T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KOÇ SPERMASININ MODİFİYE EDİLMİŞ SPERMA SULANDIRICILARI İLE DONDURULMASI

ELİF MERVE ÇINAR

DANIŞMAN
PROF. DR. ÖZEN BANU ÖZDAŞ

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI/
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA PROGRAMI

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

Bu çalışma 29.11.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Doktora Programı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. Özen Banu ÖZDAŞ
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama ABD

Prof. Dr. Kemal AK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama ABD

Prof. Dr. Alper BARAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama ABD

Prof. Dr. Muzaffer TAŞ
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama ABD

Prof. Dr. Recai KULAKSIZ
Balıkesir Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama ABD

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ELİF MERVE ÇINAR

İTHAF

Başta annem olmak üzere; abim, babam ve doktoram süresince desteğini esirgemeyen tüm değerli dostlarıma ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Uzun süren doktora serüvenimde her türlü nazımı çeken danışman hocam Prof. Dr. Özen Banu ÖZDAŞ'a, düştüğüm her çıkmazda yol gösteren ve moralimi yükselten hocam Prof. Dr. Alper BARAN'a, tez izleme komitemde yer alan Prof. Dr. Muzaffer TAŞ'a, kıymetli tavsiyelerine başvurduğum değerli hocam Prof. Dr. Halil GÜNEŞ'e, doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden çokça faydalandığım hocam Prof. Dr. Kemal AK'a, ders aldığım hocalarım Prof. Dr. Sema BİRLER, Prof. Dr. Serhat ALKAN, Prof. Dr. Serhat PABUCCUOĞLU, Prof. Dr. Mithat EVECEN, Doç. Dr. Kamber DEMİR'e, verilerimin istatistiksel hesaplamaları ile sabırla ilgilenen kıymetli hocam Prof. Dr. Bülent EKİZ'e, çalışmalarım esnasında benden desteklerini esirgemeyen Dr. Asiye İzem SANDAL, Dr. Gül BAKIRER ÖZTÜRK, Dr. Ramazan ARICI ve en çok kahrımı çeken kişi olarak çok sevdiğim doktora kardeşim Dokt. Öğr. Hatice ŞENLİKCİ'ye teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... İX
ÖZET ..... Xİ
ABSTRACT ..... Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Türkiyede Koyun Yetiştiriciliği 4
2.2. Spermatogenezis 4
2.3. Koçlarda Spermatolojik Özellikler 6
2.4. Sperma Alma Yöntemleri 7
2.4.1. Normal aşım sonrası vaginanın yıkanması ile sperma alımı 7
2.4.2. Suni vajina yardımı ile sperma alımı 7
2.4.3. Elektroejakülatör yardımı ile sperma alımı 7
2.5. Spermanın Dondurulması ve Aşamaları 8
2.5.1. Spermanın sulandırılması 9
2.5.2. Spermanın soğutulması 11
2.5.3. Spermanın dondurulması 11
2.5.4. Spermanın Eritilmesi 13
2.6. Serbest Radikaller (Oksidanlar) ve Reaktif Oksijen Türleri 14
2.7. Kriyoprotektan Maddeler 16
2.7.1. Proteinler 18
2.7.2. Fötal Calf Serum (FCS) 20
2.8. Antioksidanlar 22
2.8.1. Sisteamin 25
3. GEREÇ VE YÖNTEM 28
3.1. Spermanın Alınması 28

3.2. Taze Spermanın Makroskobik Özelliklerinin Değerlendirilmesi 28
3.2.1. Kitlesel Hareket (Mass Aktivitesi).....28
3.2.2. Hareketlilik (Motilite).....29
3.2.3. Spermatozoon Yoğunluğu.....29
3.3. Motilite ile Morfolojik Bütünlüğün Değerlendirilmesi 29
3.3.1. Sperma Analiz Cihazı İle Motilite Muayenesi.....29
3.3.2. Morfolojik Bütünlüğün Değerlendirilmesi (Hancock) 30
3.3.3. Fonksiyonel Bütünlüğün Değerlendirilmesi (Hipoosmotik şişme testi; HOST) 31
3.4. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması 32
3.5. Donmuş Spermanın Eritilmesi ve İncelenmesi.....33
3.5.1. Morfolojik Bütünlüğün Değerlendirilmesi (Hancock) 33
3.5.2. Fonksiyonel Bütünlüğün Değerlendirilmesi (Hipoosmotik şişme testi; HOST) 33
3.5.3. Bilgisayar Destekli Sperma Analiz Cihazı(CASA) ile Değerlendirme 34
3.6. İstatistiksel Analiz.....34
4. BULGULAR.....35
5. TARTIŞMA 40
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....76
ÖZGEÇMİŞ 77

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Fetal Sığır Serumu Bileşimi (Price ve Gregory, 1982) 20
Tablo 4-1: Ekilibrasyon ve Eritme Sonrası Subjektif Motilite 35
Tablo 4-2: Ekilibrasyon ve Eritme Sonrasında HOST Ile Canlı/Ölü Muayenesi Oranları 36
Tablo 4-3: Eritme Sonrası Hancock Solüsyonu Ile Muayene Edilen Anormal Spermazoon Oranları 36
Tablo 4-4: Ekilibrasyon Sonrası 5°C'de Bekletilen Spermaların CASA Değerlerinin Gruplar Arasında Karşılaştırılması 38
Tablo 4-5: Eritme Sonrası Sperma CASA Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması 39

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ark.: Arkadaşları

cm: Santimetre

gr: Gram

lt: Litre

ml: Mililitre

mM: Milimolar

mOsm: Miliosmol

ºC: Santigrat derece

v: Hacim

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

βME: Beta merkaptoetanol

ALH: Salınım-Sapma Mesafesi (Lateral Head Amplitude)

BSA: Bovine serum albumin/ sığır serum albumin

CAT: Katalaz

DMSO: Dimetilsülfoksit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

GPx: Glutatyon peroksidaz

GRx: Glutatyon redüktaz

GSH: Glutatyon

GST: Glutatyon s-transferaz

HOST: Hipoosmotik şişme testi

LIN: Spermatozoonun Doğrusal Hareketi (Linearity)

LPO: Lipid peroksidasyonu

MDA: Malondialdehit

Mot: Motilite

PNL: Polimorf nüklear lökosit

RNT: Reaktif azot türleri

ROT/ ROS: Reaktif oksijen türleri/Reaktif oksijen substantları

RST: Reaktif kükürt türleri

SOD: Süperoksit dismutaz

Sol: Solusyon

SPSS: Statistical package for the social science

STR: Spermatozoonun Düz Bir Hat Boyunca Aldığı Mesafe (Straightness)

Tot.: Total

Tris: (Hydroxymethyl) Aminomethane

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

VAP: Birim Zamanda Spermatozoonun Ortalama Mesafeyi Takip Hızı (Velocity Average Path)

vb.: Ve benzeri

VCL: Birim Zamanda Spermatozoon Tarafından Kat Edilen Toplam Mesafe (Velocity Curve Linear)

VSL: Birim Zamanda Spermatozoonun Net Alan Kazanımı (Velocity Straight Line)

ÖZET

Çınar, E. M. (2019). Koç Spermasının Modifiye Edilmiş Sulandırıcılar ile Dondurulması İstanbul-Cerrahpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Tezi. İstanbul.

Tez çalışmasında, koç spermasının sulandırma sıvısına fötal sığır serumu (%15 FCS) ve farklı molaritelerde (3-6 mM) sisteamin eklenerek, düşük sıcaklıklarda saklanmış spermada oluşan pozitif yada negatif değişiklikler incelendi. Çalışma için 5 adet koçtan elektroejakülatör yardımı ile sperma alındı ve spermatolojik özellikleri incelenerek her hayvandan eşit hacimde olacak şekilde (pooling) bir araya getirildi. Sonuç değerlendirmeleri yapıldıktan sonra 6 eşit hacime ayrıldı. Birincisi kontrol grubu olmakla birlikte, ikinci gruba %15 FCS, üçüncü gruba 3 mM sisteamin, dördüncü gruba 3 mM sisteamin + %15 FCS, beşinci gruba 6 mM sisteamin ve altıncı gruba 6 mM sisteamin + %15 FCS olacak şekilde toplamda altı grup oluşturuldu. Sulandırma sonrası dondurma aşamaları takip edilerek payetlere çekilen sperma örnekleri sıvı azot buharında dondurulduğ (-110 °C). Ekilibrasyon sonrası ve eritme sonrası aşamalarda sperma; faz-kontrast mikroskobu, CASA (Computer Asisted Semen Analysis-Bilgisayar Destekli Sperma Analiz Sistemi), HOST, Hancock yöntemleri kullanılarak kalite ve morfolojik değerlendirmeye tabi tutuldu. Çalışmada 6 mM sisteamin eklenmiş gruplarda (5 ve 6. gruplar) motilitenin düştüğü ve ölü spermatozoa sayısının arttığı, bunun yanında diğer grupların (kontrol grubu, 2, 3 ve 4. grup) motilite ve morfolojilerinde dikkate değer değişimlerin olmadığı görüldü. Sonuç olarak 3 mM sisteamin ve FCS (%15)' nin ekilibrasyonda sinerjik etki göstererek spermatozoonların motilitesini pozitif yönde etkilediği ve istatistiksel olarak önemli olduğu ($p<0,05$), ancak bu etkinin donma ve eritme sonrasında görülmediği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Koç sperması, donma-eritme, antioksidan, sisteamin, FCS.

ABSTRACT

Çınar, E. M. (2019). Freezing ram semen with modified diluents. İstanbul- Cerrahpasa University Postgraduate Education Institute, Department of Reproduction and Artificial Insemination, PhD Thesis. İstanbul.

In the thesis study, positive and negative changes in semen were observed after storing spermatozoa at lower temperatures by adding different molarity (3-6 mM) cysteamine and FCS (15%) in sperm diluents. For the study, semen was taken from 5 rams with the help of electro-ejaculator. Spermatological quality of collected sperm were investigate after that mixed with pooling system and the results were divided into 6 equal volumes. While the first was the control group, a total of six groups were formed by adding 15% FCS to the second group, 3 mM cysteamine to the third group, 3 mM cysteamine + 15% FCS to the fourth group, 6 mM cysteamine to the fifth group and 6 mM cysteamine + 15% FCS in the sixth group. Samples of semen taken into straws following the steps of freezing with liquid nitrogen (-110 °C) after equilibration and post-thawing stages; quality and morphology evaluations were performed using phase-contrast microscopy, CASA (Computer Assisted Semen Analysis), HOST, Hancock methods. In the study, 6 mM cysteamine supplemented groups (groups 5 and 6) decreased motility and increased number of dead spermatozoa, also there were no significant changes in the motility and morphology of the other groups (control group, 2, 3 and 4). In conclusion, it was found that 3 mM cysteamine and FCS (15%) had a synergistic effect and positively affected the motility of spermatozoa on equilibration, also statistically significant but this effect was not seen after freezing and thawing.

Key words: Ram sperm, freezing- thawing, antioxidant, cysteamine, FCS.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin, düşük kaliteli mera alanlarının değerlendirilmesi ve bunların hayvansal kaynaklı tüketim ürünlerine dönüştürülmesinde çok önemli bir yeri vardır (Kaymakçı ve ark., 2000). Özellikle ülkemiz hayvancılığının yarısından fazlasını kapsayan koyun yetiştiriciliği gerek kırmızı et ve süt ürünleri üretimiyle beslenmeyi, gerekse de yapağı ve deri gibi sanayi ürünleri ile yaşamı destekleyen kombine verimli bir yetiştiricilik türüdür (TÜİK 2018).

Türkiye koyun yetiştiriciliğinde dünyanın sayılı ülkeleri arasında bulunmasına rağmen, yerli ırkların verim özellikleri yönünden zayıf olmaları sebebiyle yeterli üretim yapılamamaktadır (Emsen ve Koşum, 2009).

Koyunlarda suni tohumlama ilk kez Rusya'da uygulanmıştır. Daha sonra Çin'de, Fransa önderliğinde Avrupa'da, Brezilya önderliğinde ise Latin Amerika'da uygulanmaya başlanmıştır (Anderson, 1945; Milovanov, 1962; Foote, 1999). Rusya'dan sonra suni tohumlama tekniğini uygulayan ikinci ülke ise 1926 yılında Rus asıllı bir veteriner hekiminin konuya ilişkin kurslar vermesiyle, Türkiye olmuştur. Ancak tekniğin geniş olarak kullanılması ilk defa yapağı kalınlığını inceltmek amaçlı Merinoslaştırma çalışmaları için kullanılmıştır (Koşum, 2006).

Hayvancılık sektöründe büyük önem arz eden reprodüksiyon biyoteknolojisi; in vitro fertilizasyon, sun'i tohumlama, embriyo üretimi, klonlama ve gen transferi gibi yeni uygulamaları içermektedir. Bu uygulamalar arasında en etkili ve yaygın bir şekilde kullanılan, kaliteli erkek üreme hücrelerinin dondurulması ve dişilerin yapay teknikler kullanılarak tohumlanması temeline dayanan sun'i tohumlama biyoteknolojisidir (Nur ve Ak, 2003). Geliştirilen bu teknik ile hayvan populasyonunda istenen genetik ilerleme kısa sürede sağlanabilmekte, yetiştirici erkek damızlık bakım masraflarından kurtulmakta, kıymetli bir damızlık bireyden daha fazla yararlanılabilmekte ve veneral yolla bulaşan hastalıkların önüne geçilebildiği gibi mevcut sürüde bir örneklilik sağlanabilmektedir (Özkoca, 1984).

Suni tohumlama çalışmaları sığırlarda ulaştığı başarıya küçükbaş hayvancılıkta ulaşamamış olsa da, birçok ülke de uygulanmakta ve artan bir ilgi görmektedir. Bu sebeple koç ve teke spermalarını başarıyla dondurabilme çalışmaları sürerken, yüksek

gebelik oranlarına ulaşabilmek adına yöntemler üzerine de çalışılmaktadır (Uysal ve ark., 2000; Kulaksız ve ark., 2013).

Koyun ve keçilerde serviks uteri'nin yapısı, bazı özel uygulamalar haricinde, transservikal yolla, uterusa ulaşmayı oldukça zorlaştırmaktadır. Bu sebeple dondurulmuş sperma kullanılarak yapılan intraservikal tohumlamalarda istenilen sonuç alınamazken, intrauterin tohumlama ile başarıya ulaşılabilmektedir (Salamon ve Maxwell 2000). Uterusa ulaşarak uygulanabilen başarılı bir tohumlama yöntemi de laparoskopi cihazı kullanılarak yapılan tohumlama tekniğidir (Gourley ve Riese, 1990).

Laparoskopik intrauterin tohumlama, soğuk bir ışık kaynağı ile aydınlatılan fiberoptik bir iğnenin genital organların görüntülenmesini ve spermanın doğrudan uterusa verilmesini sağlayan bir yöntemdir. Dondurulmuş sperma ile laproskopik intrauterin tohumlama uygulanan koyunlarda %25 ile %75 arasında değişen gebelik oranları gözlenmiştir (Dovenski ve ark., 2012).

Dondurulmuş koç sperması kullanılarak uygulanan laparoskopik intrauterin tohumlama yöntemiyle, oldukça başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Fakat bu yöntemin, uygulama zamanının uzun sürmesi, büyük koyun sürüleri için pratik ve ucuz olmaması ayrıca embriyonik ölümlere yol açması gibi olumsuz yönleri de bulunmaktadır (Tekin ve ark. 2006). Bu sebeple, araştırıcılar koç spermasının başarılı dondurulabilmesi için gerekli çalışmalar üzerine yönelmişlerdir (Windsor ve ark., 1994).

Türkiye, koyun varlığı ile hayvancılık sektörü içinde önemli bir yere sahipken, verim özellikleri açısından bakıldığında aynı durum söz konusu değildir. Buna neden olarak, henüz koç spermasının başarıyla dondurulamaması ve koyunlarda sun'i tohumlamanın etkin yapılamaması da dahil birçok sebep sayılabilir (Sirivaidyapong ve ark., 2001).

Kriyoprezervasyon her ne kadar hayvan üreme biyoteknolojilerinin dayanağı olsa da memeli spermasının önemli bir kısmının donma ve çözülme sırasında fertilitelerini kaybetmeleri sebebiyle, henüz tam potansiyelini gösterememiştir (Bailey ve ark., 2003).

Başarılı tohumlama çalışmaları, ülkemizdeki koyun ırklarının kısa sürede ıslahının yapılarak, verim özelliklerinin artırılmasına olanak sağlayabilecek en ucuz ve kolay biyoteknolojik yöntemdir. Çalışmamızın amacı; koç spermasını, dondurma-eritme uygulamalarının zararlı etkilerine karşı korumak ve böylelikle suni tohumlama

çalışmalarından daha yüksek başarılar elde etmektir. Ayrıca, spermayı kriyobiyolojik yöntemlerin zararlarından korumak amacıyla kullanılan sisteamin (3-6 mM) ve fötal calf serum (FCS %15)' un donma ve eritme sonrası spermatolojik özellikler üzerine etkisinin saptanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Türkiyede Koyun Yetiştiriciliği

Türkiye genelinde 24 farklı ırk koyun yetiştirilmekte olup, bunların bir kısmı birkaç ırkın kontrolsüz melezlenmesi ile elde edilmiş ırklardır. Bunların başlıcaları; Anadolu bölgesinde Akkaraman, Anadolu Merinosu, Malya, Dağlıç, Marmara bölgesinde Kıvırcık, Karacabey Merinosu, Ege bölgesinde Sakız, Pırlak, Çine Çaparı, Akdeniz bölgesinde Güney Karaman, Güneydoğu Anadolu bölgesinde İvesi, Karadeniz bölgesinde Karagül, Hemşin, Karayaka ve Doğu Anadolu bölgesinde Morkaraman, Norduz, Tuj, Ramlıç olarak sayılabilir (HAYGEM, 2009). Tüm bu ırklar zorlu bölge şartlarına uyum sağlamakla birlikte düşük ya da ortalama verim düzeyleri ile üretime ihtiyaç duyulan katkıyı sağlayamamaktadır.

Avrupa'da sütçü ve etçi ırklarda dişi toklular 7-8 aylık yaşta pubertaya gelerek koçla çiftleşmeye alınabilmekte ve 12-13 aylık yaşta bu hayvanlardan ilk yavru alınabilmekte iken; Türkiye de yerli ırklar geç geliştiği için ancak 1,5 yaşında çiftleşme (koç katımı) çağına gelmekte, bunun sonucunda ilk yavru, hayvan 2 yaşında iken alınabilmektedir. Benzer şekilde erkek toklularda ancak 1,5 yaşından itibaren, yetişkin koçlara göre daha nadir olarak çiftleşmede kullanılabilmektedirler (Özcan ve Torun, 2007).

Koyunlar mevsime bağlı, birden fazla östrus gösteren hayvanlardır. Koyunların bu döngüleri; gün ışığı, hava sıcaklığı, nem, yağış, hayvanın yaşı, kuzulama zamanı, laktasyon dönemi, beslenme, koç etkisi, vücut kondisyonu, yağ metabolizması vb. durumlardan etkilenmektedir (Jainudeen ve Hafez, 1993; Baştan, 1995; Rosa ve Bryant, 2003; Özyurtlu ve Macun, 2005).

Cinsiyetler arasında görülen sosyal ilişkilerin üreme üzerine birçok etkisi olabilmektedir. Koyunlarda cinsel etkileşimlerin (aynı ya da farklı cinsiyet gruplarının ilişkileri) de üreme fizyolojisinde etkili olduğu bildirilmiştir (Rosa ve Bryant, 2002).

2.2. Spermatogenezis

Koçlarda erkek üreme sistemini penis, testisler, testis kesesi (scrotum), genital kanallar ve eklenti üreme bezleri (vesikula seminalis, cowper bezi, prostat) oluşturmaktadır. Testisin görevleri spermatozoon ve hormon üretmektir. Testiste üretilen başlıca hormon testosterondur. Testosteron spermatogeneziste, embriyo ve fetal gelişim

esnasında cinsel farklılaşmada ve gonadotropin salgılanmasında önemli yere sahiptir (Junqueira, 2006).

Testislerde bulunan ve tubulus seminiferus kontortus'ları çevreleyen epitel hücrelerinin çoğu, değişik olgunlaşma safhasında spermatogenik hücreler olarak görev almaktadır. Spermatogenezis sürecinde ilk olarak spermatogonyumlar oluşur. Spermatogonyumlar, mitoz bölünmeler geçirerek yeni spermatogonyumları ve primer spermatositleri meydana getirirler. Primer spermatositler mayoz bölünme ile sekonder spermatositleri, onlar da haploid hücreler olan spermatidleri meydana getirirler. Daha sonra bu haploid hücreler spermiyogenezis ile sitoplazmalarının çoğundan kurtulur, organellerini yeniden düzenler ve flagella oluşturarak, spermatozoa halini alırlar (Elder, 2000; Sadler, 2005; Hogeveen, 2006; Moore, 2009).

Spermatogenezis koçlarda doğumdan sonra 2-2,5 aylıkken başlar ve 6-7 aylıkken tam bir spermatogenezisten bahsedilebilir (Schanbacher, 1974). Koçlarda spermatozoanın oluşumu yaklaşık 46-49 gün kadar sürmektedir. Spermatozoonlar sertoli hücrelerinden ayrılarak tubulus seminiferus'un lümenine geçiş yapar ve buradan da rete testis vasıtasıyla epididimise taşınırlar. Bu işlem 12-14 gün kadar sürer ve "epididimal göç" adı verilir. Spermatozoonlar bu epididimal göç süresince olgunlaşır ve motilite özelliği kazanırlar. Ejakülasyon esnasında eklenti üreme bezlerinden salgılanan sıvılar spermatozoonlara karışır ve sperma denen ejakülatı meydana getirirler (Çoyan ve ark., 2002).

Koç ve boğalarda yapılan bir araştırmada, sertoli hücrelerinde görülen mitoz bölünmelerin çoğunluğunun fötal dönemde geliştiği, doğduktan sonra puberte çağına erişinceye dek yaklaşık 5 kat arttığı, fakat puberteye eriştikten sonra yaş ya da mevsimsel değişimlerin olgun sertoli hücrelerine etki etmediği bildirilmiştir (Hochereau-de Reviers ve ark., 1987).

Spermatogenezis'in normal işleyişi içerisinde, hücrelerin gelişim ve farklılaşmasına ek olarak, germinal hücrelerde ölüm de şekillenir. Bu durum spermatozoon oluşumu için önemli bir rol oynar. Apoptozis (programlı hücre ölümü), çoğunlukla spermatogonia ve spermatosit aşamalarında, hücrelerin programlı bir şekilde ölmelerini sağlamaktadır. Spermatogoniumların erken gelişim evrelerinde başlayan apoptotik eleme işlemi, olgunlaşmakta olan germinal hücreler ile sertoli hücreleri

arasındaki sayısal oranın dengede kalmasını sağlayan fizyolojik bir tepki olarak tanımlanmıştır (Weng ve ark., 2002; Yılmaz, 2005).

Memeli canlılarda testisler, ergenlik ile birlikte scrotuma iner ve genellikle vücut sıcaklığından 2-8 derece kadar daha düşük sıcaklıkta muhafaza edilirler (Banks ve ark., 2005). Çevre sıcaklığının yüksek oluşu, testis dokusunda hipoksi gözlenmesine sebep olur (Barth ve Bowman, 1994). Hipoksi sonucu, reaktif oksijen türleri (ROT) üretiminde artış gözlenir (Zini ve ark., 1998; Filho ve ark., 2004). ROT'un artması; oksidatif stres, spermatogenezis sürecinde gözlenen apoptozis ve DNA hasarlarına neden olan ana etkenlerdendir (Hansen, 2009).

Koç testislerine lokal olarak sıcak stresi uygulanan bir çalışmada (21 gün boyunca günde 16 saat) stres altındaki grubun motilitesinin, kontrol grubuna oranla daha düşük olduğu; buna rağmen spermatozoa yoğunluğunda istatiksel bir fark gözlenmediği bildirilmiştir (Arman ve ark., 2006). Sıcak stresinin hem koçların testislerine lokal olarak uygulandığı, hem de çevre sıcaklıklarının artırıldığı bir araştırmada ise, strese maruz bırakılan grup ile kontrol grubu arasında sperma hacmi ve motilite açısından bir fark gözlenmezken, strese maruz kalan gruplarda spermatozoa yoğunluğunda azalma ve anormal spermatozoa oranında artma gözlendiği belirtilmiştir (Saab ve ark., 2011). Yaz sıcaklıklarının yüksek yaşandığı bir kesimde yapılan bir araştırmada, yazın sıcak stresine bağlı olarak koçlarda anormal ve ölü spermatozoa miktarının arttığı bildirilmiştir (Al-Ghetaa, 2012).

2.3. Koçlarda Spermatolojik Özellikler

Koçlarda bakım, beslenme, testis ölçüleri ve mevsime göre değişiklik göstermekle birlikte; sperma hacmi 0.7–3 ml, spermada bulunan spermatozoon yoğunluğu 1,5-5,0 x 10^9/ml, normal spermatozoon miktarının % 60-95 olduğu, pH'nın 5,9-7,3 arasında olduğu ve motilitenin de % 60-80 arasında değiştiği gözlenmiştir (Jainudeen ve Hafez, 1987; Tekin, 1994; Demirci, 2002; Ak, 2005).

Koç spermasının normal rengi, spermatozoon yoğunluğuna göre açık krem ile koyu krem rengi arasında görülebilmektedir (Gökçen, 1990; Tekin, 1990; Özkoca, 1984). Çeşitli patolojik durumların varlığına bağlı olarak (kanama, iltahap) farklı renkler ve kokular da görülebilmektedir.

Elektroejakülatör ile sperma alma yönteminde spermaya idrar karışabilmekte, bu durum da ejakülasyonun renk veya kokusundaki değişimle anlaşılabilmektedir (Evans ve Maxwell, 1987).

Koç spermasının yoğun özellikte olması sebebiyle spermanın kitlesel hareketleri (mass aktivite) makroskobik olarak incelenebilmektedir. Yüksek yoğunluktaki sperma kaynama hareketine benzer bir dalgalanma ile ayırt edilebilmektedir (Evans ve Maxwell, 1987; İleri ve ark., 2000).

Farklı ırk koç spermalarında en fazla gözlenen anomali tiplerinin bozuk baş ve kıvrık kuyruk olduğu, nadir olarak da sitoplazmik damlacık gözlendiği bildirilmektedir (Raadsma ve Edey, 1985).

2.4. Sperma Alma Yöntemleri

Koçlardan sperma alma, normal aşım sonrası koyun vaginasının yıkanması ile, suni vajina yardımı ile ve elektroejakülatör kullanımı ile yapılabilmektedir (Cameron, 1977; Moore, 1983-1984; Özkoca 1984; Cupps, 1991).

2.4.1. Normal aşım sonrası vaginanın yıkanması ile sperma alımı

Koçların, kızgın olmayan koyunlara atlatılması ve ejakülasyonun, vajinadan özel pipetler ile geri alınması yöntemidir.

2.4.2. Suni vajina yardımı ile sperma alımı

Suni vajina, kızgınlıktaki bir dişinin vajinal özelliklerini (kayganlık, uygun sıcaklık ve basınç) göstererek erkek hayvanlardan sperma almaya yardımcı, plastik boru, elastik iç lastik, kauçuk huni ve cam toplama kadehinden oluşan farklı boyutlardaki araçtır (Ak, 2005). Koçlar puberta ile birlikte fantom ya da östrustaki bir dişinin varlığında suni vajinaya sperma vermeye alıştırılır.

2.4.3. Elektroejakülatör yardımı ile sperma alımı

Elektroejakülatör ile ereksiyon olmaksızın, sadece düşük voltlarda elektrik akımıyla lumbal 5 ile sakral 1. omurlar arasındaki ejakülasyon merkezi uyarılarak genital organlara giden sinirlerin harekete geçirilmesi sonucu sperma alınır (Yurdaydın, 1990). Stresli bir yöntem olduğu için sperması alınacak hayvanın dikkatlice tespit edilmesi ya da ksilazin (detomidine 0.27 mg/kg + ketamin hidroklorit 1.4 mg/kg (Coloma ve ark., 2011) veya ksilazin (0.2 mg/kg) benzeri sedatifler kullanılarak sakinleştirilmesi

gerekmektedir (Marco-Jiménez ve ark., 2005). Elektroejakülator ile sperma almak başlangıç aşamasında zor olsa da yönteme alışan koçlar kolayca sperma vermektedirler. Ayrıca bu yöntem östrus dönemine girmiş bir dişi bulunması gerekmediğinden yılın her döneminde kullanılabilmektedir (Ak, 2005).

Elektro-ejakülatör'ün uyarımları yapacak bölümü olan probun ucu, vazelin vb. kayganlaştırıcılardan ince bir tabaka halinde sürülerek, kaygan bir hale getirilir. Prop serum fizyolojik ile ıslatılır ve rektumdan yavaşça 8-10 cm kadar itilir. Düşük voltajda akımlar verilip durdurularak ve gerektiği takdirde voltaj artırılarak ejakülasyon bölgesi uyarılır. Bunun sonucunda damlama yada fışkırma tarzında sperma toplama kabında toplanır (Ak, 2005).

Suni vajen ve elektroejakülasyon yöntemi karşılaştırıldığında alınan sperma hacminin daha yüksek olduğu spermatozoa konsantrasyonunun daha düşük gözlendiği ve total spermatozoa miktarının benzer olduğu belirtilmiştir (Dziuk ve ark., 1954; Hulet ve ark. 1964; Quinn ve White, 1966; Pineda ve ark., 1987; Pineda ve Dooley, 1991),.

Deneyimsiz koçlar sperma alımında sıkıntılara sebep oldukları gibi, deneyimsiz koçların birçoğu alıştırıldıktan sonra bile östrus döneminde olmayan bir dişiyle çiftleşmeyi reddeder. Bunun yanında koçların %50'ye yakını fantoma atlamayı reddeder (Terrill, 1940). Bu sebeplerle, koçlarda eğitim ihtiyacını ortadan kaldırdığı için elektroejakülasyon faydalı bir seçenek olabilir (Foote, 2002).

Araştırmacılar, koçlarda yeni sulandırıcı geliştirilmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda sperma alma yöntemi olarak elektro-ejekülasyon yönteminin tercih edilmesinin daha faydalı olacağını, geliştirilecek sperma sulandırıcısının elektro-ejekülatörle alınan koç spermasının dondurulmasında başarılı olması halinde aynı sulandırıcının suni vajina ile alınan spermanın dondurulması çalışmalarında daha başarılı olacağını ileri sürmüşlerdir (Cirit ve ark., 2013).

2.5. Spermanın Dondurulması ve Aşamaları

Dondurma işlemi çok düşük sıcaklıklarda canlı hücre yada dokuların, en az hasarla ve işlev kaybı olmadan uzun bir süre saklanmasıdır (Wetzels, 1996, Kaynak: Akyol ve ark. 2019 p. 257-262). Dondurulmuş sperma ile suni tohumlama yapılabilmesi için, öncelikle spermanın en iyi şekilde dondurulması gerekmektedir (Roca ve ark. 2006).

Spermanın dondurulması işlemi sırasıyla; spermanın uygun miktarlara sulandırılması, soğutulması, dondurulması ve çözdürülmesi adımlarını içermektedir. Bu adımlar sırasında spermatozoonlarda osmotik şok, soğuk şoku, kapasitasyon ya da akrozomda bozulmalar gözlenebilmektedir (Holt, 2000b).

Koç spermasının dondurulabilmesine yönelik derin araştırmalar yapılmasına karşın her zaman başarılı sonuçlar alınamamakta ve spermatozoonlar, donma-eritme sırasında yüksek miktarda akrozomal zarara ve motilite kaybına uğramaktadır (Watson, 1995).

2.5.1. Spermanın sulandırılması

Koç sperması, membran yapısındaki fosfolipitlerin (doymamış yağ asitlerinin) fazla olması sebebiyle dondurulma işlemine karşı daha hassastır. Soğutma işlemi sırasında geri dönüşümsüz (irreversibl) olarak jel fazına geçen spermatozoon membranı, membran içi enzimlerin kinetiğini değiştirerek eritme sonrası canlılığın azalmasına sebep olduğu belirtilmiştir (Watson, 1995).

Koç spermasının dondurulmasında gözlenen sorunların çözülmesine yönelik araştırmalar başlatılmış ve bir takım cevaplar alınabilmiştir (El-Alamy ve Foote, 2001; Morrier ve ark., 2003). Fakat bu araştırmalarda kullanılan sulandırma oranları intraservikal tohumlama için bir hayli fazladır (D'Allessandro, 2001; Gil, 2003). İntraservikal tohumlama için en uygun doz 200 milyon motil spermatozoondur. Bunun için de takriben 1+3 final sulandırma miktarı gerekmektedir. Ancak bu kadar az sulandırma oranının spermatozoonları donmanın zararlarından korumadığı bildirilmiştir (Salamon ve Maxwell, 2000; D'Allessandro ve ark., 2001).

Dondurma işlemi sebebiyle spermatozoonlarda biyokimyasal, fiziksel ya da işlevsel hasarlar gelişebilmektedir. Koçlarda gözlenen hasarlar çoğunlukla fizikseldir ve spermatozoonun orta kısmında geliştiği bildirilmiştir (Bailey ve ark., 2000; Salamon ve Maxwell, 2000).

Koç spermasının donma ve eritmeye karşı gösterdiği hassasiyet, araştırmacıları farklı sulandırıcı formulasyonları üzerine çalışmaya yönlendirmiş; çeşitli kriyoprotektan ve antioksidan maddelerin denenmesine ortam sağlamıştır (Gökçen ve ark., 1985; Chen ve ark., 1993).

Koç ve teke spermalarının sulandırılma işleminde çoğunlukla hafif hipertonik özellikte solüsyonlar kullanılmaktadır (Barbas ve Mascarenhas, 2009).

Koç spermasının sulandırılmasında kabul görmüş, en fazla kullanılan sulandırıcı glikoz-sitrat-yumurta sarısı sulandırıcısı olmakla birlikte genelde koç spermasının kısa süreli saklanmasında kullanılmaktadır. Fakat bu sulandırıcı ile dondurulan koç spermalarında fertilite başarısı pek yüksek olmadığı için (%17-40) rutin olarak kullanılmamaktadır (Semkov ve Zakhariev, 1972; Salamon ve ark., 1995a).

Sulandırıcıların geliştirilmesi amacıyla başlanan çalışmalarda, organik maddelerin de önem kazanmasıyla, araştırmacılar Tris (hidroksimetil aminometan) sulandırıcısı geliştirmişlerdir (Visser ve Salamon, 1973). Araştırmalar Tris sulandırıcısının tamponlama kapasitesinin fosfat ve sitrat sulandırıcılarına oranla daha iyi olduğunu ayrıca daha az toksisiteye sebep olduğunu ortaya koymuştur (Salamon ve Visser, 1972; Mesaros ve Gamcık, 1992). Tris, spermatozoon içerisine girebilmesi ve ph değişikliklerine karşı iyi bir hücreler arası tampon olması sebebiyle boğa, koç ve hatta insan (Kerpiçci, 2015) spermasının saklanmasında kullanılmıştır. Tris'in 10-50 mM arasında değişen konsantrasyonlarının, spermatozoon metabolizması ve motilitesi üzerine olumsuz etkiler göstermediği hatta 250-400 mM' ye varan konsantrasyonlarına dahi tolerans gösterebildiği bildirilmiştir (Visser ve Salamon, 1973; Salamon ve Maxwell, 2000).

Koç spermasının dondurulmasında Tris , sodyum sitrat ve yağsız süt tozu içeren sulandırıcılar kullanılmaktadır (Holt, 2000a). Son yıllarda, boğa spermasını dondurabilmek amacıyla ticari sulandırıcılar geliştirilmiş ve bunların koç sperması dondurulması işlemlerinde de kullanılabileceği belirtilmiştir (Kulaksız ve Daşkın, 2007). Bazı araştırmacılar ise, yumurta sarısının bireysel, ırksal ve türsel farklılıkları ve süt gibi hayvan kaynaklı maddeler ile hazırlanan sperma sulandırıcılarının, sperma üzerinde mikrobiyel kontaminasyon bakımından risk oluşturduğunu, ticari sentetik sperma sulandırıcılarının kullanılmasının, daha sağlıklı olacağını belirtmişlerdir (Smith ve ark., 1993, Bousseau ve ark., 1998; Lopez-Saez ve ark., 2000; Aires ve ark., 2003; Gavin-Plagne ve ark., 2018).

Düşük sulandırma hacmi sonucu, bir tohumlama dozunda yüksek sayıda spermatozoon bulunması yeterli fertilite oranı elde edilmesinde etkili olmasına rağmen, donma işlemi sırasında spermatozoonlara zarar verdiği ve eritme sonrasında sperma

kalitesini azalttığı bildirilmiştir (Gil ve ark., 2000;2002). Yüksek hacimlerde sulandırma işlemi sonrasında ise akrozomal bozukluk oranının arttığı saptanmıştır (Prathalingan ve ark., 2006).

Final sulandırılması genellikle ml'de 100-200 milyon olacak şekilde hesaplanır. Konsantrasyonu artırmak eritme sonrası kalitenin düşmesine sebep olmaktadır (Alvarez ve ark., 2012)

2.5.2. Spermanın soğutulması

Spermanın 30ºC 'den 4ºC 'ye hızlı soğutulması soğuk şoku adı verilen hasara neden olmaktadır (Gilmore ve ark., 1998; Watson, 2000). Sperma, sulandırmanın ardından 5ºC'ye en az 1,5-2 saatte soğutulmalı ve payetlere yüklenip sıvı azot buharında dondurulmalıdır (Cseh ve ark., 2012).

Boğa, koç, teke, domuz ve aygır spermasının 30ºC'den 0ºC'ye hızla düşürülmesinin spermatozoonlarda ölümcül bir strese neden olduğu uzun zaman önce bildirilmiştir (Watson, 1981).

Spermatozoitlerdeki kolesterol miktarı ile soğuk şokuna olan duyarlılıklarının araştırıldığı bir çalışmada, insan ve tavşan spermatozoitlerinde bulunan doymuş fosfolipit oranının, boğa ve koç spermatozoitlerinde bulunandan fazla olduğu, buna bağlı olarak da insan ve tavşan spermatozoitlerinin soğuk şokuna karşı daha dirençli oldukları belirtilmiştir. Araştırmacılar, plazmadaki kolesterol düzeyinin de hücrelerin soğuk şokuna karşı direncini önemli derecede etkilediğini bildirmişlerdir (Darin-Bennett ve White, 1977).

2.5.3. Spermanın dondurulması

Spermanın dondurulması işleminde kullanılan ampul, pellet ve payet şeklinde olmak üzere 3 farklı yöntem vardır:

Ampul yönteminde sperma 1 ml hacimli ampullere kapatılarak (plastik ya da cam materyal) özel sepetler vasıtasıyla etil alkol banyosuna konur. Etil alkol banyosuna kuru buz parçaları atılarak 2 kademeli olacak şekilde dondurma işlemi yapılır. Bu yöntem ile çalışan laboratuar sayısı az olup, artık kullanılmayan eski bir yöntemdir.

Pellet yöntemi, -79ºC de kuru buz diskleri vasıtasıyla ani bir hızla dondurma yöntemidir. Kuru buz (katı CO_2) diskleri üzerine küçük oyuklar açılır, bu oyuklar üzerine

0,1 ml sperma damlatılır. Spermanın bilgileri kâğıtlara yazılarak donmadan evvel pelletin üzerine yapıştırılır 2-3 dk içerisinde donan sperma özel pellet taşıyıcılarına yerleştirilerek -196ºC sıvı azot içerisinde saklanır. Amerika ve Almanya'da bu yöntemle çalışan laboratuarlar olsa da yaygın bir yöntem değildir.

Payet yöntemi kullanılan en yaygın yöntemdir. 0,25-0,50 ml hacimlerde, bir ucunda sıvı ile temas edince kapanan bir yapı bulunan payetlere, spermanın negatif basınç yardımıyla çekilmesi esasına dayanır. Sperma payete çekildikten sonra açık kalan uç ezilerek ya da polivinil alkol ile kapatılır. 5ºC de payet taraklarına dizilen spermalar, şoklayarak dondurma işlemi yapılmak üzere, içerisinde sıvı azot bulunan donma kazanının ortalama 4 cm üzerine gelecek şekilde (sıcaklık değerleri -110ºC ile -120ºC'yi gösterecek bir yüksekliğe) dizilir. Şoklama sonrası sıvı azot içerisine bırakılan payetler, plastik gobletlere yerleştirilerek, -196ºC sıvı azot içerisinde depolanır (İleri ve ark., 2000).

Spermatozoonların metabolik aktivitelerinin 5ºC'de azaltılması, hücrenin uzun süre yaşamasına olanak sağlar. Ancak sperma hücresi, sınırlanmış da olsa biyosentetik aktivitesi nedeniyle, katabolik yolla yaşlanmakta ve ölmektedir. Bunu engellemek için sperma hücresi -110ºC ile -130ºC arasında dondurulmalıdır (Medeiros ve ark., 2002).

Dondurma işlemi sırasında, sperma numunesinde çeşitli biyofiziksel değişiklikler gözlenir. Sıcaklık donma derecesinin altına düştüğünde, numune hızlı soğumaya maruz kalır. Bu soğuma sonucu sulandırıcı solüsyonda, hücre dışı buz kristalleri oluşmaya başlar. Bu buz oluşumu, şeker, tuz ve protein gibi çözünenlerin yoğunluğunu arttırır. Gelişen bu osmotik basınç farkı ve spermatozoon sitoplazmasındaki suyun, çevresindeki sıvıdan daha yavaş kristalleşmesi sonucu, spermatozoonun baş bölgesinden özellikle de yarı geçirgen plazma zarı boyunca, su geçer. Sonuç olarak, spermatozoon giderek daha fazla susuz kalır (Woelders, 1997; Watson, 2000; Andrabi, 2007). Suyun sızma hızı spermatozoaya ve sıcaklık düşüşünün hızına bağlıdır; sıcaklık düşüşü ne kadar yavaş olursa, suyun sızabilmesi için fazla zaman kalır ve dolayısıyla dehidrasyon çok daha fazla olur. Bu durum, spermatozoon içerisinde buz kristali oluşma olasılığını azaltır, bu da ciddi fiziksel hasara neden olabilir (Amann ve Pickett, 1987; Hammerstedt ve ark., 1990). Ancak hücre içi dehidrasyon ve çözünen konsantrasyonunun artması nedeniyle daha da büyük bir hasar meydana gelir. Bununla birlikte, eğer soğutma hızı yüksekse, suyun spermatozoonu terk etmesi için yeterli zamanı olmaz, bu da hücre zarına ve diğer hücre içi bileşenlerde fiziksel hasara neden olan büyük hücre içi buz kristalleri oluşumuna

neden olur. Bu sebeplerle, başarılı bir kriyoprezervasyon işlemi için, tüm bu faktörler arasında bir orta yol bulunarak optimum bir soğutma hızına ulaşmak hedeflenmelidir.

Dondurma sırasında spermatozoonların zarar görmesine ilişkin iki ana sıcaklık aralığı vardır: süper soğutma (0°C ile -5°C) ve buz kristallerinin oluşumu (-6°C ile -15°C) (Woelders, 1997). Ölçüsüz yapılan hızlı soğutma, ani bir buz oluşumu neticesinde fiziksel hasar olasılığı ile sonuçlanır. Sperma dışındaki örneklerde (embriyo, korteks vb.), bu sorun 'seeding' adı verilen ve daha yüksek bir sıcaklık aralığında daha yavaş buz oluşumunu teşvik etmek için tasarlanan bir teknikle çözülebilir (Lemma, 2011).

Donma sırasında en önemli olay kristalleşmedir. Kristalleşme ise; donma hızına, kristal büyüklüğüne, viskoziteye, membranın geçirgenliğine, hücre içi ya da dışı çözeltilere ve başlangıçta meydana gelen kristal yapıların özelliklerine göre değişebilmektedir. Meydana gelen kristallerin hacimce küçük ve sayıca fazla olması ideal kabul edilmektedir (Ak ve ark., 2010).

Spermatozoonlarda membran hasarlarının ilk olarak dondurma ve eritme işlemleri sırasında -15ºC ile -60ºC aralığında şekillendiği ve depolanma sıcaklığının (-196ºC) fazla bir zarara neden olmadığı bildirilmiştir (Mazur, 1965; 1984).

Kristalizasyon genelde -6ºC ile -10ºC arasında şekillenmesine rağmen (Morris ve Farrant, 1972), koç spermatozoalarında buz kristalizasyonu ve anormalitelerin -10ºC ile -25ºC' lerde oluştuğu bildirilmektedir (Salamon ve Maxwell, 1995).

2.5.4. Spermanın Eritilmesi

Mini payetlerde (0,25 ml hacimli) dondurulan sperma, geleneksel olarak 37ºC 'de 30 saniyede eritilmektedir. Farklı eritme yöntemleri üzerine de araştırmalar yapılmıştır. Koç spermasının 60ºC - 8 saniyede ve 37ºC - 20 saniyede eritilmesi sonrası, motilite ve akrozom bütünlük oranlarının yöntemler arasında fark göstermediği belirtilmiştir (Pontbriand ve ark., 1989; Holt, 2000a). Yine başka bir çalışmada koç sperması 70ºC - 5 saniye, 50ºC - 9 saniye ve 35ºC - 12 saniye şeklinde yöntemler kullanılmış ve 70ºC ile 50ºC arasındaki istatistiksel farkın önemli olmadığını bildirmişlerdir (Söderquist ve ark., 1999). Benzer bir şekilde, 50ºC ve 35ºC 'de çözdürülen koç spermaları ile yapılan intraservikal tohumlamalar sonucu gelişen gebeliklerin oranlarında da fark belirtilmemiştir (Paulenz ve ark., 2004).

2.6. Serbest Radikaller (Oksidanlar) ve Reaktif Oksijen Türleri

Biyolojik materyallerde serbest radikallerin varlığı 1950'li yıllarda keşfedilmiştir (Commoner ve ark., 1954). Bundan kısa bir süre sonra Denham Harman, oksijen radikallerinin canlı vücudunda gerçekleşen enzimatik reaksiyonlarının yan ürünleri olabileceği hipotezini öne sürmüş, 1956 yılında da serbest radikaller için Pandoranın Kutusu benzetmesini yaparak; yağ hücrelerinin hasarı, mutajenez, kanser ve biyolojik yaşlanma gibi sonuçlar doğurduğunu belirtmiştir (Harman, 1956; 1981). Canlı organizmalardaki serbest radikal bilinci, McCord ve Fridovich'in süperoksit dismutaz (SOD) enzimini keşfetmesiyle ikinci dönemine girmiş ve birçok araştırmacıyı serbest radikallerin önemli olduğuna ikna etmiştir. Bu gelişmeler DNA, proteinler, yağlar ve hücrenin diğer bileşenlerinde radikallerin sebep olduğu hasarları araştırmak için birçok araştırmacıya ilham vermiştir (Beckman ve Ames, 1998).

Serbest radikaller; çok kısa ömürlü , moleküllerle hızla reaksiyona girebilen, oldukça kararsız olup kimyasal olarak kararlı hale gelebilmek ve oksidan özellikler kazanabilmek için elektron almaya ihtiyaç duyan moleküllerdir (Mercan, 2004; Karabulut ve Gülay, 2016). Bir moleküle saldırdıklarında onun elektronlarını çalıp okside ederek, yeni molekülün serbest radikale dönüşmesine sebep olur. Birbiri ardına gelişen bu reaksiyonlar, antioksidan sistemler ile etkisiz hale getirilinceye kadar sürer. Serbest radikallerin sebep olduğu en ciddi hasarlar hücre membranlarına karşı gelişmektedir. Ayrıca maruz kalınan zaman ve miktara bağlı olarak hücre fonksiyonlarını aksatırlar (Kulaksız, 2009).

Normal bir hücrede serbest radikallerin oluşması ve ortadan kaldırılması arasında denge bulunmaktadır. Ancak bu denge serbest radikallerin yapımının artması ya da antioksidan seviyesinin azalması ile bozulabilmektedir. Bu duruma oksidatif stres denir ve uzun sürdüğü ya da baskın olduğu durumlarda hücrede ciddi hasarlara neden olabilmektedir (Pham-Huy ve ark., 2008).

Serbest radikaller, aynı zamanda reaktif oksijen türleri (ROT) kararlı olmayan elektronlara sahip atomlar, moleküller veya iyonlardır. Reaktif oksijen türleri sadece molekülleri işaretlemek değil aynı zamanda proteinlerin görevi olan redoks düzenleyicileri olarak da işlev görür (Sean ve ark., 2015). Canlı vücudu tarafından tüketilen oksijenin yaklaşık % 1-3'ü reaktif oksijen türlerine dönüşür. Oksijenli solunum reaksiyonları sonucunda mitokondriumun iç membranında intrasellüler ROT'un

%90'lara varan bir kısmı üretilmektedir (Wei ve Pang, 2005). Vücut içi dengede önemli bir rolü olan ROT'ların, küçük miktarları birçok tepkimede ara bulucu olarak görev alırken, fazla miktarlar hücrelerde hasar (oksidatif stres gibi) meydana getirmektedir (Martin ve Barret, 2002).

Serbest radikaller üç elementten oluşur: Oksijen, azot ve kükürt, böylece reaktif oksijen türleri (ROT), reaktif azot türleri (RNT) ve reaktif kükürt türleri (RST) oluşturur (Lu ve ark., 2010). ROT'lar; süperoksit, ozon, hidrojen peroksit, hidroksil radikali vb.; RNT'ler; nitrik oksit ve dioksit vb. ve son olarak RST'ler; thiyl radikali olarak sınıflandırılmaktadırlar (Fehrenbach ve Northoff, 2001).

Spermada gözlenen serbest radikallerin kaynağı; semende bulunan lökositler, spermatozoa, reprodüktif epitel hücreleri ve genital kanalı enfekte eden bakterilerdir (Kulaksız, 2009). Spermatozoa tarafından ROT üretimi fizyolojik bir durumdur (Hammadeh ve ark., 2009). Bununla birlikte spermatozoa tarafından aşırı ROT üretimi, orta bölüm anomalileri, rezidü sitoplazma, sitoplazmik damlacık ve immatürite ile ilişkilendirilmiştir (Bansal ve Bilaspuri, 2010).

Spermin dondurulması genellikle soğuk şoku, atmosferik oksijene maruz kalma ve seminal plazmanın çıkarılması nedeniyle aşırı ROT üretilmesine neden olur (Bailey ve ark, 2003). Çalışmalar sonucu, dondurma ve eritme işlemlerinin spermatozoalara verdiği hasarlar az da olsa ortaya konabilmiş ve bu işlemlerin oksidatif strese neden olarak hücrelere ciddi zararlar verdiği belirtilmiştir (Potts ve ark., 2000).

Dondurma ve saklama işlemleri sırasında koç sperması yüksek miktarda hidrojen peroksit açığa çıkarır (Maia ve ark., 2010; La Falci ve ark., 2011). Bu durum eritme sonrası spermatozoon hareketliliğini azaltıcı bir etki göstermektedir (Maia ve ark., 2014).

Erkeklerde görülen sperm kalitesinin yetersizliği ile ROT üretiminin kökeni ve artışının etiyolojisinin ilişkisi yakın zamanda açıklanmış olup, potansiyel bir tedavi için birçok yöntem sunulmaktadır (Kefer ve ark., 2009). İnfertilite tedavisinde özellikle önleyici bir yaklaşım olarak antioksidan takviyesi kullanmak, araştırılması gereken ilginç bir konudur. Ayrıca, ROT'un doğurganlık ve kısırlıktaki rolü araştırmaya devam edilmesini hak eden bir alandır (Sekhon ve ark., 2010).

Canlı organizmalar, vücut sistemlerini serbest radikal hasarlarına karşı korumak için sinerjik olarak çalışan, oldukça karmaşık antioksidan sistemler geliştirmişlerdir

(Sisein, 2014). Spermatozoa ve eklenti üreme bezlerinin sıvıları bazı antioksidanları içerseler de ROT'ların toksik etkilerine ve verdikleri zarara karşı yeterli gelememektedir. Bu sebeple, spermanın eksternal antioksidan ilavesi ile desteklenmesi gerekmektedir (Er, 2013).

ROT'ların fazla üretilmesi durumunda, endojen ve eksojen antioksidan savunma sistemleri, fizyolojik işlemlerin normal düzeylerde sürdürülmesi için bu radikalleri etkisiz hale getirilirler (Urso ve Clarkson, 2003). Bu dengenin oksidanların lehine bozulması literatürde oksidatif stres olarak ifade edilen doku hasarına yol açmaktadır (Yeum ve ark., 2004). Bu hasarlar, hücresel yapının bileşenleri olan nükleik asit, enzim, karbonhidrat, lipit ve proteinler nedeniyle, oksidan moleküllerin yarattığı reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır (Yu, 1999). Dengenin ROT'lar lehine bozulması, çok çekirdekli lökositlerin (polimorf nüklear lökositler- PNL) etkinleşmesine neden olmaktadır. Bu da ROT oluşumunu desteklemektedir (Carden ve Granger, 2000).

ROT'lar, hücrelerin membranlarında bulunan lipit yapıları okside ederek, malondialdehid (MDA) benzeri zehirleyici maddelerin oluşmasına neden olurlar (Kısaoğlu ve ark., 2013). Memeli spermatozoonları, doymamış yağ asitleri adı verilen oldukça spesifik lipit bileşimlerinden oluşmaktadır. Spermatozoon membranının bu alışılmadık yapısı, esnekliğinden ve işlevsel becerilerinden sorumludur. Bununla birlikte, spermatozoonlarda bulunan lipidler, hayatta kalmasını tehdit edebilecek peroksidasyon için alt yapıyı da oluşturular. Lipitlerin bu patolojik peroksidasyonu, oksidatif stres sırasında sperm membranlarını dengesiz hale getirir (Sanocka ve Kurpisz, 2004).

Kontrolsüz ROT seviyeleri, spermatozoonların hücre yapılarında, lipit peroksidasyonu, protein modifikasyonu ve hücre fonksiyonlarında bozulmalarla sonuçlanan DNA hasarlarına neden olarak, hücrenin canlılığını etkileyebilir ancak döllenme (De Lamirande ve ark., 1997) ve apoptozis (Merton ve ark., 2013) için de yeterli bir fizyolojik seviyede ROT gerekmektedir.

2.7. Kriyoprotektan Maddeler

Spermanın dondurulması ve çözdürülmesi esnasında değişen sıcaklık nedeniyle ortamda oluşan farklı osmotik basınç ve kimyasal bileşimde oluşan değişikliklere karşı, spermatozoonları koruyan maddelere kriyoprotektif maddeler (kriyoprotektan) denir (İleri, 1994).

Kriyoprotektan olarak adlandırılan bileşiklerin genel özellikleri; düşük moleküler ağırlığa sahip olmaları, belirli oranlarda kullanıldıklarında toksik olmamalarıdır. Kriyoprotektif bileşikler genellikle ortamda bulunan donmamış bölümleri attırma ve iyon sayısını azaltma gibi işlemler yaparak hücreyi korur. Hücre dondurma işleminden önce kriyoprotektan maddelerle inkübe edilerek, intraselüler açıdan dengelenmesi sağlanır. Bu bileşiklerin koruyucu etkileri, geçirgenlik (permeabilite) farklılıkları ve toksisitesi; hayvan türüne, hücre farklılıklarına, embriyoda ise farklı gelişim aşamasında kullanılmalarına göre değişebilmektedir (Jackson ve ark., 1997; Bucak ve Tekin, 2007).

Dondurma sırasında oluşan buz kristallerini hacimce küçültmek ve spermaya karşı zararlı etkisini minimize etmek amacı ile hücre içine girebilen (permeable) ve hücre zarını geçemeyen (non-permeable) çok sayıda farklı etkiye sahip kriyoprotektif madde kullanılmıştır (Bucak ve Tekin, 2007; Soylu ve ark., 2007; Nur, 2010).

Hücre dışı (eksternal) kriyoprotektanlar; sakkaritler ve makromoleküller şelinde incelenirler. Sığır serum albumini, ficoll 70, polietilen glikol, mannitol, dekstran ve polivinilprolidon makromolekülleri sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle lipit peroksidasyon inhibitörü olduğu düşünülen sığır serum albumini (bovine serum albumin; BSA) çok sayıda çalışmada kullanılmıştır (Kasai, 1996; Ball, 2001). Ölümcül (letal) etkili hücre içi (intrasellüler) kristalleşmeyi engellemek için hücrede dehidrasyon oluşturan glikoz, sükroz, trehaloz ve raffinoz sıklıkla kullanılan sakkaritlerin arasında sayılabilir (Mcwilliams ve ark., 1995; An ve ark., 2000; Baran ve ark., 2011; 2012).

Hücre sitoplazmasından geçebilme özelliğine sahip kriyoprotektanlar internal kriyoprotektan olarak adlandırılır. Dondurma sırasında ortamdaki elektrolit miktarını azaltmak, su kaybını düzenlemek, protein yapıları korumak ve osmotik büzüşmeyi azaltmak gibi görevleri vardır (Holt, 2000b). Başlıca internal kriyoprotektanlar; gliserol, etilen glikol, (1,2) propanediol, dimetilsülfoksit (DMSO), methanol, asetamid, adenitol, perseitol, metil formamidedir (Gao ve Crister, 2000).

Koç ve boğa spermatozoasının dokosaheksaenoik asit içeriğine, domuza göre yüksek oranda sahip olması, soğuk şokuna karşı direnç göstermede ve dondurmada daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir (Leibo ve Songsasen, 2002).

2.7.1. Proteinler

1969'da Antarktika balığının donmaya dayanabileceği keşfedildi. Araştımacılar bu keşifle, daha sonra antifriz proteinleri olarak da anılan spesifik proteinlerin, donma üzerine yaptıkları etkileri araştırmaya başlamışlardır (DeVries ve Wohlschlag, 1969). Bu antifriz proteinlerinin daha sonra hücreyi; dondurma işlemi sırasında buz kristali oluşumunu modifiye ederek (Ishiguro ve Rubinsky, 1994; Chapsky ve Rubinsky, 1997), yeniden kristalleşmeyi önleyerek (Knight ve ark 1984; Knight ve ark., 1988) ve düşük sıcaklıklarda plazma membranı ile etkileşime girerek (Rubinsky ve ark., 1991; Rubinsky ve ark., 1992) başka şekillerde koruduğu görüldü.

Spermanın dondurulmasında kullanılan sulandırıcılara, spermatozoonları soğuk şokundan koruyan, lipoprotein ve yüksek moleküler ağırlıklı bileşenleri içeren yumurta sarısı konulmaktadır (Beccaglia ve ark., 2009).

Birçok araştırmacı düşük yoğunluklu yumurta sarısının başlıca düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)'lerden oluştuğunu, bunun da soğuk şokuna direnç göstermede ve depolanan spermatozoonların motilitelerini geliştirmekten sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir (Evans ve ark., 1973; Pace ve Graham, 1974; Quinn ve Chow, 1980).

Soya fasulyesindeki yağların %10'unun, yumurta sarısında bulunan düşük yoğunluklu lipoproteinlerin aktif bileşeni olduğuna inanılan lesitin bazlı olduğu (Moussa ve ark., 2002, Gil ve ark., 2003, Jeyendran ve ark., 2008) ve %1 oranında lesitin'in koç sperması dondurulmasında yumurta sarısının yerini alabileceği bildirilmektedir (Forouzanfar ve ark., 2010).

Albumin, spermatozoon plazma zarı ve DNA'sındaki lipit peroksit kaynaklı hasarı nötralize etmeye yardımcı olur (Twigg ve ark., 1998).

Araştırmacılar, sığır serum albümini'nin (BSA), sperm hücrelerinin membran bütünlüğünü ısıya karşı koruduğunu bildirmişlerdir (Lewis ve ark., 1997).

Uysal ve Bucak (2007), sulandırıcıya BSA takviyesinin, dondurma-çözdürme işlemi sırasında koç spermasının özelliklerini korumada olumlu bir etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, başka bir çalışmada, BSA'nın düşük konsantrasyonlarının koç sperma sulandırıcılarında yumurta sarısı yerine kullanılabileceği bunun eritme sonrası canlılık ve hareketliliği artırabileceği bildirilmiştir (Matsuoka ve ark., 2006; Fukui ve ark., 2007).

Aynı veya farklı türlerden toplanan seminal plazmanın sıvı veya dondurulmuş sulandırıcılarda kullanımının, memeli spermasında gözlenen düşük sıcaklıkların negatif etkilerini ve donmanın neden olduğu olumsuz etkileri en aza indirme kapasitesi yönünden değerlendirilmiştir (Baran ve ark., 2004). Seminal plazma, spermayı oksidatif stresten korumak ve koç spermasının kapasitasyonunu önlemek için protein, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları içermektedir (Van Overveld ve ark., 2000; Maxwell ve ark, 2006). Seminal plazma eklenmesinin, taze ya da dondurulmuş ve çözdürülmüş koç spermasında; motilite, canlılık, akrozom bütünlüğü, kapasitasyon ve mitokondriyal solunum aktivitesi gibi özellikleri geliştirdiği de bildirilmiştir (Ashworth ve ark., 1994; Graham, 1994; Maxwell ve Johnson, 1999; El-Hajj Ghaoui ve ark., 2007; Domínguez ve ark., 2008; Leahy ve ark., 2010; Bernardini ve ark., 2011; Rovegno ve ark., 2013; Mata-Campuzano ve ark., 2015).

Sakkarit ve makromoleküler yapıda maddeler, hücrelerin hasar ve kaybını azaltmak, hücre kriyoprezervasyonunu geliştirmek amacıyla işlem çözeltilerine, membran dengeleyici olarak eklenmektedir. Araştırıcılar özellikle BSA'nın çeşitli hücrelerde donmadaki görevi üzerine çalışmış ve hücrelerin tür çeşitliliğine göre değişik sonuçlar gözlenmiştir (Shaw ve Trounsen 1989; Ollero ve ark., 1996; Borderie ve ark., 1998; Duran ve ark., 2001; Sağırkaya ve ark., 2007; Özdaş ve ark., 2012).

Proteinler söz konusu olduğunda, sığır serum albümini (BSA), spermatozoon hücrelerinin membran bütünlüğünü ısıya karşı korur (Lewis ve ark., 1997). Uysal ve Bucak 2007), sulandırıcıya BSA takviyesinin, dondurma-çözdürme işlemi sırasında koç spermasının özelliklerini korumada olumlu bir etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

BSA'nın %10 veya %15 oranında kullanılmasının, koç sperma sulandırıcılarındaki yumurta sarısının yerine geçebileceği ve dondurma-çözdürme sonrası sperm hareketliliğini ve canlılığı artırmak için kullanılabileceği bildirilmiştir (Matsuoka ve ark., 2006; Fukui ve ark., 2007).

Bazal kültür ortamına farklı kökenlere sahip hayvan serumunun takviyesi, hücre büyümesi ve proliferasyonun uyarılması için esastır (mitojenik etki). En yaygın olarak kullanılan serum, yetişkin veya yeni doğan hayvanlardan veya fötal sığır kökenlidir.

Hayvan serumu ve fötal sığır serumu (FBS), genellikle düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı farklı biyomoleküller, fizyolojik olarak dengelenmiş büyümeyi teşvik

edici ve engelleyici faaliyetleri olan çok sayıda bileşenin oldukça komplike bir karışımıdır. FBS büyüme faktörlerinin zenginliği ve düşük gama globülini içeriği sayesinde, hücre kültürü ortamının standart bir tamamlayıcısı haline gelmiştir. Çoğu durumda, FBS, %10 (h / h) konsantrasyonlarında kullanılır, ancak spesifik uygulamalar için (ör. düşük serum ortamı) değişebilir. FBS, hücre çoğalması ve bakımı için gereken faktörlerin çoğunun bir kokteylidir. İnsan ve hayvan (böcek dahil) hücrelerinin çoğunda etkili olan neredeyse evrensel bir büyüme takviyesidir. Ayrıca serum destekli besi yerinin kullanılması, her hücre tipi için spesifik, optimize edilmiş bir besi yeri formülasyonu geliştirmek için zaman ve çaba harcama gereksinimini azaltır (Gstraunthaler, 2003).

2.7.2. Fötal Calf Serum (FCS)

Kumulus-oosit kompleksleri kültürlerinde çokça kullanılan FCS'nin, hücreler arası ortamı stabilize ettiğine inanılmaktadır (Simon ve ark., 1992).

Sığır ve hamster oosit-kumulus komplekslerinin, iv vitro maturasyonunda kullanılan FCS ve BSA'dan, BSA hücreleri desteklemekte yetersiz kalırken, FCS'nin düşük dozları bile gelişim için beklenen desteği sağlamıştır. Ayrıca protein takviyesi olarak FCS kullanıldığında polisperminin arttığı gözlenmiştir. Bunun FCS'nin sperma ya da oositle karşılıklı etkileşimi olup olmadığı bilinmemektedir (Leibfried-Rutledge ve ark., 1986).

Serumun hemolitik aktivitesini engellemek için, serumun 30 dakika boyunca 56°C sıcaklıkta, ısıya duyarlı tamamlayıcı proteinlerinin titresi azaltılarak inaktivasyonu sağlanır (Triglia ve Linscott., 1980). Hücre kültürü ortamında kullanılmadan önce FCS'nin ısıyla etkisizleştirilmesinin önemi ile ilgili çelişkili raporlar vardır. Bazı çalışmalar, serum modifikasyonlarının ısıyla inaktive edilmesinin büyüme faktörü içeriğini ve hücre çoğalmasını artırdığını bildirmiştir (Huang ve Stott, 1995; Bruinink ve ark., 2004). Bununla birlikte, Leshem ve ark., (1999) serumun ısıyla inaktivasyonunun lenfosit fonksiyonlarını etkilemediğini, en azından in vitro çalışmalarda etkilemediğini bildirmişlerdir.

Tablo 2-1: Fetal Sığır Serumu Bileşimi (Price ve Gregory, 1982)

Bileşenler	Konsantrasyon	Aralık
Total Protein	3.8 g/100 ml	3.2-7.0

Albümin	2.3g/100 ml	2.0-3.6
Endotoksin	0.36 ng/ml	0.01-10
Hemoglobulin	11.3 mg/100 ml	2.4-18.1
Kolesterol	31 mg/10 ml	12-63
Glukoz	125 mg/100 ml	85-247
İnsülin	10µU/ml	6-14
Kortizon	0.5µg/100 ml	< 0.1-2.3
Triiyodo-tironin	119 ng/100 ml	56-223
Tiroksin	12.1 ng/100ml	7.8-15.6
PTH	1718 pg/ml	85-6180
PGE	5.91 ng/ml	0.5-30.5
PGF	12.33 ng/ml	3.8-42.0

FCS'nin dinlenme kültürlerine eklenmesi, protein ve RNA sentezi oranlarının arttırılması ve nihayetinde DNA kopyalanmasının sürdürülmesiyle, siklik nükleotit konsantrasyonları ve taşıma oranlarında ani değişikliklere neden olur. Bununla birlikte, serum birçok farklı büyüme faktörü ve hormon içerdiğinden, gözlemlenebilir çeşitli etkiler ayrı mekanizmalar tarafından ortaya çıkarılabilir. Bazı fibroblastik hücrelere FCS eklenmesi, hücre içerisindeki Ca^{++} konsantrasyonunu artırarak DNA sentezini aktive eder. Bu gözlem, büyüme aktivasyon mekanizmasını açıklar (Bertsch ve Marks, 1974).

Wakayama ve Yanagimachi 1998 senesinde yaptıkları ICSI (İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu) çalışmasında spermaların dondurularak kurutulması (liyofilizasyon , freeze-drying, FD) işlemi için %10 FCS katılmış iki farklı kültür medyumu kullanmışlar ve başarılı ilk FD-ICSI kaynaklı fare yavruları elde etmişlerdir (Gil ve ark, 2014).

Sisteamin ve merkaptoetanol (P3-ME) gibi düşük moleküler ağırlıklı tiyol bileşiklerinin hücre canlılığını arttırdığı bildirilmektedir (Takahashi ve ark,1993).

2-Merkaptoetanol (2-ME), çeşitli hücre kültür sistemleri üzerinde yararlı bir etkiye sahiptir. Birkaç hücre dizisi için büyümeyi teşvik edici bir ajan olarak görev yaptığı (Broome ve Jeng., 1973), in vitro eritropoezi arttırdığı (Iscove ve Sieber 1975), serum içermeyen kültürlerde karışık lenfosit kültürü reaksiyonlarını destekleyebildiği (Heber-Katz ve ark., 1973; Peck ve ark., 1973) gösterilmiştir. 2-ME'nin, in vitro primer immün yanıtı arttırdığı, bu immün cevapta makrofajları fonksiyonel olarak temsil ettiği ve hücre canlılığını arttırdığı gösterilmiştir (Click ve ark., 1972; Chen ve Hirsch 1972).

2-ME'nin, in vitro primer immün yanıtı (yetersiz serum, FCSdef) destekleyemeyen fetal buzağı serumu (FCS) 'yi etkili bir FCS'ye (iyi serum, FCSgood) dönüştürebildiği bildirilmiştir. 2-ME'nin normal olarak FCS'de bulunan bir serum bileşenini aktifleştirdiği varsayılmıştır. Ayrıca, FCS ile birlikte 2-ME'nin, T hücreleri üzerinde güçlü bir mitojenik aktivite sergilediği gösterilmiştir (Lemke ve Opitz, 1976).

2.8. Antioksidanlar

ROT miktarının artmasını, bunların neden olduğu zararların önlemesini ve toksinlerin uzaklaştırılmasını sağlayan savunma sistemlerine "antioksidan savunma sistemleri" veya "antioksidanlar" adı verilmektedir (Şener ve Yeğen, 2009).

Agarwal ve arkadaşlarına göre (2004) antioksidanlar hücreleri oksidadif strese karşı üç mekanizma ile korurlar bunlar önleme, durdurma ve onarımdır.

Antioksidanlar vücut tarafından üretilen (endojen) ve dışarıdan alınan (eksojen) antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Endojenler; enzim yapıda ve enzim yapıda olmayan antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılır:

Enzim yapıda olanlar; katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GRx), glutatyon peroksidaz (GPx).

Enzimatik yapıda olmayanlar ise; ürik asit glutatyon, koenzim Q10, melatonin, selenyum, , α-lipoik asit, transferrin, albümin, bilirubin, seruloplazmin.

Eksojen antioksidanlar, ilaç ve vitaminler şeklinde ikiye ayrılır:

Vitaminler; A, B9, C, E vitaminleri vb.

İlaç olanlar; demir şelatörleri, trolox-C, nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar ksantin oksidaz inhibitörleri, demir redoks döngüsü inhibitörleri, barbitüratlar, NADPH oksidaz inhibitörleri, sitokinler, rekombinant süperoksit dismutaz, endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar, nötrofil adezyon inhibitörleri vb (Aydemir ve Karadağ, 2009; Sen ve Chakraborty, 2011).

Spermanın dondurma ve eritme esnasında oluşan ROT türevleri, hücre içi antioksidanların savunmasını düşürerek fertiliteyi düşürmektedir. ROT az konsantrasyonlarda; spermatozoanın fizyolojik gelişim aşamalarında önemli rol oynar. Ancak, yüksek miktarda üretilmesi spermatolojik fonksiyonları olumsuz yönde etkilemektedir (Aitken ve Baker, 2004).

Spermatozooa, boyutu ve sitoplazmasının küçük hacminden dolayı, düşük konsantrasyonlarda temizleyici enzimlere ve sınırlı miktarda antioksidan savunma özelliklerine sahiptir. Memeli spermaları çoğunlukla enzimatik antioksidanlar içerir; buna SOD ve GPx de dahildir ki bunlar ağırlıklı olarak orta kısımda yer alır. Vitamin E, vitamin A, transferrin ve seruloplazmin gibi birkaç non enzimatik antioksidan, spermatozoanın plazma membranında bulunur ve koruyucu antioksidanlar gibi hareket eder. Normal şartlar altında seminal plazma, spermatozoonları serbest radikallerin oluşumuna ve yayılımına karşı koruyan önemli bir koruyucudur. Seminal plazma, hem enzimatik antioksidanları hem de bir dizi enzimatik olmayan antioksidanları (örneğin, askorbat, ürat, vitamin E, vitamin A, piruvat, glutatyon, albümin, taurin ve hipotaurin) içerir (Agarwal ve ark., 2004).

Farklı türlerin oksidatif hasara karşı, çok çeşitli antioksidan savunmaları vardır. Aygır spermatozoonu domuz spermatozoonuna kıyasla ROT kaynaklı hasara karşı son derece iyi korunmaktadır (Strzezek ve ark., 1999; Strzezek, 2002). Aygır seminal plazmasında bulunan antioksidan enzimler arasında CAT oldukça yüksek bir aktivite göstermektedir (Strzezek ve ark., 1999). Foote 1962 yılında yaptığı çalışmada boğa ve domuzdan alınan örneklerle kıyasladığında, tavşan ve koç spermasında daha yüksek CAT aktivitesi olduğunu belirtmiştir. Seminal plazma GPx aktivitesi tavşanlarda bulunmakla birlikte (Virág ve Mézes, 1994), erkek ve koçlarda düşük, domuz ve aygırlarda noksan, boğa da ise oldukça yüksektir (Saaranen ve ark., 1988).

Spermada bulunan ve spermatozoayı oksidadif strese karşı koruyan enzim yapıda olmayan antioksidanlar; glutatyon, sistein, C ve E vitaminlari, karotenler, ürik asit,

piruvat, taurin, hipotaurin, albümin, çinko, selenyum, koenzim-Q10, laktoferrin ve prostozomdur.

Ratlarda yapılan bir çalışmada aflotoksin B1 ile oksidadif strese sokulan hayvanlara likopen uygulanmış, bunun sonucunda testis ve sperma özellikleri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda likopen'in sperma motilitesini yükselttiği ve aflotoksinin neden olduğu strese karşı testisi koruduğu bildirilmiştir (Taş ve ark., 2010)

Çalışmalar, antioksidanların spermayı ROT'ların sebep olduğu; anormal spermatozoalardan koruduğu, lökositleri uzaklaştırdığı, DNA parçalanmasını önlediği, sperm kalitesini artırdığı, donmanın zararlı etkilerini azalttığı, erken sperm olgunlaşmasını önleme ve genel olarak spermayı teşvik ettiğini göstermiştir (Cocuzza ve ark., 2007). Antioksidanların, oksidatif stres sebebiyle indüklenen DNA parçalanmasını azalttığı da ispat edilmiştir (Greco ve ark., 2005).

Spermatozoon membranının soğuk şoku ve lipit peroksidasyonuna (LPO) duyarlılığı, düşük sıcaklıkta bir membran stabilizatörü olan kolesterole (Darin-Bennett ve White, 1977; Muiño-Blanco ve ark., 2008) ve PUFA'ya bağlıdır (Aitken ve ark., 1991; Watson, 1995; Agarwal ve ark., 2014). Boğa ve tavşan spermatozoonları ile karşılaştırıldığında, koç spermatozoon zarı daha az kolesterol / fosfolipid oranına (Darin-Bennett ve White, 1977) ve nispeten daha büyük oranda PUFA'ya (doymamış yağ asitleri/ doymuş yağ asitleri≈ 3/1) (Holt ve North, 1985; White, 1993), sahiptir. Bu durum gametlerin soğuk şoku ve LPO'ya daha duyarlı hale gelmesine sebep olur (Jones ve Mann, 1973; Darin-Bennett ve White, 1977; Amann ve Pickett, 1987; Medeiros ve ark., 2002; Peris ve ark., 2007). Ayrıca, dondurarak saklama işlemi, spermatozoa membranındaki kolesterolün tükenmesine neden olarak soğuk şokunun zararlarını şiddetlendirmektedir (Maldjian ve ark., 2005; Amidi ve ark., 2010).

E Vitamini, ROT ve LPO üretimini inhibe ettiği bilinen en güçlü moleküllerden biridir. Lipofilik bir molekül olan E Vitamini, hem LPO ile savaşmak için antioksidan olarak (Niki, 2014), hem de plazma membranlarının stabilizatörü olarak kullanılır (Urano ve ark., 1987; 1988).

Yapılan bir çalışmada, erkek sıçanların sukrotal bölgelerine bir defa gama radyasyon uygulanmış, bunun sonrasında hayvanlara tedavi amacıyla oral yolla C

vitamini takviye edilmiştir. Çalışma sonunda, C vitaminin tubulus seminiferus çaplarında olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (Taş ve ark., 2014).

Amino asitler, belirli antioksidan özelliklere sahip, enzimatik olmayan temizleyicilerdir ve seminal plazmada yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Koç sperması sulandırıcılarına amino asit katarak (örneğin; taurin, hipotaurin, prolin, glutamin, glisin, histidin ve sistein) DNA parçalanmasının azaldığı ve çözülme sonrası hareket kabiliyetinin geliştiği, canlılığının, zar bütünlüğünün ve döl verimliliğinin arttırdığı kanıtlanmıştır (Sanchez-Partida ve ark., 1997; Bucak ve ark., 2009a; 2013). Ekici ve ark., (2012) gökkuşağı alabalıklarında yaptıkları bir çalışmada, taurin eklenmiş glikoz bazlı sperma sulandıcılarının, eritme sonrasında sperma motilitesi ve fertilite yeteneğine etkilerini araştırmış ve düşük dozlarda etkili görülen taurinin, yoğunluğu arttıkça canlılık ve fertilite özelliklerinin azalmasına sebep olduğu gözlenmiştir.

Seminal plazma, spermayı oksidatif stresten korumak ve koç spermasının kapasitasyonunu önlemek için protein, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları içermektedir (Van Overveld ve ark., 2000; Maxwell ve ark., 2006).

Koç sperması ROT'u temizleyebilmek için; indirgenmiş GSH, GSx, CAT ve SOD gibi güçlü bir antioksidan enzim sistemi ile donatılmıştır (Aitken ve Baker, 2004; Gadea ve ark., 2004). Buna rağmen, endojen antioksidan sistemi, genellikle ölü spermatozoonlardan kaynaklanan oksidatif stresin neden olduğu, ROT üretimi ve eliminasyonu arasındaki dengesizliği gidermek için yeterli değildir (Dowling ve Simmons, 2008). Bunu, yapısal ve işlevsel bütünlüğün kaybolması, membran geçirgenliğinin arttırılması, DNA'da yapısal hasar ve hücre ölümü takip eder (Aitken ve Baker, 2004; Gadea ve ark.,2004; Heish ve ark., 2006). Bu sebeplerle, sperma sulandırıcılarına uygun bir antioksidan eklenmesiyle, spermanın donma ve eritme aşamalarında maruz kalacağı oksidadif stresin zararlı etkilerinden korunması sağlanabilir (Bucak ve ark., 2007; Camara ve ark., 2011; Amidi ve ark., 2016; Rather ve ark., 2016).

2.8.1. Sisteamin

Sisteamin, sisteinden oluşan SH grubu taşıyan bir biyojenamindir. Vücut içerisinde sisteine dönüşebilir ve disülfid bağları şeklinde lizozomlar içerisinde sistin olarak saklanır. Antioksidan ve antiklastojenik özelliklere sahip olmakla birlikte asetilCoA'nın yapısına girerek hücre metabolizması açısından önemli görevlerde bulunurlar (Miller ve Schlesinger, 1993).

Biyojenaminler, aminoasitlerden karbondioksitin uzaklaşması ile meydana gelir ve tüm canlılar tarafından sentezlenebilirler. Bu nedenle vücutta sentezlenenler endojen ve dışarıdan temin edilen eksojen biyojenaminler olarak sınıflandırılırlar (Doğan, 2010; Vatansever, 2004).

Biyojenaminler vücutta kobalamin, coenzim A ve hormon yapılarına girip, hücrelerin üremesi, farklılaşması, çoğalması ve metabolizmalarında görev alırlar (Vatansever, 2004; Wang ve ark., 2010).

Yapılan bir çalışmada fibrosarkomaya neden olan 3-metilkolantren maddesi verilen farelerde, sisteaminin koruyucu etkisi araştırılmış ve bu maddenin fibrosarkoma yapıcı etkisinin %50 oranında azaldığı belirtilmiştir (Doğan ve ark., 2013).

Bucak ve ark. (2007); sperma sulandırıcısına farklı yoğunlukta sisteamin katılmış koç spermalarının, eritme sonrası muayenelerinde motilite ve canlılık bakımından kontrol grubuna göre daha yüksek değerler gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yapılan başka bir araştırmada 5 mM sisteamin eklenmiş sulandırıcı ile dondurulan spermanın eritme sonrası membran bütünlüğünün kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Cirit ve ark. 2013).

Sisteamin, N-asetilsistein, β-merkaptoetanol benzeri düşük molekül ağırlığına sahip maddeler, sistin alımını yükselterek glutatyon yapımını artırmaktadırlar (Ishii ve ark., 1981).

Sisteamin ile sistein, oositlerin in vitro olgunlaşması ile glutatyon miktarını artırma ve korumakta yardımcıdırlar. Sisteamin, hücreleri ROT'a karşısında destekleyerek ve temizleyici olarak görev alırlar (Deleuze ve Gaudet, 2010).

Boğa spermasında yapılan bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda sisteamin eklenmiş sulandırıcılar ile dondurulan speramatozoonların eritme sonrası hareket kabiliyetlerinde ve morfolojik özelliklerinde olumlu bir gelişme gözlendiği bildirilmiştir (Sarıözkan ve ark., 2015).

Sisteamin, koç ve tekelerde suni vajina ile toplanmış spermanın antioksidan kapasitesini artırarak eritme sonrası motiliteyi geliştirmiştir (Bucak ve ark., 2007; Bucak ve ark., 2009b).

Sisteamin, hücreler tarafından sistein alımını uyararak GSH sentezini arttırır. Bu döngünün sonucu olarak sisteaminin ROT'a karşı savunma mekanizmasında hayati bir rolü vardır (Merton ve ark., 2013).

Sığır, küçükbaş, domuz, hamster ve manda embriyosu geliştirme çalışmaları sisteaminin hidrojen peroksit seviyelerini azalttığını vurgulamaktadırlar (Grupen ve ark., 1995; De Matos ve ark., 2002; Gasparrini ve ark., 2003).

Düşük molekül ağırlıklı bir tiyol bileşiği olan sisteamin, sistin ile reaksiyona girer ve lösin aracılığıyla taşınarak bir memeli hücresi tarafından alınan ve sitoplazmada sisteine bölünen birleşik bir disülfür formuna dönüşür (İshii ve ark., 1981). Böylece, sisteamin, sistini sisteine indirger ve glutatyon sentezini arttırır (İssels ve ark., 1988). Bu gerçeği göz önünde bulundurarak çok sayıda çalışma yapılmıştır ve in vitro olgunlaşma ortamına sisteamin eklenmesinin embriyo gelişim oranını arttırdığı gösterilmiştir (Takahashi ve ark., 1993; De Matos ve ark., 1996, 2002; Olson ve Seidel, 2000; Anand ve ark., 2008; Sandal ve ark., 2018). Bununla birlikte, çeşitli türlerin sperma sulandırıcılarına sisteamin eklenmesi çelişkili sonuçlar vermiştir (Bucak ve ark., 2007, 2009b; Tuncer ve ark., 2014; Najafi ve ark, 2014; Sarıözkan ve ark., 2015; Akalın ve ark., 2016; Büyükleblebici ve ark., 2016; Güngör ve ark., 2016).

Sisteamin, in vitro olgunlaşma sırasında glutatyon (GSH) sentezini uyarır, embriyonik gelişmeyi ve kaliteyi destekler (De Matos ve ark., 2002). Bunlara ek olarak, koç spermasının çözülme sonrası hareket kabiliyetini ve antioksidan kapasitesini artırır (Bucak ve ark., 2007).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı'nda, aynı bakım ve beslenme şartlarında barındırılan, 2-5 yaşlı 5 adet Kıvırcık ırkı koç kullanılmıştır. Ön çalışma amacıyla, koçlardan bir hafta ara ile 2 defa sperma örneği alınıp, makroskobik ve mikroskobik incelemeleri yapılmış ve en uygun görülen 5 koç seçilerek çalışmaya alınmıştır. Sperma alındıktan sonra koçlar arasındaki bireysel farklılıkları engellemek amacıyla pooling yapılmış ve tekrar spermatolojik incelemeleri yapılmıştır. Koçlar çalışma süresince kaliteli kuru ot + birey başına 1 kg konsantre yem/gün ile beslenmiş ve önlerinde sürekli temiz su bulundurulmuştur. Sperma alma çalışmaları üreme sezonu göz önünde bulundurularak Haziran-Eylül ayları içerisinde ve 10 çalışma olacak şekilde tamamlanmıştır.

3.1. Spermanın Alınması

Koçlardan elektro-ejakülatör ile haftada iki sefer sperma alındı. Bunun için hareketleri kısıtlanarak tespiti yapılan koçların prepisyum bölgeleri, serum fizyolojik yardımı ile temizlenip, uzayan kıllar makas yardımı ile kısaltıldı ardından temiz ve yumuşak bir bezle kurulandı.

Elektroejakülatörün prob kısmı distile su ile temizlenerek, rektuma zarar vermemesi açısından uç kısmına vazelin sürüldü ve rektumdan yerleştirilen probun elektrotlu kısmı dorsale gelecek şekilde yerleştirilerek, ereksiyonu uyarabilmek amacıyla 2-10 volt'luk elektrik akımları beşer saniye aralıklarla uygulandı. Uyarılan penis flexura sigmoidea'dan tutularak 37°C sıcaklıkta bekletilen 50 ml hacimli plastik tüpün içine yönlendirildi ve ejakülasyon sağlandı. Plastik tüplerde toplanan spermalar, androloji laboratuarında hızla muayene edilip 1 ml'lik hacimlerde birleştirilerek (pooling) 6 eşit gruba ayrılarak 26ºC 'lik su banyosuna alındı.

3.2. Taze Spermanın Makroskobik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Alınan sperma örnekleri hızla androloji laboratuarına getirilerek koku, renk, hacim ve hareketlilik (motilite), yoğunluk değerlerinin ölçümü yapıldı.

3.2.1. Kitlesel Hareket (Mass Aktivitesi)

Koç spermasının yoğun olması sebebiyle spermanın konulduğu tüpün gözle muayenesinde bile kaynama benzeri hareket gözlenebilmektedir. Bunun haricinde her

hayvandan alınan örnekler, lam üzerine konulup lamel kapatılmaksızın x10 büyütmede ısıtma tablalı ışık mikroskobunda incelendi. Kitle hareketinin değerlendirilmesi, +1 en düşük olmak üzere, +1 ile +4 arasında değerlendirmeye alındı ve en az +3 değere alan örnekler çalışmada kullanıldı (İleri ve ark., 2000).

3.2.2. Hareketlilik (Motilite)

Sperma örnekleri sulandırıcı ile 1/3 oranında sulandırıldı ve her örnekten 5 µl alınıp lam ile lamel arasına kapatılarak ısıtma tablalı faz kontrast mikroskobunda incelemeye tabi tutuldu. Lamın farklı bölgeleri gezilerek ileri doğru hareket eden spermatozoonlar yüzde olarak değerlendirildi (İleri ve ark., 2000). Motilite değerleri %80'in altında olan örnekler değerlendirilmeye alınmadı.

3.2.3. Spermatozoon Yoğunluğu

Birim hacimdeki (ml) spermatozoon sayısını belirlemek için hemositometrik yöntem kullanıldı. Her payette 40 milyon spermatozoon olacak şekilde sulandırma oranları belirlendi (İleri ve ark., 2000). Ejakülatta 1ml ve 1,5 milyar spermatozoonun altında olan örnekler değerlendirilmedi.

3.3. Motilite ile Morfolojik Bütünlüğün Değerlendirilmesi

Makroskopik olarak yapılan muayenelerin yanında mikrokopik düzeyde değerlendirilmeler yapılarak sonuçlar incelendi. Bu amaçla çeşitli yöntem ve araçlardan yararlanıldı.

3.3.1. Sperma Analiz Cihazı İle Motilite Muayenesi

CASA (Computer Assisted Sperm Analysis-Version 12 IVOS, Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) optik, ışık kaynağı ve bilgisayardan oluşan kompleks bir yapı ile canlılık, morfoloji ve motilite analizi yapabilen bilgisayar programı birleşimidir (Güçtaş, 2006).

Ölçüm yapılırken boğalarda ve koçlarda 30 farklı alanda 300 spermatozoonun değerlendirilmesi (Budworth ve ark., 1988) yeterliyken, aygırlarda ideal olanı 300-500 spermatozoonun değerlendirilmesidir. (Verstegen ve ark., 2002). Sulandırılmış taze sperma örneklerinden 3 µl alınarak CASA adı verilen bilgisayar destekli sperma analiz cihazının, üzerinde sayım kareleri bulunan makler (Makler Counting Chamber, Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) adındaki bölmesine konularak cihazda ölçümü

yapıldı. CASA ile yapılan ölçümler sonucu; total motilite (%), progresif motilite (%), ortalama yol hızı (VAP, average pathvelocity, μm/sn), düzgün doğrusal hız (VSL, straight linear velocity, μm/sn), doğrusal olmayan hız (VCL, Curvi linear velocity, μm/sn), yanal kafa salınımı (ALH, Lateral head amplitude, μm/sn), çapraz vuruş frekansı (BCF, Beat cross frequency, Hz), doğrusallık (STR, Straightness, %) ve linearite (LIN, VSL:VCL oranı) gibi özellikler değerlendirildi.

3.3.2. Morfolojik Bütünlüğün Değerlendirilmesi (Hancock)

Spermatozoaların normal yapılarının bozulması ve %20'den fazla anormal hücre bulunması fertilizasyonu düşürmektedir. Anormal spermatozoonlar primer, sekonder ve tersiyer bozukluklar şeklinde tanımlanmaktadırlar. Çoğunlukla spermatogenezis sırasında oluşanlar primer, epididimal göç sırasında oluşanlar sekonder, ejakülasyon sonrasında spermaya yapılan işlemler sırasında oluşanlar ise tersiyer anomaliler olarak tanımlanmaktadır. Gözlenen anomaliler primer sebeplerden oluşuyorsa orta bölüm ve kuyruk kısmında, sekonder nedenlerden kaynaklanıyorsa da çözülmüş baş, sitoplazmik damlacıklar, kuyruğun diğer kısımlara sarılması ve akrozom çözülmesi şeklinde bozukluklar gözlenir (Çoyan ve ark., 2002).

Bu çalışmada spermatozoonların morfolojik yapılarını kontrol etmek için Hancock solüsyonunda tespiti yapıldı.

Hancock'un formol-salin solüsyonunun hazırlanması:

Formalin (%35'lik) 62.5 ml,

NaCl ana sol. 150 ml,

Tampon ana sol. 150 ml,

Distile su 500 ml

NaCl Ana Solüsyonun Hazırlanması:

NaCl 9.1 gr,

Distile su 500 ml

Tampon Ana Solüsyonun Hazırlanması:

a) $Na_2HPO_42H_2O$ 21.862 gr.,

Distile su 500 ml.

b) KH_2PO_4 22.254 gr.,

Distile su 500 ml.

Hazırlanan Hancock solüsyonunda 225 µl sperma örneğinden ise 25 µl ependorflara alınarak fikzasyonu için 5°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan karışımdan 5 µl örnek alınarak faz-kontrast mikroskobunda x100 büyütmede immersiyon yağında incelendi. Örneklerden 100'er spermatazoon incelenerek anormal hücreler yüzdelik olarak belirlendi.

3.3.3. Fonksiyonel Bütünlüğün Değerlendirilmesi (Hipoosmotik şişme testi; HOST)

Hipoosmotik şişme testi, osmotik basınçları farklı olan iki ortam arasındaki basıncın, fonksiyonel bütünlüğü sağlam olan membrandan suyun taşınmasıyla, dengelenmesi esasına dayananan bir yöntemdir (Jeyendran ve ark., 1992). Spermatozoon membran bütünlüğü metabolik faaliyetler dışında; akrozom reaksiyonu, kapasitasyon ve spermatozoonun oosit yüzeyine tutunabilmesi bakımından da önemlidir. Bu sebeple membran bütünlüğü, spermatozoonun dölleme yeteneğinin de önemli bir belirtisidir (Jeyendran ve ark., 1984). Spermatozoanın kuyruğu baş kısmına göre daha gevşek olup daha belirgin bir şişme gözlenir. Kıvrılma plazma membranının şişmesinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada spermatozoon membran bütünlüğünü kontrol etmek amacıyla hipoosmotik şişme testi (HOST) uygulanmıştır.

HOST Solüsyonunun hazırlanışı:

0,9 gr fruktoz

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

Membran testi için, sulandırılan örneklerden 40 µl, HOST solüsyonundan 960 µl ependorf tüplerde karıştırılarak ve 37°C'lik etüvde 30 dk. inkübasyona bırakılıp sonrasında x100 büyütmede 100 hücre sayıldı. Kuyruk bölgesi kıvrılan ya da sarmal benzeri görünüm alan spermatozoalar membranları sağlam ve canlı kabul edilirken, herhangi bir değişim göstermeyen spermatozoonlar ölü olarak kabul edildi (Tuncer ve ark., 2010).

3.4. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması

Çalışmada distile su içerisinde hazırlanan %15 yumurta sarısı solüsyonu, içerisindeki kaba partiküllerin arındırılması amacıyla soğutmalı santrifüj cihazında 4100 rpm'de (Nüve, NF400) 45 dk süresince santrifüje edildi. Sulandırıcılar bu solüsyon temel alınarak hazırlandı. Çalışmada ana sulandırıcı olarak Tris bazlı sulandırıcı kullanıldı.

Tris Sulandırıcısı: Tris 27.1 gr/lt

Sitrik asit 14 gr/lt

Fruktoz 10 gr/lt

Yumurta sarısı %15 ile v/v hazırlanmıştır.

Gliserol içermeyen temel sulandırıcı (285 mOsm, pH 6,8) 6 eşit hacime ayrılarak, kontrol grubu hariç sisteamin ve FCS farklı konsantrasyonlarının ilave edilmesiyle sulandırıcı grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

1. Grup Tris (Kontrol grubu)
2. Grup Tris + % 15 FCS
3. Grup Tris + 3 mM Sisteamin
4. Grup Tris + 3 mM Sisteamin + %15 FCS
5. Grup Tris + 6 mM Sisteamin
6. Grup Tris + 6 mM Sisteamin + %15 FCS

Sulandırıcılar hazırlandıktan sonra, kaba partiküllerinden arınması için 0.22 µm tek kullanımlık filtreler (Millexgp, 0.22 µm) ile süzüldü ve çalışma öncesi taze olarak hazırlanan bu sulandırıcılar kullanım anına kadar buzdolabında +4 °C de muhafaza edildi. Hazırlanan sulandırıcılar en fazla 2 sperma alımı süresince kullanılarak, her çalışma öncesi taze olarak tekrar hazırlandı. Hazırlanıp gruplara ayrılan her sulandırıcı kendi içinde eşit olarak ikiye ayrıldı ve bunlar A ve B sulandırıcıları olarak etiketlendi.

B olarak etiketlenen sulandırıcılara %10 oranında gliserol ilave edilerek sulandırılmada kullanılan final gliserol oranı %5 olarak ayarlandı (Ak ve ark., 2010).

Gliserolsüz sulandırıcılarda sulandırma işlemi, sulandırıcıların önce %10'u, daha sonra da %20'si, %30'u ve %40'ı, 2 dakika aralıklarla eklenerek 4 aşamada

tamamlandı. Daha sonra 26°C'ye ayarlanmış olan otomatik soğutma cihazına (BioCool III) konularak, sıcaklığı dakikada 0,2°C düşecek şekilde 5°C'ye kadar soğumaya bırakıldı (Ak ve ark., 2010).

45 dk. ekilibrasyona maruz bırakılan spermanın, ekilibrasyon sonunda motilite analizleri yapıldı ve örnekler 0,25 ml'lik şeffaf plastik payetlere, her payete 40 milyon spermatozoon gelecek şekilde çekilerek pamuksuz kısımlar polivinil alkol ile kapatıldı. Payetler çelik taraklara dizilip -110 °C'de sıvı azot buharında kalacak şekilde 10 dk dondurularak sıvı azot içerisindeki kanisterlere yerleştirildi ve inceleme gününe kadar burada depolandı.

3.5. Donmuş Spermanın Eritilmesi ve İncelenmesi

Dondurulan sperma gruplarına ait 2 adet payet en az 1 hafta sonra tesadüfi olarak seçildi ve 37 °C de 30 saniyede çözdürülerek ölü-canlı muayenesi (Hipoosmotik şişme testi-HOST), akrozom, boyun, orta kısım ve kuyruk (ABOK) muayenesi (Hancock), subjektif motilite ve CASA incelemelerine tabii tutuldu.

3.5.1. Morfolojik Bütünlüğün Değerlendirilmesi (Hancock)

Hazırlanan Hancock solüsyonunda 225 µl eritilmiş sperma örneğinden ise 25 µl ependorflara alınarak fikzasyonu için 5 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan karışımdan 5 µl örnek alınarak faz-kontrast mikroskobunda x100 büyütmede immersiyon yağında incelendi. Örneklerden 100'er spermatazoon incelenerek anormal hücreler yüzdelik olarak belirlendi.

3.5.2. Fonksiyonel Bütünlüğün Değerlendirilmesi (Hipoosmotik şişme testi; HOST)

Dondurulan her örnekten tesadüfi olarak ikişer payet seçildi ve 37°C'deki su banyosunda çözdürüldü. Çözdürülen örnekler ependorf tüplere boşaltılarak karıştırıldı. 960 µl HOST solüsyonu içerisine 40 µl çözdürülen sperma örneğinden eklenerek ve 37°C'lik etüvde 1 saat inkübe edildikten sonra x100 büyütmede 100 hücre sayıldı. Kuyruk bölgesi kıvrılan ya da sarmal benzeri görünüm alan spermatozoonlar canlı ve membran özellikleri sağlam olarak kabul edilirken, herhangi bir değişim göstermeyen spermatozoonlar ölü olarak kabul edildi (Tuncer ve ark., 2010).

3.5.3. Bilgisayar Destekli Sperma Analiz Cihazı(CASA) ile Değerlendirme

Çalışmada eritme sonrasında alınan örneklerden 3'er µl alınarak 37°C'lik ısıtma tablası üzerinde bulunan makler'e konuldu. Bunun sonucunda; total motilite (%), progresif motilite (%),VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN değerleri incelendi.

3.6. İstatistiksel Analiz

Tez çalışmasının istatistik analizleri için SPSS programı 25.0 versiyonu (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanıldı. Çalışmada sulandırıcıya katılan maddelerin ve bunların değişik konsantrasyonlarının (3 mM-6 mM sisteamin ve %15 FCS) gruplar arasındaki farklarını incelemek için Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve Duncan's Multiple Range testi, her bir grubun ekilibrasyon ve eritme sonrası analizlerinin karşılaştırılması içinde Bağıllı Örneklem T testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR

Tez çalışmasında sulandırma sonrası 5 °C'de ekilibrasyona maruz bırakılmış spermalar ile eritme sonrası spermaların subjektif değerlendirmeleri arasındaki fark tablo 4-1'de özetlenmiştir. Ekilibrasyon sonrası gruplar arasında belirgin bir fark gözlenmezken, eritme sonrasında yapılan incelemelerde en yüksek motilitenin 3 numaralı gruba ait olduğu (%70±0,3) en düşük ise 6 numaralı gruba (%48±0,7) ait olduğu görüldü.

Tablo 4-1: Ekilibrasyon ve Eritme Sonrası Subjektif Motilite

ÇALIŞMA GRUPLARI	EKILIBRASYON SONRASI MOTILITE (%)	ERITME SONRASI MOTILITE (%)
GRUP 1	80± 0,4	61±0,4
GRUP 2	80± 0,2	63±0,4
GRUP 3	80± 0,4	70±0,3
GRUP 4	80± 0,4	59±0,4
GRUP 5	71± 0,5	59±0,6
GRUP 6	71±0,4	48±0,7

Sonuçlar, ortalama değer ± standart hata (mean±SE) şeklinde gösterilmiştir (p>0,05).

Spermanın ekilibrasyon sonrası HOST sonuçları incelendiğinde gruplar arasında herhangi bir istatistiksel önem bulunmamıştır. Eritme sonrasında FCS ve sisteamin ekli olup olmadığına bakılmaksızın tüm gruplar arasında yapılan değerlendirmede spermanın HOST sonuçları önemsiz değer sınırında çıkmıştır. Diğer gruplar arasında istatistiki bir fark olmamakla birlikte, sırasıyla grup 2'nin eritme sonrası değeri %59,00 ve grup 6'nın %42,10 ortalamalar ile p=0,05 sonucunu vermiştir. Bu değer istatistik fark sınırında çıkmış olsa da, istatistiki önemi karşılamamakla birlikte, değişime yönelik bir eğilimi olduğu yönünde yorumlanabilir (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Ekilibrasyon ve eritme sonrasında HOST ile canlı/ölü muayenesi oranları

ÇALIŞMA GRUPLARI	EKILIBRASYON SONRASI HOST DEĞERLERI (%)	ERITME SONRASI HOST DEĞERLERI (%)
GRUP 1	79,80±1,8	57,70[a] ±4,2
GRUP 2	77,20±1,9	59,00[a] ±3,0
GRUP 3	75,30±1,7	55,60 [a] ±3,1
GRUP 4	67,40±7,2	52,90 [a] ±3,6
GRUP 5	70,40±3,6	51,60 [a] ±4,6
GRUP 6	67,50±4,3	42,10[b]±4,6

Sonuçlar, ortalama değer ± standart hata (mean±SE) şeklinde gösterilmiştir (p>0,05).

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen (a,b) sonuçlar arasında farka yönelik bir eğilimden (b grubu daha düşük olmak üzere) bahsedilebilir (p=0,05).

Eritme sonrasında FCS ve sisteamin ekli olup olmadığına bakılmaksızın tüm gruplar arasında yapılan değerlendirmede spermada gözlenen morfolojik bozukluklardan akrozom, baş, orta, kuyruk incelendiğinde istatistiki olarak bir önem saptanmamış, anormal spermatozoa oranı en düşük kontrol grubunda bulunmuş ve diğer gruplarla arasında istatistiki bir fark görülmemiştir (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Eritme sonrası Hancock solüsyonu ile muayene edilen anormal spermazoon oranları

ÇALIŞMA GRUBU	AKROZOM BOZUKLUĞU (%)	BOYUN BOZUKLUĞU (%)	ORTA KISIM BOZUKLUĞU (%)	KUYRUK BOZUKLUĞU (%)
GRUP 1	8,10±1,4	4,70±0,6	7,70±1,1	7,60±1,4
GRUP 2	9,00±0,5	6,20±0,8	6,40±0,8	8,00±1,4
GRUP 3	9,60±1,4	5,70±0,9	8,00±1,3	8,00±1,5
GRUP 4	8,30±1,0	6,40±1,2	7,30±1,0	6,90±1,7
GRUP 5	8,90±0,9	6,40±0,8	8,20±0,9	8,20±1,0
GRUP 6	10,70±0,8	5,70±0,9	8,60±0,7	8,40±1,4

Sonuçlar, ortalama değer ± standart hata (mean±SE) şeklinde gösterilmiştir (p>0,05).

Çalışmada spermanın FCS'li olup olmamasına bakılmaksızın, sisteamin konsantrasyonları (3-6 mM) birbirleriyle karşılaştırmalı olarak CASA 'da değerlendirildiğinde, sisteamin içermeyen kontrol grubu için ekilibrasyon sonrası motilite %91; grup 3 için %88,8; grup 5 için ise %78,1'dir. Sisteamin gruplarına %15 FCS eklendiğinde bulunan sonuçlar ise grup 2 için %88,3, grup 4 için %93,1, grup 6 için %81,6 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak ekilibrasyon sonrası motilite değerleri grup 4 lehine olmak üzere $p<0,5$ düzeyinde istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Grupların progresif motiliteleri değerlendirildiğinde ise yine en yüksek değer %53 ile 3 mM sisteamin ve %15 FCS içeren grup 4 de bulunmuş, en düşük değer ise %47,2 ile 6 mM sisteamin içeren grup 5'te bulunmuştur. Tüm gruplar arasında ekilibrasyon sonrası progresif motiliteler değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiki bir önem saptanmamıştır. Aynı grupların eritme sonrası sperma motilitelerini değerlendirdiğimizde ise en yüksek motilite grup 3'de %76,6 sonrasında grup 2 de %67,5, en düşük olarak da grup 6 da %53,0 bulunmuş ve aralarında istatistiksel bir fark bulunmamıştır (Tablo 4-4 ve 4-5).

Tablo 4-4: Ekilibrasyon sonrası 5 ˚C'de bekletilen spermaların CASA değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

	SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLER								
GRUP NO.	TOT.MOT.(%)	PROG.MOT.(%)	VAP (µm/sn)	VSL (µm/sn)	VCL (µm/sn)	ALH(µm/sn)	BCF (Hz)	STR (%)	LİN (%)
GRUP 1	91.0^{ab} ±2,3	51,9 ±3,7	155,02±4,49	120,96±5,51	259,53±9,29	8,66±0,35	31,92±1,89	76,70±2,28	48,60±2,42
GRUP 2	88,3^{abc}±2,7	51,3 ±3,6	145,26±3,19	117,70±4,43	236,02±8,79	7,97±0,50	31,96±2,49	79,90±2,11	52,80±3,01
GRUP 3	88,8^{abc}±3,8	48,1 ±2,6	148,73±5,27	114,58±4,64	253,07±10,37	8,43±0,42	31,66±1,80	76,20±1,23	47,40±1,73
GRUP 4	93,1^{a} ±1,1	53 ±3,7	141,90±7,06	111,75±6,18	233,62±13,58	7,89±0,36	31,82±1,65	77,50±1,75	49,80±2,77
GRUP 5	78,1^{c} ±4,1	47,2 ±3,6	135,30±10,42	109,04±7,28	225,25±19,28	7,68±0,60	33,32±1,71	80,40±1,91	51,80±2,68
GRUP 6	81,6^{bc} ±5,6	49 ±3,1	135,82±8,50	110,33±6,25	221,59±18,10	7,44±0,59	34,72±1,53	80,90±2,44	53,30±3,50

Sonuçlar, ortalama değer ± standart hata (mean±SE) şeklinde gösterilmiştir.

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasında (a,b,c) istatistiki fark bulunmaktadır ($p<0,05$).

Tablo 4-5: Eritme sonrası sperma CASA değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

	SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLER								
GRUP NO.	TOT.MOT.(%)	PROG.MOT.(%)	VAP (µm/sn)	VSL (µm/sn)	VCL (µm/sn)	ALH (µm/sn)	BCF (Hz)	STR (%)	LİN (%)
GRUP 1	67,40±4,40	27,00±3,09	107,96±4,03	84,54±4,91	193,28±5,32	8,50±0,19	31,91±1,23	75,00±1,77	43,90±1,57
GRUP 2	67,50±3,81	30,90±1,74	101,82±2,21	82,02±2,33	174,89±4,95	7,51±0,26	33,51±0,71	76,70±1,26	46,50±1,26
GRUP 3	76,60±3,77	31,90±2,33	105,63±4,41	83,54±4,49	179,63±5,69	7,73±0,19	31,01±1,27	76,10±1,66	46,40±2,01
GRUP 4	61,20±4,74	27,30±2,72	93,43±3,96	76,79±2,96	157,42±7,85	6,94±0,26	33,15±0,63	79,70±1,29	49,60±1,43
GRUP 5	64,40±6,73	32,10±4,07	103,76±4,17	84,97±4,00	173,12±7,02	7,04±0,38	34,44±1,28	79,20±2,09	50,00±2,28
GRUP 6	53,00±7,64	24,80±3,42	96,83±4,39	82,00±4,70	156,10±6,70	6,26±0,36	36,87±1,11	81,10±2,29	52,50±3,01

Sonuçlar, ortalama değer ± standart hata (mean±SE) şeklinde gösterilmiştir ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA

Kriyoprezervasyon işlemi, spermatozoonları serbest radikallerin saldırısı gibi bir dizi fiziksel ve kimyasal travmaya maruz bırakır. Bu travma ise spematozoonun canlılığını ve üreme özelliklerini düşürmektedir (Aitken ve ark., 2012). Donma işlemi süresince spermatozoonun üreme kabiliyetini tehlikeye atan birincil faktör, plazma membran hasarıdır ve spermatozoon membranı, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve sperm-oosit etkileşimleri gibi farklı biyolojik eylemler için gerekli bir yapıdır (Gadella ve Luna, 2014).

Günümüzde araştırmacılar koç spermasının motilite, morfoloji, fertilite gibi parametrelerinin iyileştirilmesi için özellikle sperma sulandırıcılarında farklı maddeler (protein, vitamin, antioksidan, kriyoprotektan maddeler) kullanarak deneysel çalışmalar yapmaktadırlar (Ak ve ark., 2010, Ceylan ve ark., 2013).

Birçok memeli türünde, in vitro ve in vivo embriyo üretimi ile hayvanların genetik seleksiyonlarının iyileştirilmesinde suni tohumlama büyük bir önem arz etmektedir. Ancak dondurulmuş sperma ile yapılan suni tohumlama uygulamalarında taze spermaya göre elde edilen gebelik oranları %30-50 seviyelerindedir. Canlı türlerinin farklı membran özellikleri, kriyoprezervasyon işlemine farklı yanıtlar verilmesine neden olmaktadır. Küçük ruminantlardan koç ve teke spermasının membran yapısı, boğa, insan, at spermasına göre çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) zengin olması ve protein yapısı nedeniyle dondurmaya karşı oldukça hassastır (Watson, 1995). Dondurma ve çözdürme işlemleri sonucunda spermanın enzimatik aktivitesinde ve hücre bütünlüğünde değişen miktarlarda oluşan ROT ve oksidatif stres, dönüşümsüz hasarlar meydana getirmektedir (Najafi ve ark., 2014). Oksidatif stres spermatozoonun sadece akrozom membranında değil, özellikle DNA yapısında ve boyun bölgesindeki mitokondriyal kılıfta hasarlara neden olarak motilite ve fertilite yeteneğini oldukça düşürmektedir (Bailey ve ark., 2000; Salamon ve Maxwell 2000; Nur, 2010).

Son yıllarda seminal plazmada yüksek konsantrasyonlarda doğal olarak bulunan taurin, hipotaurin, inositol, prolin, SOD, katalaz, BHT, desferal, askorbik asit, alfa-tokoferol gibi maddelerin antioksidan özelliklerinden faydalanma yoluna gidilmiştir. Araştırmacılar bu amaçla antioksidanları sperma sulandırıcılarına katarak spermaların

kısa ve uzun süreli muhafazasında kullanmışlar ve başarılı sonuçlar almışlardır (Alvarez ve ark., 1987; Ashworth ve ark.,1994)

Araştırıcılar (Ola ve ark., 1989; Tekin, 2000) sulandırıcılarına antioksidan maddeler eklenerek dondurulan koç spermalarının, eritme sonrasında motiliteyi artırdığını, plazma membran hasarı ve akrozom bozukluklarında azalmalar görüldüğünü belirtmişlerdir. Ancak elde edilen sonuçlar istenilen düzeyde olmadığı için farklı düşük moleküllü thiol bileşiklerinden sistin, sisteamin, sistein, beta merkaptoetanol (βME) vb. olan antioksidan maddeler sperma dondurmada ve in vitro embriyo üretim çalışmalarında kullanmaktadır (Partyka ve ark., 2012; Silva ve ark., 2012). Sisteamin (SH-CH2-CH2-NH2-b-merkaptoetilamin), koenzim A katabolik yolunun bir parçası olarak hayvanlarda üretilen bir indirgeyici aminotioldür (Pisoni ve ark., 1995). Sisteaminin, membran dengeleyici ve antioksidan özellikleri olan taurinin ana kaynağı olduğu bildirilmiştir (Dominy ve ark., 2007). Son yıllarda tercih edilen sisteaminin, embriyo üretiminde koyun ve sığır oositlerinin olgunlaşma medyumuna ilavesinin pozitif bir etkisi olmadığı belirtilirken (Enginler ve ark., 2016; Sandal ve Özdaş, 2015), domuzda (Kobayashi ve ark., 2006), keçide (Rodríguez-González, 2003), sığırda (De Matos ve ark, 2002), manda (Gasparrini ve ark.,2000) da embriyo üretiminde olumlu sonuçlar verdiğini bilim insanları bildirmişlerdir. Dondurmanın spermatozoon üzerine bahsedilen bu zararlı etkilerini çözmek için araştırıcılar halen çalışmalara devam etmektedirler.

Sığır serum albümininin (BSA) koç spermasında donma-çözülme işlemi sırasında sperm hareketliliğini, plazma zarı bütünlüğünü ve akrozomu soğuk şokuna karşı geliştirdiği bilinmektedir (Bucak ve Tekin, 2007). Ayrıca ineklerde döllenmeden önce, spermanın üreme kanalında hayatta kalmasına yardımcı olabilmektedir (Chen ve ark., 1993). Memeli sperm kapasitasyonu için ortamın önemli bileşenlerinden biri olan BSA, kolesterolü spermatozoonun plazma zarından çıkarıp, kapasitasyonu destekleyici bir rol oynamaktadır (Suzuki ve Yanagimachi, 1989; Visconti ve Kopf, 1998). Sığır serum albumini (FCS), hayvansal hücrelerin kültür medyumlarında kullanılan başlıca bileşenlerinden biridir. Kültürü yapılmış hücreleri koruyan birçok proteini içerir (Hayman, 1985). Pollard ve ark. 1995' te domuzlarda yaptıkları bir çalışmada BSA içeren basit bir kültür ortamının, zigottan blastosist aşamasına kadar in vitro gelişmesi için yeterli olabileceği, ancak daha fazla gelişme ve yumurtadan çıkma (hatching) için domuz blastosistlerinin FCS varlığına ihtiyaç duyduğunu bildirmişlerdir.

Bovine serum albümin (BSA) ve fötal calf serum (FCS), oositlerin döllenmesi ve in vitro olgunlaşması amacıyla protein takviyesi olarak değerlendirilmektedir. Laboratuarlar arasında değişkenlik görülmekle birlikte oosit olgunlaşması için kan serumu (FCS) takviyesinin üstün bir ortam sağladığı, BSA'nın ise hücre çoğalması ve desteklemesini sağladığı bildirilmiştir (Kane, 1983, Leibfried-Rutledge ve ark., 1986). Araştırmacılar antioksidan maddelerin yanı sıra protein kaynaklı olan BSA ve FCS'nin kriyoprotektif özellikleri olduğunu ve hatta sulandırıcılarda antioksidan maddeler gibi etki göstererek spermatozoonların hücre membran bütünlüğünü ısıya karşı ve lipit peroksidasyona karşı koruduklarını bildirmişlerdir (Uysal ve Bucak, 2007; Lewis ve ark., 1997, Sarıözkan ve ark., 2013). BSA'nın sperma dondurulması işleminde pozitif etkileri olduğu araştırmacılar tarafından bildirilse de, FCS ile yapılmış araştırmaların yetersizliği çalışmamızda buna yönelmemize teşvik etmiştir.

Bu tez çalışmasında FCS'li ve FCS'siz Tris bazlı sulandırma ve dondurma medyumuna farklı konsantrasyonlarda (3 mM ve 6 mM) sisteamin eklenmesinin koç spermasının ekilibrasyon ve donma sonrası spermatolojik özelliklerine etkisi incelenmiştir.

Ekilibrasyon sonrası yapılan subjektif motilite muayenesi sonucu gruplar arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir (Tablo 4-1). FCS ve sisteaminli gruplarda ekilibrasyon sonrası CASA motilite değerleri (Tablo 4-4) sırasıyla kontrol grubu %91, grup 2 %88,3; grup 3 %88,8; grup 4 %93,1; grup 5 %78,1; grup 6 %81,6 bulunmuştur. Sonuçlar 3 mM sisteamin ve %15 FCS içeren 4. grup lehine olmak üzere, motilite değerleri diğer gruplara göre istatistiki olarak $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu sonuçlar soğutma ve ekilibrasyon aşamasında 3mM sisteamin'in 6 mM' a göre spermanın motilitesi üzerine pozitif yönde etki gösterdiğini, FCS'nin ise sisteaminle birlikte sinerjik etki gösterdiğini düşündürmektedir. Elde edilen bu veriler, Ezgi Ertürk'ün (2017) teke spermasının dondurulması çalışmasında 5 ve 10 mM sisteamin ile aldığı sonuçlar (sırasıyla %73,21 ve %58,93) ile karşılaştırıldığında yüksek konsantrasyonun ekilibrasyon sonrası sperma motilite değerlerinde azaltıcı etkiye sahip olduğu sonucuyla paraleldir. Ayrıca ekilibrasyon süresince 6mM sisteamin grubuna FCS ilave edildiğinde (grup 6), daha yüksek konsantrasyonun negatif etkisinin serum ilavesi ile tolare edildiğini ve grup 1,2,3 ile aralarında bir fark olmadığı saptanmıştır.

Akalın ve ark., 2016' da yaptıkları çalışmada farklı oranlarda sisteamin ekledikleri (kontrol grubu, 0,5, 1 ve 2 mM sisteamin) sulandırıcılar ile +5 ^{o}C de sakladıkları merinos ırkı koçların spermalarını 0. ve 24. saatlerde incelemişler ve sırasıyla 0. saatte %84,1, %86,6, %87,5, %87,5; 24. saatte ise %79,1, %82,5, %80,8, %82,5 bulmuşlardır. İstatistiksel olarak fark görülmeyen bu çalışma ile bizim ekilibrasyon sonrası motilite parametrelerimiz arasında paralellik bulunmuştur (Tablo 4-4).

Swami ve ark. (2017), boğalarda yaptıkları çalışmada farklı dozlarda sisteamin ekledikleri sulandırıcılarda dondurdukları spermayı eritip membran bütünlüğünü ölçmek için HOST tekniğini uygulamışlar, membran bütünlüğünün 5 mM sisteamin grubunda (%27,88) kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde düştüğünü bildirmişlerdir. Çalışmamızda HOST değerlendirmesi sonucunda sisteamin içeren gruplar arasında istatistiki bir fark bulunmadığı fakat 6 mM sisteamin içeren grubun 3 mM içeren gruba göre daha düşük canlı oranına sahip olduğuna yönelik bir eğim olduğu görülmüştür (Tablo 4-2). Anormal spermatozoa oranının sisteamin konsantrasyonu arttıkça yükseldiği, en yüksek değerin 2,5 mM (%23,22) ve 5 mM sisteamin grubunda (%23,38) olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda benzer şekilde, total anormal spermatozoa oranı sadece 3 mM sisteamin eklenmiş grupta %31,3 ve 6 mM sisteamin eklenmiş grupta %33,4 olarak bulunmuştur. Çalışmamız sonucunda çıkan anormal spermatozoa değerleri biraz daha yüksek seyretmekle beraber Swami ve ark. ile paralellik göstermektedir. Cirit ve ark., (2013) iyodiksanol, trehaloz ve sisteamin ekledikleri gruplardan elde ettikleri HOST sonuçlarında en yüksek sonucu trehaloz gruplarında elde etmiş, sisteamin gruplarında (Cy %38,8, OpCy %43,8, TrCy %42,2, OpTrCy1 %44,9, OpTrCy %44,0) istatistiki bir fark bildirmemişlerdir. Bizim çalışmamızda da istatistiki bir fark olmaması yönünden sonuçlar paralellik göstermektedir.

Spermanın dondurulma işlemleri sırasında gelişen ani ısı değişimleri, spermada biyokimyasal ve yapısal bozukluklar meydana getirmekte bunun sonucu olarak da hareketlilik ve canlılık oranlarında düşüşler gözlenmektedir (Aitken ve ark., 2012). Bu bozuklukları önlemek amacıyla araştırmacılar çeşitli antioksidanları kullanmışlardır. Bucak ve ark., (2007) koç sperması kriyoprezervasyonunda katkı maddesi olarak taurini ve sisteamini kullanmış, eritme sonrası sperma hareketlerini incelemiştir. Kontrol grubu, 5mM sisteamin,10 mM sisteamin, 25 mM taurin ve 50 mM taurin'in sonuçlarını sırasıyla; %47,5, %73, %63, %63 ve %56 bulmuşlardır. Sisteaminin taurine kıyasla daha iyi

sonuçlar verdiği görülmüştür. Tez çalışmamızda ise kontrol, 3 ve 6 mM sisteamin kullanılmış, sırasıyla %67,40; %76,60 ve %64,40 olarak bulunmuştur. Bu motilite sonuçları farklı ırk koçlarda ve farklı dozlarda sisteamin içeren sulandırıcılar ile bulunmuş olsa da benzer bulunmuştur. Aynı araştırıcılar sisteamin gruplarında eritme sonrası motilite oranlarında istatistiksel bir fark saptamamışlardır. Buna paralel olarak bu tez çalışmasında da sisteamin grupları arasında eritme sonrasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır (Tablo 4-5). Aynı araştırmacıların 2009 yılında teke sperması üzerine yaptıkları bir araştırmada sisteaminin sperm motilitesini arttırdığını bildirmişler. Buna paralel olarak Sarıözkan ve ark.,(2015); 2,5 mM sisteaminin boğa spermasının motilite, morfoloji, ve membran bütünlüğünde daha iyi sonuçlar gözlemlemişlerdir. Swami ve ark., 2017 ve Büyükleblebici ve ark., (2016), yaptıkları çalışmada boğa spermasında 4 mM sisteaminin eritme sonrası progresif ve total motilite de azalmaya sebep olduğunu bildirmektedirler.

Najafi ve ark., (2014) koç spermasının dondurulmasında sisteamini 2, 4, 6, 8 mM yoğunluklarında denemişler ve eritme sonrası motiliteleri sırasıyla %53,7, %54,7, %59,5, %49,2 bulmuşlar ve 6 mM sisteamin grubunun lehine olmak üzere $p<0,05$ düzeyinde önemli olduğunu tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise 3 ve 6 mM sisteamin denendiği, grup 3 de eritme sonrası motilite %76,6 bulunurken, grup 5 de %64,4 bulunmuştur. Bulunan bu sonuçlar arasında istitistiki bir önem saptanmazken Najafi'nin sonuçlarına göre yüzdesel olarak yüksek bir fark bulunmuştur ve 3 mM sisteaminin 6 mM sisteamine göre bu çalışma için %12'lik, Najafi ve ark.'ın çalışmasına göre %17,1 oranında yüzdesel bir fark vardır.

Cirit ve ark., (2013) dorset koçlarında tris sulandırıcısı ile dondurdukları spermada 5mM sisteamin kullanmışlar ve eritme sonrası total motilite değerlerini %24,4 bulurken, kontrol grubunda %26,8 bulmuşlar ve aralarında istatistiki bir önem saptamamışlardır. Tris bazlı sulandırıcı kullanılan bu tez çalışmasında grup 3 (3 mM Sisteamin) ve grup 5 (6 mM Sisteamin) arasında istatistiki bir fark bulunmamış ve motilite değerleri sırasıyla %76,6 ve %64,4 bulunmuştur. Bizim bulduğumuz sonuçlar Cirit ve ark.'ın buldukları sonuçlara göre daha yüksek olup sisteaminin koç sperması motilitesini pozitif yönde etkilediğini göstermektedir. Progresif motilitelere baktığımızda ise çalışma da gruplar arasında (Tablo 4-5) herhangi bir istatistiki bir fark görülmemiş ve bu sonuçlar Güngör

ve ark. (2016) ile Najafi ve ark. (2014)'nın sisteamin gruplarında progresif motiliteyi etkilemediği sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Mata-Campuzano ve ark., 2015 yılında yaptığı araştırmada koç spermasını farklı sulandırıcı (Tes-Tris-Fruktoz ile %4 gliserol, %10 yumurta sarısı, %3,5 soya fasulyesi lesitini) ve antioksidanlar (glutatyon, troloks, crosin ve sisteamin) ile dondurmuş, sonuç olarak 1 mM kullandığı sisteaminin motiliteyi düşürdüğünü bunun yanısıra yumurta sarısı ile hazırlanan sulandırıcının sperma canlılığını arttırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmadan farklı olarak yumurta sarısı ile hazırlanan sulandırıcılarda sisteamin ve FCS denediğimiz tez çalışmasında düşük dozlarda (3 mM) sisteaminin spermanın motilite, anormal spermatozoon ve membran bütünlüğünde istatistiksel fark yaratacak bir azalışa sebep olmadığı gözlemlenmiştir (Tablo 4-2; Tablo 4-3; Tablo 4-5).

Sarıözkan ve ark., (2013) yılında tavşanlarda yaptıkları bir çalışma da sulandırıcıya %10 FCS ve 5 mg/ml BSA eklemişler ve bunun 5ºC'de farklı saatlerde spermaya olan etkilerini araştırmışlardır. Yaptıkları araştırmada 5°C'de motilite, anormal spermatozoa ve HOST sonucunda kontrol, BSA ve FCS gruplarında istatistiki bir fark bulmamışlardır. Tez çalışmasında kontrol grubu ve %15 FCS eklenmiş gruplar arasında da ekilibrasyon sonrası HOST sonucunda (5°C de 0. saat) istatistiki bir fark görülmemiştir. Eritme sonrasında ise %15 FCS+ 6 mM sisteamin grubunda en düşük değerler görülmüş (motilite %53,00±7,64; HOST %42,10±4,6) fakat istatistiki önem sınırında olduğundan fark göz ardı edilmiştir (Tablo 4-2).

Bucak ve ark., (2007) koç spermasında yaptıkları çalışmada 5 ve 10 mM sisteamin ekledikleri gruplarda HOST sonuçlarında ve anormal spermatozoa oranlarında istatistiki bir fark görülmediğini bildirmişlerdir. Bunun yanında membran bütünlüğünün 5 mM grubunda (%50,4) 10 mM grubuna (%38,4) oranla daha fazla zarar gördüğü görülmüştür. Çalışmamızda HOST sonuçları bununla paralellik göstermekle birlikte 3 mM grubunda %55,6 iken, 6 mM grubunda %51,6 olduğu görülmüş ayrıca anormal spermatozoa oranında bir fark bulunmamıştır (Tablo 4-2, Tablo 4-3).

Güngör ve ark., 2016 yılında boğalarda yaptıkları bir çalışmada sisteamin ekledikleri grup ile kontrol grubunu eritme sonrası motilite ve CASA değerleri (VCL hariç) açısından kıyaslamışlar ve istatistiki bir fark bulamamışlardır. VCL değerleri de kontrol grubuna oranla yüksek olduğu görülmüştür. Mata-Campuzano ve ark. (2015)

sisteamin ekledikleri gruplarda VCL ve VSL'nin azaldığını, doğrusallık ve yalpalamanın sisteaminle işlem görmüş numunelerde eritme sonrası arttığını ($p < 0.001$) bildirmişlerdir. Tuncer ve ark., 2014 yılında kriyoprotektan özellikleri araştırdıkları bir çalışmada 5 mM sisteamini kullanmış ve VAP, VSL, VCL değerlerinde $p<0.001$; ALH, BCF değerlerinde $p<0.01$; STR, LIN değerleri arasında $p<0.05$ oranında istatistik fark bulmuştur. Bu araştırmalardan farklı olarak, tez çalışmasında motilite ve CASA değerleri (VAP, VSL, VCL , ALH, BCF) bakımından istatistiki bir fark bulunmamıştır (Tablo 4.5).

Sarıözkan ve ark.,(2015) montofon boğalarında suni vajenle alınmış spermalar ile yaptığı çalışmada sisteamin, hyaluronan ve fetuinin etkilerini araştırmış ve bunun sonucunda CASA motilite ve CASA total motilite sonuçlarını en yüksek 2,5 mM sisteaminde (%55,3-%69,1), sonrasında fetuinin 10 mg ml-1 dozunda (%52,6-%64,3) bulmuşlardır. Sisteaminin 2,5 ve 7,5 mM dozlarında kullanıldığı gruplarda motiliteyi sırasıyla %69,1 ve %59,6 bulmuşlar ve bu sonuçlar tez çalışmasında 3 ve 6 mM sisteamin kullanılmış gruplardaki (grup 3 ve 5) motilite değerlerinden (%76,6 ve %64,4) biraz düşük olup, konsantrasyon artışında gözlenen motilite düşüşü sonucuyla paralellik göstermektedir. Yine araştırıcılar gruplar arasında VAP, VSL, VCL,ALH, BCF, STR, LIN değerleri istatistiki bir önem saptamamışlar ve bu sonuçlar da tez çalışmasıyla paralellik göstermektedir. Anormal sperma oranları 2,5 ve 7,5 mM için sırasıyla %13 ile %21,3 olarak bulunmuş ve aralarındaki fark $p < 0.001$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Ducha 2018 yılında, limuzin boğalarında yaptığı araştırmada, sperma sulandırıcısında (CEP sulandırıcısı) BSA ve kan serumu kullanarak etkilerini araştırmıştır. Araştırma sonucunda kan serumunun BSA yerine kullanılabileceğini bildirmiştir. Tez çalışmasında sulandırıcıya yumurta sarısına ek protein kaynağı olarak FCS eklenmiş ve bunun sperma motilitesi (Tablo 4-1, Tablo 4-4 ve Tablo 4-5) ile canlılığına olan (Tablo 4-2) etkileri araştırılmıştır. Kontrol grubu ile %15 FCS ekli grubun karşılaştırılmasında FCS'nin spermaya olumsuz bir etki sağlamadığı ve yumurta sarısı yerine kullanılabileceği öngörülmüştür.

Martins ve ark., (2007) yaptıkları bir ICSI çalışmasında sadece FCS ve FCS+trehaloz ekledikleri medyumlardan elde ettikleri sonuçlarda, yarıklanan oosit sayısı FCS'li medyumda %67, FCS+Trehaloz medyumunda %93, blastosist sayısında ise yine sırasıyla %19 ve %34 sonuçlarını almışlar bu verilere göre FCS + trehalozun daha iyi sonuçlar verdiğini gözlemlemişlerdir. Bu veriler bizim çalışmamızda yalnız FCS katılmış

grup ile FCS + 3 mM sisteamin ile aldığımız sonuçları (total motilite sırasıyla %88,3 ile %93,1 ve progresif motilite sırasıyla %51,3 ile %53,0) desteklemektedir (Tablo 4-4).

Çalışmada FCS eklenmiş gruplardan grup 2, grup 4 ve grup 6'nın eritme sonrası total motilite değerleri sırasıyla %67,50, %61,20, %53,00 bulunmuş (Tablo 4-5) ve aralarında istatistiki bir önem saptanmamıştır. Her ne kadar istatistiki fark bulunmasa da 3mM sisteamine %15 FCS eklendiğinde motilite değerinde %15,4'lük bir azalma, 6 mM grubunda ise %11,4'lük bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar koç spermasının dondurulup eritilmesinde FCS'nin sisteaminle birlikte motilite üzerine antagonist bir etki yaratabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanısıra antioksidan maddelerden 3 mM sisteamin ve %15 FCS birlikte kullanıldığında ekilibrasyon süresince motil olan ve ejakulasyon sonrası hafif hasarlı olarak düşündüğümüz spermatozoonları koruyabilirken, donma sırasında ve eritme sonrasında 3mM ve 6mM sisteamin konsantrasyonuna ve FCS'li olup olmamasına bakılmaksızın, koruyucu ve sinerjik etkiyi gösteremediği ve sadece ejakulasyon anında morfolojik olarak sağlam spermatozoonların donmaya karşı korunabildiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

AGARWAL, A., NALLELLA, K. P., ALLAMANENI, S. S., SAID, T. M. (2004): Role of Antioxidants in Treatment of Male İnfertility: An Overview of The Literature. Reprod. Biomed. Online 8, 616–627.

AGARWAL, A., SHARMA, R.K., SHARMA, R., ASSIDI, M., ABUZENADAH, A.M., ALSHAHRANI, S., DURAIRAJANAYAGAM, D. ve SABANEGH, E. (2014): Characterizing Semen Parametersand Their Association with Reactive Oxygen Species in İnfertile Men. Reprod. Biol. Endocrinol. 12 (33).

AİRES, V.A., HİNSCH, K-D, MUELLER-SCHLOESSER, F., BOGNER, K., MUELLER-SCHLOESSER, S. ve HİNSCH, E. (2003): In Vitro and İn Vivo Comparison of Egg Yolk-Based and Soybean Lecithin-Based Extenders for Cryopreservation of Bovine Semen. Theriogenology, 60:269–279

AISEN, E.G., MEDINA V.H. ve VENTURINO, A. (2002): Cryopreservation and Post-Thawed Fertility of Ram Semen Frozen in Different Trehalose Concentrations. Theriogenology, 57: 1801-1808.

AITKEN, R.J. ve BAKER M. A. (2004): Oxidative Stress and Male Reproductive Biology. Reproduction, Fertility and Development. 16(5):581-8.

AITKEN, R.J., IRVINE, D.S. ve WU, F.C. (1991): Prospective Analysis of Sperm-Oocyte Fusion and Reactive Oxygen Species Generation as Criteria for the Diagnosis of İnfertility. Am. J. Obstet. Gynecol. 164, 542–551.

AITKEN, R.J., JONES, K.T., ROBERTSON ve S.A. (2012): Reactive Oxygen Species and Sperm Function–İn Sickness and in Health. J Androl. 33:1096–106.

AK, K. (2005): Koyunlarda Reprodüksiyon Ve Sun'i Tohumlama. İçinde Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama, İ.K. İleri, K. Ak, S. Pabuccuoğlu, S. Birler, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Ders Notu No: 138, 189-204.

AK, K., CIRIT, Ü., NUR, Z., BACINOĞLU, S., PABUCCUOĞLU, S., ÖZDAŞ, Ö.B. ve BIRLER, S. (2010): Effects of Extender Osmolarity, Cooling Rate, Dilution Rate and Glycerol Addition Time on Post-Thaw Ram Semen Characteristics and Fertilization. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 36 (2), 33-46.

AKALIN, P.P., BUCAK, M.N., GÜNGÖR, Ş., BAŞPINAR, N., ÇOYAN, K., DURSUN, Ş., İLI, P., AKSOY, A., KARAŞÖR, Ö.F., SARIÖZKAN, S. ve YENI, D.(2016):

Influence of Lycopene and Cysteamine on Sperm and Oxidative Stressparameters During Liquid Storage of Ram Semen at 5 °C. Small Rumin.Res. 137, 117–123.

AKYOL, N., ERTEM, T.B., VARIŞLI, Ö. (2019): Investigation of the Effects of Storage Period for Frozen Bull Semen on In Vitro Embryo Production.Kafkas Univ Vet Fak Derg 25 (2): 257-262, DOI: 10.9775/kvfd.2018.20839

AL-GHETAA, H.F.K. (2012): Effect of Environmental High Temperature on the Reproductive Activity of Awassi Ram Lambs. Iraqi Journal of Veterinary Medicine, 36(2):244-253.

ALVAREZ, J.G., TOUCHSTONE, J.C., BLASCO, L. ve STOREY, B.T. (1987): Spontaneous Lipid Peroxidation of Production of Hydrogen Peroxide and Superoxide in Human Spermatozoa. J Androl, 8:338-348.

ALVAREZ, M., TAMAYO-CANUL, J., ANEL, E., BOIXO, J.C., MATA-CAMPUZANO, M., MARTINEZ-PASTOR, F., ANEL, L. ve DE PAZ, P. (2012): Sperm Concentration at Freezing Affects Post-Thaw Quality and Fertility of Ram Semen. Theriogenology, 77: 1111-1118.

AMANN, R.P. ve PICKETT B.W. (1987): Principals of Cryopreservation and A Review of Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. J. Equine Vet. Sci. 7:145-173.

AMIDI, F., FARSHAD, A. ve KHOR, A.K. (2010): Effects of Cholesterol-Loaded Cyclodextrin during Freezing Step of Cryopreservation with TCGY Extender Containing Bovine Serum Albumin on Quality of Goat Spermatozoa. Cryobiology 61, 94–99.

AMIDI, F., PAZHOHAN, A., NASHTAEI, M.S., KHODARAHMIAN, M. ve NEKOONAM, S. (2016): The Role of Antioxidants in Sperm Freezing, A Review, Cell Tissue Bank. Dec; 17(4):745-756.

AN, T.Z., IWAKIRI, M., EDASHIGE, K. ve TAKASHI M. (2000): Factors Affecting the Survival of Frozen Mouse Spermatozoa. Cryobiology, 40: 237-249.

ANAND, T., KUMAR, D., CHAUHAN, M.S., MANIK, R.S. ve PALTA, P. (2008): Cysteamine Supplimentation of İn Vitro Maturation and/or Culturemedia Promote İn Vitro Development of Buffalo (Bubalus Bubalis) Embryos. Reprod. Fertil. Dev. 20, 253–257.

ANDERSON, J. (1945): The Semen of Animals and İts Use For Artificial Insemination. Tech. Comm. Imperial Bureau of Animal Breeding Genetics, Edinburgh.

ANDRABI, S.M.H. (2007): Fundamental Principles of Cryopreservation of Bos taurus and Bos indicus Bull Spermatozoa. Mini review. Int. J. Agri. and Biol. 9:367-369.

ARMAN, C., QUINTANA CASARES, P.I., SANCHEZ PARTIDA, L.G. ve SETCHELL, B.P. (2006): Ram Sperm Motility after Intermittent Scrotal Insulation Evaluated By Manual and Computer-Assisted Methods. Asian Journal of Andrology, 8:411-418.

ASHWORTH, P.J.C., HARRISON, R.A.P., MILLER, N.G., PLUMMER, J.M. ve WATSON, P.J. (1994): Survival of Ram Spermatozoa at High Dilution: Protective Effect of Simple Contituents of Culture Media as Compared with Seminal Plasma. Reprod. Fertil. Develop, 6: 173- 180, 1994.

AYDEMIR, B. ve KARADAĞ SARI, E. (2009): Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri İle İlişkisi. Kocatepe Veterinary Journal. 2(2): 56-60.

BAILEY, J.L., BILODEAU, J.F. ve CORMIER, N. (2000): Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. J Androl. 21 (1):1-7.

BAILEY, J.L., MORRIER, A. ve CORMIER, N. (2003): Semen Cryopreservation: Successes and Persistent Problems İn Farm Species. Canadian Journal of Animal Science 83, 393–401.

BALL, B.A. ve VO, A. (2001): Osmotic Tolerance of Equine Spermatozoa and The Effects of Soluble Cryoprotectants on Equine Sperm Motility, Viability and Mitochondrial Membrane Potential. Journal of Andrology, 22: 1061-1069.

BANKS, S., KING, S.A., IRVINE, D.S. ve SAUNDERS, P.T. (2005): Impact of a Mild Scrotal Heat Stress on DNA İntegrity in Murine Spermatozoa. Reproduction 129:505-514.

BANSAL, A.K. ve BILASPURI, G.S. (2010): İmpacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. Vet Med Int.Sep 7; pii: 686137. doi: 10.4061/2011/686137.

BARAN, A., AK, K., ILERI, I.K. ve SOYLU, M.K.(2004): Effects of Adding Bull Seminal Plasma to Ram Semen Extenders on Post-Thaw Spermatozoa Motility and Morphology. Indian Vet. J. India 81, 780–783.

BARAN, A., TEK, Ç., DEMİR, K., SABUNCU, A. ve ÖZDAŞ, Ö. B. (2011): Intrauterine İnsemination with Cat Semen Frozen with Various Extenders. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 35(5): 311-318

BARAN, A., OZDAS, O.B., SANDAL, A.İ. ve AK, K. (2012): Effects of Skim Milk and Tris Extender on Frozen-Thawed Canine Sperm Morphology. J. Anim. Vet. Adv. 11 (17): 3242-3246.

BARBAS, J. P. ve MASCARENHAS, R. D. (2009): Cryopreservation of Domestic Animal Sperm Cells. Cell Tissue Bank, 10, 49–62.

BARTH, A.D. ve BOWMAN, P.A. (1994): The Sequential Appearance of Sperm Abnormalities after Scrotal İnsulation or Dexamethasone Treatment in Bulls. Canadian Veterinary Journal,34:93- 102.

BAŞTAN, A. (1995): Akkaraman Irkı Koyunlarda Melatonin ve Progestagen Uygulamalarının Reprodüktif Performans Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

BECCAGLIA, M., ANASTASI, P., CHIGIONI, S. ve LUVONI, G.C. (2009): Tris-Lecithin Extender Supplemented With Antioxidant Catalase for Chilling of Canine Semen. Reprod Dom Anim 44 (Suppl. 2), 345–349.

BECKMAN, K.B. ve AMES, B.N. (1998): The Free Radical Theory of Aging Matures. Physiol Rev 78: 547–581.

BERNARDINI, A., HOZBOR, F., SANCHEZ, E., FORNÉS, M.W., ALBERIO, R.H. ve CESARI, A.(2011): Conserved Ram Seminal Plasma Proteins Bind to the Sperm Membrane and Repair Cryopreservation Damage. Theriogenology 76, 436–447.

BERTSCH, S. ve MARKS, F. (1974): Effect of Fetal Calf Serum and Epidermal Growth Factor on DNA Synthesis in Explants of Chick Embryo Epidermis. Nature, 251:517-9.

BORDERIE, V.M., LOPEZ, M., LOMBET, A., CARVAJAL, G.S., CYWINER, C. (1998): Cryopreservation and Culture of Human Corneal Keratocytes.Invest Ophthalmol Vis Sci, 39 (8): 1511-9.

BOUSSEAU, S., BRİLLARD, J.P., MARQUANT-LE GUİENNE, B., GUERİN, B.,CAMUS, A. ve LECHAT, M. (1998): Comparison of Bacteriological Qualities of Various Egg Yolk Sources and the İn Vitro and İn Vivo Fertilizing Potential of Bovine Semen Frozen in Egg Yolk or Lecithin Based Diluents. Theriogenology, 50:699–706.

BROOME, J. D. ve JENG, M.W. (1973): Promotion of Replication in Lymphoid Cells by Specific Thiols and Disulfides İn Vitro. J. Exp. Med. 138:574.

BRUININK, A., TOBLER, U., HALG, M. ve GRUNERT, J. (2004): Effects of Serum and Serum Heatinactivation on Human Bone Derived Osteoblast Progenitor Cells. J Mater Sci Mater Med, 15:497-501.

BUCAK, M.N. ve TEKIN, N. (2007): Kryoprotektanlar ve Gamet Hücrelerinin Dondurulmasında Kryoprotektif Etki. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 54(1):67-72.

BUCAK, M.N., ATESSAHIN, A., VARISLI, O., YUCE, A., TEKIN, N. ve AKCAY, A.(2007): The İnfluence of Trehalose, Taurine, Cysteamine and Hyaluronan on Ram Semen. Microscopic and Oxidative Stress Parameters After Freeze-Thawing Process. Theriogenology 67, 1060–1067.

BUCAK, M.N., TUNCER, P.B., SARIÖZKAN, S. ve ULUTAŞ, P.A. (2009a): Comparison of the Effects of Glutamine and an Amino Acid Solution on Post-Thawed Ram Sperm Parameters, Lipid Peroxidation and Anti-Oxidant Activities. Small Rumin. Res. 81, 13–17.

BUCAK, M.N., TUNCER, P.B., SARIÖZKAN, S., ULUTAŞ, P.A., ÇOYAN, K., BAŞPINAR, N. VE ÖZKALP, B. (2009b): Effects of Hypotaurine, Cysteamine and Aminoacids Solution on Post-Thaw Microscopic and Oxidative Stress Parameters of Angora Goat Semen. Reserch İn Veterinary Science. 87:468-72.

BUCAK, M.N., KESKIN, N., TAŞPINAR, M., ÇOYAN, K., BAŞPINAR, N., CENARIU, M.C., BILGILI, A., ÖZTÜRK, C. ve KURŞUNLU, A.N. (2013): Raffinose and Hypotaurine İmprove the Post Thawed Merinos Ram Sperm Parameters. Cryobiology 67, 34–39.

BUDWORTH, P.R., AMANN, R.P. ve CHAPMAN, P.L. (1988). Relationships between Computerized Measurements of Motion of Frozen Thawed Bull Spermatozoa and Fertility. J. Androl., 9: 41-54.

BÜYÜKLEBLEBICI, O., BÜYÜKLEBLEBICI, S., TAŞDEMIR, U. ve TUNCER, P. B. (2016): The Effects of Different Antioxidants on Post-thaw Microscopic and Oxidative Stress Parameters in the Cryopreservation of Brown-Swiss Bull Semen. Kafkas Univ Vet Fak Derg 22 (1): 101-107.

CAMARA, D.R., SILVA, S.V., ALMEIDA, F.C., NUNES, J.N. ve GUERRA, M.M.P. (2011): Effects of Antioxidants and Duration of Pre-Freezing Equilibration on Frozen-Thawed Ram Semen. Theriogenology 76, 342-350.

CAMERON, C.D. (1977): Semen Collection and Evaluation in the Ram: The Effect Method of Stimulation on Response to Electro-Ejaculation. Aust. Vet. J. 58: 380-383.

CARDEN, D. L. ve GRANGER, D. N. (2000): Phatophsiology of İschemia-Reperfusion İnjury. J. Pathol. 190: 255-66.

CEYLAN, A., AKSOY, M., SERIN, İ., KÜÇÜK, N., UÇAN, U., AHMED, E. ve NASEER, Z. (2013): Farklı Antioksidanlarla Kısa Süreli Saklanılan Kıvırcık Koç Spermasının In Vitro ve In Vivo Değerlendirilmesi. Animal Health Prod and Hyg. 2(2): 216 - 220.

CHAPSKY, L. ve RUBINSKY, B. (1997): Kinetics of Antifreeze Protein-Induced Ice Growth Inhibition. FEBS Lett,412:241–244.

CHEN, C.H. ve HIRSCH J.G. (1972): The Effect of Mercaptoethanol and of Peritoneal Macrophages on the Antibody-Forming Capacity of Nonadherent Mouse Spleen Cells İn Vitro. J. Exp. Med. 136:604.

CHEN, Y., FOOTE, R.H. ve BROCKETT, C.C. (1993): Effect of Sucrose, Trehalose, Hypotaurine, Taurine and Blood Serum on Survival of Frozen Bull Sperm. Cryobiology. Aug. 30(4):423-31.

CIRIT, Ü., BAĞIŞ, H., DEMIR, K., AĞCA, C., PABUCCUOĞLU, S., VARIŞLI, Ö., CLIFFORD- RATHERT, C. ve AĞCA, Y. (2013): Comparison of Cryoprotective Effects of İodixanol, Trehalose and Cysteamine on Ram Semen. Animal Reproduction Science, 139:38-44.

CLICK, R. E., BENCK, L. ve ALTER, B. J. (1972): Enhancement of Antibody Synthesis İn Vitro by Mercaptoethanol. Cell Imrnunol. 3:156.

COCUZZA, M., SIKKA, S.C., ATHAYDE, K.S. ve AGARWAL, A. (2007): Clinical Relevance of Oxidative Stress and Sperm Chromatin Damage in Male İnfertility: An evidence Based Analysis. International Braz J Urol Vol.33 (5): 603-621.

COLOMA, M.A., TOLEDANO-DÍAZ, A., CASTAÑO, C., VELÁZQUEZ, R., GÓMEZ-BRUNET, A., LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. ve SANTIAGO-MORENO, J. (2011): Seasonal Variation in Reproductive Physiological Status in Theiberian İbex (Capra Pyrenaica) and İts Relationship with Sperm Freezability.Theriogenology 76, 1695–1705.

COMMONER, B., TOWNSEND, J. ve PAKE, G.E. (1954): Free Radicals İn Biological Materials. Nature 174: 689–691.

CSEH S., FAIGL, V. ve AMIRIDIS, G.S. (2012): Semen Processing and Artificial Insemination in Health Management of Small Ruminants. Anim. Reprod. Sci.,130: 187-192.

ÇOYAN, K., ATAMAN, M.B., KAYA, A. ve KARACA, F. (2002):Evcil Hayvanlarda Dölerme ve Suni Tohumlama. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi.

CUPPS, T. P. (1991):Semen Production and Collection. Reproduction İn Domestic Animals (Ed. T.P. Cupps). Academic Press, Inc., California, 252-255.

D'ALLESSANDRO, A.G.D., MARTEMUCCI, G., COLLANNA, M.A. ve BELLINI, A. (2001): Post Thaw Survival of Ram Spermatozoon and Fertility After İnsemination as Affected by Prefreezing Sperm Concentration and Extender Composition. Theriogenology, 55, 1159-1170.

DARIN-BENNETT, A. ve WHITE, I.G. (1977): Influence of the Cholesterol Content of Mammalian Spermatozoa on Susceptibility to Cold-Shock. Cryobiology 14, 466–470.

DE LAMIRANDE, E., JIANG, H., ZINI, A., KODAMA, H. ve GAGNON, C. (1997): Reactive Oxygen Species and Sperm Physiology. Rev Repord. 2, 48–54.

DE MATOS, D.G., FURNUS, C.C., MOSES, D.F., MARTINEZ, A.G., MATKOVIC, M. (1996): Stimulation of GSH Synthesis of İn Vitro Matured Bovine Oocytes and İts Effect on Embryo Development and Freezability. Mol. Reprod. Dev. 54, 451–457.

DE MATOS, D.G., HERRERA, C., CORTVRINDT, R., SMITZ, J., VAN SOOM, A. ve NOGUEIRA, D. (2002): Cysteamine Supplementation During İn Vitro maturation And Embryo Culture: A Useful Tool For İncreasing the efficiency of Bovine İn Vitro Embryo Production. Mol. Reprod. Dev.62, 203–209.

DELEUZE, S. ve GAUDET, G. (2010): Cysteamin Supplemantation of İn Vitro Maturation Media: A Review. Reproduction İn Domestic Animals, 45, 476-482.

DURAN, N., YARKIN, F. ve ALLAHVERDİYEV, A.M. (2001): Çeşitli Dondurma Yöntemlerinin Hep-2 ve Tavşan Böbrek Hücrelerinin Kriyoprezervasyonunda Hücre Canlılığına Etkisi. Türk Hij Den Biyol Derg. Cilt 58, No 2, S: 53 – 60.

DEMIRCI, E. (2002): Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. F Ü Vet Fak Ders Teksiri. No: 53 Elazığ.

DEVRIES, A.L. ve WOHLSCHLAG, D.E. (1969): Freezing resistance in some Antarctic fishes. Science, 163:1074–5.

DOĞAN, A. (2010): Veteriner Hekimler İçin Farmakoloji. Ders Notları. Kars.

DOĞAN, A., AKSU, P., ERDAĞ, D., BAYEZID, M., DOĞAN, E. ve ÖZCAN, K. (2013): Farelerde 3- Metilkolantren İle İndüklenen Fibrosarkoma Üzerine Sisteaminin Etkileri. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg. 19(1):7-12.

DOMÍNGUEZ, M.P., FALCINELLI, A., HOZBOR, F., SÁNCHEZ, E., CESARI, A. ve ALBERIO, R.H. (2008): Seasonal Variations in the Composition of Ram Seminal Plasma and İts Effect on Frozen-Thawed Ram Sperm. Theriogenology 69, 564–573.

DOMINY, J.E. JR., SIMMONS, C.R., HIRSCHBERGER, L.L., HWANG, J., COLOSO, R.M. ve STIPANUK, M.H. (2007): Discovery and Characterization of A Second Mammalian Thiol Dioxygenase: Cysteamine Dioxygenase. J Biol Chem. Aug 31; 282(35):25189-98.

DOVENSKI, T., TROJACANEC, P., PETKOV, V., POPOVSKA-PERCINIC, F., KOCOSKI, L. ve GRIZELJ, J. (2012): Laparoscopy-Promising Tool for Improvement of Reproductive Efficiency of Small Ruminants. Macedon Vet Rev. 35 (1):5-11.

DOWLING, D.K ve SIMMONS, L.W. (2008): Reactive Oxygen Species as Universal Constraintsin Life-History Evolution, R. Soc. Lond. Biol. Sci. 276, 1737-1745.

DUCHA, N. (2018): The Test about Blood Serum Capabilities in Maintaining the Quality of Bull Spermatozoa during Storage in Cep Diluent at Refrigerator Temperature. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 130,012043. doi :10.1088/1755-1315/130/1/012043

DZIUK, P.J., GRAHAM, E.F., DONKER, J.D., MARION, G.B. ve PETERSEN, W.E. (1954). Some Observations in Collection of Semen from Bulls, Goats, Boars and Rams by Electrical Stimulation. Vet.Med. 49:455-458.

EKICI, A., BARAN, A., YAMANER, G., ÖZDAŞ, Ö.B., SANDAL, A.İ., GÜVEN, E. ve BALTACI, M.A. (2012): Effects of Different Doses of Taurine in the Glucose-Based Extender During Cryopreservation of Rainbow Trout (Oncorhynchus Mykiss) Semen, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 26:4, 3113-3115.

EL-ALAMY, M.A. ve FOOTE, R.H. (2001): Freezaability of Spermatozoon from Finn and Dorset Rams in Multiple Extenders. Animal Reproduction Science, 65,245-254.

ELDER, K. ve DALE, B. (2000): In Vitro Fertilization. 2nd Ed. Cambridge University Press, Cambridge (UK), 22.

EL-HAJJ GHAOUI, R., THOMSON, P.C., LEAHY, T., EVANS, G. ve MAXWELL, W.M.C. (2007): Autologous Whole Ram Seminal Plasma and İts Vesicle-Free Fraction İmprove Motility Characteristics and Membrane Status But Not İn Vivo

Fertility of Frozen-Thawed Ram Spermatozoa. Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg. 42, 541–549.

EMSEN, E. ve KOŞUM, N. (2009): Koyunculukta Yeni Üretim Teknikleri, U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt 23, Sayı 2, 33-42.

ENGINLER, S.Ö., ÖZDAŞ, Ö.B., SANDAL, A.İ., ARICI, R., ERTÜRK, E., BARAN, A., TOYDEMIR T.F.S., TEK, Ç., KILIÇARSLAN, M.R. ve AK, K. (2016): "The Effect of Cysteamine and Oviductal Cells in Different Culture Media on the Development of Sheep Embryos. ", Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Vol.22, pp.139-145.

ER, M. (2013): Dondurulup- Çözdürülen Tavşan Spermi Üzerine Metionin, Sisteamin, Ellajik Asit ve Arjininin Etkileri.Uzmanlık Tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Histoloji- Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Hatay.

ERTÜRK E. (2017): Sisteamin'in Teke Spermasının Dondurulması Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, İstanbul.

EVANS, G. ve MAXWELL, W.M.C.(1987): Salamon's Artificial İnseminations of Sheep and Goats. Butterworts Pty Limited, Australia. 19, 91-141.

EVANS, R.C., BAUER, D.H., BANDEMER, S.L., VAGHELF, S.B. ve FLEGAL, C.J. (1973): Structure of Egg Yolk Very Low Density Lipoprotein. Polydispersity of the Very Low Density of Lipoprotein and the Role of Lipovitellenin in the Structure. Arch Biochem Biophys, 154:493-500.

FEHRENBACH, E. ve NORTHOFF, H. (2001): Free Radicals, Exercise, Apoptosis and Heat Shock Proteins, Exerc Immunol Rev. 7:66-89.

FILHO, D.W., TORRES, M.A., BORDIN, A.L., CREZCYNSKI-PASA, T.B. ve BOVERIS, A. (2004): Spermatic Cord Torsion, Reactive Oxygen and Nitrogen Species and İschemia-Reperfusion İnjury. Molecular Aspects of Medicine, 25:199–210.

FOOTE, R. H. (1962): Catalase Content of Rabbit, Ram, Bull and Boar Semen. J. Anim. Sci. 21, 966–968.

FOOTE, R. H. (1999): Artificial İnsemination from İts Origins up to Today. In: V. Russo, S. Dall 'Olio, and L. Fontanesi (Ed.) Proc. of the Spallanzani Int. Symp., Reggio Emilia, Italy. Pp 23–67.

FOOTE, R.H. (2002): The History of Artificial İnsemination: Selected Notes and Notables. J. Anim. Sci. 80, 1–10.

FOROUZANFAR, M., SHARAFI, M., HOSSEINI, S.M., OSTADHOSSEINI, S., HAJIAN, M., HOSSEINI, L., ABEDI, P., NILI, N., RAHMANI, H.R. ve NASR-ESFAHANI, M.H. (2010): In Vitro Comparison of Egg Yolk and Soybean Lecithin-based Extenders for Cryopreservation of Ram Semen. Theriogenology 73, 480–487.

FUKUI, Y., KOHNO, H., TOGARI, T. ve HIWASA, M. (2007): Fertility of Ewes İnseminated İntrauterinally With Frozen Semen Using Extender Containing Bovine Serum Albumin. J. Reprod. Dev. 53, 959–962.

GADEA, J., SELLES, E., MARCO, M.A, COY, P., MATAS C., ROMAR, R. ve RUIZ, R.S. (2004): Decrease in Glutathione Content in Boar Sperm After Cryopreservation: Effect of the Addition of Reduced Glutathione to the Freezing and Thawing Extenders, Theriogenology 62, 690-701.

GADELLA, B. M. ve LUNA, C. (2014): Cell Biology and Functional Dynamics of the Mammalian Sperm Surface. Theriogenology 81, 74–84.

GAO, D. Y. ve CRISTER, J. K. (2000): Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. Ilar Journal. 41(4):187-96.

GASPARRINI, B., NEGLIA, G., DI PALO, R., CAMPANILE, G. ve ZICARELLI, L. (2000): Effect of Cysteamıne durıng İn Vıtro Maturatıon on Buffalo Embryo Development, Theriogenology, 54:1537-1542.

GASPARRINI, B., SAYOUD, H., NEGLIA, G., DE MATOS, D.G., DONNAY, I. ve ZICARELLI, L. (2003): Glutatione Synthesis During İn Vitro Maturation of Buffalo (Bubalus Bubalis) Oocytes: Effects of Cysteamine on Embryo Development Theriogenology 60: 943–952.

GAVIN-PLAGNE, L., COMMIN, L., BRUYERE, P., BUFF,S. ve JOLY T. (2018): Comparison Between an Animal-Derived Product Medium and a Chemically Defined Medium for Ram Sperm Cryopreservation. Biopreservation and Biobanking, Volume 17, Number 1, 2. DOI: 10.1089/bio.2018.0067

GIL, J., RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M., LUNDEHEIM, N., SÖDERQUIST, L. ve RODRIGUEZ- MARTINEZ, H. (2003): Fertility of Ram Semen Frozen İn Bioexcell and Used for Cervical Artificial İnsemination. Theriogenology 59, 1157-1170.

GIL, J., RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M., SÖDERQUIST, L. ve RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2002): Influence of Centrifugation or Low Extension Rates

Prefreezing on the Fertility of Ram Semen after Cervical İnsemination. Theriogenology, 57, 1781-1792.

GIL, J., SÖDERQUIST, L. ve RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2000): Influence of Centrifugation and Different Extenders on Post Thaw Sperm Quality of Ram Semen. Theriogenology, 54, 93-108.

GIL, L., OLACIREGUI, M., LUNO, V., MALO, C., GONZALEZ, N. ve MARTINEZ, F. (2014): Current Status of Freeze-Drying Technology to Preserve Domestic Animals Sperm, Reprod Dom Anim 49 (Suppl. 4), 72–81.

GILMORE, J.A., LIU, J., PETER, A.T. ve CRITSER, J.K. (1998): Determination of Plasma Membrane Characteristics of Boar Spermatozoa and Their Relevance to Cryopreservation. Biol. Reprod., 58: 28–36

GÖKÇEN, H. (1990): Koyunlarda Sun'i Tohumlama, İçinde Aytuğ, C.N (Ed), Koyun Keçi Hastalıkları Ve Yetiştiriciliği. İstanbul: 485-501; Teknografik Matbaası.

GÖKÇEN, H., AŞTI, R.N., ÇEKGÜL, E. ve ŞENER, E. (1985): Prostaglandin F2 Alfa ve Vit. E Katılarak Dondurulan Koç Spermalarında Akrozom Morfolojisi ve Döl Verimi Üzerinde Araştırmalar. U.Ü. Vet. Fak. Derg. 4:1-2-3.

GOURLEY, D.D. ve RIESE, R.L. (1990): Laparoscopic Artificial İnsemination in Sheep. Vet Clin N Am-Food A, 6(3): 615-33.

GRAHAM, J.K.(1994): Effect of Seminal Plasma on the Motility of Epididymal and Ejaculated Spermatozoa of the Ram and Bull during the Cryopreservation Process. Theriogenology 41, 1151–1162.

GRECO, E., IACOBELLI, M., RIENZI, L., UBALDI, F., FERRERO,S. ve TESARIK, J. (2005) Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. Journal of Andrology, 26: 349–353.

GRUPEN, C.G., NAGASHIMA, H. ve NOTTLE, M.B. (1995): Cysteamine Enhances İn Vitro Development of Porcine Oocytes Matured and Fertilized İn Vitro, Biol Reprod. Jul;53(1):173-8.

GSTRAUNTHALER, G. (2003): Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Serum-Free Cell Culture, ALTEX; 20(4):275-81.

GÜÇTAŞ, A.Ö. (2006):Bilgisayar Destekli Semen Analiz Sistemi (CASA) İle Yapılan Sperm Morfolojisi İncelemelerinin Tekrarlanabilirliği, Değişken Analizleri Ve Laboratuar İçi Manuel Yöntemle Karşılaştırılması.Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi.

GÜNGÖR, S., AKSOY, A., YENI, D. ve AVDATEK, F. (2016): Combination of cysteamine and Lipoic Acid İmproves the Post-Thawed Bull Spermparameters. Kocatepe Vet. J. 9, 87–95.

HAMMADEH, M.E., FLIPPOS, A. ve HAMAD, M.F. (2009): Reaktive Oxygen Species and Antioxidant İn Seminal Plasma and Their İmpact On Male Fertilitiy. Fertility and Sterility. 3(3):87-110.

HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K. ve NOLAN, J.P. (1990): Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. J. Androl. 11:73–88.

HANSEN, P.J. (2009): Effects of Heat Stress on Mammalian Reproduction. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 364:3341-3350.

HARMAN, D. (1956): Aging: A Theory Based On Free Radical and Radiation Chemistry. J Gerontol 11: 298–300.

HARMAN, D. (1981): The Aging Process. Proc Natl Acad Sci USA 78: 7124–7128.

HAYGEM, Türkiye Evcil Hayvan Genetik Kaynakları, GTHB TAPGEM, Ankara Aralık-2009.

HAYMAN, E.G., PIERSCHBACHER, M.D., SUZUKI, S. ve RUOSLAHTI, E., (1985): Vitronectin—A Major Cell Attachment-Promoting Protein in Fetal Bovine Serum. Exp. Cell Res. 160, 245–258.

HEBER-KATZ, E., PECK, A.B. ve CLICK, R.E. (1973): Immune Response İn Vitro. II. Mixed Leucocyte İnteraction in a Protein-Free Medium. Eur. J. Immunol. 3:379.

HEISH, Y.Y., CHANG, C.C. ve LIN, C.S. (2006): Seminal Malondialdehyde Concentration Butnot Glutathione Peroxidase Activity is Negatively Correlated with Seminal Concentration and Motility, Int. J. Biol. Sci. 2, 23-29.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T., MONET-KUNTZ, C., COUROT, M. (1987): Spermatogenesis and Sertoli Cell Numbers and Function in Rams and Bulls. J Reprod Fertil Suppl, 34: 101- 114.

HOGEVEEN, K.N. ve SASSONE-CORSI, P. (2006): Regulation of Gene Expression İn Post-Meiotic Male Germ Cells: CREM-Signalling Pathways and Male Fertility. Hum Fertil (Camb), 9(2):73-79.

HOLT, W.V. ve NORTH, R.D. (1985): Determination of Lipid Composition and Thermal Phase Transition Temperature in an Enriched Plasma Membrane Fraction from Ram Spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 73, 285–294.

HOLT, W.V. (2000a): Basic Aspects of Frozen Storage of Semen. Anim. Reprod. Sci. 62: 3-22.

HOLT, W.V. (2000b): Fundamental Aspects on Sperm Cryobiology: The İmportance of Species and İndividual Differences. Theriogenology, 53, 47-58.

HUANG, F.P. ve STOTT, D.I. (1995): Dual İnhibitory and Stimulatory Activities in Serum from SLE Patients and Lupus Mice That Regulate the Proliferation of an IL-2-Dependent T Cell Line. Lupus, 4:297-303.

HULET, C.V., FOOTE, W.C. ve BLACKWELL, R.L. (1964): Effects of Natural and Electrical Ejaculation on Predicting Fertility in The Ram. J Anim Sci, 23:418–24.

İLERI, İ.K. (1994): Reprodüksiyon Ve Suni Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi. Masaüstü Yayımcılık Ünitesi. Ders Notu No: 23.

İLERI, İ.K., AK, K., PABUCCUUOĞLU, S. ve BIRLER, S. (2000):Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Faültesi Yayını, Ders Notu No: 112, İstanbul.

ISCOVE, N. N. ve SIEBER, F. (1975): Erythroid Progenitors İn Mouse Bone Marrow Detected by Macroscopic Colony Formation İn Culture. Exp. Hematol. (Copenh.) 3:32.

ISHIGURO, H. ve RUBINSKY, B. (1994): Mechanical Interactions between Ice Crystals and Red Blood Cells during Directional Solidification. Cryobiology, 31:483–500.

ISHII, T., BANNAI, S. ve SUGITA, Y. (1981): Mechanism of Growth Stimulation of L1210 Cells by 2-Mercaptoethanol İn Vitro. Journal of Biological Chemistry, 256, 12387–12392.

İSSELS, R.D., NAGELE, A., ECKERT, K.G. ve WILMANNS, W. (1988): Promotion of Cysteine Uptake and İts Utilization for Glutathione Biosynthesis İnduced by Cysteamine and N-Acetil-Cysteine. Biochem. Pharmacol.37, 881–888.

JACKSON, T. H., UNGAN, A., CRISTER, J. K. ve GAO, D. (1997): Novel Microwave Technology for Cryopreservation of Biomaterials by Suppression of Apperant İce Formation. Cryobiology, 34: 363-372.

JAINUDEEN, M.R. ve HAFEZ, E.S.E. (1987): Reproductive Failure in Males. In: Reproduction İn Farm Animals. Hafez, E.S.E. (Ed.). Lea & Febiger, Philadelphia (5nd Ed). Pp 423-435.

JAINUDEEN, M.R. ve HAFEZ, E.S.E. (1993): Sheep and Goat. In: Reproduction in Farm Animals, Ed; E.S.E. Hafez, 6th Edition, Pp: 330-342. Lea & Febiger, Philadelphia.

JEYENDRAN, R., ACOSTA, V., LAND, S. ve COULAM, C. (2008): Cryopreservation of Human Sperm in a Lecithin-Supplemented Freezing Medium. Fértil Steril. 90(4):1263-1265.

JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H. ve ZANEVELD, L.J.D. (1992): The Hypoosmotic Swelling Test: An Update. Arch Androl. 29, 105-116.

JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H., PEREZ-PELAEZ, M. ve ZANEVELD, L.J. (1984): Comparison of Gliserol and a İon Buffer System as Cryoprotective Media for Human Spermatozoa. Effect on Motility, Penetration of Zona-Free Hamster Oocytes and Acrosin/Proacrosin. J. Androl., 5 (1): 1-7.

JONES, R. ve MANN, T. (1973): Lipid Peroxidation İn Spermatozoa. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 184, 103–107.

JUNQUEIRA, L.C. ve CARNEIRO, J. (2006): Temel Histoloji. (Çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S). Nobel Tıp Kitabevi,431-47.

KANE, M.T. (1983): Variability in Different Lots Of Commercial Bovine Serum Albumin Affects Cell Multiplication and Hatching of Rabbit Blastocysts in Culture. J Reprod Fertil 69:555-58.

KARABULUT, H. ve GÜLAY, M.Ş. (2016): Serbest Radikaller. MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg. 4(1): 50-59.

KASAI, M. (1996): Simple and Efficient Methods for Vitrification of Mammalian Embryos. Animal Reproduction Science, 42: 67-75.

KAYMAKÇI, M., ELIÇIN, A., TUNCEL, E., PEKEL,E., KARACA, O., IŞIN, F., TAŞKIN, T., AŞKIN, Y., EMSEN, H., ÖZDER, M., SELÇUK, E. VE SÖNMEZ, R. (2000): Türkiye'de Küçükbaş Hayvan Yetiştiriciliği. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi 17-21 Ocak, Ankara.

KEFER, J. C., AGARWAL, A. ve SABANEGH, E. (2009): Role of Antioxidants in the Treatment of Maleinfertility. Int. J. Urol. 16, 449–457.

KERPIÇCI, A. (2015): Erkek İnfertilitesinde Farklı Antioksidan Maddelerin Sperm Kriyopreservasyon Yöntemleri Üzerine Etkisi. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ağustos.

KISAOĞLU, A., BÖREKCI, B., YAPCA, O.E., BILEN, H. ve SÜLEYMAN, H. (2013): Tissue Damage and Oxidant/Antioxidant Balance. EAJM; 45: 47-9.

KNIGHT, C.A., DEVRIES, A.L. ve OOLMAN, L.D. (1984): Fish Antifreeze Protein and The Freezing and Recrystallization of Ice. Nature, 308:295–6.

KNIGHT, C.A., HALLETT, J. ve DEVRIES, A.L. (1988): Solute Effects on Ice Recrystallization: An Assessment Technique. Cryobiology, 25:55–60.

KOBAYASHI, M., LEE, E.S. ve FUKUI, Y. (2006): Cysteamine or B-Mercaptoethanol Added to a Defined Maturation Medium Improves Blastocyst Formation of Porcine Oocytes after Intracytoplasmic Sperm Injection, Theriogenology 65, 1191–1199.

KOŞUM, N. (2006): Koyun ve Keçilerde Yapay Tohumlama. Hasad, Aylık Gıda, Tarım Ve Hayvancılık Dergisi, Yıl: 22, Sayı: 259.

KULAKSIZ, R. ve DAŞKIN, A. (2007): Teke Spermasının Kısa ve Uzun Sureli Saklanması. Vet Hek Dern Derg, 78, 4, 51-56.

KULAKSIZ, R. (2009): Farklı Antioksidanlar Eklenmiş Sulandırıcılarla Dondurulmuş Saanen Tekesi Spermasının İn Vitro Değerlendirilmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

KULAKSIZ, R., ARI, U.C., DAŞKIN, A. ve ÜNER, A.G. (2013): The Effect of Different Glycerol Concentrations of Freezability of Semen from Angora, Kilis Andsaanen Goats. Slovak J of Anim Sci, 46(2): 39-4.

LA FALCI, V.S.N., YRJÖ-KOSKINEN, A.E., FAZELI, A., HOLT, W.V. ve WATSON, P.F.(2011):Antioxidant Combinations are No More Beneficial than Individual Components in Combating Ram Sperm Oxidative Stress during Storage at 5 °C. Anim. Reprod. Sci. 129, 180–187

LEAHY, T., MARTI, J.I., EVANS, G. ve MAXWELL, W.M.C.(2010): Seasonal Variation in the Protective Effect of Seminal Plasma on Frozen-Thawed Ram Spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 119, 147–153.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L., CRITSER, E. S. ve FIRST, N. L. (1986): Effects of Fetal Calf Serum and Bovine Serum Albumin on In Vitro Maturation and Fertilization of Bovine and Hamster Cumulus-Oocyte Complexes, Biology of Reproduction 35, 850-857.

LEIBO, S. P. ve SONGSASEN, N. (2002): Cryopreservation of Gamets and Embryos of Non-Domestic Species. Theriogenology, 57: 303-326.

LEMKE, H. ve OPITZ, H.G. (1976): Function of 2-Mercaptoethanol as A Macrophage Substitute in the Primary İmmune Response İn Vitro. J. Immunol. 117:388.

LEMMA, A. (2011): Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility. Artificial Insemination in Farm Animals Edited by Dr. Milad Manafi: 191-216.

LESHEM, B., YOGEV, D. ve FIORENTINI, D. (1999): Heat İnactivation of Fetal Calf Serum is not Required For İn Vitro Measurement of Lymphocyte Functions. J Immunol Methods, 223:249-254.

LEWIS, S.E., STERLING, E.S., YOUNG, I.S. ve THOMPSON, W. (1997): Comparison of İndividual Antioxidants of Sperm and Seminal Plasma in Fertile and İnfertile Men. Fertil. Steril. 67, 142–147.

LOPEZ-SAEZ, A., ORTIZ, N., GALLEGO, L. ve GADRE, J.J. (2000): Liquid Storage (5°C) of Ram Semen İn Different Diluents. Arch Androl 44, 155-164.

LU, J., LIN, P.H., YAO, Q. ve CHEN, C. (2010): Chemical and Molecular Mechanisms of Antioxidants: Experimental Approaches and Model Systems. J Cellular Mol Med., 14, 840–860.

MAIA, M.S., BICUDO, S.D., SICHERLE, C.C., RODELLO, L. ve GALLEGO, I.C.S.(2010): Lipid Peroxidation and Generation of Hydrogen Peroxide in Frozen-Thawed Ram Semen Cryopreserved in Extenders with Antioxidants. Anim. Reprod. Sci. 122, 118–123.

MAIA, M.S., BICUDO, S.D. ve Rodello, L.(2014): Effect of Hydrogen Peroxide on Thawed Ovine Sperm Motility. Anim. Reprod. 11, 119–123.

MALDJIAN, A., PIZZI, F., GLIOZZI, T., CEROLINI, S., PENNY, P. ve NOBLE, R.(2005): Changes İn Sperm Quality and Lipid Composition During Cryopreservation of Boar Semen. Theriogenology 63, 411–421.

MARCO-JIMÉNEZ, F., PUCHADES, S., GADEA, J., VICENTE, J. S. ve VIUDES-DE-CASTRO, M. P. (2005): Effect of Semen Collection Method on Pre- and Post-Thaw Guirra Ram Spermatozoa. Theriogenology, 64(8), 1756-1765.

MARTIN, K.R. ve BARRET, J.C. (2002): Reaktive Oksijen Species as Double-Edged Swords İn Cellular Processes: Low-Dose Cell Signaling Versus High-Dose Toxicity. Hum Exp Toxicol. Feb; 21(2):71-5.

MARTINS, C.F., BAO, S.N., DODEA, M.N., CORREA, G.A. ve RUMPF, R. (2007): Effects of Freeze-Drying on Cytology, Ultrastructure, DNA Fragmentation, and Fertilizing Ability of Bovine Sperm. Theriogenology 67, 1307–1315.

MATA- CAMPUZANO, M., ALVAREZ- RODRIGUEZ, M., ALVAREZ, M., TAMAYO-CANUL, J., ANEL, L., DE PAZ, P. ve MARTINEZ- PASTOR, F. (2015): Post-Thawing Quality and Incubation Resilience of Cryopreserved Ram Spermatozoa are Affected by Antioxidant Supplementation and Choice of Extender. Theriogenology 83, 520–528.

MATSUOKA, T., IMAI, H., KOHNO, H. ve FUKUI, Y. (2006): Effects of Bovine Serum Albumin and Trehalose in Semen Diluents for İmprovement of Frozen–Thawed Ram Spermatozoa. J. Reprod. Dev. 52, 675–683.

MAXWELL, W.M. ve JOHNSON, L.A. (1999): Physiology of Spermatozoa at High Dilution Rates: The İnfluence of Seminal Plasma. Theriogenology 52, 1353–1362.

MAXWELL, W.M.C., DE GRAAF, S.P., EL-HAJJ GHAOUI, R. ve EVANS, G. (2006): Seminal Plasma Effects on Sperm Handling and Female Fertility. In: Juengel, J.L., Murray, J.F., Smith, M.F. (Eds.), Reproduction in Domestic Ruminants VI, Society of Reproduction and Fertility. Nottingham University Press, Pp. 13–38.

MAZUR, P. (1965): Causes Of İnjury İn Frozen and Thawed Cells. J. Gen. Physiol.47,347-369.

MAZUR, P. (1984): Freezing Of Living Cells: Mechanisms and İmplications. Am J Physiol, 247, 125-142.

MCWILLIAMS, R.B., GIBBONS, W.E. ve LEIBO, S.P. (1995): Osmotic and Physiological Responses Zygotes and Human Oocytes to Mono- and Disaccharides. Human Reproduction, 10: 1163-1171.

MEDEIROS, C.M.O., FORELL, F., OLIVEIRA, A.T.D. ve RODRIGUES, J.L. (2002): Current Status of Sperm Cryopreservation: Why İsn't İt Better? Theriogenology 57, 327–344.

MERCAN, U. (2004): Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. YYU Vet Fak Derg. 15 (1-2):91-96.

MERTON, J.S., KNIJN, H.M., FLAPPER, H., DOTINGA. F., ROELEN, B.A., VOS, P.L. ve MULLAART, E. (2013): Cysteamine Supplementation During İn Vitro Maturation of Slaughterhouse- and Opu-Derived Bovine Oocytes İmproves Embryonic Development Without Affecting Cryotolerance, Pregnancy Rate, And Calf Characteristics. Theriogenology. 80: 365–371.

MESAROS P. ve GAMCIK P. (1992): The Possibility of Freezing Ram Semen İn a Diluent without Glyserol. Anim. Breed. Abst. 60, No: 10, Abst. No: 6159,787.

MILLER, S.L. ve SCHLESINGER, G. (1993): Prebiotic Syntheses of Vitamin Coenzymes: I. Cysteamine and 2-Mercaptoethanesulphonic Acid (Coenzym M). J Mol Evol, 36, 302-307.

MILOVANOV, V.K. (1962): The Biology of Reproduction and Artificial Insemination of Animals. Seljhozizdat, Moscow, Win Russian, 696 Pp.

MOORE, K.L. ve PERSAUD, T.V.N. (2009): The Developing Human, Clinically Oriented Embryology. 8th Ed. Philadelphia: WB Saunders, 14-40.

MOORE, W.R. (1983-1984): A Comparison of Electroejeculation with the Artificial Vagina for Ram Semen Collection. Annual Report. New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries, 134.

MORRIER, A., CASTONGUAY, F. ve BAILY, J.L. (2003): Glycerol Addition and Conservation of Fresh and Cryopreserved Ram Semen. Canadian Journal of Animal Science, 221- 227

MORRIS, G.J. ve FARRANT, J. (1972): Interactions of Cooling Rate and Protective Additive on the Survival of Wash Human Erythrocytes Frozen To–196°C. Cryobiology, 9, 173-181.

MOUSSA, M., MATINET, V., TRIMECHE, A., TAINTURIER, D. ve ANTON, M. (2002): Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effecton frozen-thawed bull semen. Theriogenology, 57:1695-1706.

MUIÑO-BLANCO, T., PÉREZ-PÉ, R., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.(2008): Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. Reprod. Domest. Anim. 43, 18–31.

NAJAFI, A., KIA, H.D., MOHAMMADI, H., NAJAFI, M.H., ZANGANEH, Z., SHARAFI,M., MARTINEZ-PASTOR, F. ve ADELDUST, H. (2014): Different Concentrationsof Cysteamine and Ergothioneine İmprove Microscopic and Oxidativeparameters in Ram Semen Frozen with a Soybean Lecithin Extender. Cryobiology 69, 68–73.

NIKI, E.(2014): Role of Vitamin E as A Lipid-Soluble Peroxyl Radical Scavenger: İn Vitro and İn Vivo Evidence. Free Radic. Biol. Med. 66, 3–12.

NUR, Z. ve AK, K. (2003): Donmuş Spermanın Saklanması Ve Eritilmesi. Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.22, 1-2-3: 97-102.

NUR, Z., ZIK, B., USTUNER, B., SAGIRKAYA, H. ve OZGUDEN, C.G. (2010): Effects of Different Cryoprotective Agents on Ram Sperm Morphology and DNA İntegrity. Theriogenology, 73: 1267-1275.

OLA, T.T., BOWEN, R.A. ve PICKET, B.W. (1989): Influence of Extender, Cryopreservative and Seminal Processing Procedures on Post-Thaw Motility of Canine Spermatozoa Frozen in Straws. Theriogenology, 31, 451-461.

OLLERO, M., BLANCO, T.M., LOPEZ PEREZ, M.J. ve CEBRIAN PEREZ, J.A. (1996): Surface Changes Associated with Ram Sperm Cryopreservation Revealed by Counter-Current Distribution İn An Aqueous Two-Phase System. Effect of Different Cryoprotectants. J Chromatogr B Biomed Appl. 680 (1-2): 154-64.

OLSON, S.E. ve SEIDEL, G.E. Jr. (2000): Reduced Oxygen Tension andEDTA İmprove Bovine Zygote Development in a Chemically Defined Medium. J Anım Sci, 78:152-157.

ÖZCAN, L. ve TORUN, O. (2007): Ders Notları. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Hayvan Yetiştirme ve Islahı Bölümü, Adana.

ÖZDAŞ, Ö.B., BARAN, A., TAŞ, M., CIRIT, Ü., DEMIR, K., BACINOĞLU, S., ve ark. (2012): Effect of Different Transport Temperatures on In Vitro Maturation of Oocytes Collected from Frozen-Thawed Sheep Ovaries. Turk J Vet Anim Sci 36(1): doi:10,3906/vet-1104-24.

ÖZKOCA, A. (1984): Çiftlik Hayvanlarında Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İ.Ü. Vet. Fak.Yay. İstanbul, 145-152, Rekt. No: 3209. Dek. No: 4.

ÖZYURTLU, N. ve MACUN, H.C. (2005): Koyunlarda Seksüel Siklus ve Follikül Dinamiği. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi, 76(2), 50-53.

PACE, M.M. ve GRAHAM, E.F. (1974): Components in Egg Yolk Which Protect Bovine Spermatozoa During Freezing. J. Anim Sci. 39:1144-9.

PARTYKA, A., LUKASZEWICZ, E. ve NIZANSKI, W. (2012): Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. Theriogenology 77, 1497–1504.

PAULENZ, H., SÖDERQUIST, L., ADNOY, T., NORDSTOGA, A., GULBRANDSEN, B. ve BERG, K.A. (2004): Fertility Results after Different Thawing Procedures for Ram Semen Frozen İn Minitubes and Mini Straws. Theriogenology, 61, 1719-1727.

PECK, A. B., HEBER-KATZ, E.ve CLICK, R.E. (1973): Immune Response İn Vitro. IV. A Comparison of The Protein-Free and Mouse Serum Supplemented Mouse Mixed Lymphocyte İnteraction Assays. Eur. J. Immunol. 3:516.

PERIS, S.I., BILODEAU, J.F., DUFOUR, M. ve BAILEY, J.L.(2007): Impact of Cryopreservation and Reactive Oxygen Species on DNA İntegrity, Lipid Peroxidation and Functional Parameters İn Ram Sperm. Mol. Reprod. Dev. 74, 878–892.

PINEDA, M.H. ve DOOLEY, M.P. (1991): Effect of Method of Seminal Collection on the Retrograde Flow of Spermatozoa into the Urinary Bladder of Rams. Am J Vet Res, 52:307–13.

PINEDA, M.H., DOOLEY, M.P. ve HEMBROUGH, F.B. (1987): Retrograde Flow of Spermatozoa into the Urinary Bladder of Rams. Am J Vet Res, 48:562–8.

PISONI, R.L., PARK, G.Y., VELILLA, V.Q. ve ark. (1995): Detection and Characterization of a Transport System Mediating Cysteamine Entry into Human Fibroblast Lysosomes. Specificity for Aminoethylthiol and Aminoethylsulfide Derivatives. J Biol Chem 270(3):1179– 1184.

POLLARD, J.W., PLANTE, C. ve LEIBO, S.P. (1995): Comparison of Development of Pig Zygotes and Embryos in Simple and Complex Media. J. Reprod. Fertil. 103, 331–337.

PONTBRIAND, D., HOWARD, J.G., SCHIEVE, M.C., STUART, L.D. ve WILDT, D.E. (1989): Effect of Cryoprotective Diluent and Method of Freeze-Thawing on Survival and Acrosomal İntegrity of Ram Spermatozoon. Cryobiology, 26, 341-354.

POTTS, R.J., NOTARIANNI, L.J. ve JEFFERIES, T.M. (2000): Seminal Plasma Reduces Exogenous Oxidative Damage to Human Sperm, Determined by the Measurement of DNA Strand Breaks and Lipid Peroxidation. Mutat Res. Feb 14; 447(2):249-56.

PRATHALINGAN, N.S., HOLT, W.V., REVELL, S.G., JONES, S. ve WATSON, P. F. (2006): Dilution of Spermatozoon Results İn İmproved Viability Following a 24 Hours Storage Period but Decreased Acrosome İntegrity Following Cryopreservation. Anim Reprod Sci, 91, 11-22.

PRICE, P. J. ve GREGORY, E. A. (1982): Relationship Between İn Vitro Growth Promotion and Biophysical and Biochemical Properties of The Serum Supplement. In Vitro 18, 576-584.

QUINN, P. J. ve WHITE I. C. (1966): Variation in Semen Cations in Relation to Semen Quality and Methods of Collection. Fertility & Sterility Vol. 17, No.6, 815-825.

QUINN, P.J. ve CHOW, P.Y.W. (1980): Evidence That Phospholipids Protect Spermatozoa from Cold Shock at A Plasma Membrane Site. J Reprod Fertil, 60:403-7.

RAADSMA, W.H. ve EDEY, N.T. (1985): Mating Performans of Paddock – Mated Rams. I. Changes İn Mating Performance, Ejeculate Characteristics and Testicular Size During The Joining Period. Animal Science 8: 79-99.

RATHER, H.A., ISLAM, R., MALIK, A.A. ve LONE, F.A. (2016): Addition of Antioxidants İmproves Quality of Ram Spermatozoa during Preservation at 4 C, Small Rumin. Res. 141, 24-28.

ROCA, J., HERNANDEZ, M., CARVAJAL, G., VAZQUEZ, J.M. ve MARTINEZ, E.A., (2006): Factors İnfluencing Boar Sperm Cryosurvival. J Anim Sci, 84, 2692-2699.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E., LÓPEZ-BEJAR, M., IZQUIERDO, D. ve PARAMIO, M.T. (2003): Developmental Competence of Prepubertal Goat Oocytes Selected with Brilliant Cresyl Blue and Matured With Cysteamine Supplementation, Reprod. Nutr. Dev. 43, 179–187.

ROSA, H.J.D. ve BRYANT, M.J. (2003): Seasonality of Reproduction in Sheep. Small Rum. Res. 48:155–171.

ROSA, H.J.D., BRYANT. M.J. (2002):The 'Ram Effect' as Away of Modifying The Reproductive Activity in Theewe. Small Rumin. Res. 45:1–16.

ROVEGNO, M., FEITOSA, W.B., ROCHA, A.M., MENDES, C.M., VISINTIN, J.A. ve D'AVILA ASSUMPÇÃO, M.E.O. (2013): Assessment of Post-Thawed Ram Sperm Viability After İncubation With Seminal Plasma. Cell Tissue Bank. 14, 333–339.

RUBINSKY, B., ARAV, A. ve DEVRIES, A.L. (1992): The Cryoprotective Effect of Antifreeze Glycopeptides from Antarctic Fishes. Cryobiology, 29:69–79.

RUBINSKY, B., ARAV, A. ve FLETCHER, G.L. (1991): Hypothermic Protection-A Fundamental Property of ''Antifreeze'' Proteins. Biochem Biophys Res Commun, 180:566-71.

SAAB, A.S., SLEIMAN, F.T., KALLASSY, N., DARWEESH, W.Y. ve AAD, P.Y. (2011): Effect of Adaptation and Heat Stress on Reproductive Performances of Fat-Tail Awassi Rams in Eastern Mediterranean. Lebanese Science Journal 12(1):31-44.

SAARANEN, M., SUISTOMAA, U. ve VANHA-PERTTULA, T. (1988): Semen Selenium Content and Spermmitochondrial Volume in Human and Some Animal Species. Hum. Reprod. 4, 304–408.

SADLER, T.W. (2005): Langman's Medikal Embriyoloji. Başaklar AC (Çeviri). Ankara: Palme Yayıncılık,7-38.

SAGIRKAYA, H., MISIRLIOGLU, M., KAYA, A., FIRST, N.L., PARRISH, J.J. ve MEMILI, E. (2007): Developmental Potential of Bovine Oocytes Cultured in Different Maturation and Culture Conditions. Anim Reprod Sci 101(3-4):225-40.

SALAMON, S. ve MAXWELL, W.M.C. (1995): Frozen Storage of Ram Semen I. Processing, Freezing, Thawing and Fertility after Cervical İnsemination. Animal Reproduction Science, 37, 185-249.

SALAMON, S. ve MAXWELL, W.M.C. (2000): Storage of Ram Semen. Anim Reprod Sci 62 (1-3): 77- 111.

SALAMON, S. ve VISSER D. (1972): Effect of Composition of Tris-Based Diluent of Thawing Solution on Survival of Ram Spermatozoa Frozen by the Pellet Method. Aust. J. Biol. Sci. 25: 605-618.

SANCHEZ-PARTIDA, L.G., SETCHELL, B.P. ve MAXWELL, M.C. (1997): Epididymal Compounds and Antioxidants İn Diluents for the Frozen Storage of Ram Spermatozoa. Reprod Fertil Dev, 9, 689-696.

SANDAL, A.İ. ve ÖZDAŞ, Ö.B. (2015): Vitrification of İn Vitro Produced Bovine Embryos Matured in Modified TCM- 199. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, Vol. 39, pp. 688-692.

SANDAL, A.İ., ÖZDAŞ, Ö.B., BARAN, A. (2018): In Vitro Maturation of Bovine Oocytes: Beneficial Effects of Cysteamine. J Dairy Vet Anim Res. 7(2):64–65.

SANOCKA D. ve KURPISZ M. (2004): Reactive Oxygen Species and Sperm Cells. Reprod Biol Endocrinol. 2(12), 1-7.

SARIÖZKAN, S., TUNCER, P.B., BÜYÜKLEBLEBICI, S., BUCAK, M.N., CANTÜRK, F. ve EKEN, A. (2015): Antioxidative Effects of Cysteamine, Hyaluronan and Fetuin on Post-Thawsemen Quality: DNA İntegrity and Oxidative Stress Parameters İn the Brownswiss Bull. Andrologia 47, 138–147.

SARIÖZKAN, S., TÜRK, G., CANTÜRK, F., YAY, A., EKEN, A. ve AKÇAY, A. (2013): The Effect of Bovine Serum Albumin and Fetal Calf Serum on Sperm Quality,

DNA Fragmentation and Lipid Peroxidation of the Liquid Stored Rabbit Semen. Cryobiology 67, 1–6.

SCHANBACHER, B.D., GOMES, W.R. ve VAN DEMARK, N.L. (1974): Developmental Changes in Spermatogenesis, Testicular Carnitine Acetyltransferase Activity and Serum Testosterone in the Ram. Animal Reproduction Science 39, 889-892.

SEAN, X.G, STEVENS, J.W., LENTZ, S.R. (2015): Regulation of Thrombosis and Vascular Function by Protein Methionine Oxidation. Blood,125 (25): 3851-3859.

SEKHON, L. H., GUPTA, S., KIM, Y. ve AGARWAL, A. (2010): Female İnfertility and Antioxidants.Curr.Women's HealthRev. 6, 84–95.

SEMKOV, M.M. ve ZAKHARIEV, Z. (1972): Comparison of Some Semen Diluents for Use in Deep Freezing of Ram Semen. Zhivotnovud. Nauki. 9: 105-111.

SEN, S. ve CHAKRABORTY, R. (2011): The Role of Antioxidants in Human Health. American Chemical Society, Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy. Chapter 1: 1-37.

ŞENER, G. ve YEĞEN, B.Ç. (2009): İskemi Reperfüzyon Hasarı. Klinik Gelişim Dergisi. 22: 5-13.

SHAW, J.M. ve TROUNSEN, A. (1989): Effect of Dimethyl Sulfoxide and Protein Concentration on The Viability of Two-Cell Mouse Embriyos Frozen with a Rapid Freezing Technique. Cryobiology, 26 (5): 413-21.

SILVA, E.C.B., CAJUEIRO, J.F.P., SILVA, S.V., SOARES, P.C. ve GUERRA, M.M.P. (2012): Effect of Antioxidant Resveratrol and Quercetin on İn Vitro Evaluation of Frozen Ram Sperm, Theriogenology 77, 1722-1726.

SIMON, C.L., MAO, S.J.T ve LARSEN, W.J. (1992): Identification of a Factor in Fetal Bovine Serum That Stabilizes the Cumulus Extracellular Matrix. J. Biol. Chem. 267, 12380–12386.

SIRIVAIDYAPONG, S., URSEMI, P., BEVERS, M.M. ve COLENBRANDER, B. (2001): Effect of Prostatic Fluid on Motility, Viability and Acrosome İntegrity of Chilled and Frozen-Thawed Dog Spermatozoa. J. Reprod Fertil Suppl, 57, 383-386.

SISEIN, E.A. (2014): Biochemistry of Free Radicals and Antioxidants.Academic J Biosci. 2, 110-118.

SMITH, J.F., ASHER, G.W., BRIGGS, R.M., MORROW, C.J., MURRAY, G.R., OLIVER, J.E., PARR, J., VELDHUIZEN, F.A. ve UPRETI, G.C. (1993): Effect of

Diluent and Storage Time on Pregnancy Rate in Ewes After İntrauterine İnsemination. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 53, 295-298.

SÖDERQUIST, L., LUNDEHEIM, N. ve NILSSON, B. (1999): Assessment of Fertility after Using Different Procedures to Thaw Ram Spermatozoon Frozen İn Mini Straw. Reprod Dom Anim, 34, 61-66.

SOYLU, M.K., NUR, Z., USTUNER, B., DOGAN, I., SAGIRKAYA, H., GUNAY, U. ve AK, K. (2007): Effects of Various Cryoprotective Agents and Extender Osmolality on Post-Thaw Ram Semen. Bullettin of the Veterinary Institute İn Pulawy, 51: 241-246.

STRZEZEK, J., ŁAPKIEWICZ, S. ve LECEWICZ, M. (1999): A Note on Antioxidant Capacity of Boarseminal Plasma. Anim. Sci. Pap. Rep. 17, 181–188.

STRZEZEK, J. (2002): Secretory Activity of Boar Seminal Vesicle Glands. Reprod. Biol. 2, 243–266.

SUZUKI, F. ve YANAGIMACHI, R. (1989): Changes in the Distribution of Intramembranous Particles and Filipin-Reactive Membrane Sterols during in Vitro Capacitation of Golden Hamster Spermatozoa. Gamete Res. 23:335-47.

SWAMI, D.S., KUMAR, P., MALIK, R.K., SAINI, M., KUMAR, D. ve JAN, M.H. (2017): Cysteamine supplementation revealed detrimental effect on cryosurvival of buffalo sperm based on computer-assisted semen analysis and oxidative parameters. Animal Reproduction Science 177, 56–64.

TAKAHASHI, M., NAGAI, T., HAMANO, S., KUWAYAMA, M., OKAMURA, N. ve OKANO, A. (1993): Effect of Thiol Compounds on İn Vitro Development and İntracellular Glutathione Content of Bovine Embryos. Biol Reprod 49, 228–232.

TAŞ, M., GÜNEY SARUHAN, B., KURT, D., YOKUŞ, B. ve DENLİ, M. (2010): Protective Role of Lycopene on Aflatoxin B1 Induced Changes Sperm Characteristics and Testicular Damages in Rats. Kafkas Univ Vet Fak Derg 16 (4): 597-604.

TAŞ, M., CİRİT, Ü., ÖZKAN, O., DENLİ, M., ZİNCİRCİOĞLU, S.B., ŞEKER, U., ÖZMEN, M.F. ve BİLGE EREN, L. (2014): Protective Role of Vitamin C on Sperm Characteristics and Testicular Damage in Rats Exposed to Radiation. Kafkas Univ Vet Fak Derg 20 (1): 59-64.

TEKIN, N. (1990): Erkek Üreme Organlarının Muayenesi (Androlojik Muayeneler): Alaçam, E.: Theriogenology. Nurol Matbaacılık, Ankara.

TEKIN, N. (1994): Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi. In: Alaçam, E. Ed. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Sun'i Tohumlama, Doğum ve İnfertilite. Dizgievi, Konya. 69-79.

TEKIN, N. (2000): Yetiştiricilikte Sun'i Tohumlamanın Önemi.Türkiye- Hayvancılık Kongresi, 57-64, Kızılcahamam, Ankara.

TEKIN, N., UYSAL, O., AKÇAY, E. ve YAVAŞ, İ. (2006): Farklı Taurin Dozlarının ve Dondurma Hızının Koç Spermasının Dondurulması Üzerine Etkileri. Ankara Ünivesitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 53,179-184.

TERRILL, C.E. (1940): Comparison of Ram Semen Collection Obtained By Three Different Methods for Artificial İnsemination. J. Anim. Sci. 201–207.

TRIGLIA, R.P. ve LINSCOTT, W.D. (1980): Titers of Nine Complement Components, Conglutinin and C3b-İnactivator in Adult and Fetal Bovine Sera. Mol Immunol. 17:741-748.

TÜİK 2018.

TUNCER, P.B., BUCAK, M.N., BÜYÜKLEBLEBICI, S., SARIÖZKAN, S., YENI, D., EKEN, A., AKALIN, P.P., KINET, H., AVDATEK, F., FIDAN, A.F. ve GÜNDOĞAN, M. (2010): The Effect of Cysteine and Glutathione on Sperm and Oxidative Stress Parameters of Post-Thawed Bull Semen. Cryobiology, 61, 303-307.

TUNCER, P.B., BUYUKLEBLEBICI, S., EKEN, A., TASDEMIR, U., DURMAZ, E., BUYUKLEBLEBICI, O. ve COSKUN, E. (2014): Comparison of Cryoprotective Effects of Lycopene and Cysteamine İn Different Cryoprotectants on Bull Semen and Fertility Results. Reprod. Domest. Anim. 49, 746–752.

TWIGG, J., FULTON, N., E. GOMEZ, E., IRVINE, D.S. ve AITKEN, R.J. (1998): Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. Hum. Reprod. 13, 1429–1436.

URANO, S., MAMI, I., IKUKO, O. ve MATSUO, M. (1987): Membrane Stabilization of Vitamin E; Interactions of Alpha-Tocopherol with Phospholipids İn Bilayer Liposomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 146, 1413–1418.

URANO, S., YANO, K. ve MATSUO, M. (1988): Membrane-Stabilizing Effect of Vitamin E: Effect of Alpha-Tocopherol and İts Model Compounds on Fluidity of Lecithin Liposomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 469–475.

URSO, M.L. ve CLARKSON, P.M. (2003): Oxidative Stress, Exercise and Antioxidant Supplementation, Toxicology, 189 41-54.

UYSAL, O. ve BUCAK, M.N. (2007): Effects of Oxidized Glutathione, Bovine Serum Albumin, Cysteine and Lycopene onthe Quality of Frozen-Thawed Ram Semen. Acta Vet. Brno 76, 383–390.

UYSAL, O., KINET, H., ÇEVIK, M. ve ÇETINKAYA, S. (2000): Değişik Antioksidanlar İçeren Farklı Sulandırıcılarla Dondurulmuş Koç Spermalarında Elde Edilen Döl Verimi. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 47(2):177-89.

VAN OVERVELD, F.W., HAENEN, G.R., RHEMREV, J., VERMEIDEN, J.P. ve BAST, A. (2000): Tyrosine as İmportant Contributor to the Antioxidant Capacity of Seminal Plasma. Chem. Biol. Interact. 127, 151–161.

VATANSEVER, L. (2004): Et ve Et Ürünlerinde Biyojenik Aminler. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 10 (2): 203-208.

VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M. ve ONCLIN, K. (2002): Computer Assisted Semen Analyzers in Andrology Research and Veterinary Practice. Theriogenology, 57: 149-L79.

VIRÁG, G.Y. ve MÉZES, M. (1994): Glutathione Peroxidase Activity of the Seminal Plasma of Rabbits. Magyar Állatorvosok Lapja 49, 296-297.

VISCONTI, P.E. ve KOPF, G.S. (1998): Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. Biol Reprod. 59:1-6.

VISSER, D. ve SALAMON, S. (1973): Fertility of Ram Semen Frozen in Tris-Based Diluent. Austr. J. Biol. Sci. 26:513-516.

WAKAYAMA, T. ve YANAGIMACHI, R. (1998): Development of Normal Mice from Oocytes Injected with Freeze-Dried Spermatozoa. Nat Biotechnol. 16(7):639-41.

WANG, J., ZHIYONG, C., SONGQIANG, X., JIN, Z. ve CHAOJIE, W. (2010): Sythesis and Bioevaluation of Aryl-Guadino Congugates Targeting the Polyamine Transporter. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 20, 6421-6425.

WATSON, P.F. (1981): The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris G J, Clarke, A. Eds., Effects of Low Temperatures on Biological Membranes. Academic Press, London. pp. 189–218.

WATSON, P.F. (1995): Recent Developments and Concepts in the Cryopreservation of Spermatozoa and the Assessment of Their Post-Thawing Function. Reprod Fertil Dev, 7, 871-891.

WATSON, P.F. (2000): The Causes of Reduce Fertility with Cryopreserved Semen. Anim. Reprod. Sci. 60:481-92.

WEI, Y.H. ve PANG, C.Y. (2005): The Role of Mitocondria in Human Aging Process. Biotech International, 17: 8-13.

WENG, L.S., TAYLOR, L.S., MORSHEDI, M., SCHUFFNER, A., DURAN, H.E., BEEBE, S. ve OEHNINGER, S. (2002): Caspase Activity and Apoptotic Markers İn Ejeculated Human Sperm. Mol Hum Reprod, 8 (10): 984-991.

WHITE, I.G. (1993): Lipids and Calcium Uptake of Sperm in Relation to Cold Shock and Preservation: A Review. Reprod. Fertil. Dev. 5, 639–658.

WINDSOR, P.P., SZELL, A.Z., BUSCHBECK, C., EDWARD, A.Y., MILTON, T.T.B. ve BUCHRELL, B.C. (1994): Transcervical Artificial İnsemination of Western Australian Merinos Ewes with Frozen-Thawed Semen. Theriogenology, 42, 147-157.

WOELDERS, H. (1997): Fundamentals and Recent Development in Cryopreservation of Bull and Boar Semen. Vet. Quart. 19:135-138.

YEUM, K.J., RUSSELL, M.R., KRINSKY, I.N. ve ADLINI, G. (2004): Biomarkers of Antioxidan Capacity in Hydrophilic and Lipophilic Compartments of Human Plasma. Archives of Biochemistry and Biophysics, 430: 97-103.

YILMAZ, İ. (2005): Erişkin Ratlarda Deneysel Varikosel Oluşturulması Sonrası Testislerde Germ Hucrelerinde Apoptozis Düzeylerinin Yukselmesi ve Yukselmiş Olan Apoptozisin Varikoselektomi Sonrası Gerileme Duzeyi ve Suresinin Tunel Yontemi İle Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, T. C. Sağlik Bakanliği Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.

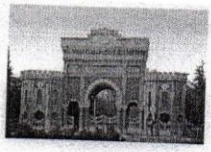
YU, B.P. (1999): Approaches To Anti-Aging İntervention: The Promises and the Uncertainties. Mech. Ageing Dev.111 73-87.

YURDAYDIN, N. (1990): Spermanın Alınması, Saklanması ve Sun'i Tohumlama. Theriogenoloji (Ed. E. Alaçam). Nurol Matbaacılık A.Ş., Ankara, 77-89.

ZINI, A., ABITBOL, J., GIRARDI, S.K., SCHULSINGER, D., GOLDSTEIN, M. ve SCHLEGEL, P.N. (1998): Germ Cell Apoptosis and Endothelial Nitric Oxide Synthase (Enos) Expression Following İschemiareperfusion İnjury To Testis. Archives of Andrology 41:57-65.

ETİK KURUL KARARI

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayın Prof. Dr. Özen Banu ÖZDAŞ
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Başvuru : .19.10.2017

Toplantı Tarihi : 26.10.2017

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen **Veteriner Hekim Elif Merve ÇINAR'** a ait "Koç Spermasının Modifiye Edilmiş Sperma Sulandırıcıları İle Dondurulması" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Koç
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	5
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		07.11.2017/ 07.11.2018

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Prof. Dr. Mustafa Oral ÖNCÜL
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Doç. Dr. Aygül EKİCİ
Üye

Doç. Dr. Uğur AKSU
Üye

Yard. Doç. Dr Altan ARMUTAK
Üye

Yrd. Doç. Dr. Aydın ÇEVİK
Üye

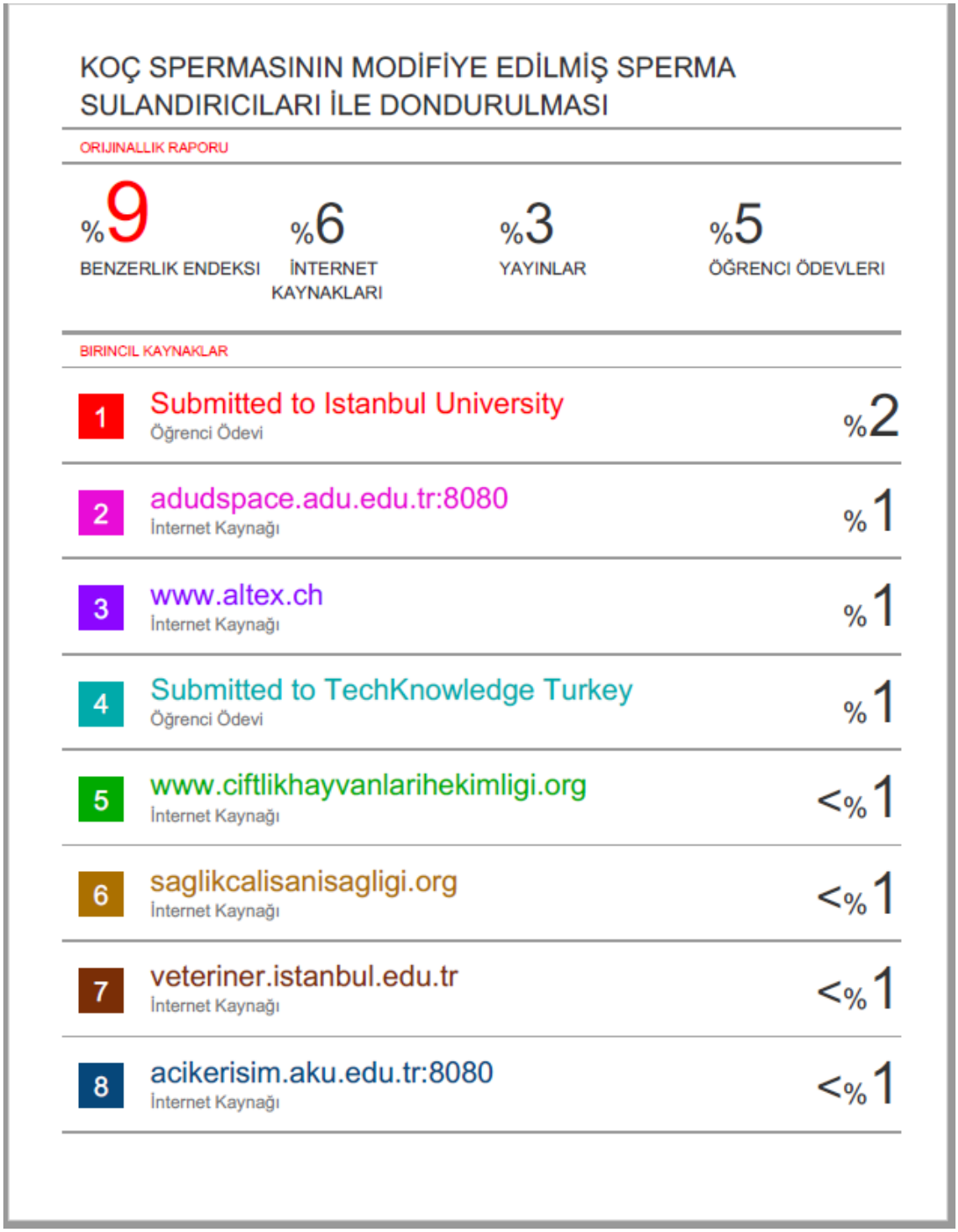
Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak.Yük. Müh
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221 nolu Oda Avcılar –İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail: hadyek@istanbul.edu.tr

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



KOÇ SPERMASININ MODİFİYE EDİLMİŞ SPERMA SULANDIRICILARI İLE DONDURULMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%9	%6	%3	%5
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%2
2	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
3	www.altex.ch İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	%1
5	www.ciftlikhayvanlarihekimligi.org İnternet Kaynağı	<%1
6	saglikcalisanisagligi.org İnternet Kaynağı	<%1
7	veteriner.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	acikerisim.aku.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Elif Merve	**Soyadı**	Çınar
Doğ.Yeri	Iğdır	**Doğ.Tar.**	03.11.1988
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	10008181380
Email	elifmervecinar@hotmail.com	**Tel**	05075354340

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora	İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa	2019
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2011
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2011
Lise	Cem Bakioğlu Lisesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Veteriner Hekimi	TİGEM	2014-Halen
2.	Veteriner Hekimi	Özerden Et	2012-2013
3.	Danışman-Veteriner Hekim	Suntet Danışmanlık Ltd. Şti	2011-2013

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
Ingilizce	Iyi	Iyi	Iyi	58	68,75(YÖKDIL)

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	68,95	70,83	66,48
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Office Programları	Iyi
Internet	Iyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlar:

1. Enginler Ö. S., Özdaş Ö. B., Sandal A. İ., Arıcı R., Ertürk E., Mohammed İ. F., **Çınar E. M.,** Gündüz M. C., Doğan N., Baran A., Accuracy of Ultrasonographic Diagnosis of Sex and Effect of Sex And Birth Type on Biparietal Diameter of Saanen Goat Fetuses (Sheep and Goat Research Journal Volume 28, 2013 – November).

2. Enginler Ö. S., Sandal A. İ., Özdaş Ö. B., Arıcı R., Ertürk E., **Çınar E. M.,** Mohammed İ. F., Baran A., Tek Ç., Gündüz M. C., The Effect of Oviductal Cells on İn Vitro Maturation of Canine Oocytes in Different Culture Media (Turk. J. Vet. Anim. Sci. (2014) 38: 14-19 TÜBİTAK).

3. Demir K., Can A., Ertürk E., Özdemirci S., Karaçam H., Sandal A. İ., Öztürk G. B., Arıcı R., **Çınar E.M.,** Birler S., Papuccuoğlu S., Ak K., Evecen M., Farklı Aktivasyon Tekniklerinin Olgun Olmayan ve In Vitro Olgunlaştırılmış Kedi Oositleri Üzerine Etkisi (Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 20 (4): 565-570, 2014).

4. Cirit Ü**,** Özmen MF, Küçükaslan İ, Köse M, Kutsal HG, **Çınar EM**: Effect of the interval from follicle aspiration to initiation of lengthened FSH treatment on follicular superstimulatory and superovulatory responses and embryo production in lactating simmental cows. Theriogenology, 128: 218-224, 2019.

5. Cirit Ü, Özmen MF, Köse M, Küçükaslan İ, **Çınar EM**, Kutsal HG. Effects of Presence or Absence of a Dominant Follicle Estimated by a Single Ultrasound Examination at the Time of Follicular Aspiration on Superovulatory Responses and Embryo Production in Lactating Simmental Cows. Kafkas Univ Vet Fak Derg,25 (5): 627-632, 2019.

Sertifikalar:

1. Sığırlarda Recto-Vaginal Metodla Sunî Tohumlama, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Hayvancılık Genel Müdürlüğü, Meslek İçi Eğitim Sertifikası 17-21 Kasım 2014, Bursa

2. Bilgisayarlı Sürü Yönetimi Programı ve Mekanizasyonu Eğitimi Sertifikası, Akgüneş Teknik, 19-23 Ekim 2015, Eskişehir.

3. Embriyo Üretim ve Transferi Yetki Sertifikası T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Hayvancılık Genel Müdürlüğü, Sertifika No: 2017/03, 2017.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Kitap okumak, yazmak, müzik dinlemek, yemek yapmak.