaki OH⁻ gruplarının sayısı arttıkça gösterdikleri kriyoprotektan etkiler de artmaktadır (Utsumi ve ark 1992).

Farelerde sperma vitrifikasyonunda denenen adonitol, DMSO gibi daha sık tercih edilen kriyoprotektanlar kadar iyi sonuçlar vermemektedir (Sztein ve ark 2001).

Koç ve insan spermasının vitrifikasyonunda denenen farklı poliyoller ve adonitolün, tek başlarına gliserol kadar etki etmediği bildirilmiştir (Alvarez ve Storey 1993, Molinia ve ark 1994).

Diğer Alkoller

Dondurma ve uzun süreli saklanması tercih edilen etanol, üreme hücre ve dokularında tercih edilmemektedir. Dietilen glikol, trimetilen glikol, polipropilen glikol,

polietilen oksit gibi, pek çok alkol ve türevlerinin çeşitli alanlarda kullanımı mevcuttur (Hubalek 2003). Ayrıca, embriyo saklanması ksilitol, sorbitol, eritritol gibi poliyollerin denendiği gözlemlenmiştir (Utsumi ve ark 1992).

Hücre İçine Girmeyen (Non-permeabl/External) Kriyoprotektanlar

Hücre zarlarının sıvı ve katyonlara karşı penetrasyon özelliğini yükselterek ozmotik stres karşısında güçlü olmalarını sağlarlar. Ek olarak, hücrelerde donma-çözdürme esnasında lipid peroksidasyonu en aza indirerek hücreyi desteklerler. Nonpermeabl kriyoprotektanlara örnek olarak, polietilen glikol, dekstran, bovine serum albümin (BSA), ficoll 70, polivinil pirolidon (PVP) ve mannitol gösterilebilir. Çoğunlukla tercih edilen BSA, hücreleri yağ asitlerinin peroksidasyondan koruma konusunda ayrı bir öneme sahiptir (Kasai 1996).

Donma esnasında hücre içinde oluşan kristalizasyonun hücreler üzerine ölümcül etkisinin olduğu düşünüldüğünde, rafinoz, sükroz, glikoz ve trehaloz gibi yaygın olarak kullanılan sakkaritler, hücrede dehidrasyon oluşturarak kristalleşmeyi engelleyen maddeler arasında gösterilmektedirler (McWilliams ve ark 1995).

Hücre dışında geçirgen olmayan kriyoprotektanlardan laktoz, sükroz, d-mannitol ve trehaloz, hücrenin sıvı kaybının daha hızlı olmasını sağlayarak soğutma esnasında yaşama şansını yükseltmektedir. Örneğin, gliserol ve sakkaritler gibi bazı kriyoprotektanlar, proteinlerin donma sırasında denatürasyonunu engeller ve kolay eriyen kristallerin oluşumunu sağlar. Düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektan olarak kullanılabilen maddeler arasında DMSO, gliserol, disakkaritler ve diğerleri sayılabilir. Yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektan olarak polimerler ve metalik nanopartiküllerden bahsedilebilir (Strambini ve Gabellieri 1996).

Bir kriyoprotektanın başarılı sayılabilmesi için gereken kriterlerden birisi de su bağlayıcılığıdır. Hücre, kriyoprotektan içeren bir çözeltiye maruz kaldığında, hipertonic ortamın etkisiyle su kaybederek hacimce azalma gösterir. İlk büzülme olayının ardından, su ve kriyoprotektif özellikli maddeler hücreye geri dönerek yeniden bir balans elde edilir ve hücre şişer. Kriyoprotektanlar hücre içinden dışarı çıkarken, bu süreç tersine işler

(Salinas-Flores ve ark 2008). Bu aşamada, eğer hücre aşırı şişmeye başlarsa membranında geri döndürülemeyecek hasarlar oluşur. Temelde bu hasarlar, yeni bir membranın onarımı süreci (rejenerasyon) için gereken sürenin ve hasara uğrayan kısmın yokluğundan ileri gelir (Reinhoud ve ark 2000).

Memelilerde genellikle kriyoprotektan etkisinden yararlanılan madde gliseroldür. Kanatlılarda kullanıma bakıldığında DMSO ve etilen glikol, balık türlerinde ise DMSO, metanol ve gliserol'ün sıklıkla kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca etilen glikol, düşük moleküler ağırlığı yüksek membran geçirgenliği gösterdiğinden ve zararlı etkilerinin az olması sebebiyle daha çok oosit ve embriyo dondurulmasında kullanımı söz konusudur (Anchamparuthy 2007).

Kriyoprotektanların başarısı hakkında tür içi ve türler arası oldukça değişken sonuçlar olduğuna dair bilgiler mevcuttur. Örneğin, turna kuşu ve hindi gibi iki kanatlı türü arasında altı kat etkinlik farkı olduğu bildirilmiştir (Blanco ve ark 2008). Memeli türlerinin spermasının ozmotik direnç yetenekleri geniş bir yelpazede bulunmaktadır. Bu geniş yelpazenin sebebinin hücrelerin erişebileceği limit hacimlerinden ve hücre zarlarının su iletkenlik becerilerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Gilmore ve ark 1998).

Kriyoprotektanların türe özgü farklılıkları, izotonik medyumlarda gösterdiği toksik etkiler açısından da değerlidir. Kriyoprotektanlar, hücre membranının geçirgenliğini ve protein kinetiklerini değiştirmek suretiyle etkilerini gösterirler. Bunu yaparken de oda sıcaklığında membran ile etkileşerek lipid zarlardaki proteinlerin dizilimlerini bozarlar (Crowe ve ark 1988).

Monosakkaritler, su içerisinde düşük oranlarda yer tutmalarına rağmen, sulandırıcılara eklendiklerinde hücre zarı ile aralarında yaklaşık 1 nm'lik bir mesafe şekillenir. Mesafenin varlığı, vitrifikasyon esnasında dehidrasyona maruziyetine neden olur. Molekül ağırlığı düşük olan bileşikler ve oligosakkaritlerin hücre zarına daha yakın oldukları için zarların sıvı fazdan jel faza geçişi esnasında geçirgenliğini yükselterek rehidrasyona sebep oldukları bildirilmektedir (Kuleshova ve ark 1999).

Nükleer manyetik rezonans kullanarak hücre zarının dondurulmasında DMSO, sakkaroz, sorbitol ve trehaloz gibi kriyoprotektanların lamellar faz değişimine olan etkisinin incelendiği bir çalışmada yöntemin donmamış fraksiyonların ölçümüne olanak verdiği belirlenmiştir (Yoon ve ark 1998).

Dondurma esnasında hücre, yaklaşık %10 su kaybeder ve hücre içinde bu durum su ile etkileşmeyen maddelerin yoğunluğunu yükseltir. Bu maddeler, hücre zarına yakın olduklarında suyun sürüme kuvveti hücre zarında bozulmalara sebebiyet verecek derecede artabilir. Bu durumda çoğunlukla lamel fazlarına benzeyen hücre zarı birikintilerinin şekillendiği bildirilmektedir (Yoon ve ark 1998).

Kriyoprotektif maddelerin temel görevi, hücreye giren suyun bileşelerini değiştirerek hücre zarları arasındaki suyun sürüme kuvvetini düşürmektir. Sperma sulandırıcılarında düşük yoğunluk içeren sakkaroz ve trehaloz kullanıldığında ozmotik basıncın verdiği hasarlara karşı optimal korumanın sağlandığı bildirilmiştir (Kuleshova ve ark 1999).

Şekerler

Hücre dışı kriyoprotektanlar genellikle büyük, orta ve küçük (poli- oligo- ve monosakkarit) yapılı basit ya da bileşik şekerlerden oluşurlar. Bu şekerlerin, soğuk iklimlere karşı doğal bir koruma sağlamak amacıyla çeşitli bitki ve hayvan türlerinde kullanıldığı ifade edilmektedir (Fuller 2004). Kriyobiyolojide kullanımları da yine aynı mantıklıdır. Monosakkaritlerin, özellikle düşük sıcaklıklarda hızlı bir şekilde çözünbildiği ve vitrifiye olabildiği bilinmektedir (Kuleshova ve ark 1999). Ancak, hücreler tarafından non enzimatik glikolizde de kullanılabilecekleri ve bu sebeple protein etkileşimlerine yol açabilecekleri dikkate alınmalıdır. Uygulamada kabul gören pekçok dondurma protokolünün di- ve polisakkaritlerin kullanımına dayanması bu sebeptir (Chian ve Quinn 2010).

Yapılan kimi araştırmalarda embriyo ve oositlerin bazı şeker gruplarının 7 mmol/L'ye kadar yoğun çözeltilerinin 10 dakika ya da daha fazla süreyle muamele edilmesinin hücre yapısı ve fonksiyonlarını bozduğu vurgulanmaktadır (Kuleshova ve ark

1999). Kriyoprezervasyon sırasında değişik şekerlerin farklı koruma düzeylerinde etki ettiği ve bu durumun kullanılan medyumun içeriğine ve dondurma koşullarına bağlı olarak değişebileceği vurgulanmaktadır (Arns ve ark 1987, McWilliams ve ark 1995, Kuleshova ve ark 1999).

Monosakkaritler

Glikoz

Glikoz, bir heksoz şekeridir ve altı karbon atomu iğerir. Tipik olarak, gametler ve embriyoların beslenmesinde kullanılmak üzere milimolar yoğunluktaki kùltür ortamlarına katılırlar. Bununla birlikte, glikozun özel bir kriyoprotektan olarak kullanımı geniş bir kabul görmemektedir. Glikoz, doğadaki organizmaların soğuk, zorlu iklimlere karşı korunmasında kullanılan şekerlerden biridir, ancak reproduktif anlamda geniş bir ilgi görmemiştir (Fuller 2004).

Galaktoz

Galaktoz, non-permeabl bir kriyoprotektan olarak sınırlı bir ilgi gören diğer heksoz şekerlerinden biridir. Glikolize katılmayan disakkarit şekerlerinin kullanımıyla kıyaslandığında, galaktozun eklenmesi durumunda aygır spermatozoonlarının motilitesinin olumsuz etkilenebileceği bildirilmiştir (Arns ve ark 1987).

Arabinoz

Nonpermeabl kriyoprotektanlardan olan arabinoz bir pentoz şekerdir. Aygır spermasının dondurulmasında sulandırıcıya katıldığında spermatozoonlarının motilitesini olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Arns ve ark 1987). Mannoza, Ksiloz ve Fruktosa nazaran geyik spermasının dondurulmasında kriyoprotektan olarak kullanımını içeren az sayıda çalışma olduğu bilinmektedir (Fernández-Santos ve ark 2007).

Disakkaritler

Her bir disakkaritin kriyoprotektif etkisinin, tür ve hücre hattına bağlı olarak farklılık gösterdiği ifade edilmektedir (De Leeuw ve ark 1993).

Sakkaroz

Sakkaroz daha ziyade farklı türlerde ve çeşitli reproduktif organların dondurma-çözdürme protokollerinde permeabl olan kriyoprotektanlarla birlikte koruyucu ve katkı maddesi olarak kullanılan bir şekerdir. Sakkaroz ilk kez kurbağa spermatozoonlarının vitrifiyesi amacıyla kullanılmıştır (Luyet ve Hodapp 1938). Ek olarak insan pronükleer embriyolarının dondurularak saklanmasıyla başarıyla kullanıldığı tespit edilmiştir (Testart ve ark 1986).

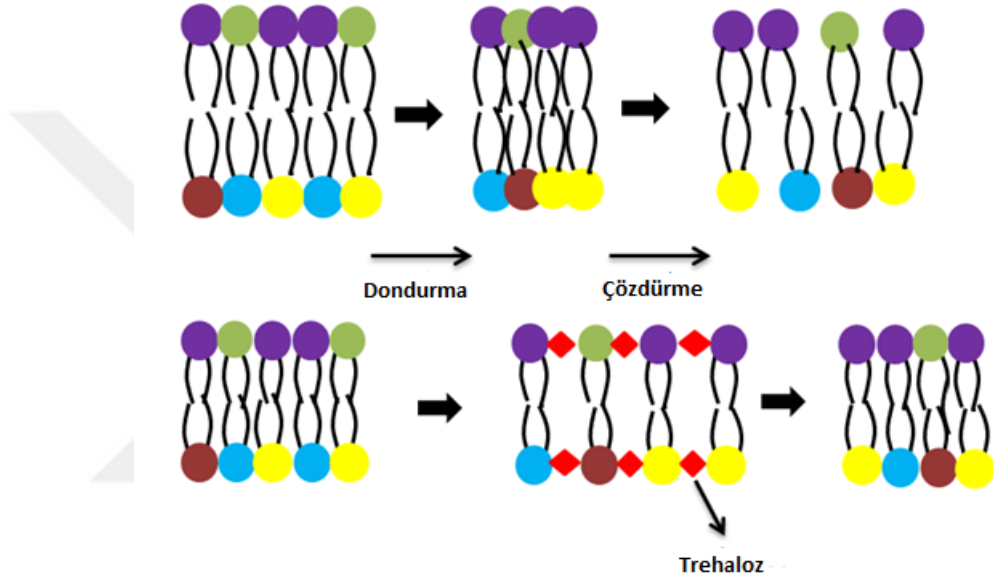
Trehaloz

Spermanın dondurulması için kullanılan sulandırıcılar, içerdikleri şekerler sayesinde spermanın enerji kaynağı olarak işlev görürken, aynı zamanda sulandırıcının ozmotik basıncını düzenler, kriyoprotektan olarak işlev görür ve hücre sel buz oluşumunu azaltıcı etkiye sahiptirler.

İki D-Glikoz molekülünün birleşiminden oluşan ve hücre dışı kriyoprotektan olarak işlev gören bir disakkarittir (Richards ve ark 2002). Çalışma mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da genel olarak yapılarındaki hidroksil gruplarının sperma hücresinin membranına nüfuz ettiği, donma ve çözünme sırasında membrandaki fosfolipidlerdeki polar gruplarıyla bağ kurduğu ve aralarında bir boşluk oluşmasını sağladığı, oluşan bu boşlukların donma esnasında hücreden dış ortama su çıkışına yardımcı olarak hücre içi buz oluşumunu engellediği, hücre sel dehidrasyonun hücre membranı üzerine olan zararlı etkilerini önlediği ve hücre membranını stabilize ederek yüzey gerilimini artırdığı bildirilmektedir.

Sperma sulandırıcısı olarak kullanılan trehalozun, spermatozoonlar için hayati öneme sahip ozmotik basıncı dengelediği ve serbest oksijen radikallerinin yol açabileceği hasarlara karşı kriyoprotektif etki gösterdiği ileri sürülmektedir. Hücrenin su kaybı esnasında membranında oluşan zararlı değişimlerin engellenmesinde rol oynadığı, bunu da spermatozoonlardaki endojen glutatyon kullanımını azaltıp ROS'u engelleyerek olumlu etki gösterdiği bildirilmektedir (Molinia ve ark 1994, McWilliams ve ark 1995, Aisen ve ark 2000, 2002, 2005, Aboagla ve Terada 2003).

Sperma hücre membranı dondurma esnasında ortamdan enerji çekilmesi ve sıvı kristal fazdan jel fazına geçişinde, fosfolipidler Van der Waals çekim kuvvetine bağlı olarak birbirlerine yaklaşırlar. Çözdürme esnasında ise aniden artan sıcaklıkla hızlanan elektronlar birbirlerini iterek membranda düzensiz boşluklar oluşturur. Bu durum, membran yapısında hasara ve düzensiz iyon ve su giriş çıkışına neden olabilir (Patist ve Zoerb 2005).



Şekil 1.4. Trehalozun dondurma çözdürme aşamalarındaki etkisi.

Sulandırıcıya trehaloz ilavesinde, hücre membranındaki fosfolipidlerin arasına giren trehaloz aralarında bir boşluk oluşturur. Oluşan boşluk donma esnasında fosfolipidlerin birbirlerine yaklaşmasını engeller ve çözüm sonunda membran yapısını korur (Ahmad ve Aksoy 2012).

Trehaloz, donmayı tolere edebilen organizmalarda doğal olarak bulunmaktadır. Çözüm sonu motilite, membran ve akrozom bütünlüğü gibi belirteçlerin yanısıra lipid peroksidasyonunu minimize etmesi ve kendine has özelliklerinden dolayı kriyobiyolojide büyük ilgi çekmiş ve diğer hücre sistemlerinde sıklıkla kullanılır hale gelmiştir (Aisen ve ark 2000, 2002, Aboagla ve Terada 2003, Bucak ve ark 2007). Protein stabilitesini artırma özelliği bulunan trehalozun bu özelliği hidrasyon yarıçapının diğer şekerlerden yaklaşık 2,5 kat daha büyük olmasına ve proteinlerin hidrasyon artıklarından uzaklaşmasını sağlamalarıyla yaptıkları düşünülmektedir (Lin ve Timasheff 1996).

Embriyo vitrifikasyon ve sperma dondurma protokollerinin bir bileşeni olarak pek çok çalışmada kriyoprotektan olarak kullanımı söz konusudur. Trehalozun kriyoprotektan olarak kullanıldığı koç, boğa, aygır spermalarının dondurulmalarında da olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark 1993, Aisen ve ark 2000, 2002, Squires ve ark 2004). Fare embriyolarının vitrifikasyonunda rafinoz veya sakaroza göre daha olumsuz sonuçlar verdiği de ifade edilmektedir (Bağış ve ark 2004). Hücre içine giremeyen nonpermeabl yapıdaki trehaloz, intrastoplazmik mikroenjeksiyon yöntemiyle oositlere uygulandığında elde edilen insan ile fare embriyolarının dondurularak muhafazasında etkiye sahip olduğu vurgulanmaktadır (Eroğlu ve ark 2003).

Bucak ve arkadaşlarının koç spermasının dondurulması üzerine yaptıkları çalışmada kriyoprotektan olarak 2 şer farklı dozda glutatyon (5mM, 10 mM), taurin (50mM, 100mM) ve trehaloz (50mM, 100mM) denenmiş olup dondurma sonrasında 0. saatte, 6. saatte, 24. saatte ve 30. saatte çözündürülüp kontrol edilmiştir. En yüksek motilite sonucu 0, 24 ve 30. saatlerde 50mM trehaloz içeren örneklerden elde edilmiştir (Bucak ve Tekin 2007).

Hu ve arkadaşları trehalozun boğa spermasının kriyoprezervasyonu üzerine etkisini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada 5 farklı grup oluşturulmuştur. 1. grup trehaloz katılmayan kontrol grubu iken 2. grupta 25mM trehaloz, 3.grupta 50mM trehaloz, 4.grupta 100mM trehaloz ve 5.grupta 200mM trehaloz içeren sulandırıcılar hazırlanmıştır. Çözüm sonu yapılan değerlendirmelerde sperma motilitesi, mitokondriyal aktivite, akrozom bütünlüğü ve membran bütünlüğü parametrelerinin her birinde 100mM trehaloz tüm gruplarda en yüksek sonucu göstermiştir (Hu ve ark 2009).

Laktoz

Bir galaktoz ve bir glikoz molekülünden meydana gelen laktoz, sütte yaygın olarak bulunan bir disakkarittir. Sığır sperması için kriyoprotektan olarak kullanımı mevcuttur. Yapılan araştırmalar, laktozun diğer disakkaritlerle benzer bir kriyoprotektif etki gösterdiğini, hatta sakkaroz gibi diğer disakkaritlerle kıyaslandığında daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Arns ve ark 1987). Fare spermatozoonlarının motilitesinin korumasında yeterince başarılı olmayan laktozun, sakkaroz ve trehalozla benzer bir seviyede fertilite sağladığı gözlemlenmiştir (Sztein ve ark 2001).

Maltoz

İki glikozdan oluşan malt şekeridir. Poli ve disakkaritlerin yüksek kriyoprotektif etkileri araştırmalarda bildirilse de geyik spermatozoonlarıyla yapılan bir çalışmada maltozun çözüm sonunda aynı etkiyi gösteremediği ve koruyuculuğunun bazı monosakkaritler gibi olmadığı tespit edilmiştir (Fernández-Santos ve ark 2007). Ayrıca, tavşan spermatozoonlarının korunmasında da sakarozdan daha düşük etki gösterdiği vurgulanmaktadır (Vicente ve Viudes-de-Castro 1996).

Polisakkaritler

Rafinoz

Glikoz, fruktoz ve galaktozdan oluşan sebzelerde yaygın olarak bulunan bir trisakkarittir olan rafinozun kriyoprotektan olarak ilk kullanımı %18 oranla fare sperması için olmuştur. Hem kendisinin hem de gliserol katkılı olarak kullanımıyla yapılan diğer çalışmalarda da yine fare spermatozoonlarında koruma sağlamıştır (Tada ve ark 1990). Benzer şekilde gliserol ile kombine kullanılarak epididimal fare spermasının dondurulması ve saklanması amacıyla kullanılmış daha sonrasında IVF uygulaması sonucunda doğumun gerçekleştiği bildirilmiştir (Songsasen ve ark 1997). Rafinozun, farklı türlere ait spermaların dondurulması ve muhafazasına dair kullanımını içeren çalışmalar bildirilmektedir (Arns ve ark 1987).

Sakkaroz ve trehaloz ile mukayese edildiğinde, fare spermasının korunmasında benzer özellikler gösterdiği belirtilmiştir (Sztein ve ark 2001). Aygır sperması üzerinde yapılan çalışmalarda rafinozun, glikoz ve fruktoz ile benzerlik gösterdiği rapor edilmiştir (Squires ve ark 2004). Etilen glikol katkılı sulandırıcılarda kombine kullanıldığında ise vitrifikasyon özelliklerini bozduğu bildirilmiştir (Kuleshova ve ark 1999). Yine etilen glikol-rafinoz sulandırıcısında, fare oositlerinin rafinozla muamelesinin dondurma öncesi zararlı etki göstermediği ve çözüm sonu canlılık oranını yükselttiği vurgulanmaktadır (Dela Pena ve ark 2001).

Dekstran

Dekstran, karmaşık dallı bir polisakkarit olup genellikle yineleyen glikoz moleküllerinden sentezlenir. Temelde α -D-1,6-glukoz bağlarına sahip olan ve 1-3 yan zincirleri içeren bir polimerdir. Dekstran, molekül ağırlığına bağlı olarak değişiklik gösteren bir kriyoprotektif özelliğe sahiptir. Bu koruyucu etkisini vitrifikasyon esnasında meydana gelen buz kristallerini zararsız hale uyarlayarak gösterdiği düşünülmektedir (Kundu ve ark 2002). Dekstran kullanılan medyumların, kriyoprezervasyon sonrası fare zona pellucidasının hasar görmesini azalttığı belirtilmektedir (Dumoulin ve ark 1994).

Farklı molekül ağırlığı içeren dekstranın (10-2000 kDa) DMSO katkılı sulandırıcılara farklı yoğunluklarda eklenmesiyle dondurulan epididimal teke spermalarının sonuçlarının başarılı olduğu ifade edilmektedir (Kundu ve ark 2002).

Yine dekstran katkılı ve DMSO eklenmiş sperma sulandırıcısının tavşanlarda akrozom bütünlüğünü koruduğu ve fertilitesi artırdığı, ancak aynı etkiyi motilitede gösteremediği rapor edilmiştir (Viudes de-Castro ve ark 2021).

Makromoleküller/Polimerler

Polimerler ya da makromoleküller çoğunlukla sulandırıcının donma aşamasında sulandırıcılara eklenirler. Bu da potansiyel olarak zararlı maddelerin yoğunluğunun azalmasına katkı sağlayabilir. Makromoleküller, kriyoprotektan ilave edilmiş sulandırıcıların vizkozitesini yükselterek destek olurlar (Mackenzie 1977). Buna ek olarak su ile hidrojen bağı kurarak kristalizasyon oluşumunu minimuma indirirler (Fuller 2004). Hem embriyo çalışmalarında medyumlara hem de sperma kriyoprezervasyonunda sulandırıcılara eklenen ve en çok bilinen ve sıklıkla kullanımına başvuru olan makromoleküller serum albümini gibi proteinlerdir. Bu makromoleküller, kriyoprotektan olarak işlev yapabileceği gibi, aynı zamanda hücrelerin konulacağı payet ya da diğer kriyo tüplere yapışmasını önlemek amacıyla yüzey aktif madde olarak da görev yaparlar.

Ficoll

Ficoll, polisakkaritler sınıfında sayılabileceği gibi aynı zamanda iyonik olmayan sentetik bir polimerdir. Kriyoprezervasyon medyumuna eklenmesiyle donma aşamasından sonra insanlarda ve farelerde zona pellusida hasarını düşürdüğü gözlemlenmiştir (Dumoulin ve ark 1994). Ficoll, farelerin yanısıra domuz, maymun, kedi gibi çeşitli türlerde ki oositlerin vitrifiye prookollerinde kriyoprotektif amaçlı kullanılmıştır (Hurt ve ark 2000, Kuleshova ve ark 2001, Checure ve Seidel Jr 2007).

Polietilen glikol (PEG)

Polietilen glikol, alkol türevi bir nonpermeabl kriyoprotektandır. PEG'in çeşitli hücre ve dokuların dondurulması sırasında koruyucu etkisi olduğu kimi çalışmalarda rapor edilmiştir (Kandelousi ve ark 2013, Lee ve ark 2013).

Fare oositlerinin vitrifikasyonunda kullanıldığında DMSO'dan daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmektedir (O'Neil ve ark 1997). İnsan oositlerinin dondurulmasında diğer kriyoprotektanlarla kombine kullanımı tercih edilmemiştir (Liebermann ve ark 2003). Bunun yanısıra sıçan, sığır ve fare blastosistlerinin üzerinde koruyuculuğunun olduğu da vurgulanmaktadır (Kono ve ark 1988, Ohboshi ve ark 1997).

PEG, hidrofilik özelliklere sahip bir polietilen glikol türevidir. Bu madde, boğa sperması sulandırıcılarında denendiğinde, çözüm sonu total motilite (TM), progresif motilite (PM) ve canlı spermatozoa oranını olumsuz yönde etkilediği rapor edilmiştir (Abavisani ve ark 2013, Kandelousi ve ark 2013). Ancak, koç spermasının dondurulmasıyla ilgili çalışmalarda bu maddeye dair bilgilere rastlanmamıştır.

Polivinil pirolidon (PVP)

Polivinilpirolidon, polimerik bir dış kriyoprotektandır. Bu madde, toksik etkilerini en aza indirmek amacıyla permeabl kriyoprotektanların yerine kullanılarak embriyo ve sperma gibi farklı dokular ve hücrelerin vitrifikasyonunda olumlu sonuçların görülebileceği ifade edilmektedir (Checure ve Seidel Jr 2007). Yine kullanım alanlarına bakıldığında Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) tekniğinde spermanın geçici

hareketsizliğinde (immobilizasyon), sperm seçiminde, oosit kültüründe ve dondurma gibi biyoteknolojik alanlarda kullanılmaktadır (Kato ve Nagao 2012).

Bu kriyoprotektan, fare embriyolarının -79 °C'de dondurularak saklanması için kullanılan ilk non-permeabl kriyoprotektandır ve bu sayede 8 hücreli fare embriyolarının başarılı bir şekilde muhafaza edilmesine olanak tanımıştır (Whittingham 1971).

Manda boğası spermasının çözüm sonu plazma membran bütünlüğünü artırdığı ve bu süreçte PVP ilavesinin etkili olduğu gözlemlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda ve diğer kriyoprotektanlarla birlikte sığır oositlerinin dondurulmasında tercih edildiği; kontrol grubuna göre %6 PVP katılan horoz sperması sulandırıcısının plazma membran bütünlüğünü dah iyi muhafaza ettiğine dair çalışmalar vardır (Checura ve Seidel Jr 2007).

Ancak PVP'nin, kalsiyumun hücre içine penetrasyonunu artırarak, spermatozoon membranında önemli hasarlara yol açtığı ve ayrıca kromozomal hasarlara neden olduğu da ileri sürülmüştür (Kato ve Nagao 2012).

Hiyaluronan

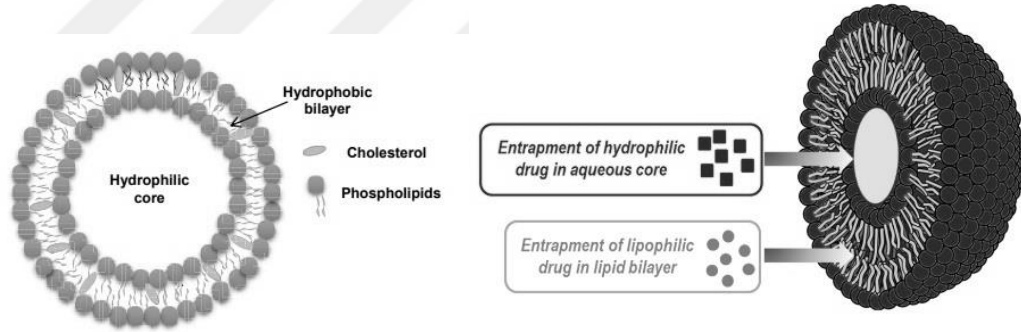
Hiyaluronan (hiyaluronik asit, hiyaluronat), hücre dışı matrisin önemli bir bileşeni ve korona radyatada bulunan kriyoprotektandır. Bu maddenin, fare, sıçan ve sığır embriyoları ile koyun keçi blastosistlerinde yenidoğan buzağı serumuna bir seçenek olabileceği rapor edilmiştir (Palasz ve ark 1993). Domuzlarda hiyaluronan takviyesinin membran stabilitesini artırdığı ve çözündürme sonrası motiliteyi olumlu etkilediği bildirilmiştir (Pena ve ark 2004).

Lipozom

Lipozomlar genellikle 50-500 nm çapında (partikül boyutunda) bir veya daha fazla çift tabakadan oluşan küresel lipid vezikülleridir ve genellikle doğal veya sentetik lipidlerin bir sulu ortamda emülsifiye edilmesi sonucu oluşurlar (Sun ve ark 2014). Sadece kozmetik ve farmasötik uygulamalarda biyolojik olarak aktif bileşikler için değil, antioksidanlar, aromalar, antimikrobiyaller gibi farklı kullanım alanları mevcuttur. Spermatozoon membranında yüksek yoğunluklu lipoproteinler (LDL) gibi lipozomlar da

membran korunması ve stabilizasyonu gibi işlev görürler (Elhissi ve ark 2015, Belala ve ark 2016). Lipozomlar, biyolojik uyumlulukları, kararlılıkları, sentezlemelerinin kolaylığı ve yüksek ilaç yükleme verimlilikleri, yüksek biyoaktarım gibi özelliklerinden dolayı geniş bir şekilde kullanım alanı bulmuşlardır. (Noble ve ark 2014).

Lipozomlar, lesitin gibi hidrofilik bir baş ve lipofilik bir kuyruğa sahip amfifilik moleküller olan fosfolipitlerden oluşmaktadırlar. Bu fosfolipitler sulu bir ortama sokulduğunda polar uçları sulu ortama bakacak ve polar olmayan uçlar bir çift tabaka oluşturacak şekilde veziküller halinde kendiliğinden birleşirler. Bu eşsiz özellik nedeniyle, çok çeşitli hidrofilik (hidrofilik çekirdekte) ve hidrofobik bileşenler (hidrofobik çift katmanda) içerebilirler. Lipozomların hazırlanmasında en sık kullanılan fosfolipidler, fosfatidilkolinler (PC), fosfatidiletanolaminler (PE), fosfatidilserinler (PS) ve fosfatidilgliserollerdir (PG) olarak bildirilmektedir (Noble ve ark 2014).



Şekil 1.5. Hidrofilik çekirdekli (sulu) ve hidrofobik çift katmanlı lipozom yapısı

Lipozomlar, trigliseritlerin veya mono / digliseritlerin ve fosfolipidlerin bir kombinasyonu ile oluşturulabilir. Lipid ve/veya fosfolipid moleküllerine ek olarak, daha küçük boyutta olan nanolipozomlar yapılarında steroller gibi başka moleküller de içerebilir. Lipid veziküllerin üretiminde en yaygın kullanılan sterol, lipid zarının çözünen maddelerin geçirgenliğini azaltarak veziküllerin stabilitesini artırmaya yardımcı olan kolesteroldür. Lipozomlar katman boyutuna ve sayısına göre, dört ana lipozom kategorisi tanımlanabilir (Yang ve ark 2011).

- Küçük unilamellar veziküller (SUV): Tek fosfolipid çift tabakalı, 20 nm ila 100 nm

- Büyük unilameller veziküller (LUV): Tek fosfolipid çift tabakalı, 100 nm ila 400 nm
- Çok katmanlı büyük veziküller (MLV): Çoklu fosfolipid çift tabakalı, 500 nm ila ~ 3000 nm
- Multiveziküler veziküller (MVV): 1000 nm'den birkaç bin nanometreye kadar olanlardır.

Bu dört kategori genellikle ilaç taşınımlarında kullanılır. Temel fark, bağışıklık sistemi tarafından kan dolaşımından temizlenme sürecidir. Büyük ve çok katmanlı vezikül boyutu, kan proteinleri ile etkileşim nedeniyle daha hızlı bir uzaklaşmayı tetikler. Bileşimlerine göre, lipozomlar geleneksel, uzun dolaşımda, katyonik, uyarılara duyarlı ve immünilipozomlar olarak sınıflandırılabilir (Tapaswi 2013).

Boyutları, hidrofobik ve hidrofilik özellikleri ve ilaç moleküllerini veziküllerin sulu iç kısmında veya lipofilik zarında kapsama yetenekleri nedeniyle, lipozomlar etkili bir şekilde ilaç teslim sistemleri olarak kullanılmak üzere umut vadeden özelliklere sahiptir (Fathi ve Oyelere 2016). Hidrofilik ve sterik bir bariyer oluşturarak PEG, silika, kitosan ve polisakkarit gibi moleküllerle kaplanabilirler ve taşıma sistemleri için kullanıldığında modifikasyon önemlidir. Yüzey yükünün değişimi ve engelleme artışı, plazma proteinlerinin bağlanmasını ve bazı hücresel reseptörler tarafından tanınmalarını önler, bu da dolaşım sisteminden uzaklaşmaya neden olabilir. Kaplama sayesinde lipozomların stabilitesi artar ve içerdikleri ilacın aşamalı salınımı sağlanabilir (Sagrista ve ark 2010).

Lipozomların hücre membranları üzerine etkinliği, lipidlerin asil zincirlerinin uzunluğuna, çift bağ sayısına ve lipid baş grubunun tipi ve yükü ile belirlenen fiziksel ve kimyasal özelliklere bağlıdır (Röpke ve ark 2011). Zararlı etkileri en aza indirebilecek olan membran modifikasyon stratejileri arasında, spermatozoanın yumurta sarısı veya lipozomlar ile inkübasyonu gibi yöntemlerin hücrelerin kriyo-stabilitesini artırabileceği ya da azaltabileceği düşünülmektedir. Lipozomların hücre dondurma ve çözme işlemlerindeki stabilizasyon etkisi ilk olarak boğa spermatozoonlarında keşfedilmiştir (Quinn ve ark 1980, Graham ve Foote 1987). Manda spermaları üzerinde lipozomun çözündürme sonunda spermatozoon motilitesini önemli derecede artırdığı (Kumar ve ark

2015), koçlarda ise membran bütünlüğünü korumadaki etkisinin dondurma çözündürme sonrasında gözlemlendiği bildirilmiştir (Luna-Orozco ve ark 2019). Lipozomların ayrıca kırmızı kan hücrelerinin dondurma (Holovati ve ark 2008) ve kurutma (Kheirloom ve ark 2005) işlemleri için de kullanıldığı rapor edilmiştir. Ancak, lipozomların hücreleri dondurma veya kurutma sırasında nasıl stabilize ettiğine dair temel mekanizmalar hala yeterince anlaşılamamıştır. Kolesterol, lipid transferine kıyasla farklı membran çift tabakaları arasında daha hızlı değiş tokuş yapabilir. Bu nedenle lipozomlar membranın konformasyonel bozukluklarını değiştirebileceği ve membranın su geçirgenliği ile kriyoprotektanlara karşı geçirgenliğini etkileyebileceği, dolayısıyla koruyucu özelliklerinin muhtemelen lipozomlar ile hücrel membranlar arasında lipid ve kolesterol transferine atfedildiği düşünülmektedir. (Bruckdorfer ve ark 1969, Phillips ve ark 1987, Steck ve ark 1988).

Sunulan tez çalışmasında Tris bazlı temel sperma sulandırıcısına eklenen Lipozom'un farklı dozlarının tek başına ve Trehaloz ile birlikte farklı dozlarda kullanımının spermanın dondurulması, çözündürülmesi ve uzun süreli muhafazası sonrası spermatolojik parametrelere olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Çalışmada Kullanılan Hayvan Materyali

Sunulan tez çalışmasında fertil özelliği bilinen 2 – 4 yaş aralığında 5 baş Kıvırcık x Akkaraman G1 koçlarına ait ejakülatlar kullanıldı. Koçlara ait ön çalışmalar ve tez çalışmaları üreme sezonu içerisinde (Eylül-Ekim ayları) yapıldı. Hayvanların bakım ve beslemesi Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü (39°58'07.2"N - 33°06'30.3"E) koyunculuk şubesinde mevcut şartlara ek herhangi bir katkı ya da müdehale olmaksızın yapıldı.



Şekil 2.1. Kıvırcık x Akkaraman G1 koçları (Lalahan/Ankara)

2.2 Ana Sulandırıcının Hazırlanması

Sunulan tez çalışmasında tris bazlı temel sulandırıcı (TAS) kullanıldı. Kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich (Merck)'ten temin edildi. Ana stok sulandırıcısını hazırlamak için 1000 ml mezür içerisine oda ısısında yaklaşık 200 ml ultra saf su (MES Mp MINIpure) konularak üzerine;

Trisma Base (Sigma Aldrich - T6791) 27,1gr/L

Sitrik asit (Sigma Aldrich - C0759) 14 gr/L

Fruktoz (Sigma Aldrich - F-2543) 10 gr/L

ayrı ayrı tartılarak eklendi. 1 ml Penisilin-Streptomisin (Sigma Aldrich – P4333) kombinasyonu stok solüsyonuna eklenerek hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Sulandırıcının osmotik basıncı 280- 300 mOsm ve pH'sı 6,8-7,0 aralığında olacak şekilde ayarlandı ve +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi (Aisen ve ark 2002).



Şekil 2.2. Temel Sulandırıcı kimyasalları

Trehalozun Hazırlanması

Sperma alım günlerinde ana stok solüsyonu üzerinden 100 ml alınarak, üzerine %20 oranında olacak şekilde günlük taze yumurtalardan elde edilen yumurta sarısı katıldı. Santrifüj işlemi 4000 rpm'de 15 dk'da gerçekleştirilip süpernatant kısım alındı ve %3 gliserol eklendi (Kontrol grubu). Çalışmada kullanılan trehaloz (Sigma Aldrich – T0167) molekül ağırlığına göre mM cinsinden hesaplandı ve deneme gruplarına ait sulandırıcılara eklendi.



Şekil 2.3. Temel sulandırıcı kimyasalları ve Osmotik basınç ölçümü

Lipozomun Hazırlanması

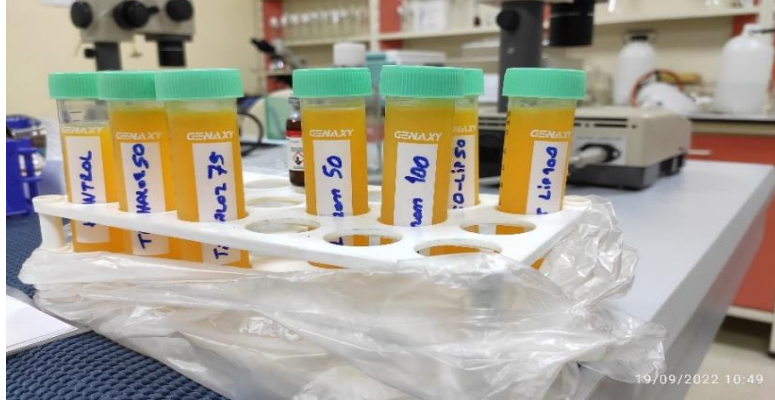
Sunulan tez çalışmasında kullanılan lipozom (Sigma Aldrich – L4395) 9 μ mol Cholesterol, 63 μ mol L- α -Phosphatidylcholine ve 18 μ mol Stearylamine ihtiva eden

liyofilize toz halinde bir kimyasaldır. Çözdürme işlemi için fiziksel disperasyon yöntemi kullanıldı (Shivhare ve ark 2009). Bu yöntemde, düz tabanlı konik bir balon joje içerisinde eklenen lipozom, kloroform içinde çözündürüldü. Çözelti, oda sıcaklığında ($22^{\circ}\text{C}\pm 2$) çözeltiyi bozmadan yaklaşık 2 saat içerisinde buharlaştırıldı. Oluşan lipid film tabakayı hidrate etmek için, fosfat tamponu (pH 7.4) içeren bir sulu ortam, bir tarafına eğik olan balon jojenin içine eklendi ve balon joje yavaşça dik konumuna getirildi. Sıvının, lipid tabakasının üzerinden akması sağlandı ve balon joje, tam şişmeyi sağlamak için 37°C 'de 2 saat boyunca bekletildi. Şişme sonrasında oluşan veziküller balon joje içeriğini karıştırarak elde edilen süt beyaz süspansiyonla toplandı. Ardından santrifüj edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

2.3 Deney Grupları

Çalışmada kullanılan sulandırıcı grupları aşağıda belirtilen şekilde oluşturuldu;

- 1- Tris Ana Sulandırıcı + Yumurta Sarısı (%20) + %3 Gliserol (Kontrol Grubu)
- 2- K + 50mM Trehaloz
- 3- K + 75mM Trehaloz
- 4- K + Lipozom 50 μl /5ml
- 5- K + Lipozom 100 μl /5ml
- 6- K + Trehaloz 50mM+ Lipozom 50 μl /5ml
- 7- K + Trehaloz 75mM+ Lipozom 100 μl /5ml



Şekil 2.4. Deney grupları

2.4 Spermanın Alınması

Koçlardan proje dönemi boyunca aşım dönemi içinde, haftada iki kez sperma numuneleri toplandı. Spermanın alınmasında koç ve tekeler için uygun büyüklük ve yapıdaki suni vajenler kullanıldı. Suni vajen hazırlanırken yaklaşık 44 °C sıcaklıktaki su ile doldurulup, vanasından üfleme suretiyle “Y” formunu alıncaya kadar uygun basınç oluşması sağlandı, ardından sıvı vazelin ile kayganlaştırılarak koçun kızgın koyuna atlatılması sağlandı. Koçun ilk atlaması beklendikten sonra ikinci kez atladığı esnada penis prepsiyumdan kavranarak suni vajene yönlendirildi ve yüklenmenin ardından hayvanın inmesi beklendi. Daha sonra suni vajenin vanası gevşetilerek iç aksamında kalan spermanın kadehe dolması beklendi ve ardından pipet vasıtasıyla dereceli tüpler içine alındı. Alınan numuneler ilk muayeneleri yapılmıncaya kadar yaklaşık 35 °C sıcaklıktaki su banyosu içerisinde muhafaza edildi.



Şekil 2.5.a. Suni vajen yardımıyla sperma alınması. Şekil 2.5.b. Suni vajen.

2.5 Spermatolojik Muayeneler

Alınan tüm ejekülatlar bireysel olarak muayeneleri tamamlandıktan (hacim, kitle ve motilite) sonra pooling yapılarak yoğunluk ölçümleri ve sulandırma oranları belirlendi. Bu amaçla Accucell® (IMV, France) fotometrik cihazı kullanıldı. Gruplara göre sulandırma oranı ve sperma miktarı hesaplandıktan sonra dozlandı ve yaklaşık 35 °C sıcaklıktaki su banyosu içerisinde muhafaza edildi.

Pooling yapılan örneklerin hacimce 0,8 ml'den fazla, 3 ve üzeri kitle hareketine sahip, yoğunluk olarak en az 2×10^9 /ml ve motilitesi ise en az %80 ve üzeri olan spermalar olmasına dikkat edildi.



Şekil 2.6. Spermaların toplanması ve deney gruplarının oluşturulması.

2.5.1 Spermanın hacmi

Toplanan her bir bireysel sperma numunesi dereceli tüpler içerisinde miktar olarak kaydedildi. Her bir koçtan 0,8 - 1,1 ml aralığında sperma toplandı.

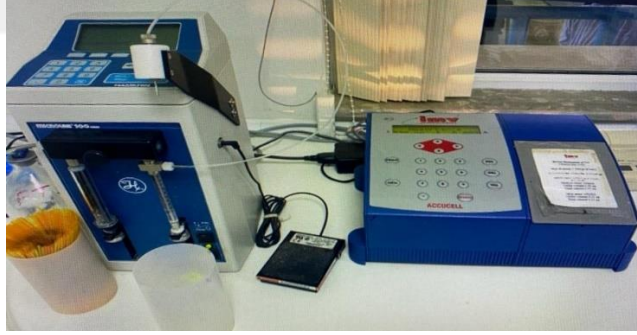
2.5.2 Spermada kitle hareketi

Alınan nativ sperma örneklerinden kitle hareketi muayenesi için ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskobu üzerinde ısıtılmış bir lam üzerine pipet yardımıyla 5µl damlatıldı. Lamel kapatılmadan, ısıtma tablasına yerleştirilen örnek, mikroskopta 10x büyütmede

incelendi. Değerlendirmede, damlanın içindeki kitlesel hareketlerin özellikleri gözlemlendi (dalgalanma – kaynama) ve +4 puanlama sistemi ile değerlendirmeye alındı (Ak ve ark 2010). Değerlendirme sonucunda 3 ve üzeri puan alan spermalar kullanıldı.

2.5.3 Sperma yoğunluğu

Alınan sperma örnekleri pooling yapıldıktan sonra yoğunluk oranı Accucell® (IMV, France) cihazı kullanılarak belirlendi. Çalışma boyunca yoğunluğu en az 2000×10^6 spermatozoon/ml olan spermalar kullanıldı. Sperma yoğunluğu tespit edildikten sonra sulandırma oranı payet başına 100×10^6 spermatozoon olacak şekilde hesaplandı. Toplamdaki sperma miktarı grup sayısına göre 7'ye bölünerek grup başı kullanılacak sperma ve sulandırıcı miktarları belirlendi. İlk etapta tespit edilen ve grup başına kullanılacak olan sperma miktarı kadar sulandırıcı kullanılarak (1:1 (v/v) 10 dakika benmaride bekletildikten sonra Accucell cihazının belirlediği asıl sulandırma oranına tamamlandı.



Şekil 2.7. Accucell cihazı vasıtasıyla yoğunluk ölçümü.

2.5.4 Sperma motilitesi

Alınan sperma örnekleri belirlenen dozlarda sulandırıldıktan sonra ısı tablalı faz kontrast mikroskobu altında üzerine lam kapatılarak 40'lık objektif kullanılarak subjektif olarak en az 5 ayrı alan taranarak gerçekleştirildi, %80 ve üzeri normospermatif özellik gösteren spermalar kullanıldı.



Şekil 2.8. Ölü/Anormal Spermatozoon Muayenesi

2.6 Sperma Dondurulması

Dereceli tüpler içerisinde gruplara ayrılan sulandırılmış spermalar kademeli olarak soğutulmak üzere önce 27 °C de bulunan su banyosunda yarım saat bekletildi, ardından içerisine buz konularak bir yarım saat daha bekletildi. Ekilibrasyon +4 °C’de buzdolabında 2 saat süre ile tamamlandı.

Ekilibrasyon sonunda spermalar her grup için farklı renklerde hazırlanmış olan payetlere çekilerek MX3 payet kapatma cihazında (IMV Technologies, France) kapatıldı. Ardından payet toplama rak’larına tekrar dizilen sperma payetleri, Digitcool 5300 ZB otomatik sperma dondurma cihazı (IMV Technologies, France) kullanılarak 7 dakika içerisinde kademeli olarak -140 °C ısıya düşürüldü. Dondurma işlemi üç aşamada gerçekleşmiş olup birinci aşamada +4°C’den -10°C’ye 3 dakikada (5°C/dk), ikinci aşamada -10°C’den - 100°C’ye 2 dakikada (45°C/dk) ve üçüncü aşamada -100°C’den - 140°C’ye 2 dakikada (20°C/dk) olmak üzere 7 dakika gibi kısa bir sürede gerçekleştirildi. Otomatik dondurma işleminden sonra tüm numuneler -196 °C sıvı azot içerisinde depolanmak üzere stok tanklarına kaldırıldı.



Şekil 2.9. Spermanın ekilibrasyon ve dondurma aşamaları ile sıvı azot tankında depolanması.

2.7 Spermaların Çözdürülmesi

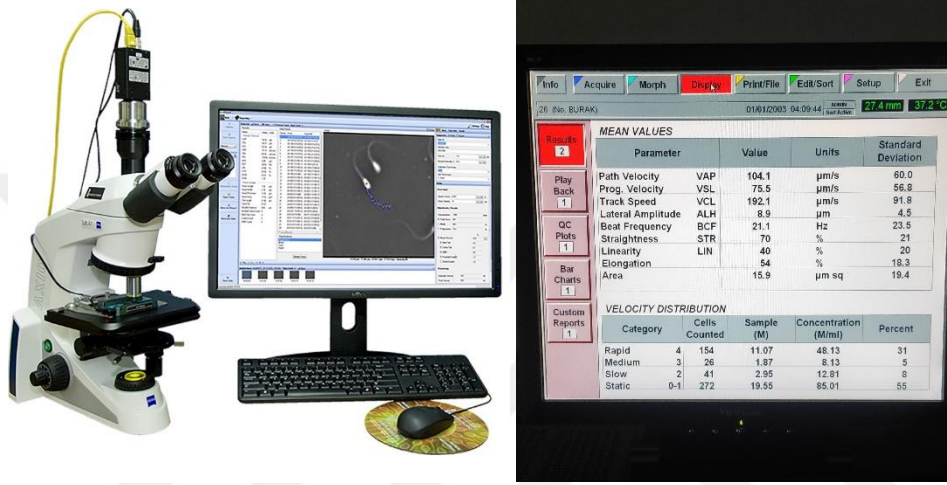
Sunulan tez çalışmasında spermatolojik muayeneleri yapılacak olan örnekler 2 ay sıvı azot stok tankında muhafaza edildikten sonra 37 °C'deki benmari içerisinde 30 sn bekletilerek çözdürüldü (Hafez ve Hafez 1993, İleri ve ark 2000).

2.8 Çözüm Sonu Spermatolojik Parametrelerin Belirlenmesi

Bu işlem için her gruba ait çözdürülen 2 numune 1,5 ml hacimli eppendorf tüplere alınarak pipet vasıtasıyla yavaşça çek-bırak yapılarak karıştırıldı. İçerisinden 5µl alınarak Leja lamına (Leja®, Ref. 025107, IMV Technologies, France) konulan örnekler bilgisayar destekli sperm analiz cihazı CASA (IVOS I, Hamilton Thorne Inc, USA)'ya yüklenerek spermatolojik parametreleri belirlendi.

2.9 CASA Değerlendirmesi

Bilgisayar destekli sperm analiz cihazı CASA’da Total Motilite % (TM), Progresif Motilite % (PM) ve kinetik hareket parametreleri (VAP, VCL, VSL, ALH, BCF, LIN, STR) belirlendi.



Şekil 2.10. CASA cihazı ve örnek parametre sonuçları.

2.9.1 Kinetik hareket parametreleri (KHP)

Bu parametreler; spermatozoonun belirli bir zaman diliminde sergilediği konumsal değişiklikleri, bu değişiklikler sırasındaki hızını ve hareket tarzını içeren tanımlamalardır.

VAP (Velocity Average Path; Eğrisel Ortalama Yol Hızı): Bu değer, spermatozoon başının katettiği ortalama mesafedeki hızı ifade eder ve birim olarak mikrometre/sn (µm/sn) cinsinden ölçülür.

VCL (Velocity Curve Linear; Eğrisel Salınımlı Yol Hızı): Bu değer, spermatozoon başının 2-boyutlu gerçek eğrisel bir yoldaki hareketi sırasında katettiği hızı ifade eder ve birim olarak mikrometre/sn (µm/sn) cinsinden ölçülür. VCL (Curvilinear Velocity), spermatozoon canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilir.

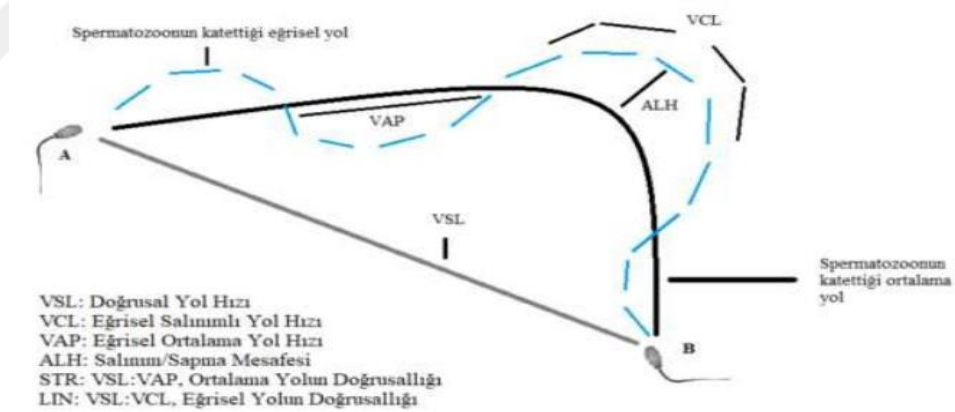
VSL (Velocity Straight Linear; Doğrusal Yol Hızı): Bu değer, spermatozoon başının iki nokta arasındaki doğrusal mesafeyi ifade eder ve birim olarak mikrometre/sn ($\mu\text{m}/\text{sn}$) cinsinden ölçülür.

ALH (Lateral Head Amplitude; Sapma/Salınım Mesafesi): Bu değer, spermatozoonun izlediği ortalama yolda başın lateral (yan) yönde ortalama sapma mesafesini ifade eder ve birim olarak mikrometre (μm) cinsinden ölçülür.

BCF (Beat Cross Frequency; Çapraz Geçiş Frekans Ritmi): Bu değer, spermatozoonun katettiği eğrisel yolun, ortalama yoldan geçme frekansını ifade eder ve birim olarak Hertz (Hz) cinsinden ölçülür.

LIN (Linearite; Eğrisel Yolun Doğrusallığı): VSL/VCL (%).

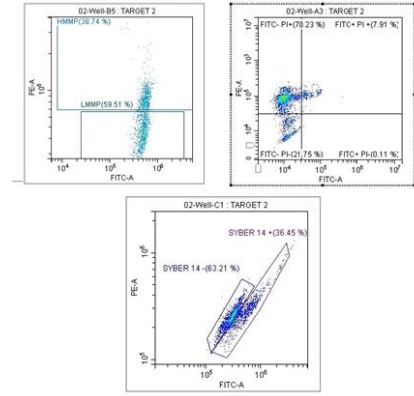
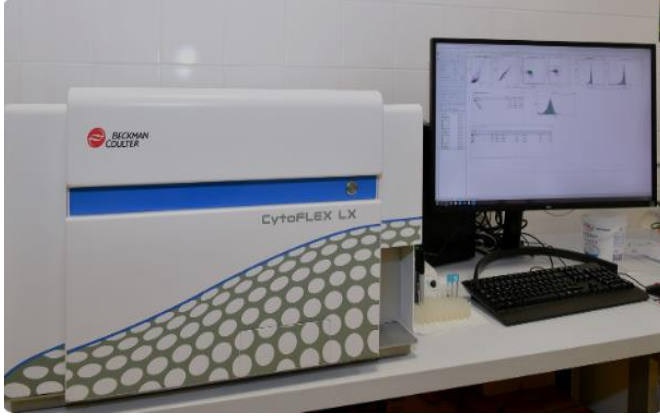
STR (Straightness; Ortalama Yolun Doğrusallığı): VSL/VAP (%).



Şekil 2.11. Kinematik hareket parametreleri

2.10 Flow Cytometri (Akış sitometri) Analizleri

Yapılan tüm akış sitometri analizleri, CytoFlex Akış sitometresi (Beckman Coulter, Fullerton, CA, ABD) ile gerçekleştirildi. CytoFlex, 488 nm ve 638 nm (50 mW lazer çıkışı)'de sinyal veren katı hal lazer sistemli ve sırasıyla 525nm'de yeşil, 590nm'de turuncu ve 670 nm'de kırmızı floresanı belirleyen emisyon filtrelerine sahip olan bir sistemdir. Sistem kullanılarak akış hızı 500 spermatozoon/s olarak ayarlandı ve her numune için 10000 spermatozoon analiz edildi.



Şekil 2.12. Flowcytometri cihazı ve örnek parametreler.

2.10.1 Canlılık muayenesi (Membran bütünlüğü)

Spermada ölü-canlı (membran bütünlüğü) oranı değerlendirilmesi için hasarlı ya da sağlam hücre membranlarını geçebilen SYBER-14 ve Propidium Iodid (PI) florasan boyaları kullanılmıştır. SYBR -14 hücre içine penetre olarak içerdiği yeşil florasan boya sayesinde spermatozoanın başını yeşile boyar. Plazma membranı sağlam olan spermatozoonlar bu nedenle yeşil görünürler. PI ise membranı hasarlı spermatozoonlara penetre olarak içerdiği kırmızı florasan boya ile onları boyar. Plazma membranı hasarlı olan spermatozoonlar bu nedenle kırmızı görünürler.

Analiz başına 241µl Tyrode's solüsyonu (Sigm Aldrich – T1788), 2,5µl SYBR-14 (Thermo Fisher T7011) ve 1,5µl PI olacak şekilde Mastermix solüsyonu hazırlandı. 96'lık well-plate'e (Beckman Coulter – Plate) aktarılan solüsyon üzerine 5 µl sperma eklendi ve 37°C de 15 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası analiz edilen (Malama ve ark 2017) spermatozoonlarda SYBR/PI boyama tekniğiyle ölü-canlı spermatozoa oranı değerlendirilirken baş kısmı yeşil floresan ışığı yansıtan hücreler canlı; kırmızı ve kırmızı-yeşil floresan ışığı yansıtan hücreler ölü olarak değerlendirildi.

2.10.2 Plazma membran ve akrozom bütünlüğü

Plazma membran ve akrozom bütünlüğü değerlendirilmesinde yine analiz başına 241µl Tyrode's solüsyonu, 2,5µl FITC-PNA (Sigma Aldrich – L7381) ve 1,5µl PI olacak şekilde Mastermix solüsyonu hazırlandı. 96'lık well-plate'e (Beckman Coulter – Plate)

aktarılan solüsyon üzerine 5 µl sperma eklendi ve 37°C de 15 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası analiz edilen (Malama ve ark 2017) spermatozoonlarda plazma membranı ve akrozomu bütün olan PI ve FITC-PNA negatif hücreler canlı olarak kabul edildi (PMAI, %).

2.10.3 Mitokondriyal membran potansiyeli

Yüksek mitokondriyal membran potansiyeline (HMMP) % ve düşük mitokondriyal membran potansiyeline (LMMP) % sahip spermatozoon hücrelerinin belirlenmesinde analiz başına 241µl Tyrode's solüsyonu, 2,5µl JC-1(Thermo Fischer – T3168) ve 1,5µl PI olacak şekilde Mastermix solüsyonu hazırlandı. 96'lık well-plate'e (Beckman Coulter – Plate) aktarılan solüsyon üzerine 5 µl sperma eklendi ve 37°C de 15 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası analiz edilen (Malama ve ark 2017) spermatozoonlarda PI pozitif hücreler değerlendirme dışı kabul edilerek iki canlı alt grup gözlemlendi.

- a) Turuncu floresan ışığı yansıtan PI negatif sperm (Yüksek Mitokondriyal Membran Potansiyeli (HMMP), %).
- b) Yeşil floresan ışığı yansıtan PI negatif sperm (Düşük Mitokondriyal Membran Potansiyeli (LMMP), %)

2.11 İstatistik Analizler

Sunulan tez çalışmasının sonucunda elde edilen tüm veriler öncelikle normallik yönünden Shapiro-Wilk testi ve varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile değerlendirilmeye tabi tutulmuştur. Gruplar arasındaki farkların önem derecesinin belirlenmesinde tekrarlı ölçümler için nonparametrik test varsayımlarından Friedman Testi uygulanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunanların belirlenmesi amacıyla varyansların homejenliğine göre Tamhane's T2 ve Tukey çoklu karşılaştırma testleri uygulanmıştır.

İstatistik hesaplamalarda, P değeri 0,05'ten düşük olan farklılıklar anlamlı olarak değerlendirilmiştir ($P<0,05$). Yapılan tüm istatistik analizler SPSS (IBM®, SPSS Statistical Software, version 27) istatistik paket programı kullanılarak hesaplanmıştır.



3. BULGULAR

Sunulan tez çalışması toplamda beş baş Kıvırcık x Akkaraman G1 koçu ve dokuz tekrar üzerinden gerçekleştirildi. Pooling yapılan sperma hacmi en düşük 4.4 ml, en yüksek 5.1 ml ve ortalama olarakta $4,8 \pm 0,23$ ml olarak tespit edilmiştir. Spermaların yoğunluğu en düşük 2000×10^6 ml, en yüksek 3400×10^6 ml ve ortalama olarakta $2800 \times 10^6 \pm 378,12$ ml olarak tespit edildi.

Bilgisayar Destekli Sperma Analiz (CASA- IVOS I, Hamilton Thorne Inc, USA) cihazında çözüm sonu motiliteye ilişkin sonuçlar Tablo 1’de sunulmuştur. Total motilite açısından gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). Total motilite oranının TR50 ($45,22 \pm 0,99$) grubunda K ($40,00 \pm 1,26$) grubuna göre istatistik olarak önemli derecede daha yüksek olduğu ($P < 0,05$); LIP100 ($35,11 \pm 0,42$) ve TR75-LIP100 ($34,33 \pm 0,52$) gruplarının istatistiki olarak K grubundan önemli derecede düşük olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$). Diğer gruplar arasındaki farklılıkların istatistiki açıdan önemsiz olduğu tespit edilmiştir ($P > 0,05$);

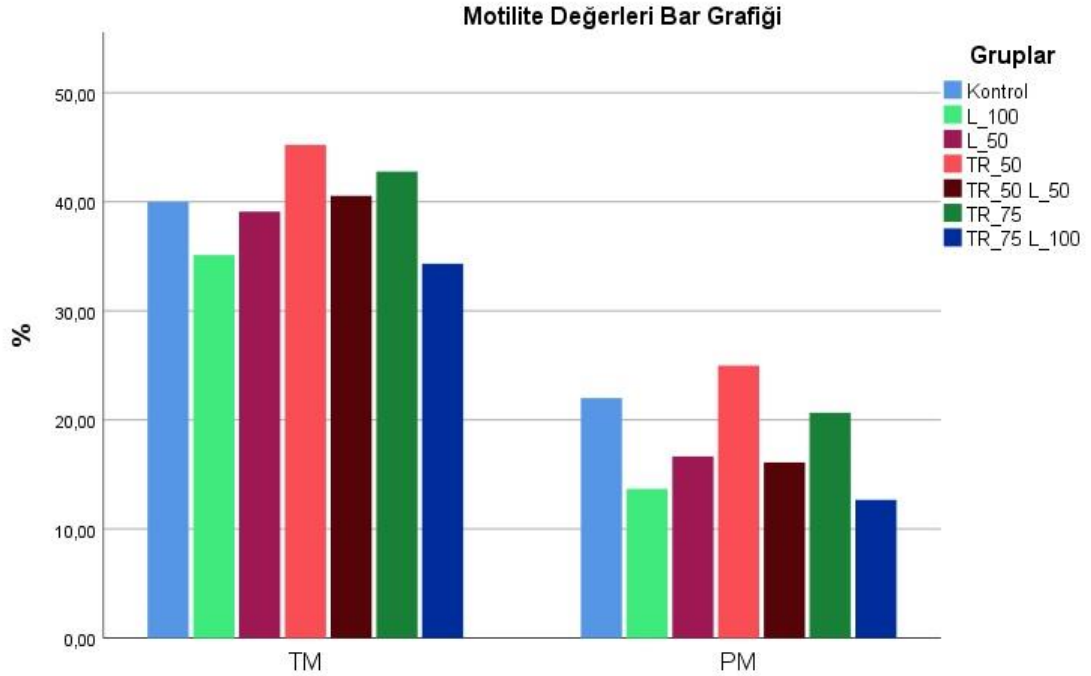
Progresif motilite oranları açısından yine TR50 ($25,00 \pm 0,47$) grubunun istatistiki olarak diğer tüm gruplardan önemli derecede yüksek olduğu belirlenirken ($P < 0,05$); LIP50 ($16,66 \pm 0,68$), LIP100 ($13,66 \pm 0,28$), TR50-LIP50 ($16,11 \pm 0,35$) ve TR75-LIP100 ($12,66 \pm 0,33$) gruplarının K ($22,00 \pm 0,81$) grubuna göre istatistiki olarak önemli derecede düşük olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$). TR75 ($20,66 \pm 0,33$) grubu ile K grubu arasında istatistiki açıdan önemli herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir ($P > 0,05$) (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Deneme gruplarında çözüm sonu elde edilen TM ve PM sonuçlarına ilişkin bulgular

CASA		
Gruplar	Total Motilite* (%)	Progresif Motilite* (%)
K	40,00±1,26 ^{bc}	22,00±0,81 ^b
TR50	45,22±0,99 ^a	25,00±0,47 ^a
TR75	42,77±0,68 ^{ab}	20,66±0,33 ^b
LIP50	39,11±0,61 ^c	16,66±0,68 ^c
LIP100	35,11±0,42 ^d	13,66±0,28 ^d
TR50 – LIP50	40,55±0,58 ^{bc}	16,11±0,35 ^c
TR75 – LIP100	34,33±0,52 ^d	12,66±0,33 ^d
P değeri	<0,05	<0,05

Aynı sütunda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0,05).

*SEM: Ortalama Standart Hata



Şekil 3.1. Çözüm sonu motilite değerlerine ilişkin bar grafiği.

Çözüm sonu CASA kinematik değer analiz bulguları açısından kimi değişkenlere ilişkin gruplar arası farklılıkların istatistiki olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$), (Tablo 3.2.).

VAP değerleri açısından TR50 ($58,42\pm0,45$) ve TR75 ($57,47\pm0,53$) grupları ile K ($55,17\pm1,36$) grubu arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$). LIP50 ($52,20\pm0,64$), LIP100 ($48,08\pm0,48$), TR50-LIP50 ($48,37\pm1,39$) ve TR75-LIP100 ($44,21\pm1,29$) gruplarının VAP değerlerinin istatistiki olarak K ($55,17\pm1,36$) grubuna göre önemli bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$).

VSL değerlerinin TR50 ($57,48\pm0,26$) ve TR75 ($56,86\pm0,50$) gruplarında K ($52,17\pm1,42$) grubuna göre istatistiki açıdan önemli bir şekilde yüksek olduğu ($P<0,05$); LIP50 ($51,31\pm0,56$) grubu ile K ($52,17\pm1,42$) grubu arasında istatistiki olarak önemli bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). LIP100 ($47,43\pm0,44$), TR50-LIP50 ($46,68\pm1,55$) ve TR75-LIP100 ($43,46\pm1,28$) gruplarının VSL değerlerinin ise istatistiki olarak K ($52,17\pm1,42$) grubundan önemli bir şekilde düşük olduğu görülmüştür ($P>0,05$).

Spermatozoon'un canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilen VCL değerleri açısından TR50 ($85,78\pm0,38$), TR75 ($83,91\pm0,71$) ve LIP50 ($75,73\pm0,16$) grupları ile K ($80,84\pm1,76$) grubu arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılığının olmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$). Ancak LIP100 ($74,08\pm0,22$), TR50-LIP50 ($71,11\pm1,85$) ve TR75-LIP100 ($65,03\pm2,00$) gruplarının istatistiki olarak K ($80,84\pm1,76$) grubuna göre önemli bir şekilde düşük VCL değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$).

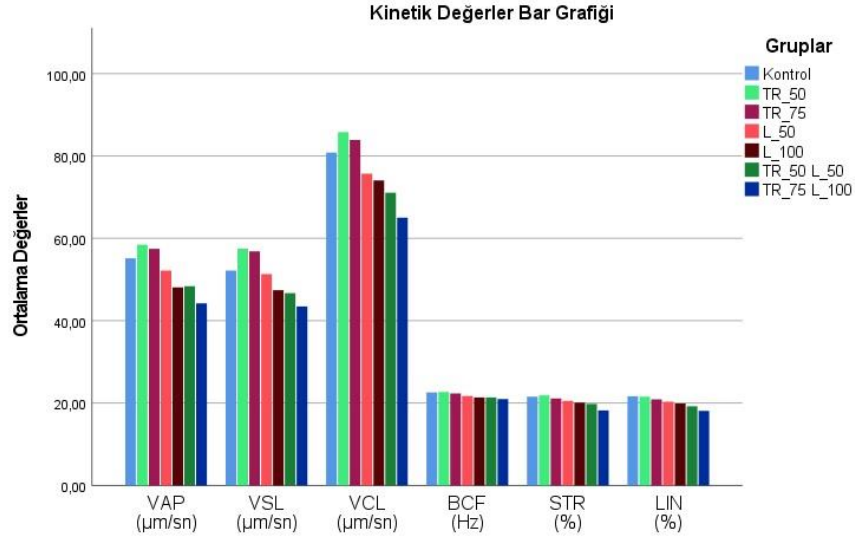
ALH değerleri açısından TR50 ($4,05\pm0,02$), TR75 ($4,08\pm0,01$) ve LIP50 ($3,92\pm0,04$) grupları ile K ($4,05\pm0,04$) grubu arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılık belirlenmezken ($P>0,05$); LIP100 ($3,32\pm0,07$), TR50-LIP50 ($3,66\pm0,07$) ve TR75-LIP100 ($3,35\pm0,10$) gruplarının ise istatistiki olarak K ($4,05\pm0,04$) grubuna göre önemli bir şekilde düşük olduğu görülmüştür ($P<0,05$).

BFC değerleri açısından TR50 ($22,68\pm0,06$) ve TR75 ($22,35\pm0,06$) grupları ile K ($22,57\pm0,10$) grubu arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılığının olmadığı görülürken ($P>0,05$); LIP50 ($21,73\pm0,10$), LIP100 ($21,35\pm0,08$), TR50-LIP50 ($21,38\pm0,14$) ve TR75-

LIP100 ($20,97 \pm 0,18$) gruplarının ise K ($22,57 \pm 0,10$) grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde düşük BCF değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$).

STR değerleri açısından TR50 ($21,88 \pm 0,11$) ve TR75 ($21,11 \pm 0,30$) grupları ile K ($21,55 \pm 0,70$) grubu arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılık belirlenmezken ($P > 0,05$); LIP50 ($20,55 \pm 0,17$), LIP100 ($20,11 \pm 0,20$), TR50-LIP50 ($19,77 \pm 0,22$) ve TR75-LIP100 ($18,22 \pm 0,27$) gruplarının ise istatistiki olarak K ($21,55 \pm 0,70$) grubuna göre önemli bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$).

LIN değerleri açısından yine TR50 ($21,66 \pm 0,17$) ve TR75 ($20,88 \pm 0,30$) gruplarının istatistiki olarak K ($21,66 \pm 0,23$) grubuna göre önemli bir farklılık göstermediği ($P > 0,05$) ancak LIP50 ($20,33 \pm 0,23$), LIP100 ($19,88 \pm 0,26$), TR50-LIP50 ($19,22 \pm 0,27$) ve TR75-LIP100 ($18,11 \pm 0,30$) gruplarında ise istatistiki olarak K ($21,66 \pm 0,23$) grubuna göre önemli bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$).



Şekil 3.2. Çözüm sonu kinetik değerlere ait bar grafiği

Tablo 3.2. Deneme gruplarında çözüm sonu elde edilen kinematik değerlere ilişkin bulgular

CASA							
Gruplar	VAP ($\mu\text{m/sn}$)*	VSL ($\mu\text{m/sn}$)*	VCL ($\mu\text{m/sn}$)*	ALH ($\mu\text{m/sn}$)*	BCF (Hz)*	STR (%)*	LIN (%)*
K	55,17 $\pm$ 1,36 ^a	52,17 $\pm$ 1,42 ^b	80,84 $\pm$ 1,76 ^{ab}	4,05 $\pm$ 0,04 ^a	22,57 $\pm$ 0,10 ^a	21,55 $\pm$ 0,17 ^a	21,66 $\pm$ 0,23 ^a
TR50	58,45 $\pm$ 0,45 ^{ab}	57,48 $\pm$ 0,26 ^a	85,78 $\pm$ 0,38 ^a	4,05 $\pm$ 0,02 ^a	22,68 $\pm$ 0,06 ^a	21,88 $\pm$ 0,11 ^a	21,66 $\pm$ 0,17 ^a
TR75	57,47 $\pm$ 0,53 ^a	56,86 $\pm$ 0,50 ^a	83,91 $\pm$ 0,71 ^a	4,08 $\pm$ 0,01 ^a	22,35 $\pm$ 0,06 ^a	21,11 $\pm$ 0,30 ^{ab}	20,88 $\pm$ 0,30 ^{ab}
LIP50	52,20 $\pm$ 0,64 ^{bc}	51,31 $\pm$ 0,56 ^{bc}	75,73 $\pm$ 0,16 ^{bc}	3,92 $\pm$ 0,04 ^{ab}	21,73 $\pm$ 0,10 ^b	20,55 $\pm$ 0,17 ^{bc}	20,33 $\pm$ 0,23 ^{bc}
LIP100	48,08 $\pm$ 0,48 ^{cd}	47,43 $\pm$ 0,44 ^{cd}	74,08 $\pm$ 0,22 ^c	3,32 $\pm$ 0,07 ^c	21,35 $\pm$ 0,08 ^{bc}	20,11 $\pm$ 0,20 ^c	19,88 $\pm$ 0,26 ^{bc}
TR50– LIP50	48,37 $\pm$ 1,39 ^{cd}	46,68 $\pm$ 1,55 ^d	71,11 $\pm$ 1,85 ^c	3,66 $\pm$ 0,07 ^b	21,38 $\pm$ 0,14 ^{bc}	19,77 $\pm$ 0,22 ^c	19,22 $\pm$ 0,27 ^{cd}
TR75– LIP100	44,21 $\pm$ 1,29 ^d	43,46 $\pm$ 1,28 ^d	65,03 $\pm$ 2,00 ^d	3,35 $\pm$ 0,10 ^c	20,97 $\pm$ 0,18 ^c	18,22 $\pm$ 0,27 ^d	18,11 $\pm$ 0,30 ^d
P değeri	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Aynı sütunda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0,05).

*SEM: Ortalama Standart Hata

Mitokondriyal membran potansiyeli ve viabilite değerlerine ilişkin sonuçlar Tablo 3.3'te sunulmuştur.

Düşük mitokondriyal membran potansiyeli (LMMP) değerleri açısından LIP100 ($78,96 \pm 0,72$) grubunun istatistiki olarak K ($71,41 \pm 1,23$) grubuna göre önemli bir şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). Diğer gruplar arasındaki farklılıkların istatistiki açıdan önemli olmadığı tespit edilmiştir ($P > 0,05$).

Yüksek mitokondriyal membran potansiyeli (HMMP) bulguları açısından TR50 ($32,12 \pm 1,41$), TR75 ($25,51 \pm 0,91$), LIP50 ($24,45 \pm 1,10$), TR50-LIP50 ($24,45 \pm 1,10$) ve TR75-LIP100 ($23,39 \pm 0,92$) grupları ile K ($26,49 \pm 1,25$) grubu arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılık olmadığı görölürken ($P > 0,05$); LIP100 ($19,72 \pm 0,98$) grubunun istatistiki olarak K ($26,49 \pm 1,25$) grubuna göre önemli bir şekilde düşük HMMP değerine sahip olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$).

Viabilite (canlı) oranları açısından TR50 ($52,33 \pm 3,19$) grubunun istatistiki olarak K ($40,87 \pm 0,93$) grubuna göre önemli bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$). Diğer gruplar arasında herhangi bir istatistiki farklılığın olmadığı tespit edildi ($P > 0,05$). TR50-LIP50 ($31,29 \pm 1,45$) ve TR75-LIP100 ($31,43 \pm 2,55$) gruplarında ise istatistiki olarak K ($40,87 \pm 0,93$) grubuna göre önemli bir şekilde düşük viabilite oranlarına sahip olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$).

Tablo 3.3. Çözüm sonu mitokondriyal membran ve akrozom bütünlüğüne ilişkin bulgular.

FLOW SİTOMETRİ				
Gruplar	LMMP (%) [*]	HMMP (%) [*]	CANLI (%) [*]	FITC – PI – (%) [*]
K	71,41±1,23 ^{bc}	26,49±1,25 ^{ab}	40,87±0,93 ^b	25,72±0,66 ^{ab}
TR50	67,13±1,66 ^c	32,12±1,41 ^a	52,33±3,19 ^a	31,13±1,27 ^a
TR75	73,34±1,04 ^{abc}	25,51±0,91 ^{abc}	41,90±2,69 ^b	25,79±1,56 ^{ab}
LIP50	75,59±2,92 ^{ab}	24,16±2,83 ^{bc}	38,34±1,42 ^{bc}	16,40±0,87 ^c
LIP100	78,96±0,72 ^a	19,72±0,98 ^c	39,28±1,07 ^{bc}	15,32±2,13 ^c
TR50– LIP50	74,09±1,51 ^{abc}	24,45±1,10 ^{bc}	31,29±1,45 ^c	18,01±3,02 ^{bc}
TR75– LIP100	75,25±1,14 ^{ab}	23,39±0,92 ^{bc}	31,43±2,55 ^c	20,36±2,75 ^{bc}
P değeri	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0,05).

*SEM: Ortalama Standart Hata

Akrozom bütünlüğü (FITC-) ve plazma membranı sağlam (PI-)spermatozoon oranları açısından TR50 (31,13±1,27), TR75 (25,79±1,56), TR50-LIP50 (18,01±3,02) ve TR75-LIP100 (20,36±2,75) grupları ile K (25,72±0,66) grubu arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılığın olmadığı (P>0,05); LIP50 (16,40±0,87) ve LIP100 (15,32±2,13) gruplarının ise K (25,72±0,66) grubuna göre istatistiki açıdan önemli bir şekilde düşük akrozom bütünlüğü ve plazma membran oranlarına sahip olduğu tespit edilmiştir (P<0,05). TR50 ve TR75 gruplarının LIP50 ve LIP100 gruplarına göre istatistiki açıdan önemli oranda yüksek sağlam akrozom ve plazma membran bütünlüğü oranlarına sahip olduğu belirlenmiştir. (P<0,05).

4. TARTIŞMA

Spermatozoonların kriyoprotektif etkilere karşı verdikleri cevaplar üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde özellikle koç ve teke spermalarının hücre zarı yapılarındaki Kolesterol/Fosfolipid ($C_{27}H_{46}O$ / $C_3H_8NO_6P$) dengesinin düşük oluşu ve doymamış çoklu yağ asitleri (Polyunsaturated fatty Acids) dengesinin yüksek olması sebebiyle donma ve çözündürme işlemlerine karşı oldukça hassas oldukları gözlemlenmiştir (Bucak ve ark 2007). Çözüm sonu sperma kalite parametrelerini iyileştirmek amacıyla araştırmacılar birçok kriyoprotektan maddeyi sperma sulandırıcılarına ekleyerek gerek membran yapılarındaki hasarları gerek akrozom hasarlarını gerekse viabiliteye olan etkilerini incelemişlerdir (Holt 1997, Aisen ve ark 2002).

Total motilite ve Progresif motilite bulguları:

Luna – Orozco ve ark (2018) tarafından Dorper ırkı koçlar üzerinde yürütülen çalışmada; yumurta sarılı modifiye tris (K) ve lipozom ihtiva eden ticari bir sulandırıcının (L) çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmada TM oranları açısından K (%2,2±0,2) ve L (%2,0±0,2) grupları arasında istatistiki bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). Mafolo ve ark (2020) tarafından Bapedi ırkı koçlar üzerinde yürütülen bir başka çalışmada ise; yumurta sarılı olmayan tris bazlı sulandırıcı (K1), lipozom katkılı yumurta sarılı olmayan tris bazlı sulandırıcı (L-YSO) ve yumurta sarılı tris bazlı sulandırıcı (K2), lipozom katkılı yumurta sarılı tris bazlı sulandırıcı (L-YS) kullanılmıştır. Çözüm sonu TM oranları açısından K1 (%30,6 ±7,9) ve L-YSO 0,50mg/ml (%22,6 ±7,9); K2 (%60,5 ±9,7) ve L-YS 0,50mg/ml (%60,7 ±7,9) grupları arasında istatistiki olarak bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). PM oranları açısından aynı şekilde K1 (%4,8 ±3,2) ve L-YSO 0,50mg/ml (%2,1 ±3,2); K2 (%17,6 ±3,9) ve L-YS 0,50mg/ml (%16,8 ±3,2) grupları arasında da istatistiki olarak bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). Zacarias (2023) tarafından Blackbelly ve Pelibuey ırkı koçlar üzerinde yürütülen çalışmada; tris bazlı yumurta sarılı (K) ve lipozom bazlı ticari sulandırıcılar (L) kullanılmış ve kullanılan sulandırıcıların çözüm sonu kimi spermatolojik parametreler açısından etkileri incelenmiştir. Blackbelly ırkı koçlarda TM ve PM oranları sırasıyla L (45,62±2,50 ve %2,63±0,22) ile K (40,62±3,09 ve %2,69±0,20) grubu arasında

istatistiki olarak bir farklılığın olmadığı ($P>0,05$) tespit edilmiştir ($P>0,05$). Pelibuey ırkı koçlarda ise TM oranları açısından L ($\%41,25\pm3,83$) grubu ile K ($\%41,50\pm3,19$) grubu arasında istatistiki bir farklılığın olmadığı ($P>0,05$); PM oranları açısından ise aynı şekilde L ($\%3,63\pm0,13$) grubu ile K ($\%3,31\pm0,20$) grubu arasında istatistiki bir farklılık tespit edilmediği ifade edilmiştir ($P>0,05$). Mehdipour ve ark (2017) Ghezel ırkı koçlar üzerinde yürüttükleri çalışmada; tris bazlı yumurta sarılı ana sulandırıcısına soya lesitini (K) ve lipozom eklenmiş (L) ve gruplarda sulandırıcıların çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırma neticesinde TM ve PM oranları sırasıyla L ($\%49,0$ ve $\%22,6$) ile K ($\%48,1$ ve $\%22,0$) olarak belirlenmiş ve gruplar arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık bulunmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). Mortazavi ve ark (2020) tarafından Ghezel ırkı koçlar üzerinde yürütülen bir başka çalışmada; DMSO (K) ve Lipozom (L) içeren sulandırıcılar ve bunlara eklenen Oleik Asidin çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkileri araştırılmış, TM ve PM oranları açısından sırasıyla K ($\%61,1$ ve $\%32,5$) ve L ($\%58,4$ ve $\%34,2$) grupları arasında istatistiki olarak önemli bir farklılığın olmadığını bildirilmiştir ($P>0,05$).

Miguel – Jimenez ve ark (2020) tarafından boğalar üzerinde yürütülen çalışmada; yumurta sarılı tris bazlı (K) ve lipozom bazlı ticari sulandırıcılar (L) kullanılmış, sulandırıcıların çözüm sonu spermatolojik parametreleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırma neticesinde TM oranları açısından L ($\%55,8 \pm 2,3$) grubunun K ($\%60,1 \pm 2,3$) grubuna göre önemli bir şekilde düşük olduğu ($P<0,05$); PM oranları açısından ise L ($\%82,2 \pm 0,9$) grubu ile K ($\%82,1 \pm 0,9$) grubu arasında istatistiki olarak önemli bir farklılığının olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). Singh ve ark (2018) tarafından boğalar üzerinde yürütülen bir başka çalışmada; tris bazlı yumurta sarılı (K) ve lipozom bazlı ticari sulandırıcıların (L) çözüm sonu spermatolojik parametreleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırma neticesinde TM oranları açısından L ($\%49,2 \pm 2,4$) grubunun K ($\%43,4 \pm 2,3$) grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olduğu ($P<0,05$); PM oranları açısından ise K ($\%20,4 \pm 1,6$) ve L ($\%24,3 \pm 1,8$) grupları arasında istatistiki olarak önemli bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). Turner ve ark (2020) tarafından boğalar üzerinde yürütülen bir diğer çalışmada; elektroejakülatörle alınan spermalar tris bazlı yumurta sarılı modifiye Botubov sulandırıcı (K1) ve lipozom bazlı ticari bir sulandırıcı

(EEL), epididimal spermalar ise tris bazlı yumurta sarılı modifiye Botubov (K2) ve lipozom bazlı ticari bir sulandırıcı (EPL) ile sulandırılmış gruplarda sulandırıcıların çözüm sonu spermatolojik parametre üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Çalışma neticesinde TM oranları açısından EEL (%50,2) grubunun K1 (%60,3) grubuna göre; EPL (%41,1) grubunun K2 (%59,4) grubuna göre istatistiksel açıdan önemli şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). PM oranları açısından değerlendirildiğinde ise EEL (%41,3) grubu ile K1 (43,7) grubu arasında istatistiki olarak önemli bir farkın olmadığı ($P>0,05$) ancak EPL (%33,6) grubunun K2 (%43,8) grubuna göre istatistiki açıdan önemli bir şekilde düşük olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). Kumar ve ark (2015) tarafından Murrah ırkı mandalarda yürütülen çalışmada; modifiyeli tris sulandırıcısı (K) ve lipozom ihtiva eden ticari bir sulandırıcı (L) kullanılmış ve sulandırıcıların çözüm sonu spermatolojik özellikler açısından etkileri araştırılmıştır. Araştırma neticesinde TM ve PM oranlarının sırasıyla L (%56,51±11,48 ve %31,12±5,41) grubunda K (%45,64±7,0 ve %23,96±8,95) grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olduğu ($P<0,05$) tespit edilmiştir ($P<0,05$). Medina-León ve ark (2019) tarafından atlar üzerinde yürütülen başka bir çalışmada; INRA96 (K) sulandırıcısına eklenen 50µl Lipozom (L) ve L+200mM Trehaloz (LT) gruplarının çözüm sonu spermatolojik özellikler üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada TM oranları açısından L (%33,3) grubunun K (%25,8) grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olduğu ($P<0,05$); LT (%15,8) grubunun ise K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Belala ve ark (2016) tarafından köpekler üzerinde yürütülen çalışmada; %6 lipozom (L) ve tris bazlı %40 yumurta sarısı (YS) içeren modifiyeli sulandırıcı gruplarının çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma neticesinde TM ve PM oranları sırasıyla L (%28,6 ve %19,8) ve YS (%35,2 ve %24,3) olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir ($P>0,05$). Mendoza – Viveros ve ark (2022) tarafından domuzlar üzerinde yürütülen bir diğer çalışmada; 300mM Trehaloz (K) grubu ve K+%10 Lipozom (L) gruplarının çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkileri incelenmiş, TM oranları açısından K (%21,06) ve L (%18,92) grupları arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık belirlenmemiştir ($P>0,05$).

Sunulan tez çalışmasında elde edilen bulgular TM oranları açısından incelendiğinde; TR50 grubunun K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olduğu ($P<0,05$); LIP100 ve TR75-LIP100 gruplarının ise K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde düşük olduğu ($P<0,05$); TR75, LIP50, TR50-LIP50 grupları arasında da K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir farklılığının olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). PM oranları açısından incelendiğinde, TR50 grubunun K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olduğu ($P<0,05$); LIP50, LIP100, TR50-LIP50 ve TR75-LIP100 gruplarının istatistiki olarak önemli şekilde düşük olduğu ($P<0,05$) ve TR75 grubunun ise K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir farklılık göstermediği belirlenmiştir ($P>0,05$). Lipozom grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise LIP50 grubunun LIP100 grubuna göre istatistiki olarak önemli derecede yüksek sonuçlar gösterdiği ($P<0,05$), mix gruplarında ise aynı şekilde TR50-LIP50 grubunun TR75-LIP100 grubuna göre istatistiki olarak önemli derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$).

Bu bulgular ışığında koçlar üzerinde yürütülen çalışmalar değerlendirildiğinde, sunulan tez çalışmasında kullanılan lipozomun motilite üzerine etkilerinin K grubuna göre istatistiki farklılıkları genel olarak bu tez çalışmasında tartışılan önceki çalışmaların (Luna – Orozco ve ark (2018), Mafolo ve ark (2020), Zacarias (2023), Mehdipour ve ark (2017), Mortazavi ve ark (2020)) sonuçlarıyla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Farklı türlerde yapılan çalışmalara bakıldığında ise Miguel – Jimenez ve ark (2020), Turner ve ark (2020), Belala ve ark (2016), Mendoza – Viveros ve ark (2022) bildirmiş oldukları sonuçların sunulan tez çalışmasıyla paralellik gösterdiği; Singh ve ark (2018), Kumar ve ark (2015), Medina-León ve ark (2019) yaptıkları çalışmalarda ise bu çalışma sonuçlarının aksine, lipozomun motilite üzerine olan etkisinin K grubuna göre istatistiki olarak önemli derecede yüksek olduğu görülmüştür ($P<0,05$).

Genel olarak lipozomun motilite üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışmalar ve bu tez çalışmasındaki sonuçlar değerlendirildiğinde çözüm sonu motilite oranlarının, bu çalışmada karşılaştırılan literatürler ile benzer sonuç gösterdiği görülmüştür. Bu durumun yumurta sarısında bulunan lipoproteinlerin ve fosfolipidlerin etkisine benzer şekilde, lipozomun; kolesterol/fosfolipit oranını değiştirerek spermatozoonların motilite kaybı ve

soğuk şokuna karşı koruyucu etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Bahsedilen literatürlerden farklı bulunan etkilerinin ise çalışmalarda kullanılan hayvan türleri, hayvan materyalinin bakım beslenme koşulları, kullanılan lipozom dozları arasındaki farklılıklar ve çözündürme şekilleri ile ana sulandırıcılardaki farklılıklardan kaynaklandığı şeklinde değerlendirilmektedir. Ayrıca lipozomun K grubuna göre daha yüksek etki göstermemesinin nedeni olarak, Mafolo ve ark (2020)'nın da bildirdiği şekilde, lipozomun yumurta sarısı içeren ana sulandırıcılar ile birlikte kullanıldığında spermatozoon membranı yerine yumurta sarısı lipidlerine çekildiği ve bu nedenle kriyoprotektan etkisinin azaldığı söylenebilir. Yine farklı türlerdeki çalışmalarla kıyaslandığında sonuçlar arasındaki değişimlerin sebebinin türler arasındaki membran yapılarının farklılıklardan kaynaklandığı düşünülebilir. Koç spermatozoonlarının membran yapıları doymamış yağ asitleri açısından zengin; boğa spermatozoonlarının membranları ise doymuş yağ asitleri açısından zengin olduğundan bu farklılık membran dayanıklılığını etkilemektedir.

Kinematik Değer bulguları;

Mafolo ve ark (2020) tarafından Bapedi ırkı koçlar üzerinde yürütülen çalışmada; yumurta sarılı olmayan tris bazlı sulandırıcı (K1), lipozom katkılı yumurta sarılı olmayan tris bazlı sulandırıcı (L-YSO) ve yumurta sarılı tris bazlı sulandırıcı (K2), lipozom katkılı yumurta sarılı tris bazlı sulandırıcılar (L-YS) kullanılarak dondurulmuş ve çözündürülmüş gruplarda adı geçen sulandırıcıların kinematik değer parametreleri üzerine etkilerinin incelenmesi neticesinde VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$) ve VCL ($\mu\text{m/s}$) değerleri açısından K1 grubunun L-YSO 0,50mg/ml gruba göre (%34,4 $\pm$ 8,0 / %22,8 $\pm$ 8,0), (%25,3 $\pm$ 7,3 / %15,8 $\pm$ 7,3) ve (48,9 $\pm$ 8,9 / %34,6 $\pm$ 8,9) olarak sırasıyla bildirilen değerleri arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılığın olmadığı ($P>0,05$); yine aynı şekilde K2 grubunun L-YS 0,50mg/ml gruba göre (%61,3 $\pm$ 9,8 / %54,8 $\pm$ 8,0), (%45,6 $\pm$ 8,9 / %44,4 $\pm$ 7,3) ve (77,0 $\pm$ 10,8 / %65,3 $\pm$ 8,9) olarak sırasıyla bildirilen değerler arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). Mehdipour ve ark (2017) tarafından Ghezel ırkı koçlar üzerinde yürütülen çalışmada; tris bazlı yumurta sarılı ana sulandırıcısına soya lesitini (K) ve lipozom eklenerek (L) dondurulmuş ve sulandırıcıların çözüm sonu kinematik değer parametreleri üzerine etkilerinin incelenmesi neticesinde VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$) ve VCL ($\mu\text{m/s}$) değerleri K ve L gruplarında sırasıyla (%64,3

ve %66,5), (%49,7 ve %50,6) ve (%111,1 / %111,7) olarak belirlenmiş ve bu değerler arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$).

Miguel – Jimenez ve ark (2020) tarafından boğalar üzerinde yürütülen çalışmada; yumurta sarılı tris (K) ve lipozom bazlı sulandırıcıların (L) çözüm sonu kinematik değer parametreleri açısından etkileri incelenmiş, VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$) ve VCL ($\mu\text{m/s}$) değerleri K ve L gruplarında sırasıyla (%77,5 $\pm$ 0,2 ve %72,6 $\pm$ 0,2), (%56,7 $\pm$ 0,2 ve %54,8 $\pm$ 0,2) ve (%117,9 $\pm$ 0,2 ve %115,5 $\pm$ 0,2) olarak elde edilmiştir. Bildirilen değerler arasında her üç değer için de lipozomun kontrol grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde düşük olduğu ifade edilmiştir ($P<0,05$). Singh ve ark (2018) tarafından boğalar üzerinde yapılan bir başka çalışmada; tris bazlı yumurta sarılı modifiye sulandırıcı (K) ve lipozom bazlı ticari sulandırıcı (L) gruplarında kinematik değer parametreleri değerlendirilmiş, VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$) ve VCL ($\mu\text{m/s}$) değerleri sırasıyla (%76,4 $\pm$ 3,6 ve %73,4 $\pm$ 5,1), (%54,8 $\pm$ 2,3 ve %63,5 $\pm$ 3,2) ve (%98,5 $\pm$ 5,9 ve %115,1 $\pm$ 6,7) olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak VAP değerleri arasında istatistiki olarak önemli bir farkının olmadığı ($P>0,05$), VSL ve VCL değerleri açısından ise L grubunun K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Turner ve ark (2020) tarafından boğalar üzerinde yürütülen çalışmada; elektroejakülatörle alınan spermalar tris bazlı yumurta sarılı modifiye Botubov sulandırıcı (K1) ve lipozom bazlı ticari bir sulandırıcı (EEL) ile; epididimal spermalar ise tris bazlı yumurta sarılı modifiye Botubov (K2) ve lipozom bazlı ticari bir sulandırıcı (EPL) ile sulandırılarak dondurulmuş ve gruplarda kinematik değer parametreleri tespit edilmiştir. Çalışmada VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$) ve VCL ($\mu\text{m/s}$) değerleri K1, EEL, K2 ve EPL gruplarında sırasıyla (%42, %60, %48 ve %58), (%37, %46, %33 ve %44) ve (%72, %114, %114 ve %94) olarak belirlenmiştir. VAP ve VCL değerlerinin EEL grubunda K1 grubuna göre istatistiki olarak önemli ölçüde yüksek olduğu ($P<0,05$); VSL değerleri açısından EEL ve K1 grupları arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılığın olmadığı ($P>0,05$); yine EPL ve K2 grupları arasında VAP ve VCL değerleri açısından istatistiki anlamda önemli bir farklılığın olmadığı ($P>0,05$) ancak VSL değerleri açısından EPL grubunun K2 grubuna göre istatistiki olarak önemli oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Kumar ve ark (2015) tarafından Murrah ırkı mandalar üzerinde yürütülen bir başka çalışmada;

modifiyeli tris sulandırıcısı (K) ve lipozom ihtiva eden ticari bir sulandırıcı (L) gruplarının çözüm sonu kinematik değer parametreleri açısından etkileri araştırılmıştır. Araştırma neticesinde K ve L gruplarında sırasıyla VAP ($\mu\text{m/s}$) ($\%90,53\pm12,08$ ve $\%102,36\pm17,20$), VSL ($\mu\text{m/s}$) ($\%76,28\pm8,76$ ve $\%81,29\pm12,81$) ve VCL ($\mu\text{m/s}$) ($\%155,31\pm9,96$ ve $\%185,09\pm4,17$) olarak tespit edilmiştir. VAP ve VSL parametrelerine ilişkin K ve L gruplarının istatistiki olarak farklılık göstermediği ($P>0,05$) ancak VCL değerleri açısından L grubunun K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Belala ve ark (2016) tarafından köpekler üzerinde yürütülen çalışmada $\%6$ lipozom (L) ve tris bazlı $\%40$ yumurta sarısı (YS) modifiyeli sulandırıcı gruplarının çözüm sonu kinetik değer parametreleri açısından etkileri araştırılmış, YS ve L gruplarında sırasıyla VAP ($\mu\text{m/s}$), ($\%95,90\pm3,22$ ve $\%101,0\pm4,90$), VSL ($\mu\text{m/s}$), ($\%83,39\pm3,56$ ve $\%87,43\pm5,12$) ve VCL ($\mu\text{m/s}$), ($\%156,4\pm3,0$ ve $\%169,6\pm5,97$) olarak bulunmuştur. Bildirilen değerler açısından gruplar arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). Najafi ve ark (2019) tarafından horozlar üzerinde yürütülen çalışmada; Beltsville modifiye sulandırıcısı (K) ve Ellajik asit+Lipozom (EA-L) sulandırıcılarının çözüm sonu kinematik değer parametreleri açısından etkileri araştırılmış K ve EAL 0,5mM sulandırıcılarında sırasıyla VAP ($\mu\text{m/s}$) ($\%28,8$ ve $\%31,4$), VSL ($\mu\text{m/s}$) ($\%17,9$ ve $\%20,5$) ve VCL ($\mu\text{m/s}$) ($\%51,9$ ve $55,0$); 1mM sulandırıcıda sırasıyla VAP ($\mu\text{m/s}$) ($\%28,8$ ve $\%35,8$), VSL ($\mu\text{m/s}$) ($\%17,9$ ve $\%16,5$) ve VCL ($\mu\text{m/s}$) ($\%51,9$ ve $\%60,4$) ve 2mM sulandırıcıda VAP ($\mu\text{m/s}$) ($\%28,8$ ve $\%32,5$), VSL ($\mu\text{m/s}$) ($\%17,9$ ve $\%16$) ve VCL ($\mu\text{m/s}$) ($\%51,9$ ve $\%59,1$) olarak tespit edilmiştir. Bildirilen değerler açısından gruplar arasında istatistiki bir farklılığının olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$).

Sunulan tez çalışmasından elde edilen veriler incelendiğinde; VAP ($\mu\text{m/s}$) değerleri açısından TR50 ve TR75 grupları ile K grubu arasında istatistiki olarak önemli bir farklılığının olmadığı ($P>0,05$) ancak LIP50, LIP100, TR50-LIP50 ve TR75-LIP100 gruplarının K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). VSL ($\mu\text{m/s}$) değerleri açısından TR50 ve TR75 grupları ile K grubu arasında istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olduğu ($P<0,05$); LIP50 grubu ile K grubu arasında istatistiki olarak önemli bir farklılığının olmadığı ($P>0,05$) ve LIP100,

TR50-LIP50 ve TR75-LIP100 gruplarında K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). VCL ($\mu\text{m/s}$) değerleri açısından TR50, TR75 ve LIP50 grupları ile K grubu arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık gözlemlenmemiş ($P>0,05$) ancak LIP100 TR50-LIP50 ve TR75-LIP100 grupları ile K grubu arasında istatistiki olarak önemli bir şekilde düşük olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$).

Çalışmamızda kullanılan lipozomun, spermatozoonların kinematik değerleri üzerine olan etkisi diğer çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde çözüm sonu motilite değerleri üzerine olan etkisi ile paralel olarak, kinematik değerleri üzerine de benzer özellikler göstermiştir. Lipozomun donma-çözdürme sırasındaki membran ve akrozom üzerine kriyoprotektan etkilerinin, tris bazlı yumurta sarısı içeren K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Bu durum genel anlamda kinematik değer parametreleri açısından spermatozoon hareket özelliklerindeki değişkenliğin ve sulandırıcıda bulunan bileşenlerinin çözüm sonu spermatozoon kinetiği üzerinde farklı etkilere sahip olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca farklı türlerdeki değişken sonuçların elde edilmesi de yine türler arası farklılıklara ve kullanılan kriyoprotektanların konsantrasyon farklılıklarına bağlı değişkenlik gösterdiği düşünülmektedir.

Mitokondriyal Membran Potansiyeli (HMMP) ve Viabilite bulguları

Luna – Orozco ve ark (2018) tarafından Dorper ırkı koçlar üzerinde yürütülen bir çalışmada; yumurta sarılı tris (K) ve lipozom ihtiva eden ticari sulandırıcıların (L) çözüm sonu viabilite değerleri üzerine etkileri araştırılmış ve K ($\%52,7\pm3,4$) grubuna ilişkin viabilite değerlerinin L ($\%59,0\pm3,9$) grubuna göre istatistiki olarak önemli bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($P>0,05$). Mafolo ve ark (2020) tarafından Bapedi ırkı koçlar üzerinde yürütülen çalışmada; yumurta sarısı içermeyen tris bazlı sulandırıcı (K1), lipozom katkılı yumurta sarısı içermeyen tris bazlı sulandırıcı (L-YSO) ve yumurta sarılı tris bazlı sulandırıcı (K2), lipozom katkılı yumurta sarılı tris bazlı sulandırıcılar (L-YS) kullanılmıştır. Gruplarda viabilite değerleri açısından K1 ($\%46,0\pm3,0$) ve L-YSO 0,50mg/ml ($\%43,8\pm3,0$) grupları ile K2 ($\%45,3\pm3,4$) ve L-YS 0,50mg/ml ($\%43,8\pm3,0$) grupları arasında istatistiki olarak önemli bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$).

Zacarias (2023) tarafından Blackbelly ve Pelibuey ırkı koçlar üzerinde yürütülen çalışmada; tris bazlı yumurta sarılı (K) ve lipozom bazlı ticari sulandırıcı (L) gruplarının çözüm sonu mitokondriyal membran bütünlüğü ve viabilite değerleri açısından etkileri araştırılmıştır. Araştırma neticesinde Blackbelly ırkı koçların HMMP ve viabilite değerleri K ve L gruplarında sırasıyla ($45,31 \pm 2,49$ ve $\%42,88 \pm 3,73$) ve ($\%41,31 \pm 2,43$ ve $\%44,63 \pm 2,49$) olarak tespit edilmiş ve gruplar arasında istatistiki olarak bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir ($P > 0,05$). Pelibuey ırkı koçların HMMP ve viabilite değerleri K ve L gruplarında sırasıyla ($\%45,0 \pm 2,39$ ve $\%46,25 \pm 2,23$) ve ($\%42,88 \pm 2,01$ ve $\%41,87 \pm 2,59$) olarak tespit edilmiş ve gruplar arasında istatistiki olarak bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P > 0,05$).

Mehdipour ve ark (2017) Ghezel ırkı koçlar üzerinde yürüttükleri çalışmada; tris bazlı yumurta sarılı ana sulandırıcıya soya lesitini (K) ve lipozom eklemiş (L) ve gruplarda çözüm sonu mitokondriyal membran bütünlüğü (HMMP) ve viabilite değerlerini K ve L gruplarında sırasıyla ($\%31,2$ ve $\%28,3$) ve ($\%50,9$ ve $\%52,6$) olarak tespit etmişlerdir. Araştırma neticesinde gruplar arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık olmadığı ifade edilmiştir ($P > 0,05$).

Mortazavi ve ark (2020) tarafından Ghezel ırkı koçlar üzerinden yürütülen bir başka çalışmada ise; DMSO (K) ve lipozom (L) grupları ve bunlara eklenen Oleik Asidin çözüm sonu viabilite değerleri K ve L gruplarında sırasıyla ($\%55,40 \pm 3,48$) ve ($\%59,87 \pm 3,73$) olarak tespit edilmiş, L grubunun K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olduğu görülmüştür ($P < 0,05$). Viabilite değerlerinin yine $0,50 \text{ mM}$ 'lık Oleik asit ilave edilen LO ($\%78,36 \pm 1,06$) grubunda KO ($\%59,14 \pm 1,67$) grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olduğu ($P < 0,05$) ancak 1 mM 'lık Oleik Asit ilave edilen KO ($\%67,34 \pm 3,31$) ve LO ($\%71,39 \pm 1,04$) grupları arasında istatistiki olarak farklılık belirlenmediği ifade edilmiştir ($P > 0,05$).

Miguel – Jimenez ve ark (2020) tarafından boğalar üzerinde yürütülen çalışmada; yumurta sarılı tris bazlı (K) ve lipozom bazlı ticari sulandırıcı (L) kullanılmış ve gruplarda çözüm sonu viabilite değerleri L ve K gruplarında sırasıyla ($\%66,5 \pm 1,3$) ve ($\%58,5 \pm 1,6$) olarak tespit edilmiş olup, L grubunun K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde

yüksek olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). Singh ve ark (2018) tarafından boğalar üzerinde yürütülen bir başka çalışmada ise; tris bazlı yumurta sarılı (K) ve lipozom bazlı ticari sulandırıcılar (L) kullanılmış olup grupların çözüm sonu viabilite değerleri K ve L gruplarında sırasıyla (%58,6) ve (%56,7) olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak gruplar arasında istatistiki bir farklılık olmadığı ifade edilmiştir ($P>0,05$). Turner ve ark (2020) tarafından boğalar üzerinde yürütülen bir diğer çalışmada; elektroejakülatörle alınan spermalar tris bazlı yumurta sarılı modifiye Botubov sulandırıcı (K1) ve lipozom bazlı ticari bir sulandırıcı (EEL) ile; epididimal spermalar ise tris bazlı yumurta sarılı modifiye Botubov (K2) ve lipozom bazlı ticari bir sulandırıcı (EPL) ile sulandırılarak grupların çözüm sonu mitokondriyal membran bütünlüğü (HMMP) değerlendirmeleri yapılmıştır. Yapılan çalışma neticesinde HMMP oranları K1 ve EEL gruplarında sırasıyla (%46,3) ve (%40,5) olarak belirlenmiş, EEL grubunun K1 grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). HMMP oranları aynı şekilde K2 ve EPL gruplarında sırasıyla (%5,9) ve (%9,8) olarak belirlenmiş ve EPL grubunun K2 grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Belala ve ark (2016) tarafından köpekler üzerinde yürütülen çalışmada; %6 lipozom (L) ve tris bazlı %40 yumurta sarısı (YS) modifiyeli sulandırıcıları kullanılmış ve viabilite değeri YS ve L gruplarında sırasıyla (%81,5 $\pm$ 4,6) ve (%78,3 $\pm$ 3,5) olarak bildirilmiştir. Gruplar arasında istatistiki olarak bir farklılık olmadığı araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır ($P>0,05$). Mendoza – Viveros ve ark (2022) tarafından domuzlar üzerinde yürütülen çalışmada; 300mM Trehaloz (K) grubu ve K+%10 lipozom (L) grupları oluşturulmuş viabilite değerleri K ve L gruplarında sırasıyla (%27,29 $\pm$ 3,27) ve (%28,22 $\pm$ 2,72) olarak belirlenmiş olup, gruplar arasında istatistiki olarak bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). Najafi ve ark (2019) tarafından horozlar üzerinde yürütülen çalışmada; Beltsville modifiye sulandırıcısı (K) ve Ellajik asit+Lipozom (EA-L) kullanılmış, gruplarda çözüm sonu mitokondriyal membran bütünlüğü (HMMP) ve viabilite oranları araştırılmıştır. Araştırma neticesinde HMMP oranları; K, EA-L 0,5mM, 1mM ve 2mM gruplarında sırasıyla (%47,2, %54,5, %70,7 ve %54,5) olarak tespit edilmiştir. HMMP oranlarının 1 mM EA-L grubunda K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olduğu ($P<0,05$); 0,5 ve 2mM EA-L grupları ile K grubu arasında herhangi istatistiki farklılığın olmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$). Viabilite değerleri; K, EA-L

0,5mM, 1mM ve 2mM gruplarında sırasıyla (%60,9, %65,9, %77,5 ve %62,8) olarak tespit edilmiştir. Aynı şekilde viabilite değerlerinin 1 mM EA-L grubunda K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olduğu ($P<0,05$); 0,5 ve 2mM grupları ile K grubu arasında istatistiki olarak bir farklılık olmadığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir ($P>0,05$).

Sunulan tez çalışmasından elde edilen veriler incelendiğinde; HMMP değerleri açısından LIP100 grubunun K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde düşük olduğu ($P<0,05$); TR50, TR75, LIP50, TR50-LIP50 ve TR75-LIP100 gruplarının ise K grubuna göre istatistiki olarak farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($P>0,05$). Viabilite değerleri açısından TR50 grubunun K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olduğu ($P<0,05$); TR75, LIP50 ve LIP100 grupları ile K grubu arasında istatistiki olarak farklılık bulunmadığı ($P>0,05$); TR50-LIP50 ve TR75-LIP100 gruplarına ilişkin değerlerin K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$).

Bu bulgular ışığında sunulan tez çalışması, Luna – Orozco ve ark (2018), Mafolo ve ark (2020), Zakarias ve ark (2023) ve Mehdipour ve ark (2017) tarafından yapılan çalışmaların bulgularıyla karşılaştırıldığında viabilite değerleri bakımından çalışmamıza benzer bir şekilde, Lipozom grupları ile K grupları arasında istatistiki olarak bir farklılık bulunmazken ($P>0,05$), Mortazavi ve ark (2020) lipozomun etkisini kontrol grubuna göre istatistiki olarak önemli derecede yüksek bulmuşlardır ($P<0,05$). Farklı türlerde yapılan çalışmalara bakıldığında Singh ve ark (2018), Belala ve ark (2016), Mendoza – Viveros ve ark (2022) tarafından yapılan çalışmaların viabilite bulgularıyla karşılaştırıldığında çalışmamıza benzer bir şekilde Lipozom gruplarındaki değerler K grubundaki değerlere göre istatistiki olarak farklılık göstermezken ($P>0,05$), Miguel – Jimenez ve ark (2020) lipozomun etkisini kontrol grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olarak tespit etmişlerdir ($P<0,05$).

HMMP değerleri açısından sunulan tez çalışmasındaki veriler değerlendirildiğinde, diğer çalışmalarla (Zakarias ve ark (2023), Mehdipour ve ark

(2017)) paralel bir şekilde Lipozomun kontrol grubuna göre istatistiki farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($P>0,05$).

Sunulan tez çalışmasındaki veriler diğer literatür bulgularıyla beraber değerlendirildiğinde, lipozomun gerek mitokondriyal membran potansiyeli üzerine gerekse de spermatozoon viabilitesi üzerine K grubuna göre istatistiki bir farklılık göstermediği görülmektedir ($P>0,05$). K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir etkisinin görülmemesinin nedeninin ise tris bazlı yumurta sarılı ana sulandırıcıdan kaynaklı olabileceği şeklinde değerlendirilmektedir. Çalışmamızın bazı literatür verilerine göre istatistiki farklılık gösteren sonuçları ise çalışmalarda kullanılan sulandırıcının ticari içerikli olması, içeriğine katılan gliserol oranlarındaki farklılıkların ve farklı lipozom konsantrasyonlarının da etkili olduğu düşünülmektedir.

Plazma Membran ve Akrozom Bütünlüğü PMAI (FITC-PI-) bulguları

Mafolo ve ark (2020) tarafından Bapedi ırkı koçlar üzerinde yürütülen çalışmada; yumurta sarısı içermeyen tris bazlı sulandırıcı (K1), lipozom katkılı yumurta sarısı içermeyen tris bazlı sulandırıcı (L-YSO) ve yumurta sarısı içeren tris bazlı sulandırıcı (K2), lipozom katkılı yumurta sarısı içeren tris bazlı sulandırıcılar (L-YS) kullanılmış ve grupların PMAI değerleri K1 ve L-YSO 0,50mM gruplarında sırasıyla ($\%31,9\pm3,9$ ve $\%36,3\pm3,9$) olarak elde edilmiştir. K2 ve L-YS 0,50mM gruplarında ise sırasıyla ($\%55,8\pm4,5$) ve ($\%58,4\pm3,9$) değerleri elde edilmiş olup gruplar arasında herhangi bir istatistiki önemli farklılığın bulunmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). Zacarias (2023) tarafından Blackbelly ve Pelibuey ırkı koçlarda yürütülen bir başka çalışmada; tris bazlı yumurta sarılı ticari sulandırıcı (K) ve lipozom bazlı ticari sulandırıcılar (L) kullanılmış, gruplarda PMAI değerleri Blackbelly ırkı koçlarda K ve L gruplarında sırasıyla ($\%31,81\pm1,98$) ve ($\%32,31\pm1,77$) olarak, Pelibuey ırkı koçlarda K ve L gruplarında sırasıyla ($\%32,38\pm2,08$) ve ($\%32,13\pm1,41$) olarak tespit edilmiş ve gruplar arasında istatistiki olarak farklılıklarının bulunmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$). Mehdipour ve ark (2017) tarafından Ghezel ırkı koçlarda yürütülen bir başka çalışmada; tris bazlı yumurta sarılı ana sulandırıcıya soya lesitini (K) ve lipozom eklenmiş (L) olup gruplarda PMAI bulguları K ve L gruplarının sırasıyla ($\%45,1$) ve ($\%45,4$) olarak belirlenmiş ve gruplar

arasında istatistiki olarak önemli bir farklılığının gözlemlenmediği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir ($P>0,05$).

Singh ve ark (2018) tarafından boğalar üzerinde yürütülen çalışmada; tris bazlı yumurta sarılı modifiye sulandırıcı (K) ve lipozom bazlı ticari sulandırıcı (L) kullanılmıştır. Gruplarda PMAI değerleri K ve L gruplarında sırasıyla (%40,3) ve (%42,6) olarak tespit edilmiş ve gruplar arasında istatistiki olarak önemli bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$). Turner ve ark (2020) tarafından boğalar üzerinde yürütülen bir diğer çalışmada; elektroejakülatörle alınan spermalar tris bazlı yumurta sarılı modifiye Botubov sulandırıcı (K1) ve lipozom bazlı ticari bir sulandırıcı (EEL) ile; epididimal spermalar ise tris bazlı yumurta sarılı modifiye Botubov (K2) ve lipozom bazlı ticari bir sulandırıcı (EPL) ile sulandırılmış olup grupların PMAI değerleri EEL grubunda (%38,6), K1 grubunda (%62,4) olarak tespit edilmiş olup, EL grubunda PMAI değerlerinin K grubuna göre istatistik açıdan önemli oranda düşük olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). PMAI değeri EPL grubunda (%28,8) ve K2 grubunda (%58,1) olarak tespit edilmiş olup, aynı şekilde EPL grubunun K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde düşük olduğu bildirilmiştir ($P<0,05$). Kumar ve ark (2015) tarafından Murrah ırkı mandalarda yürütülen çalışmada; modifiyeli tris sulandırıcısı (K) ve lipozom ihtiva eden ticari bir sulandırıcı (L) gruplarının PMAI değerleri K ve L gruplarında sırasıyla (%17,3 ve %19,6) olarak belirlendiği ve gruplar arasında istatistiki olarak önemli bir farklılığın olmadığı bildirilmiştir ($P>0,05$).

Sunulan tez çalışmasındaki elde edilen veriler incelendiğinde; PMAI değerleri açısından TR50, TR75, TR50-LIP50 ve TR75-LIP100 gruplarının K grubuna göre istatistiki olarak önemli farklılık göstermediği ($P>0,05$) ancak LIP50 ve LIP100 gruplarının K grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$).

Bu bulgular ışığında sunulan tez çalışmasının LIP50 ve LIP100 gruplarının PMAI değerleri açısından K grubuna göre istatistiki olarak önemli şekilde düşük olduğu belirlenirken ($P<0,05$); Mafolo ve ark (2020), Zakarias ve ark (2023), Mehdipour ve ark (2017) çalışmalarında PMAI değerleri açısından lipozom gruplarının K grubuna göre

istatistiki olarak önemli farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($P>0,05$). Farklı türlerde yapılan çalışmalar incelendiğinde Singh ve ark (2018) ve Kumar ve ark (2015) çalışmalarında lipozom grubunun K grubuna göre istatistiki olarak önemli farklılık göstermediğini ifade ederlerken ($P>0,05$), Turner ve ark (2020)'nın belirttiği sonuçlar çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Spermanın dondurulması ve çözündürülmesi sürecinde plazma membran bütünlüğü çok önemlidir ve katılan kriyoprotektan özellikli maddelerin de bunu kriyohasarlara karşı koruması gerekir. Ancak kullanılan katkı maddelerinin yüksek konsantrasyonlarda toksik etkiler gösterebileceği gibi düşük konsantrasyonlarda da kriyoprotektif etki göstermeyebilirler. Yapılan çalışmalarda; araştırmacılar donma-çözdürme işleminin membran yapısında değişikliklere neden olduğunu bildirmişlerdir (De Leeuw ve ark 1993). Zeron ve ark (2002), fosfatidilkolin'den oluşan lipozomların eklenmesinin spermatozoonların lipid faz geçişini değiştirdiğini ve dolayısıyla spermatozoonları donmaya karşı daha az duyarlı hale getirdiğini vurgulamışlardır. Ancak bu tez çalışmasındaki bulgulara bakıldığında Lipozomun, membran ve akrozom bütünlüğünü üzerine koruyucu etki göstermediği görülmüştür. Bu durumun sebebinin farklı çalışmalarda kullanılan ana sulandırıcıların, kullanılan kriyoprotektan maddelerin konsantrasyonlarının ve bileşenlerinin değişkenlik göstermesinden kaynaklı olabileceği ifade edilebilir. Ayrıca Mafolo ve ark (2020)'nın bildirdiğine benzer şekilde, çalışmamızda kullanılan lipozomun, spermatozoon membranı yerine ana sulandırıcıda kullanılan yumurta sarısı lipidlerine bağlandığı ve bu nedenle kriyoprotektan etkisinin azaldığı şeklinde yorumlanabilir.

Koç spermasının dondurulması için optimum trehaloz konsantrasyonu konusunda araştırmacılar henüz bir uzlaşıya varamamıştır. Matsuoka ve ark (2006), %5 gliserol ve 100 mM trehaloz içeren tris bazlı sulandırıcının çözüm sonrası motiliteyi artırdığını söylerken, Tonieto ve ark (2010)'da, 100 mM trehaloz ilavesinin çözüm sonrası spermanın motilitesi üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu söylemiştir. Benzer şekilde, Aisen ve ark (2000), %6 gliserol içeren tris bazlı sulandırıcıya 200 mM trehaloz eklenmesinin çözüm sonrası motiliteyi artırmadığını bildirmişlerdir. Ancak, daha sonra yine Aisen ve ark (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, %3 gliserol ve 100 mM

trehalozun çözüm sonu motiliteyi ve spermatozoonların membran bütünlüğünü önemli ölçüde koruduğunu bildirmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında kullandığımız TR50 dozunun da tüm parametreler açısından K grubuna göre istatistiki olarak önemli derecede yüksek olduğu ve koruyucu etki gösterdiği görülmüştür ($P<0,05$). Oluşan bu farklılıkların sulandırıcının içeriği, gliserol konsantrasyonu, dondurma hızı, sperma toplanma şekli gibi birçok etkene bağlı olarak değişebileceği diğer araştırmacılar tarafından da önemle vurgulanmaktadır (Aisen ve ark 2002, Uysal ve Bucak 2009).

Aboagla ve Terada (2003) keçiler üzerinde yürüttüğü çalışmada; tris bazlı sulandırıcı (K) ve trehaloz ekledikleri gruplarda (25mM, 50mM, 75mM ve 100mM) TM oranlarının K (%62) grubuna göre 50mM, 75mM ve 100mM gruplarında istatistiki olarak önemli derecede artış gösterdiğini (%69, %73 ve %78) aynı şekilde PM oranlarında da K (%49) grubuna göre 75mM ve 100mM gruplarında istatistiki olarak önemli derecede artışlar gösterdiğini (%59 ve %61) bildirmişlerdir ($P<0,05$). Sunulan tez çalışmasının TM bulgularıyla karşılaştırıldığında TR50 grubunun sonuçları ile istatistiki olarak paralellik gösterdiği, TR75 grubunun ise istatistiki olarak farklılık göstermediği, dolayısıyla Aboagla ve Terada (2003)'nın bulguları ile tezat oluşturduğu; PM bulgularıyla karşılaştırıldığında TR50 grubunun sonuçlarıyla istatistiki olarak paralel ancak TR75 grubunun ise K grubuna göre istatistiki farklılık göstermediği ve yine anılan çalışmanın bulgularıyla tezat oluşturduğu kanaatine varılmıştır ($P>0,05$).

Öztürk ve ark (2017) tarafından Holstein ırkı boğalarda yürütülen bir çalışmada; 25mMol trehaloz (T) grubu ile K grubu arasında TM ve PM oranları sırasıyla (%64,7 ve %33,4) ve (%55,4 ve %33,4) olarak belirlenmiş ve gruplar arası farkın istatistiki olarak önem göstermediği ($P>0,05$); aynı şekilde VAP VSL ve VCL kinematik parametre değerleri K ve T gruplarında sırasıyla (%64,8 ve %74), (%50,8 ve %59,5) ve (%97,9 ve %105,7) olarak belirlenmiş ve gruplar arasında istatistiki olarak herhangi bir farklılık olmadığı ortaya konmuştur ($P>0,05$). Araştırmacılar, akrozom bütünlüğü açısından T grubu ile (%48,2) K grubu (%43,5) arasında istatistiksel olarak önemli derecede bir farkın olmadığını ($P>0,05$) ancak T ve K gruplarında sırasıyla (%36,3 ve %13) ve (%44,1 ve %31,7) olarak belirlenen HMMP değerleri ve viabilite değerlerinin farklılık gösterdiği ve T grubunda K grubuna göre istatistiki olarak önemli derecede yüksek olduğu

vurgulanmaktadır ($P<0,05$). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular değerlendirildiğinde TR75 grubunun TM ve PM değerleri ile K grubu arasında istatistiki olarak farklılık göstermediği ($P>0,05$); TR50 grubu ile K grubu arasında istatistiki olarak önemli derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Yine TR50 ve TR75 gruplarının VAP ve VCL değerleri açısından K grubuna göre istatistiki bir farklılık oluşturmadığı ($P>0,05$) ancak VSL değerleri açısından önemli derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Çalışmamızda HMMP değeri açısından TR50 ve TR 75 (%32,12 ve %25,51) gruplarının K grubu arasında istatistiksel olarak önemli farklılıkların olmadığı görülmüştür ($P>0,05$). Viabilite değeri açısından TR50 grubunun (%52,3) K grubuna (%40,8) göre istatistiki olarak önemli derecede yüksek olduğu ($P<0,05$) ve kıyaslanan çalışmanın sonuçlarıyla paralellik gösterdiği ancak TR75 grubunun ise (%41,9) istatistiksel olarak bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($P>0,05$).

Bucak ve Tekin (2008) tarafından Ankara keçisi tekeleri üzerinde yürütülen çalışmada; TM değerleri açısından tris bazlı K grubu (%42,5) ve 100mM Trehaloz+EDTA+GSSG ekledikleri (TEG) grubunun (%46,2) istatistiki farklılık göstermediği ($P>0,05$) ayrıca kullanılan tris miktarının 250mM'dan fazla olması gerektiği, trehalozun ise 50mM'dan fazla olmaması gerektiği vurgulanmıştır. Yine trehalozun belirli oranlarının membran ve sulandırıcı arasında suyla yer değiştirerek donma öncesi dehidrasyona sebep olduğu, membrandaki fosfolipitlerle reaksiyona girerek kristalizasyona karşı koruyucu etki yaptığı bildirilmektedir (Aisen ve ark 2000).

Özmen ve ark (2020) tarafından Kıvrırcık ırkı koçlar üzerinde yürütülen çalışmada; kullandıkları 25 ve 50 mM Trehalozun TM değerleri bakımından (%29,9 ve %30,6) dondurma sonrası 1. saatte spermatozoonlarda K grubuna göre (%19,5) istatistiksel olarak önemli derecede yüksek motilite oranı sağladığını bildirmektedirler ($P<0,05$). Araştırmacılar trehalozun, spermatozoonların hem morfolojik hem de fonksiyonel bütünlüğü üzerinde önemli koruyucu etkilere sahip olduğunu vurgulamışlardır. Sunulan tez çalışmasında TM ve PM değerleri açısından TR50 grubunun K grubuna göre istatistiki olarak önemli derecede yüksek sonuç vererek aynı paralellikte olduğu ($P<0,05$); TR75 grubunun ise K grubuna göre istatistiki farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($P>0,05$). Özmen ve ark (2020) çalışmalarında kinematik değer parametrelerinden VAP, VSL ve

VCL açısından K grubuna göre hem 25 hem de 50mM lik trehaloz gruplarında istatistiki olarak düşük sonuç verdiğini bildirmektedirler ($P<0,05$). Tez çalışmamızda TR50 ve TR75 gruplarının VAP ve VCL değerleri açısından K grubuna göre istatistiki olarak farklılık göstermediği ($P>0,05$) ancak VSL değerleri açısından istatistiki olarak önemli derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$).

Cirit ve ark (2013) tarafından Dorset ırkı koçlar üzerinde yürütülen çalışmada; tris bazlı sulandırıcıya 100mM trehaloz eklenmiş ve ekilibasyon sonrası kontrol ve trehaloz100 gruplarında TM ve velocity oranları sırasıyla (%81,9 ve %67) ve (%117,4 ve %77,9) olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar TM ve velocity oranları açısından ve gruplar arasındaki farklılıkların istatistiki açıdan önemli olduğunu, anılan değerlerin Trehaloz100 grubunda kontrol grubuna göre önemli derecede düşük olduğunu vurgulamaktadırlar ($P<0,05$). Araştırmacılar çözüm sonu spermatozoonların özellikle orta kısımlarında hasarlanma tespit ettiklerini de vurgulamışlardır. Ancak 50mM trehalozun aynı zararlı etkileri göstermediği ve istatistiki olarak farklılık göstermediği ifade edilmektedir ($P>0,05$). Benzer şekilde tris bazlı sulandırıcıya 100mM trehaloz ilavesinin kontrol grubuna göre kinetik parametre değerleri açısından (VAP, VSL, VCL ve ALH) istatistiki olarak önemli şekilde düşük ($P<0,05$) sonuçlar verdiği ve olumsuz etkilere sahip olduğu bir başka araştırmada da tespit edilmiştir (Bittencourt ve ark 2013).

Aisen ve ark (2002) tarafından Pampinta ırkı koçlar üzerinde yürütülen çalışmada; 200mM ve 400mM Trehaloz dozları ilave edilmiş ve trehaloz konsantrasyonu arttıkça motilite üzerine zararlı etkilerin ortaya çıktığını belirtilmiştir ($P<0,05$). Bucak ve ark (2007) Akkaraman ırkı koçlar üzerinde yürüttükleri çalışmada; TM değerleri açısından sunulan tez çalışmasına paralel bir biçimde 50mM trehaloz ilaveli (%59) grubun K (%47,5) grubuna göre istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek sonuç verdiğini ($P<0,05$), aksine 100mM trehaloz ilaveli (%56) grubunun ise K grubuna göre istatistiki bir farklılık göstermediğini tespit etmişlerdir ($P>0,05$). Avdatek (2020) Pırlak ırkı koçlar üzerinde yürüttüğü çalışmada; TM değerlerinin 100mM Trehaloz ilaveli (%51,25) grupta K (%36,87) grubuna göre istatistiki olarak önemli şekilde yüksek olduğunu tespit etmiştir ($P<0,05$). Özmen (2015) Kıvırcık ırkı koçlar üzerinde yürüttüğü çalışmada; TM

değerleri açısından trehaloz25 (%38,2) ve trehaloz50 (%35,7) gruplarında K (%38,9) grubuna göre istatistiksel olarak bir farklılık göstermediğini ifade etmektedir ($P>0,05$).

Bucak ve ark (2007) Akkaraman ırkı koçlar üzerinde yürüttükleri çalışmada; trehalozun 50mM (%66), 100mM (%72,2) ve K (%76,7) gruplarının viabilite değerleri açısından istatistiki olarak farklılık göstermediğini tespit etmişlerdir ($P>0,05$). Uysal ve Bucak (2009) tarafından Akkaraman ırkı koçlar üzerinde yürütülen bir başka çalışmada ise; hızlı soğutmaya tabi tutulan koç spermalarında viabilite değerleri açısından trehaloz 50mM (%74,2), trehaloz100mM (%79,5%) ve K (%66,3) grupları arasında istatistiki olarak farklılık bulunmadığı bildirilmiştir ($P>0,05$). Sunulan tez çalışmasında viabilite değerleri bakımından TR50 grubuna ilişkin viabilite değerlerinin K grubuna ilişkin değerlerden istatistiki olarak önemli bir farklılık gösterdiği ($P<0,05$) ve TR75 grubu ile K grubu arasında istatistiki bir farklılığının olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). Çalışmamızdaki veriler değerlendirildiğinde Trehalozun 50 mM dozunun çözüm sonu viabilite üzerine olumlu etkiler yaptığı, trehaloz dozu arttıkça koruyucu etkinin azaldığı tespit edilmiştir.

Güngör ve ark (2018) tarafından Merinos x Sakız melezi koçlar üzerinde yürütülen çalışmada; Trehalozun 25 ve 50mM/L doz gruplarında TM değerleri açısından K grubu arasında farklılığın istatistiki olarak önemli bir şekilde yüksek olduğu ($P<0,05$); PM değerleri açısından K grubu ile istatistiki bir farklılığın olmadığı ($P>0,05$); viabilite değerleri açısından K grubuna göre her iki grubun da istatistiki olarak önemli şekilde yüksek olduğu bildirilmiştir ($P<0,05$). Membran bütünlüğü açısından yine her iki grubun K grubu ile istatistiksel bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($P>0,05$). Kinematik değerler VAP, VSL ve VCL açısından da daha önceki çalışmalarla (Öztürk ve ark 2007, Özmen ve ark 2020) benzer şekilde istatistiksel olarak bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$).

Trehalozun doğrudan antioksidan özelliklere sahip olmayan niteliğiyle, spermatozoon membranında ozmoregülatör ve antiperoksidatif aktivite sergileyen bir özellikle çalıştığı ifade edilmektedir. Tam olarak nasıl etki ettiği belirlenmemiş olsa da spermatozoonlar üzerinde meydana gelen serbest radikalleri temizleme özelliği, yapılan

bazı araştırmalarda bildirilmiştir (Molinia ve ark 1994, Aisen ve ark 2005). Membrandaki fosfolipidlerin çift katmanlı yapısına yerleşerek membran bütünlüğünü modüle ettiği ve bu nedenle donma sırasında stabil hale getirdiğine dair raporlar mevcuttur (Aboagla ve Terada 2003, Aisen ve ark 2005). Trehalozun buz kristallerinin neden olduğu lezyonları azaltırken dondurma çözdüirme sırasında canlılığı ve hareketliliğini artırdığı (Molinia ve ark 1994) bildirilmiştir. Çalışmamızda da genel olarak trehalozun 50 mM dozunun, koçlarda çözüm sonu sperma kalitesi üzerine olumlu etki yaptığı ve kryoprotektan olarak kullanılabileceği ifade edilebilir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Spermatozoon membranları birçok fosfolipid, protein, kolesterol ve oligosakkaritlerden oluşan intrasellüler ve ekstrasellüler dengenin sağlanmasında etkili olan yapılardır. Spermatozoonun ovumu dölleyebilmesi ve genetik materyalin sağlıklı aktarılabilmesi intrasellüler ve ekstrasellüler ortamlar arasındaki ozmotik denge, DNA bütünlüğü, mitokondriyal enerji sistemi ve daha pek çok sistemin bir uyum içerisinde ve eksiksiz çalışmasıyla mümkün olabilmektedir. Spermanın dondurulması ve -196°C da depolanması işlemleri suni tohumlama alanında önemli bir ilerleme sağlamış olsa da, uygulanan prosedürler sırasında soğuk şoku oluşmakta ve ne kadar dikkatli olunursa olunsun motilite ve canlılıkta bir miktar azalma gözlenmektedir. Spermatozoonların hızlı bir şekilde soğutulması, hücre membranının yapısını bozmakta ve hücreler, iç ve dış buz oluşumu nedeniyle fiziksel bir baskıya maruz kalmaktadırlar. Buz oluşumu ve membran bütünlüğünün korunması amacıyla çeşitli kriyoprotektanlar kullanılmıştır; ancak bu kimyasal maddelerin yapısal özellikleri hücreye zarar verebilecek çeşitli yan etkilere neden olmuştur.

Lipozomlar, en düşük kontaminasyon riskleri kimyasal olarak tanımlanmış, kalibre edilmiş, standartlaştırılmış, tüm biyogüvenlik gereksinimlerine uyacak şekilde kolayca sterilize edilmiş ve dolayısıyla kullanıma hazır olması açısından avantaja sahiptir. Lipozomların koruyucu özellikleri, lipozomlar ve hücre zarları arasında transfer edilen lipidler ve kolesterolle ilişkilidir. Bu şekilde, lipozomların kriyoprotektif etkisi, boyutlarına bağlı olmakla birlikte her bir yöntemin göreceli başarısı, spermatozoonların işlem nedeniyle oluşabilecek hasara karşı duyarlılığına bağlı olabileceği bildirilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan lipozom dozlarının kriyoprezervasyon sırasında oluşan kristalizasyon ve reaktif oksijen türleri nedeniyle meydana gelen plazma membran ve akrozom bütünlüğünün sürdürülmesi üzerine tek başlarına kontrol grubuna göre olumlu bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Lipozomun yumurta sarısı içeren ana sulandırıcıya eklenmesi durumunda spermatozoon membranı yerine ana sulandırıcıda kullanılan yumurta sarısı lipidlerine bağlandığı ve bu nedenle kriyoprotektan etkisinin azaldığı değerlendirilmektedir. Trehaloz'un ise buz kristallerinin oluşumu gibi donma sırasında

membran üzerinden su akışının olumsuz etkilerini azalttığı için kullanımı uygun olduğu değerlendirilmektedir. Trehaloz aynı zamanda bir kriyoprotektan olarak işlev görerek spermatozoonların membran fosfolipid ve proteinlerinin yapılarını değiştirerek membran esnekliği sağladığı ve bu şekilde kriyo hasarlara karşı direnci arttırdığı düşünülmektedir.

Çalışmamızdaki bulgular değerlendirildiğinde farklı dozlarda ve daha fazla sayıda örnek kullanılarak yapılacak çalışmalar ile lipozomun çözüm sonu sperma kalitesi üzerine etkilerinin daha ayrıntılı araştırılması gerektiği ifade edilebilir. Ayrıca lipozomun yumurta sarısı ile birlikte kullanılması yerine yumurta sarısına ikame olacak şekilde ana sulandırıcıya eklenerek lipozomun koruyucu etkisinin inceleneceği çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

11. KAYNAKLAR

- Abavisani A, Arshami J, Naserian AA, Kandelousi MAS, Azizzadeh M, 2013. Quality of bovine chilled or frozen-thawed semen after addition of omega-3 fatty acids supplementation to extender. *International Journal of Fertility & Sterility*, 7,3, 161-68.
- Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA, 1991. Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology*, 28,1, 36-42.
- Aboagla EME, Terada T, 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of reproduction*, 69,4, 1245-50.
- Ahmad E, Aksoy M, 2012. Trehalose as a cryoprotective agent for the sperm cells: A Mini Review, *Animal Health Prod. Hyg*, 1, 123-29.
- Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ, 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*, 53,5, 1053-61.
- Aisen EG, Medina VH, Venturino A, 2002. Cryopreservation and postthawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57,7, 1801-08.
- Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A, 2005. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, 50,3, 239-49.
- Ak K, 1990. Süt Tozu ile Sulandırılan Sulandırıcılar ile Dondurulan Boğa Spermasının Ülkemizde Kullanılabilirliği Üzerinde Araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, İstanbul.
- Ak K, 2005a. Koyunlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İçinde Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Ders Notu No: 138, 189-04.
- Ak K, 2005b. Spermanın Muayenesi. İçinde Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Ders Notu No: 138, 75-90.
- AK K, 2008. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İ Ü Vet Fak Yayını. Ders Notu, s: 69-70, 80-81, 189-98.
- Ak K, Cirit Ü, Nur Z, Bacınoğlu S, Pabuccuoğlu S, Özdaş ÖB, Birler S, 2010. Effects of extender osmolarity, cooling rate, dilution rate and glycerol additiontime on post-thaw ram semen characteristics and fertilization. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 36,2, 33-46.
- Akyol N, Ertem TB, Varışlın Ö, 2019. Investigation of the Effects of Storage Period for Frozen Bull Semen on In Vitro Embryo Production. *Kafkas University Veterinary Faculty Journal*, 25,2, 257-62.
- Alçay S, 2015. Hücre içine girebilen bazı kriyoprotektanlarla dondurulan koç spermasının in vitro embriyonik gelişim üzerine etkisi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Bursa.
- Alvarenga M.A, Papa F.O, Landim-Alvarenga F, Medeiros A, 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review, *Animal Reproduction Science*, 89, 105-13.
- Alvarez JG, Storey BT, 1993. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *Journal of Andrology*, 14,3, 199-209.
- Alvarez M, Tamayo-Canul J, Anel E, Boixo JC, Mata-Campuzano M, MartinezPastor F, Paz P, 2012. Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram semen. *Theriogenology*, 77,6, 1111-18.

- Amann RP, Pickett B, 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa, *Journal of equine veterinary science*, 7, 145-73.
- Amann RP, Waberski D, 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81,1, 5-17.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard 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.
- Anchamparuthy V, 2007. Vitrification of bovine oocytes. [Doctoral dissertation, Virginia Tech University]. SonErişim: 25.06.2024
[https://vtechworks.lib.vt.edu/bitstream/handle/10919/25986/Vahida_Anchamparuthy_Dissertation.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://vtechworks.lib.vt.edu/bitstream/handle/10919/25986/Vahida_Anchamparuthy_Dissertation.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Anchordoguy T.J, Rudolph A.S, Carpenter J.F, Crowe J.H, 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing, *Cryobiology*, 24, 324-31.
- Ansari MS, Rakha BA, Akhter S, Ashiq M, 2016. OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology*, 85,3, 528-32.
- Arns MJ, Webb GW, Kreider JL, Potter GD, Evans JW, 1987. Use of different nonglycolysable sugars to maintain stallion sperm viability when frozen or stored at 37 degrees C and 5 degrees C in a bovine serum albumin medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 35, 135-41.
- Avdatek F, Inanç M, Yeni D, Güngör Ş, Acar A, Ata A, 2020. Effect of alpha lipoic acid and trehalose on ram semen cryopreservation. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 5,3, 121-27.
- Bağış H, Sağırkaya H, Mercan HO, Dinnyes A, 2004. Vitrification of pronuclear-stage mouse embryos on solid surface (SSV) versus in cryotube: Comparison of the effect of equilibration time and different sugars in the vitrification solution. *Molecular Reproduction and Development*, 67,2, 186-92.
- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N, 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21,1, 1-7.
- Bass LD, Denniston DJ, Maclellan LJ, McCue PM, Seidel Jr GE, Squires EL, 2004. Methanol as a cryoprotectant for equine embryos. *Theriogenology*, 62,6, 1153-59.
- Belala R, Briand-Amirat L, Vinciguerra L, Tainturier D, Kaidi R, Thorin C, Bencharif D, 2016. Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders. *Research in Veterinary Science*, 106, 66-73.
- Birler S, 1999. Reprodüktif Fizyoloji. İçinde Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Ders Notu No: 112, 16-26.
- Birler S (2008). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını. İstanbul, s. 19-26.
- Bittencourt RF, Oba E, Ribeiro Filho ADL, Chalhoub M, Azevedo HC, Bicudo SD, 2013. Advances in cryopreservation of ram semen I: Extenders and Cryoprotectants. *Ciência Animal Brasileira*, 14, 522-36.
- Blanco JM, Long JA, Gee G, Donoghue AM, Wildt DE, 2008. Osmotic tolerance of avian spermatozoa: Influence of time, temperature, cryoprotectant and membrane ion pump function on sperm viability. *Cryobiology*, 56,1, 8-14.
- Bruckdorfer K.R, Demel R.A, De Gier J, Van Deenen L.L.M, 1969. The effect of partial replacements of membrane cholesterol by other steroids on the osmotic fragility and glycerol permeability of erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 183, 334-45.

- Bucak MN, Ateşşahin A, Varışlı Ö, Yüce A, Tekin N, Akçay A, 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*, 67,5, 1060-67.
- Bucak M.N, Tekin N, 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen, *Small Ruminant Research*, 73, 103-08.
- Bucak MN, Tekin N, 2008. Ankara Tekesi Spermasının Dondurulmasında Bazı Kriyoprotektanların Etkisi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 48,2, 59-66.
- Bucak M.N, Keskin N, İli P, Bodu M, Akalın P.P, Öztürk A.E, Özkan H, Topraggaleh T.R, Sari F, Başpınar N, Dursun Ş, 2020. Decreasing glycerol content by cosupplementation of trehalose and taxifolin hydrate in ram semen extender: microscopic, oxidative stress, and gene expression analyses, *Cryobiology* 96,19–29.
- Bucak M.N, Akalın P.P, Keskin N, Bodu M, Öztürk A.E, İli P, Özkan H, Topraggaleh T.R, Arslan H.O, Başpınar N, Dursun Ş, 2021. Combination of fetuin and trehalose in presence of low glycerol has beneficial effects on freeze-thawed ram spermatozoa, *Andrology* 9, 1000–09.
- Castellini, C., Dal Bosco, A., Ruggeri, S., & Collodel, G. (2011). What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computerassisted sperm analysis? *Fertility and Sterility*, 96,1,24-27.
- Castrillejo A, Morana A, Bielli A, Gastel T, Molina JR, Forsberg M, 1995. Onset of spermatogenesis in corriedale ram lambs under extensive rearing conditions in Uruguay. *Acta Vet Scand.* 36,2,161-73.
- Checura CM, Seidel Jr GE, 2007. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. *Theriogenology*, 67,5, 919-30.
- Chen Y, Foote RH, Brockett CC, 1993. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 30,4, 423-31.
- Chenoweth PJ, Lorton SP, 2014. *Animal Andrology: Theories and Applications*. London: Cabi
- Chian RC, Quinn P, 2010. *Fertility cryopreservation*. New York: Cambridge University Press.
- Chowdhury AK, 1979. Dependence of testicular germ cells on hormones: A quantitative study in hypophysectomized testosterone-treated rats. *Journal of Endocrinology*, 82,3, 331.
- Cirit Ü, Bağış H, Demir K, Ağca C, Pabuccuoğlu S, Varışlı Ö, Clifford-Rathert C, Ağca Y, 2013. Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose and cysteamine on ram semen. *Animal Reproduction Science*, 139,1-4, 38-44.
- Colas G, 1975. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep frozen ram semen. *Journal of Reproduction and Infertility*, 42, 277-85.
- Collodel G, Cardinali R, Moretti E, Mattioli S, Ruggeri S, Castellini C, 2012. Role of rabbit prostate granules on sperm viability and acrosome reaction evaluatedv with different methods. *Theriogenology*, 77,5, 1021-26.
- Corcuera B, Marigorta P, Sagüés A, Saiz-Cidoncha F, Pérez-Gutiérrez JF, 2007. Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical ridge, chromatin condensation and chromatin stability of frozen boar spermatozoa. *Theriogenology*, 67, 1150-57.
- Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Rudolph AS, Wistrom CA, Spargo BJ, Anchordoguy TJ, 1988. Interactions of sugars with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 947,2, 367-84.
- Curry MR, Millar JD, Watson PF, 1994. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations. *Biology of Reproduction*, 51,1014-21.
- Çoyan K, Ataman MB, Kaya A, Karaca F, 2002. *Evcil Hayvanlarda Dölerme ve Suni Tohumlama*. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi.

- D'Allessandro AGD, Martemucci G, Collanna MA, Bellini A, 2001. Post thaw survival of ram spermatozoon and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*, 55, 1159-70.
- De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JHG, Colenbrander B, Verkleij AJ, 1993. Effects of Various Cryoprotective Agents and Membrane Stabilizing Compounds on Bull Sperm Membrane Integrity after Cooling and Freezing. *Cryobiology*, 30,1, 32-44.
- Dela Pena EC, Takahashi Y, Atabay EC, Katagiri S, Nagano M, 2001. Vitrification of mouse oocytes in ethylene glycol-raffinose solution: effects of preexposure to ethylene glycol or raffinose on oocyte viability. *Cryobiology*, 42,2, 103-11.
- Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JPW, Althouse GC, 2005a. Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *Journal of Andrology*, 26,1, 115-22.
- Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JPW, Althouse GC, 2005b. Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. *Journal of Andrology*, 26,1, 107-14.
- Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH, 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*, 265,4, 432-37.
- Dumoulin JCM, Bergers-Janssen JM, Pieters MHEC, Enginsu ME, Geraedts JPM, Evers JLH, 1994. The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. *Fertility and Sterility*, 62,4, 793-98.
- Elhissi A, Phoenix D, Ahmed W, 2015. Some approaches to large-scale manufacturing of liposomes, *Emerg. Nanotechnol. Manuf.* 402–17.
- Elliott FI, Sherman JK, Elliott EJ, Sullivan JJ, 1973. A photographic method of measuring percentage of progressively motile sperm cells using darkfield microscopy. VIII International Symposium on Zootechny, Milan, Italy.
- Eroğlu A, Lawitts JA, Toner M, Toth TL, 2003. Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. *Cryobiology*, 46,2, 121-34.
- Evans G, Maxwell VMC (1987). *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Sydney. 19, 91-141.
- Evenson DP, Parks JE, Kaproth MT, Jost LK, 1993. Rapid determination on sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. *Journal of Dairy Science*, 76,1) 86-94.
- Fahy GM, 1986. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, 23, 1-13.
- Fathi S, Oyelere AK, 2016. Liposomal drug delivery systems for targeted cancer therapy: is active targeting the best choice? *Future Medicinal Chemistry*, 8, 2091–2112.
- Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, García-Macías V, Estes MC, Soler AJ, De Paz P, Anel L, Garde JJ, 2007. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 67,4, 738-53.
- First NL, Henneman HA, Williams JA, 1957. The influence of glycerol and various diluents on low temperature survival of ram spermatozoon. *Journal of Animal Science*, 16, 1106.
- Fiser PS, Fairfull RW, 1984. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoon frozen in straws. *Cryobiology*, 21, 542-51.
- Fiser PS, Ainsworth L, Fairfull RW, 1986. Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoon. *Theriogenology*, 25,3, 473-84.

- Fiser PS, Ainsworth L, Fairfull RW, 1987. Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 28, 599-607.
- Foote RH, Arriola J, Wall RJ, 1978. Principles and procedures for photometric measurement of sperm cell concentration. *Proceedings of the Seventh Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*, Madison, WI, 14-15.
- Foote RH, 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*, 80,1678, 1-10.
- Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K, 1995. Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Molecular reproduction and development*, 40,2, 233-41.
- Fuller BJ, 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryoletters*, 25,6, 375-88.
- Futino DO, Mendes MCB, Matos WNL, Mondadori RG, Lucci CM, 2010. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 45,2, 214-20.
- Gao D, Critser JK, 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR journal*, 41,4, 187-96.
- Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM, 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*, 34,1, 127-38.
- Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE, 1997. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 57, 1401-06.
- Gil J, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H, 2000. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*, 54, 93-108.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WMC, 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63,2, 445-57.
- Gilmore J.A, McGann L, Liu J, Gao D, Peter A, Kleinhans F, Critser J, 1995. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa, *Biology of reproduction*, 53, 985-95.
- Gilmore JA, Liu J, Peter AT, Critser JK, 1998. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 58,1, 28-36.
- Gökçen H, Aştı RN, Kozandağı M, 1983. Çeşitli ekilibasyon süreleri ve çözme ısılarının donmuş koç spermatozoonlarının motilitesi ve akrozom bozuklukları üzerine etkisi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2,1, 51-58.
- Gökçen H, 1990. Koyunlarda sun'i tohumlama, İçinde Koyun-keçi hastalıkları ve yetiştiriciliği. İstanbul. 485-501.
- Graham JK, Foote RH, 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 1987,24, 42-5.
- Güngör Ş, Ata A, İnanç M, 2018. Effects of Trehalose and Catalase on the Viability and Kinetic Parameters of Cryopreserved Ram Sperm. *Acta Scientiae Veterinariae*. 46. 10.22456/1679-9216.83865.
- Gürler H, Malama E, Heppelmann M, Calisici O, Leiding C, Kastelic JP, Bollwein H, 2016. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86,2, 562-71.
- Hafez ESE, 1993. *Reproduction in Farm Animals* (6th ed), Philadelphia, 503-25.
- Hafez ESE, Hafez B, 1993. *Reproduction in Farm Animals* (Seventh Edition). South Carolina: Lea & Febiger.

- Hammerstedt R.H, Graham J.K, 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol, *Cryobiology*, 29, 26-38.
- Hanada A, Nagase H, 1980. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *Reproduction*, 60,1, 247-52.
- Harrison RA, Jacques ML, Minguez ML, Miller NG, 1992. Behaviour of ejaculated spermatozoa from bull, boar and ram during thin-layer countercurrent partition in aqueous two-phase systems. *Journal of cell science*, 102,1, 123-32.
- Hochi S, Hirabayashi M, Hirao M, Kato M, Kobayashi T, Kimura K, Hirasawa K, Leibo SP, Ueda M, 2001. Effects of cryopreservation of pronuclearstage rabbit zygotes on the morphological survival, blastocyst formation, and full-term development after DNA microinjection. *Molecular Reproduction and Development*, 60,2, 227-32.
- Holt WV, North RD, 1986. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *Reproduction*, 78,2, 447-57.
- Holt WV, 1997. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 9,309-1).
- Holt WV, 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62,1, 3-22.
- Hotamisligil S, Toner M, Douglas Powers R, 1996. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biology of Reproduction*, 55,1, 161-68.
- Hu J.H, Li Q.W, Jiang Z.L, Yang H, Zhang S.S, Zhao H.W, 2009. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality, *Reproduction in domestic animals*, 44, 571-75.
- Hubalek Z, 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46,3,205-29.
- Hurt AE, Landim-Alvarenga F, Scidel Jr GE, Squires EL, 2000. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology*, 54,1, 119-128.
- İleri İK, 1994. Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi. Masaüstü Yayıncılık Ünitesi. Ders Notu No: 23.
- İleri İ, Ak K, Pabuççuoğlu S, Birler S, 2000. Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Yayını. Ders Notu No: 23.
- Jiménez-Rabadán P, Soler AJ, Ramón M, García ÁO, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M, Garde JJ, 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 167, 103-08.
- Kachar B, Reese T.S, 1985. Rapid formation of gap-junction-like structures induced by glycerol, *The Anatomical Record*, 213, 7-15.
- Kandelousi MAS, Arshami J, Naserian AA, Abavisani A, 2013. The effects of addition of omega-3, 6, 9 fatty acids on the quality of bovine chilled and frozen-thawed sperm. *Open Veterinary Journal*, 3,1, 47-52.
- Kasai M, 1986. Nonfreezing technique for short-term storage of mouse embryos. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 3,1, 10-14.
- Katkov II, Katkova N, Crister JK, Mazur P, 1998. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, 37, 325-38.
- Kato Y, Nagao Y, 2012. Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction. *Reproductive Medicine and Biology*, 11,4, 165- 76.

- Katz DF, Davis RO, Delandmeter BA, Overstreet JW, 1985. Real-time analysis of sperm motion using automatic video image digitization. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 21,3, 173-82.
- Kaymakçı M, Sönmez R, 1992. *Koyun Yetiştiriciliği*. Hasat Yayıncılık. İstanbul Hayvancılık Serisi 3.
- Kheirloomoom A, Satpathy GR, Török Z, Banerjee M, Bali R, Novaes RC, 2005. Phospholipid vesicles increase the survival of freeze-dried human red blood cells. *Cryobiology*, 51, 290-305.
- Kono T, Suzuki O, Tsunoda Y, 1988. Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. *Cryobiology*, 25,2, 170-73.
- Kulaksız R, Ari UC, Daşkin A, Üner AG, 2013. The effect of different glycerol concentrations on freezability of semen from Angora, Kilis and Saanen goats. *Slovak Journal of Animal Science*, 46,2, 39-44.
- Kuleshova LL, Macfarlane DR, Trounson AO, Shaw JM, 1999. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*, 38,2, 119-30.
- Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO, 2001. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation, *Cryobiology*, 43,1, 21-31
- Kumar P, Saini M, Kumar D, Balhara AK, Yadav SP, Singh P, Yadav PS, 2015. Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*, 159, 38-45.
- Kundu CN, Chakrabarty J, Dutta P, Bhattacharyya D, Ghosh A, Majumder GC, 2002. Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reproduction*, 123, 907-13.
- Lee YA, Kim YH, Kim BJ, Jung MS, Auh JH, Seo JT, Park YS, Lee SH, Ryu BY, 2013. Cryopreservation of Mouse Spermatogonial Stem Cells in Dimethylsulfoxide and Polyethylene Glycol. *Biology of Reproduction*, 89,5, 1-9.
- Liebermann J, Tucker MJ, Sills ES, 2003. Cryoloop vitrification in assisted reproduction: analysis of survival rates in > 1000 human oocytes after ultra-rapid cooling with polymer augmented cryoprotectants. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 30,2, 125-29.
- Lin T, Timasheff SN, 1996. On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. *Protein Science*, 5,2, 372-81.
- Lukaszewicz E, 2002. An effective method for freezing White Italian gander semen. *Theriogenology*, 58,1, 19-27.
- Luna-Orozco JR, González-Ramos MA, Calderón-Leyva G, Gaytán-Alemán LR, Arellano-Rodríguez F, Ángel-García O, Véliz-Deras FG, 2019. Comparison of different diluents based on liposomes and egg yolk for ram semen cooling and cryopreservation. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 20,2, 126.
- Luyet BJ, Hodapp EL, 1938. Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 39,3, 433-34.
- Mackenzie AP, 1977. Non-equilibrium freezing behaviour of aqueous systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 278,959, 167-89.
- Mafolo KS, Pilane CM, Chitura T, Nedambale TL, 2020. Use of phosphatidylcholine in Tris-based extender with or without egg yolk to freeze Bapedi ram semen. *South African Journal of Animal Science*, 50,3, 389-96.
- Makler A, 1978. A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoal motility determination. *Fertility and Sterility*, 30,2, 192-99.

- Malama E, Zeron Y, Janett F, Siuda M, Roth Z, Bollwein H (2017). Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. *Theriogenology*, 87, 79-90.
- Malejane CM, Greyling JPC, Raito MB, 2014. Seasonal variation in semen quality of Dorper rams using different collection techniques. *South African Journal of Animal Science*, 44,1, 26-32.
- Mann T, White LG, 1957. Glycerol metabolism by spermatozoon. *Biochemistry*, 65.
- Marco-Jiménez F, Puchades S, Gadea J, Vicente JS, Viudes-de-Castro MP, 2005. Effect of semen collection method on pre-and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*, 64,8, 1756-65.
- Maxwell WMC, Salamon S, 1993. Liquid Storage of Ram Semen: a Review. *Reproduction Fertility and Development*, 5,6,613-38.
- Mazur P, 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-cell Physiology*, 247,3, 125-42.
- McWilliams RB, Gibbons WE, Leibo SP, 1995. Osmotic and physiological responses zygotes and human oocytes to mono and disaccharides. *Human Reproduction*, 10, 1163-71.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL, 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57,1,327-44.
- Medina-León AZ, Domínguez-Mancera B, Cazalez-Penino N, Cervantes-Acosta P, Jácome-Sosa E, Romero-Salas D, Barrientos-Morales M, 2019. Cryopreservation of horse semen with a liposome and trehalose added extender. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 51,3, 119-23.
- Mehdipour M, Kia HD, Nazari M, Najafi A, 2017. Effect of lecithin nanoliposome or soybean lecithin supplemented by pomegranate extract on post-thaw flow cytometric, microscopic and oxidative parameters in ram semen. *Cryobiology*, 78, 34-40.
- Mendoza-Viveros CD, Gutiérrez-Pérez O, Bernad-Bernad MJ, Medina-Torres L, Monroy-Barreto M, Gimeno M, Trujillo-Ortega ME, 2022. Boar semen cryopreserved with trehalose-containing liposomes: disaccharide determination and rheological behaviour. *Zygote*, 30,6, 895-902.
- Mert N, Mert H, Aygün T, Tariq M, 2016. Relationship between Vitamin Composition and Spermatological Characteristics in Semen of Different Ram Breeds of Turkey. *Pakistan Journal of Zoology*, 48,4, 969-75.
- Meryman HT, 1971. Cryoprotective agents. *Cryobiology*, 8,2, 173-83.
- Migishima F, Suzuki-Migishima R, Song S, Kuramochi T, Azuma S, Nishijima M, Yokoyama M, 2003. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biology of Reproduction*, 68,3, 881-87.
- Miguel-Jimenez S, Del Alamo MMR, Alvarez-Rodriguez M, Hidalgo CO, Peña AI, Muino R, Mogas T, 2020. In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin-and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Animal Reproduction Science*, 215, 106315.
- Molinia FC, Evans G, Maxwell WMC, 1994. Effect of polyols on the postthawing motility of pellet-frozen ram spermatozoa. *Theriogenology*, 42,1, 15-23.
- Monteiro M.M, Araújo Silva R.A.J, Arruda L.C.P, de Oliveira A.S, da Mergulhˆao F.C, Monteiro Júnior P.L.J, de M. Seal D.C, Trevisan M, Batista A.M, Guerra M.M.P, 2022. Effect of melatonin in different extenders on the quality of frozen semen of goats, *Emerg. Anim. Species* 5, 100015.
- Mortazavi SH, Eslami M, Farrokhi-Ardabili F, 2020. Comparison of different carrier-compounds and varying concentrations of oleic acid on freezing tolerance of ram spermatozoa in tris-citric acid-egg yolk plasma semen diluent. *Animal Reproduction Science*, 219, 106533.
- Moore WR, 1985. A Comparison of Electroejaculation with the Artificial Vagina for Ram Semen Collection. *Annual Report. New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries*, 33,3, 22-3.

- Morris GJ, Farrant J, 1972. Interactions of Cooling Rate and Protective Additive on the Survival of Wash Human Erythrocytes Frozen To -196°C. *Cryobiology*, 9, 173-81.
- Morrow DA, 1986. Current therapy in theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Small and Large Animals, 330-39.
- Mortimer ST, 2000. CASA-practical aspects. *Journal of Andrology*, 21,4, 515-24.
- Mukaida S, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Luyet BJ, 1998. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Human Reproduction*, 13,10, 2874-79.
- Najafi A, Taheri RA, Mehdipour M, Martínez-Pastor F, Rouhollahi AA, Nourani MR, 2019. Improvement of post-thawed sperm quality in broiler breeder roosters by ellagic acid-loaded liposomes. *Poultry Science*, 98,1, 440-46.
- Nakagata N, 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *Reproduction*, 87,2, 479-83.
- Nascimento IA, Leite MBNL, de Araújo MMS, Sansone G, Pereira SA, do Espírito Santo EM, 2005. Selection of cryoprotectants based on their toxic effects on oyster gametes and embryos. *Cryobiology*, 51,1, 113-17.
- Nash T, 1966. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. *Cryobiology*, 46, 179-211.
- Noble GT, Stefanick JF, Ashley JD, Kiziltepe T, Bilgicer B, 2014. Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations. *Trends Biotechnology*, 32,1, 32-45.
- Noiles EE, Bailey J, Storey BT, 1995. Temperature dependence of the water permeability, LP of murine sperm shows a discontinuity between 4°C and 0°C. *Cryobiology*, 32, 220-38.
- Nur Z, Seven-Çakmak S, Ustuner B, Çakmak I, Erturk M, Abramson CI, Sağırkaya H, Soylu MK, 2011. The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. *Apidologie*, 43, 31-38.
- Ofosu J, Qazi I.H, Fang Y, Zhou G, 2021. Use of melatonin in sperm cryopreservation of farm animals: a brief review, *Anim. Reprod. Sci.* 233,106850.
- Ohboshi S, Etoh T, Sakamoto K, Fujihara N, Yoshida T, Tomogane H, 1997. Effects of bovine serum proteins in culture medium on post-warming survival of bovine blastocysts developed in vitro. *Theriogenology*, 47,6, 1237-43.
- O'Neil L, Paynter SJ, Fuller BJ, Shaw RW, 1997. Vitrification of mature mouse oocytes: improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. *Cryo*, 34,3, 295-301.
- Özmen MF, 2015. İodixanol'ün Farklı Kombinasyonlarının Koç Spermasının Dondurulması Üzerindeki Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, İstanbul.
- Özmen MF, Cirit Ü, Arıcı R, Demir K, Kurt D, Pabuccuoğlu S, Ak K, 2020. Evaluation of synergic effects of iodixanol and trehalose on cryosurvival of electroejaculated ram semen. *Andrologia*. 52,9, 13656.
- Öztürk C, Güngör Ş, Ataman MB, Bucak MN, Başpınar N, İli P, Inanç ME, 2017. Effects of arginine and trehalose on post-thawed bovine sperm quality. *Acta Vet Hungarica*, 65,3, 429-39.
- Öztürk A.E, BucakM.N, Bodu M, Başpınar N, Çelik İ, Shu Z, Keskin N, Gao D, 2019. Cryobiology and cryopreservation of sperm, in: *Cryopreservation – Current Advances and Evaluations*, IntechOpen, 75-116.
- Uysal O, Bucak MN, 2009. The role of different trehalose concentrations and cooling rates in freezing of ram semen. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 56,2, 99-103.
- Palasz A, Alkemade S, Mapletoft RJ, 1993. The use of sodium hyaluronate in freezing media for bovine and murine embryos. *Cryobiology*, 30,2, 172-78.

- Patist A, Zoerb H, 2005. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 40, 107-13.
- Payne SR, Oliver JE, Upreti GC, 1994. Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 31, 180-84.
- Pedro PB, Yokoyama E, Zhu SE, Yoshida N, Valdez Jr DM, Tanaka M, Edashige K, Kasai M, 2005. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. *Journal of Reproduction and Development*, 51,2, 235-46.
- Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H, 2004. Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation. *Theriogenology*, 61,1, 63-70.
- Phillips M.C, Johnson W.J, Rothblat G.H, 1987. Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* 906, 223–76.
- Pillet E, Labbe C, Batellier F, Duchamp G, Beaumal V, Anton M, Magistrini M, 2012. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology* 77, 268-79.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS, 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164,4172, 666.
- Pontbriand D, Howard JG, Schiewe MC, Stuart LD, Wildt DE, 1989. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26,4, 341-54.
- Quinn PJ, Chow PYW, White IG, 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Reproduction*, 60,2, 403-407.
- Quinn P, Chow P, White I, 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site *Journal of Reproduction and Fertility*, 60, 403-407.
- Quinn PJ, 1985. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes, *Cryobiology* 22 (1985) 128–46.
- Rall WF, Fahy GM, 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 C by vitrification. *Nature*, 313,6003, 573-75.
- Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek AP, Waalkens-Berendsen DH, Shigoyuki A, Kurimoto M, 2002. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology* 40,7, 871-98.
- Reinhoud PJ, Van Iren F, Kijne JW, 2000. Cryopreservation of undifferentiated plant cells. In *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*, 91-102.
- Revell SG, Wood PDP, 1978. A photographic method for the measurement of motility of bull spermatozoa. *Reproduction*, 54,1, 123-26.
- Röpke T, Oldenhof H, Leiding C, Sieme H, Bollwein H, Wolkers WF, 2011. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology*, 76, 1465-72.
- Sagristá M, Margarita M, Africa De Madariaga. 2000. "Surface Modified Liposomes by Coating with Charged Hydrophilic Molecules." *Cellular and Molecular Biology Letters*, 5, 19–33.
- Salamon S, Maxwell WMC, 1995a. Frozen storage of ram semen I. Processing, Freezing, Thawing and Fertility after Cervical Insemination. *Animal Reproduction Science*, 37, 185-249.
- Salamon S, Maxwell WMC, 1995b. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and method of improvement. *Animal Reproduction Science*, 38, 1-36.
- Salamon S, Maxwell WMC, 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 77-111.
- Saleh AI, 1997. Seasonal variation in semen quality of local and crossbred rams raised in the United Arab Emirates. *Animal Reproduction Science*, 49, 161-67.

- Salinas-Flores L, Adams SL, Lim MH, 2008. Determination of the membrane permeability characteristics of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, oocytes and development of optimized methods to add and remove ethylene glycol. *Cryobiology*, 56,1, 43-52.
- Saling PM, Storey BT, 1979. Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *The Journal of Cell Biology*, 83,3, 544-55.
- Salisbury GW, Fuller HK, Willett EL, 1941. Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. *Journal of Dairy Science*, 24, 905-10.
- Sarıözkan S, Bucak M.N, Tuncer P.B, Taşdemir U, Kinet H, Ulutaş P.A, 2010. Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm, *Theriogenology* 73, 316-23.
- Schanbacher BD, Gomes WR, VanDemark NL, 1974. Developmental changes in spermatogenesis, testicular carnitine acetyltransferase activity and serum testosterone in the ram. *Journal of Animal Science*, 39,5,889-92.
- Shipley CFB, Buckrell BC, Mylne MJA, Pollard J, Hunton JR, 2007. Chapter 86 - Artificial Insemination and Embryo Transfer in Sheep. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (Second Edition) (s629-41).
- Shivhare UD, Ambulkar DU, Mathur VB, Bhusari KP, Godbole MD, 2009. Formulation and evaluation of pentoxifylline liposome formulation. *Digest Journal Nanomaterials and Bio Structures*. 4,4,857-62.
- Sevinç A, 1977. Dölerme ve Sun'i Tohumlama Ders Kitabı. Elazığ: Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları.
- Shaw JM, Kuleshova LL, Macfarlane DR, Trounson AO, 1997. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology*, 35,3, 219-29.
- Silva PFN, Gadella BM, 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65,5, 958-78.
- Singh AK, Kumar A, Honparkhe M, Kaur S, Kaur H, Ghuman SPS, Brar PS, 2018. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of buffalo bull semen frozen in egg yolk, soya bean lecithin and liposome-based extenders. *Reproduction in Domestic Animals*, 53,1, 195-202.
- Songsasen N, Leibo SP, 1997. Cryopreservation of Mouse Spermatozoa. *Cryobiology*, 35,3, 255-69.
- Soylu MK, Nur Z, Üstuner B, Doğan I, Sağrkaya H, Günay U, Ak K, 2007. Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen. *Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy*, 51,2, 241.
- Sönmez M, 2008. Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama ve Androloji ders notları. Elazığ. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi yayınları. İkinci ön basım.
- Sönmez M, 2013. Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. Elazığ: Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını.
- Squires EL, Keith SL, Graham JK, 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62,6, 1056-65.
- Steck T.L, Kezdy F.J, Lange Y, 1988. An activation-collision mechanism for cholesterol transfer between membranes, *J. Biol. Chem.* 263, 13023-31.
- Strambini GB, Gabellieri E, 1996. Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding. *Biophysical Journal*, 70,2, 971-76.
- Sun S, Zhang YS, Pang B, Hyun DC, Yang M, Xia Y, 2014. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy, *Angewandte Chemie*, 53, 12320-64.

- Sztejn JM, Noble K, Farley JS, Mobraaten LE, 2001. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 42,1, 28-39.
- Tada N, Sato M, Yamanoi J, Mizorogi T, Kasai K, Ogawa S, 1990. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *Reproduction*, 89,2, 511-16.
- Takagi M, Boediono A, Saha S, Suzuki T, 1993a. Survival rate of frozenthawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. *Cryobiology*, 30,3, 306-12.
- Takagi M, Otoi T, Suzuki T, 1993b. Survival rate of frozen-thawed bovine IVM/IVF embryos in relation to post-thaw exposure time in two cryoprotectants. *Cryobiology*, 30,5, 466-69.
- Tapaswi RD, 2013. Liposome as a potential drug delivery system: A review. *International Research Journal of Pharmacy*. 4, 6-12.
- Tekin N, 1994. Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama, Doğum ve İnfertilite kitabı*. Konya 69-79.
- Tervit HR, Adams SL, Roberts RD, McGowan LT, Pugh PA, Smith JF, Janke AR, 2005. Successful cryopreservation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Cryobiology*, 51,2, 142-51.
- Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Frydman R, 1986. High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertility and Sterility*, 46,2, 268-72.
- Tonieto RA, Goularte KL, Gastal GDA, Schiavon RS, Deschamps JC, Lucia T, 2010. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Rum. Res.*, 93 (2-3): 206-09.
- Turner Z, Canisso I, Podico G, Garrett E, Stewart J, Henley P, Ferrer M, 2020. Cryopreservation of epididymal and electroejaculated bull semen using liposome-and egg yolkbased extenders. *Clinical Theriogenology*, 12,1, 29-38.
- Tümen H, Gökçen H, Soylu MK, Doğan İ, Karamustafaoğulları M, 1991. Değişik düzeylerde Vit.-E katılarak sulandırılan koç spermasının spermatolojik özellikleri ve dölverimi üzerine araştırmalar. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10, 1-3.
- Utsumi K, Hochi S, Iritani A, 1992. Cryoprotective effect of polyols on rat embryos during two-step freezing. *Cryobiology*, 29,3, 332-41.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K, 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57,1, 149-79.
- Vicente JS, Viudes-de-Castro MP, 1996. A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen. *Reproduction Nutrition Development*, 36,5, 485-92.
- Viudes de-Castro MP, Talaván AG, Vicente JS, 2021. Evaluation of dextran for rabbit sperm cryopreservation: Effect on frozen-thawed rabbit sperm quality variables and reproductive performance. *Animal Reproduction Science*, 226.
- Wassarman PM, 1999. Mammalian fertilization. *Physiology and Reproduction*, 96, 175–83.
- Watson PF, 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, 62,2, 483-92.
- Watson PF, 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7,4, 871-91.
- Watson PF, 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481-92.
- Wetzels AMM, Bras M, Lens JW, Piederiet MH, Rijnders PM, Zeilmaker GH, 1996. Laboratory aspects of in vitro fertilization. *Cryopreservation/Theory*, 229-44.
- Whittingham DG, 1971. Survival of mouse embryos after freezing and thawing *Nature*, 233,5315, 125-26.

- Wolf DE, Maynard VM, McKinnon CA, Melchior DL, 1990. Lipid domains in the ram sperm plasma membrane demonstrated by differential scanningcalorimetry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87,17, 6893-96.
- Wu T, Cheng F, Chen I, Yang C, Tsai M, Chang M, Wang J, Wu J, 2013. The combinatorial effect of different Equex STM paste concentrations, cryoprotectants and the straw-freezing methods on the post-thaw boar semen quality. *Reproduction Domestic Animal* 48, 53-58.
- Yang F, Chen J, Yongjian J, Ji L, Yang D, Quanxing N, Deliang F, 2011. "Liposome Based Delivery Systems in Pancreatic Cancer Treatment: From Bench to Bedside." *Cancer Treatment Reviews* 37,8, 633-42.
- Yavaş İ, 2008. Koç spermasının farklı oranlarda sükröz içeren sulandırıcılar ile gliserollü ve gliserolsüz sulandırılması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. Ankara.
- Yoon Y, Pope JM, Wolfe J, 1998. The effects of solutes on the freezing properties of and hydration forces in lipid lamellar phases. *Biophysical Journal*, 74,4, 1949-65.
- Yoshino J, Kojima T, Shimizu M, Tomizuka T, 1993. Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification. *Cryobiology*, 30,4, 413-22.
- Yurdaydın N, 1990. Spermanın Alınması, Saklanması ve Sun'ı Tohumlama Kitabı. Ankara. 77-90.
- Zacarias CAC, 2023. Effect of two animal protein-free extenders on cryopreservation of Blackbelly and Pelibuey ram semen. *Veterinaria Mexico OA*, 10.
- Zeron Y, Tomczak M, Crowe J, Arav A, 2002. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology*, 45,2, 143-52.
- Zhang YZ, Zhang SC, Liu XZ, Xu YJ, Hu JH, Xu YY, Li J, Chen SL, 2005. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Theriogenology*, 63,3, 763-73.

13. TURNİTİN RAPORU

**KIVIRCIK X AKKARAMAN G1 KOÇ SPERMASINA
KATILAN LİPOZOM'UN FARKLI DOZLARININ
DONDURMA ÇÖZDÜRME SONRASI SPERMATOLOJİK
PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ**

Talha Burak ERTEM Doktora Tez

Yazar Talha Burak ERTEM

Gönderim Tarihi: 02-Oca-2024 12:50PM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 2266646353

Dosya adı: Tez_tart_ma_yaz_l_yor.docx (764.05K)

Kelime sayısı: 20393

Karakter sayısı: 146424

KIVIRCIK X AKKARAMAN G1 KOÇ SPERMASINA KATILAN LİPOZOM'UN FARKLI DOZLARININ DONDURMA ÇÖZDÜRME SONRASI SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

%6	%6	%2	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr	%1
İnternet Kaynağı		
2	acikerisim.uludag.edu.tr	%1
İnternet Kaynağı		
3	acikerisim.aku.edu.tr	%1
İnternet Kaynağı		
4	webadmin.selcuk.edu.tr	<%1
İnternet Kaynağı		
5	acikerisim.pau.edu.tr:8080	<%1
İnternet Kaynağı		
6	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080	<%1
İnternet Kaynağı		
7	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080	<%1
İnternet Kaynağı		
8	docplayer.biz.tr	<%1
İnternet Kaynağı		
9	adudspace.adu.edu.tr:8080	<%1
İnternet Kaynağı		

10	ÖZTOP, Pınar, AYAŞ, Şehri, USTAÖMER, Kübra, COŞAR SARAÇGİL, Sacide Nur and YEMİŞCİ ÜMİt, Oya. "Functional outcomes in anterior and posterior circulation ischemic strokes", Türkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Derneği, 2013. Yayın	<% 1
11	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1
12	burkonturizm.com İnternet Kaynağı	<% 1
13	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<% 1
14	acikerisim.baskent.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
15	preview-bmcresnotes.biomedcentral.com İnternet Kaynağı	<% 1
16	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% 1
17	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
18	b3b7dd1a-d8cb-4579-8cfc-f21897e0f1ee.filesusr.com İnternet Kaynağı	<% 1
19	link.springer.com İnternet Kaynağı	

		<% 1
20	vs1.doczz.fr İnternet Kaynağı	<% 1
21	"Protocols in Semen Biology (Comparing Assays)", Springer Science and Business Media LLC, 2017 Yayın	<% 1
22	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
23	www.amienois-tourisme.fr İnternet Kaynağı	<% 1
24	dogadergi.ksu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
25	gavsispanel.gelisim.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
26	harunyahya.org İnternet Kaynağı	<% 1
27	tsukuba.repo.nii.ac.jp İnternet Kaynağı	<% 1
28	www.atenaeditora.com.br İnternet Kaynağı	<% 1
29	www.selcukmedj.org İnternet Kaynağı	<% 1

Alıntıları çıkart

Üzerinde

Eşleşmeleri çıkar

< 5 words

Bibliyografyayı Çıkart

Üzerinde