T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KOÇ SPERMASI DONDURULMASINDA RESVERATROL, SİKLODEKSTRİN VE KOMBİNASYONLARININ ERİTME SONRASI SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLER ÜZERİNE ETKİSİ

AHMET ESER

DANIŞMAN
PROF. DR. KEMAL AK

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI

Bu çalışma 28.06.2021 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. Kemal AK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Serhat ALKAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Kamber DEMİR
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Mustafa Kemal SOYLU
Bursa Uludağ Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Zekariya NUR
Bursa Uludağ Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

İTHAF

Kızım Ada ve oğlum Deniz’ e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tecrübesi ve bilgi birikimiyle her zaman yol gösteren bilimsel danışmanım Prof. Dr. Kemal AK' a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Serhat PABUCCUOĞLU, Prof. Dr. Sema BİRLER, Prof. Dr. Serhat ALKAN, Prof. Dr. Alper BARAN, Prof. Dr. Mithat EVECEN ve Prof. Dr. Özen Banu ÖZDAŞ' a bu dönemde bana kazandırdıkları her türlü bilgi için teşekkür eder, ilgi ve desteklerinden dolayı minnettar olduğumu belirtmek isterim.

Anabilim Dalı'nda göreve başladığım ilk günden itibaren her konuda yardımını gördüğüm, bulunduğum tüm bilimsel çalışmalarda ve tezimde bana yol gösteren, ikinci danışmanım olarak tanımlayabileceğim Prof. Dr. Kamber DEMİR' e ayrıca teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca çok şey öğrendiğim, her konuda yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Ramazan ARICI ve Arş. Gör. Dr. Selin YAĞCIOĞLUN' a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın tüm dönemlerinde desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Asiye İzem SANDAL, Veteriner Hekim Nur ERSOY, Veteriner Hekim Hatice ŞENLİKCİ, Veteriner Hekim Mamet ÇEŞMECİ, Laborant Ayşenur ÇAKIR ve Hayvan Sağlık Teknisyeni Ercan KETENCİ' ye teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada kullandığım kimyasalların hazırlanmasında yardımcı olan İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Kimya Mühendisliği Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Mehmet Koray GÖK' e teşekkür ederim.

Tez yazımında deneyimlerini benimle paylaşan ve değerli katkılarda bulunan Prof. Dr. Zekariya NUR ve Prof. Dr. Muzaffer TAŞ hocalarıma teşekkür ederim.

Üzerimde büyük emeği olan, bugünlere gelmemi sağlayan annem Hafize ESER, babam Hüseyin ESER' e ve her daim desteğini hissettiğim eşim Esma ESER' e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİ
ÖZET XV
ABSTRACT ..... XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Koyunlarda Suni Tohumlamanın Tarihçesi 4
2.2. Koyunlarda Suni Tohumlama Uygulamasının Önemi 5
2.3. Koyunlarda Suni Tohumlamayı Sınırlandıran Faktörler 6
2.3.1. Fizyoloji ve Serviksin Anatomik Yapısı 6
2.3.2. Koyunlarda Uygulanan Suni Tohumlama Yöntemleri (İntravajinal, İntraservikal, Transservikal İntraüterin, Laparoskopik İntraüterin) 7
2.3.3. Koç Spermatozoonun Yapısı İle İlgili Faktörler 8
2.4. Koçlarda Spermatogenezis 8
2.5. Koç Spermatozoonun Membran Yapısı 9
2.6. Koçlarda Spermatolojik Özellikler 10
2.7. Koçlarda Sperma Alma Yöntemleri 11
2.7.1. Suni Vajina Yardımı İle Sperma Alma 12
2.7.2. Elektroejakülatör Yardımı İle Sperma Alma 13
2.7.3. Aşım Sonrası Spermanın Vajinadan Geri Toplanması 15
2.8. Koç Spermasının Muayenesi 15
2.8.1. Spermanın Makroskobik Muayenesi 15
2.8.1.1. Hacim 15
2.8.1.2. Renk 16
2.8.1.3. Viskozite (Kıvam, Akışkanlık) 16

2.8.1.4. Koku 16
2.8.1.5. Kitle Hareketi (Mass Aktivite) 16
2.8.2. Spermanın Mikroskobik Muayenesi 17
2.8.2.1. Kitle Hareketi (Mass Aktivite) 17
2.8.2.2. Motilite Muayenesi 17
2.8.2.3. Spermatozoon Yoğunluğu 18
2.8.2.4. Ölü/Canlı ve Morfolojik Bütünlük Muayenesi 18
2.8.3. Hipoozmotik Şişme Testi 19
2.8.4. Gelişmiş Spermatolojik Muayene Yöntemleri 20
2.9. Spermanın Kriyoprservasyonu 22
2.9.1. Sperma Sulandırıcıları ve Özellikleri 22
2.9.2. Spermanın Sulandırılması 24
2.9.3. Spermanın Soğutulması 25
2.9.4. Spermanın Dondurulması 27
2.9.5. Spermanın Eritilmesi 28
2.10. Sperma Dondurulmasında Sulandırıcıya İlave Edilen Kriyoprotektanlar 29
2.10.1. İnternal Kriyoprotektanlar 30
2.10.2. Eksternal Kriyoprotektanlar 33
2.11. Serbest Radikaller 34
2.11.1. Serbest Radikallerin Spermatozoon Üzerindeki Etkileri 35
2.12. Antioksidanlar ve İşlevleri 39
3. GEREÇ VE YÖNTEM 46
3.1. Etik Kurul Onayı ve İzinler 46
3.2. Çalışmada Kullanılan Hayvan Materyali 46
3.3. Spermanın Elde Edilmesi 46
3.4. Sulandırıcıların Hazırlanması 48
3.5. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması 50
3.6. Spermanın Eritilmesi 52
3.7. Spermatolojik Muayeneler 52
3.7.1. Donma Öncesi Gerçekleştirilen Spermatolojik Muayeneler 52
3.7.2. Eritme Sonrası Gerçekleştirilen Spermatolojik Muayeneler 54
3.7.2.1. Motilite Muayenesi 54
3.7.2.2. Dayanıklılık Testi 54

3.7.2.3. Hipo Ozmotik Şişme Testi 54
3.7.2.4. Spermatozoon Akrozom Bütünlüğünün Muayenesi 55
3.7.2.5. Spermatozoon Membran Bütünlüğünün Muayenesi 56
3.7.2.6. Mitokondriyal Aktivite Muayenesi 57
3.7.2.7. Oksidatif Stres Muayenesi 58
3.7.2.8. Kapasitasyon Muayenesi 60
3.8. İstatistiksel Analizler 62
4. BULGULAR 63
4.1. Donma Öncesi Elde Edilen Spermatolojik Bulgular 63
4.2. Eritme Sonrası Elde Edilen Spermatolojik Bulgular 66
5. TARTIŞMA 79
KAYNAKLAR 96
ETİK KURUL KARARI 133
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 134
ÖZGEÇMİŞ 135

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3- 1: Tris bazlı yumurta sarısı (TYS) sulandırıcısının formulasyonu. **49**

Tablo 3- 2: Tris-sitrik asit-glikoz (TCG) sulandırıcısının formülasyonu **49**

Tablo 3- 3: Çalışma grupları ve sulandırıcı içerikleri **51**

Tablo 4- 1: Ekilibrasyon (5°C) sonrası saptanan motilite (%) ve kinetik hareket parametreleri özelliklerinin karşılaştırılması (n:10). 65

Tablo 4- 2: Eritme sonrası (37°C, 0. saatte) saptanan motilite (%) ve kinetik hareket parametreleri özelliklerinin karşılaştırılması (n:20). 67

Tablo 4- 3: Eritme sonrası akış sitometrisinde saptanan canlı-akrozomu sağlam (n:10), canlı-membranı bütün (n:10), mitokondriyal aktivite gösteren (n:10), oksidatif stress altındaki spermatozoon oranları (n:10), faz-kontrast mikroskopta değerlendirilen Hipoozmotik Şişme Testi (HOST) pozitif oranları (n:20) ve floresan ataçmanlı faz-kontrast mikroskopta saptanan F pattern (kapasitasyon gerçekleşmemiş) spermatozoon oranları (n:10). 69

Tablo 4- 4: Dayanıklılık testi 1. saatte (37°C) saptanan motilite (%) ve kinetik hareket parametreleri özelliklerinin karşılaştırılması (n:20). 73

Tablo 4- 5: Dayanıklılık testi 2. saatte (37°C) saptanan motilite (%) ve kinetik hareket parametreleri özelliklerinin karşılaştırılması (n:20). 74

Tablo 4- 6: Dayanıklılık testi 4. saatte (37°C) saptanan motilite (%) ve kinetik hareket parametreleri özelliklerinin karşılaştırılması (n:20). 75

Tablo 4- 7: Eritme sonrası 0. saat ve dayanıklılık testinin 1, 2 ve 4. saatlerinde saptananan total ve progresif motilite oranlarının istatistiksel etkileşimi. 76

Tablo 4- 8: Eritme sonrası 0. saat ve dayanıklılık testinin 1, 2 ve 4. saatlerinde saptananan VAP, VSL, VCL ve ALH değerlerinin istatistiksel etkileşimi. 77

Tablo 4- 9: Eritme sonrası 0. saat ve dayanıklılık testinin 1, 2 ve 4. saatlerinde saptananan BCF, STR ve LIN değerlerinin istatistiksel etkileşimi. 78

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3- 1: Spermatozoona ait birim zamanda gözlemlenen kinetik hareket parametreleri 53

Şekil 3- 2: Akrozom bütünlüğü muayenesinde FITC-PNA ve PI floresan boyaları ile boyanan spermatozoonların dağılımı (Akış sitometrisi).....56

Şekil 3- 3: Membran bütünlüğü muayenesinde CFDA ve PI floresan boyaları ile boyanan spermatozoonların dağılımı (Akış sitometrisi) 57

Şekil 3- 4: Mitokondriyal aktivite muayenesinde JC-1 floresan boyası ile boyanan ve yüksek mitokondriyal membran potansiyeline (hMMP) sahip spermatozoonların dağılımı (Akış sitometrisi) 58

Şekil 3- 5: Akış sitometrisinde gerçekleştirilen oksidatif stres muayenesinde spermatozoonların dağılımı 59

Şekil 3- 6: CTC floresan boyamada B ve F pattern spermatozoonlar (floresan ataçmanlı faz-kontrast mikroskop). 61

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µg: Mikrogram

µm: Mikrometre

µm^2: Mikrometre kare

µm^3: Mikrometre küp

ABP: Androjen Bağlayıcı Protein

ALH: (Lateral Head Amplitude) Salınım-sapma mesafesi

ANOVA: Tek yönlü varyans analizi

ark.: Arkadaşları

BCF: (Beat Cross Frequency) Çapraz geçiş ritmi

C: Karbon

°**C:** Santigrat derece

Ca: Kalsiyum

cAMP: Cyclic Adenosine Monophosphate

CASA: Bilgisayar destekli sperma analiz sistemi

CAT: Katalaz

CD: Siklodekstrin

CD-RES: Siklodekstrine Yüklenmiş Resveratrol

CFDA: Carboxyfluorescein diacetate

cm: Santimetre

CTC: Klortetrasiklin

DHA: Dokosaheksaenoik Asit

DHE: Dihydroethidium

dk: Dakika

DMSO: Dimetilsülfoksit

FSH: Folikül Stimüle Edici Hormon

g: Gram

kg: Kilogram

M: Molar

m^2: Metrekare

MDA: Malondialdehit

mg: Miligram

ml: Mililitre

mM: Milimolar

mOsm: Miliosmol

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

N.R.R: Non Return Rate

O^-_2: Süperoksit

OH^-: Hidroksil

pH: Power of Hydrogen

PI: Propidium iodide

PNA: Peanut agglutinin

PUFA: (Polyunsaturated Fatty Acid) Çoklu Doymamış Yağ Asidi

PVA: Polivinil alkol

RES: Resveratrol

RNT: Reaktif Nitrojen Türleri

ROO: Peroksil Radikali

ROOH: Hidroperoksit Radikali

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

rpm: Dönme hızı

RST: Reaktif Sülfür Türleri

Sn.: Saniye

SOD: Süperoksit Dismutaz

SPSS: Statistical package for the social science

STR: (Straightness) Ortalama yolun doğrusallığı

TCG: Tris sitrikasit glikoz

Tris: (hydroxymethyl) aminomethane

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

TYS: Tris-Yumurta Sarısı

UV: Ultraviyole

V: Hacim

VAP: (Velocity Average Path) Eğrisel ortalama yol hızı

vb.: Ve benzeri

VCL: (Velocity Curve Linear) Eğrisel salınımlı yol hızı

VSL: (Velocity Straight Linear) Doğrusal yol hızı

YS: Yumurta Sarısı

α: Alfa

β: Beta

µm/Sn.: Mikrometre/saniye

ÖZET

Eser, A. (2021). Koç Sperması Dondurulmasında Resveratrol, Siklodekstrin ve Kombinasyonlarının Eritme Sonrası Spermatolojik Özellikler Üzerine Etkisi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Çalışmada, koç sperması dondurulmasında 10 µg/ml, 20 µg/ml ve 40 µg/ml antioksidan özellikteki resveratrol maddesinin saf ve methl-β-siklodekstrine yüklenmiş formlarının eritme sonrası spermatolojik özelliklere etkisi araştırıldı. Elektro-ejakülatör yardımıyla alınan ejakülatlar pooling sonrası 10 eşit hacime bölündü ve çalışma grupları oluşturuldu (Kontrol, RES10: 10 µg/ml resveratrol, RES20: 20 µg/ml resveratrol, RES40: 40 µg/ml resveratrol, CD10: 178,65 µg/ml siklodekstrin, CD20: 357,30 µg/ml siklodekstrin, CD40: 714,60 µg/ml siklodekstrin, CD-RES10: 10 µg/ml resveratrol + 178,65 µg/ml siklodekstrin, CD-RES20: 20 µg/ml resveratrol + 357,30 µg/ml siklodekstrin, CD-RES40: 40 µg/ml resveratrol + 714,60 µg/ml siklodekstrin). Gruplar, etken maddeleri içeren eşit hacimdeki Tris-sitrik asit-glikoz medyumu ile ön sulandırma işlemine tabi tutuldu. 26°C sıcaklıktaki su banyosu içerisinde 15 dk. inkübasyon sonrası final gliserol oranı %5 olacak şekilde Tris bazlı sulandırıcıyla sulandırma ve dondurma işlemleri gerçekleştirildi. Eritme sonrası, faz kontrast mikroskopta HOST, bilgisayar destekli sperma analiz sisteminde kinetik hareket parametreleri, total ve progresif motilite (0., 1., 2. ve 4. saatlerde), floresan ataçmanlı faz kontrast mikroskopta kapasitasyon ve akış sitometrisinde mitokondriyal aktivite, oksidatif stress, membran ve akrozom bütünlüğü muayeneleri gerçekleştirildi.

Muayeneler sonucunda, siklodekstrinin eritme sonrası spermatolojik özelliklere zarar verdiği, özellikle erken kapasitasyon ve mitokondriyal aktivite gösteren spermatozoon oranını artırdığı belirlendi. 20 µg/ml resveratrolün erken kapasitasyonu engellediği saptandı. Resveratrol (RES) ve resveratrol yüklenmiş siklodekstrin gruplarının (CD-RES) genel olarak başarılı olduğu ve koç sperması dondurulmasında kullanılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Koç sperması, donma, resveratrol, siklodekstrin, antioksidan

ABSTRACT

Eser, A. (2021). Effect of Resveratrol, Cyclodextrin and Combinations on Post Thaw Spermatological Characteristics for Freezing Ram Semen. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Reproduction and Artificial Insemination. PhD thesis. Istanbul.

Key Words: Ram Semen, cryopreservation, resveratrol, cyclodextrin, antioxidant

In this study, the effect of pure and methl-β-cyclodextrin loaded forms of resveratrol (10 µg/ml, 20 µg/ml and 40 µg/ml) was investigated on spermatological properties after thawing. The semen collected with the help of electro-ejaculator were divided into 10 equal volumes after pooling and study groups were formed (Control, RES10: 10 µg/ml resveratrol, RES20: 20 µg/ml resveratrol, RES40: 40 µg/ml resveratrol, CD10: 178.65 µg/ml cyclodextrin, CD20: 357.30 µg/ml cyclodextrin, CD40: 714.60 µg/ml cyclodextrin, CD-RES10: 10 µg/ml resveratrol + 178.65 µg/ml cyclodextrin, CD-RES20: 20 µg/ml resveratrol + 357.30 µg/ml cyclodextrin, CD-RES40: 40 µg/ml resveratrol + 714.60 µg /ml cyclodextrin). Groups were pre-diluted with an equal volume of Tris-citric acid-glucose medium containing the group spesific chemicals. After 15 minutes of incubation in a water bath at 26 °C, dilution (final glycerol ratio of 5%) with Tris-based extender and freezing processes were carried out. After thawing total motility, progressive motility and kinetic motion parameters, (at 0, 1, 2 and 4 hours), HOST, capacitation status, mitochondrial activity, oxidative stress, membrane and acrosome integrity examinations were performed.

As a result of the examinations, it was determined that cyclodextrin damaged the spermatological properties after thawing and especially increased the rate of spermatozoon showing early capacitation and mitochondrial activity. It was found that 20 µg/ml resveratrol prevented early capacitation. Resveratrol (RES) and Resveratrol loaded cyclodextrin groups (CD-RES) were found to be successful in general, and can be used for freezing ram semen.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tarım ve hayvancılık, temel besin kaynaklarının temini, sanayi sektörüne ham madde karşılaması ve büyük bir istihdam alanı oluşturmasından dolayı ülke ekonomilerine önemli ölçüde katkıda bulunan bir sektördür. Diğer yandan, hızla artan insan nüfusu tarımsal ürünlerin yetersiz kalmasına özellikle de kişi başına düşen et ve süt gibi temel hayvansal ürünlerin giderek azalmasına neden olmaktadır. Ülkeler, küresel olarak artan hayvansal ürün ihtiyacını karşılamada stratejik yöntemler geliştirmektedir. Ülkemiz için sığır haricindeki hayvanlara özellikle de koyun ve keçi yetiştiriciliğine ağırlık verilmesinin gerekliliği belirtilmektedir (Yıldırım ve Tayar 2006). Ülke olarak sahip olduğumuz küçük baş hayvanların yeterli düzeyde verimli olmaması ve diğer ülkelerden farklı olarak domuz yetiştiriciliği ve tüketiminin yapılmaması, et ve süt ihtiyacını karşılamada sığır yetiştiriciliğine bağımlı olmamıza neden olmaktadır.

Ülkemiz, sahip olduğu coğrafi özellikler ile tüm çiftlik hayvanlarının özellikle de küçükbaş türlerin yetiştiriciliği için yüksek potansiyele sahiptir. Ayrıca, kültürel olarak küçükbaş hayvan yetişitiriciğinde deneyimli olmamız, toplumun küçükbaş hayvanlara ait et ve süt ürünlerinin tüketimine yabancı olmaması avantaj olarak kabul edilebilir.

Koyunculuk, ülkemizde özellikle de Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde uğraşılan hayvan yetiştiriciliği alanları arasında önemli bir yere sahiptir. Türkiye, diğer ülkelerle kıyaslandığında sahip olduğu koyun sayısı bakımından üst sıralarda yer almaktadır. Son veriler incelendiğinde ülkemizdeki koyun sayısının 42.712.580 baş olduğu görülmektedir. %91,4'ü yerli ırklardan oluşan koyun populasyonu, küçükbaş hayvanların %77,6'sını, çiftlik hayvanlarının ise %57,8'ini oluşturmaktadır (TUİK 2020). Yerli ırk koyunlarımız her ne kadar zorlu ve kötü kaliteye sahip mera şartlarına uyum sağlayabilse de verim özelliklerinin düşük olması elde edilen hayvansal üretimin arzu edilen seviyelere ulaşmasında engel teşkil etmektedir. Bu durumun oluşmasında, sürekliliği olmayan ıslah politikaları, yeterli sayıda kaliteli damızlık yetiştirilememesi ve var olan damızlıkların geniş bir yelpazede kullanılamamasının rol oynadığı söylenebilir (Özmen 2015).

Hayvansal verimliliğin yükseltilmesi, ıslah çalışmalarının planlı bir şekilde yürütülmesi ile gerçekleştirilebilir. Bu amaçla biyoteknolojik yöntemlerden, özellikle de donmuş spermanın kullanıldığı suni tohumlama uygulamasından yaralanılabilir. Çiftlik

hayvanları içerisinde özellikle de büyükbaş hayvanlarda donmuş sperma ile gerçekleştirilen suni tohumlama uygulamaları sayesinde üstün genetik özellikleri kanıtlanmış ve bu özelliklerini sonraki jenerasyonlara aktarabilen damızlık hayvanlardan geniş bir coğrafyada fayda sağlanabilmektedir. Koyunlarda ise, serviksin sahip olduğu anatomik yapının vaginal yolla intraüterin tohumlama için engel teşkil etmesi ve koç spermasının henüz arzu edilen başarıyla dondurulamaması, tohumlama sonrası gebelik oranlarının düşük olmasına, dolayısıyla uygulamanın saha koşullarında kısıtlı kalmasına neden olmaktadır (Marco-Jimenez ve ark. 2005; Ak ve ark. 2010).

Koç spermatozoon membran yapısı oransal olarak doymamış yağ asitlerinden zengin olmakla beraber kolesterol açısından oldukça fakirdir. Bu durum, koç spermatozoonların donma ve çözünme işlemlerinin zararlı etkilerine daha hassas olmasına neden olmaktadır (Bacınoğlu ve ark. 2007; Ak ve ark. 2010). Ayrıca, membran çoklu doymamış yağ asitlerinin reaktif oksijen türleri (ROS) ataklarında birincil hedef olması, özellikle donma ve çözünme esnasında meydana gelen lipit peroksidasyonu artırmakta, spermatozoonlarda motilite kaybına, akrozom ve membran hasarlarına neden olarak fertilizasyon oranlarını düşürmektedir (Dowling ve Simmons 2009; Ömür 2011).

Sperma dondurulmasında uygulanan işlemler ve kullanılan sulandırıcı içerikleri eritme sonrası başarıyı etkileyen en önemli faktörlerdir (Salamon ve Maxwell 2000). Günümüze kadar birçok sulandırma, soğutma, dondurma, eritme yöntemleri ve sulandırıcı çeşitleri geliştirilmiş, çoğunlukla da sulandırıcıya ilave edilen katkı maddelerinin etkinlikleri araştırılmıştır (Allai ve ark. 2018). Bu amaçla, birçok endojen ve/veya eksojen kaynaklı antioksidan madde sperma sulandırıcılarına ilave edilerek hücrede oluşan oksidatif stres nedenli hasarların azaltılması amaçlanmıştır. Son yıllarda yayımlanmış makaleler incelendiğinde, antioksidan özelliğe sahip resveratrol maddesinin birçok hayvan türünde sperma sulandırıcısına ilave edildiği ve eritme sonrası spermatolojik özelliklerde başarılı sonuçlar alındığı görülmüştür. Ancak, resveratrolün koç sperması dondurulmasında etkinliğini araştıran çalışma sayısı yeterli sayıda değildir (Al-Mutary ve ark. 2020).

Resveratrol kuvvetli bir antioksidandır. Ancak suda çözünme yeteneği oldukça zayıftır. Ayrıca, normal oda koşullarında, oksijen ile temas durumunda, sıcaklık ve ışık değişimlerinde yapısal olarak değişikliğe uğramaktadır (Baur ve Sinclair 2006). Resveratrolün sahip olduğu bu dezavantajlar siklodekstrin taşıt maddesine yüklenmesiyle

bertaraf edilebilmektedir. Siklodekstrinler resveratrolün çözünürlüğünü, stabilitesini ve antioksidan kapasitesini artırmaktadır (Torres ve ark. 2018).

Sunulan çalışmada, koç spermasının dondurulmasında farklı dozlardaki (10, 20 ve 40 µg/ml) resveratrol maddesinin saf veya Methl-β-siklodekstrine yüklenmiş formda kullanılmasının çözdürme sonrası spermatolojik özelliklere olan etkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koyunlarda Suni Tohumlamanın Tarihçesi

Çiftlik hayvanlarında reprodüksiyon alanındaki biyoteknolojik çalışmaların temelini suni tohumlama uygulamaları oluşturmaktadır. Suni tohumlamanın yaygın olarak gerçekleştirilmesi ve hayvan ıslahının hız kazanması sayesinde; spermanın dondurulması, spermada cinsiyet tayini, östrusların düzenlenmesi, *in vivo* embriyo üretimi, embriyoların kriyoprezervasyonu, transgenik ve klon hayvan üretimi gibi biyoteknolojik gelişmelerin önü açılmıştır (Foote 2002; Birler ve ark. 2010).

Türkiye dünyada suni tohumlama uygulamasını Rusya'dan sonra gerçekleştiren ikinci ülkedir. 1926 yılında Cumhuriyet dönemi bakanlarından Tarım Bakanı Sabri Toprak Rusya'ya ziyarette bulunmuştur. Ziyareti esnasında gözlemlediği suni tohumlama uygulamasının ülkemiz hayvancılık ıslah çalışmalarında kullanılabileceği kanısına varan Tarım Bakanı, Rus yetkililerden bu alanda yetişmiş bir personeli ülkemize gönderilmesi konusunda ricada bulunmuştur. Aynı yıl içerisinde Rus Veteriner Hekimi Prof. Mihailof Türkiye'ye gelerek Bursa Karacabey harasında Türk Veteriner Hekimlere reprodüksiyon ve suni tohumlama alanlarında eğitimler vermiş ve atlar üzerinde uygulamalar gerçekleştirmiştir (Özkoca 1984). Cumhuriyet döneminin başlarında, dokuma sanayisinin gelişmesi ve kalkınmasını sağlamak amacı ile tarım ve hayvancılık alanlarında önemli adımlar atılmıştır. Yerli koyun ırkları yapağıların kaba ve sert olması, dokuma sanayisine uygun olmamasından kaynaklanan dışa bağımlılığı azaltmak için 1928, 1929 ve 1930 yıllarında Macaristan'dan toplam 1759 baş dişi ve 914 baş erkek Merinos ırkı koyun getirilmiş ve yerli ırklarla melezleme çalışmaları başlatılmıştır (Özkoca 1984; Polatoğlu 2019). Suni tohumlamanın 1950 yılından itibaren daha yaygın kullanılması ile 1970 yılına kadar ülke genelinde 300'e yakın suni tohumlama merkezi faaliyet göstermiş ve bu istasyonlarda 300.000'e yakın koyuna suni tohumlama uygulanmıştır (Koşum 2006).

1980'li yıllara gelindiğinde ise ülkenin ekonomik durumu, teknik yetersizlikler ve geleneksel tohumlama yöntemlerinde (intravaginal, intraservikal) elde edilen gebelik oranlarının arzu edilen seviyelerde olmaması gibi nedenler koyunlarda suni tohumlama uygulamalarını durma aşamasına getirmiştir (Emsen ve Koşum 2009). 1982 yılında Avustralya'da Killen ve Caffery' in laparoskopik intraüterin suni tohumlama yöntemini geliştirmesi ve %70 oranında gebelik elde etmesi ile yeni bir dönem başlamıştır. Özellikle donmuş spermada düşük tohumlama dozlarında da başarılı gebelik oranlarının elde

edilmesinden dolayı laparoskopik intraüterin tohumlama yöntemi günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (Milovanov 1962; McKelvey ve ark. 1985; Hill ve ark. 1998; Ustuner ve ark. 2018).

2.2. Koyunlarda Suni Tohumlama Uygulamasının Önemi

Koyunlarda suni tohumlama uygulamasının önemi ve yararları aşağıda belirtilen alt başlıklar halinde özetlenebilir (Ak 2005a; Gökdal ve Yılmaz 2014):

- Islah çalışmaları: Suni tohumlama uygulaması ile değerli veya istenilen genetik özelliğe sahip erkek damızlıklardan daha fazla yavru elde edilir. Bir koçtan elde edilen sperma ile çok sayıda dişi tohumlanabileceğinden ıslah çalışmalarının hızı artar.

- Damızlık koçun ve alınan spermanın muayenesi: Suni tohumlama amaçlı kullanılacak spermanın elde edilmesinden önce koçların rutin sağlık kontrolleri yapılmaktadır. Bu sayede, damızlık koçlarda herhangi bir sağlık sorunu ile karşılaşıldığında, erken teşhis ve tedavi fırsatı doğar. Alınan spermanın muayenesi ile, spermanın potansiyel fertilitesi ve tohumlama sonrası gerçekleşecek gebelik oranları hakkında bilimsel bir öngörü sağlanır.

- Fazla sayıda koç besleme külfetinin önüne geçilmesi: Suni tohumlama sayesinde damızlık bir koç ile 250-300 baş koyun tohumlanabilmektedir. Bu sayede, bir sürüde bulunması gereken koç sayısı çok daha az olmakta, yetiştirici bakımından da işçilik kolaylığı sağlanmasının yanında ekonomik karlılık artmaktadır.

- Dondurulmuş spermanın taşınması: Günümüzde sperma küçük hacime sahip payetler içerinde dondurulmaktadır. Çok sayıda payetin sıvı azot dolu konteynerler içerinde depolanması ve taşınması oldukça kolaydır. Bu sayede damızlık koçlara ait dondurulmuş spermaların yurt içi veya yurt dışından temin etme süreci kolaylıkla sağlanabilmektedir.

- Koyunlarda östrus senkronizasyonu / takibi: Suni tohumlama uygulanacak koyunların östrus döneminde olması gerekmektedir. Bu sebepten dolayı planlanan suni tohumlama öncesinde koyunlarda östrus senkronizasyonu veya takibi ile düzenli kayıt sonrası başarı oranları artmaktadır.

- Tüm koyunların tohumlanmasından emin olma: Doğal aşımda aynı koyunlara birden fazla aşım yapılmakta, bazı koyunlarda ise hiç aşım gerçekleşmemektedir. Suni

tohumlama uygulamalarında tüm koyunlar tohumlanmakta ve kayıt altına alınmaktadır. Ayrıca doğan kuzuların babaları ve özellikleri kayıt altına alınmaktadır.

- Aşım yeteneği olmayan koçlardan faydalanma: Fertil ancak aşım yeteneği olmayan (ayak hastalıkları vb.) değerli koçlardan suni tohumlama yöntemiyle faydalanılabilmektedir. Ayrıca, ince kuyruklu koçlar yağlı kuyruklu koyunları aşamadığından suni tohumlamaya başvurulmaktadır.

2.3. Koyunlarda Suni Tohumlamayı Sınırlandıran Faktörler

Koyunlarda suni tohumlama uygulamalarının yaygın olarak kullanılmasını kısıtlayan bir çok faktör bulunmaktadır.

2.3.1. Fizyoloji ve Serviksin Anatomik Yapısı

Koyunlar mevsime bağlı poliöstrik hayvanlardır ve üreme sezonları birkaç ayla sınırlıdır (Keskin ve ark. 2002). Ayrıca intraservikal tohumlama uygulamalarında zorluklar yaşanmaktadır.

Serviks, korpus uteri ile vajina arasında yer alan, ince lümenli, kıvrımlı, uzun ve kassel yapıda bir organdır. Lümende bulunan servikal halkalar (4-7 adet) iç içe geçmiş halde olduklarından adeta bariyer görevi yapmaktadırlar (Dun 1955; Fukui ve Roberts 1978). Bu halkalar arasında dar bir lümen açıklığı vardır ve östrus döneminde bu açıklıkta genişleme olmaz. Doğal aşımda sperma vajinanın anterioruna bırakılır. Vaginaya bırakılan milyarlarca spermatozoon servikal mukusun da yardımı ile serviks uteriyi geçerek ovidukta ulaşmaya çalışır. Ancak serviksin anatomik yapısından dolayı uterusa ulaşabilen spermatozoon sayısı, vaginaya bırakılan spermatozoon sayının ancak %1'i kadar olabilmektedir. Bu nedenle suni tohumlama uygulamalarında, spermanın serviksin ileri bölümlerine hatta uterusa verilmesi zorunludur. Tohumlama anında serviks uteriye el ile maniplasyonun mümkün olmaması, serviksin anatomik yapısının koyun ırkları arasında farklılık göstermesi, serviksin vajene bakan orifisyumun laterale bakması ve kataterin servikse girişi ve ilerletilmesi esnasında dirençle karşılaşılması intraservikal tohumlama işlemini zorlaştırmaktadır. Serviks girişine düşük hacimlerde bile olsa sperma verildiğinde, servikal kontraksiyonlar spermayı vaginaya geri yönlendirir. Özellikle donmuş sperma ile yapılan uygulamalarda bu durum gebelik oranlarını oldukça düşürmektedir (Ritar ve Salamon 1983; Dattena ve ark. 1992; Eppleston 1992; Ak 2005a; Rashidi 2011).

2.3.2. Koyunlarda Uygulanan Suni Tohumlama Yöntemleri (İntravajinal, İntraservikal, Transservikal İntraüterin, Laparoskopik İntraüterin)

Uygulanan yöntemler arasında en pratik olanı, spermanın vajinanın anterior bölümüne bırakıldığı basit intravajinal suni tohumlamadır. Kör tohumlama yöntemi olarak adlandırılan bu yöntemde tohumlama dozunun oldukça yüksek olması zorunludur ve donmuş sperma için uygun değildir. İntraservikal tohumlamada ise vulva spekulum yardımıyla açılır ve ucu eğimli bir katater ile serviks lümenine 2-6 mm girilmeye çalışılarak spermanın serviks içerisinde depo edilmesi sağlanır (Ataman 1996). Donmuş sperma ile yapılan tohumlamalarda genital kanala verilen spermatozoon sayısı sınırlıdır. Ayrıca soğutma, dondurma ve eritme işlemlerinde motilite ve canlılık oranları azaldığından ovidukta ulaşan spermatozoon sayısı önemli oranda düşmekte ve istenilen gebelik oranları elde edilememektedir (Arıcı 2017). Fischer ve ark. (1992) dondurulmuş-eritilmiş sperma ile intraservikal tohumlama sonrası %23,6 gebelik elde ettiklerini bildirmişlerdir. Evans ve Maxwell (1987), donmuş sperma ile intraservikal tohumlamada %25-45, Ustuner ve ark. (2018) %39, Fukui (1977) ise %27 gebelik oranları (N.R.R.) bulmuşlardır.

Laparoskopik intraüterin suni tohumlama yöntemini diğer suni tohumlama yöntemlerine göre en büyük üstünlüğü, düşük tohumlama dozlarının başarıyla kullanılabilmesidir (Leboeuf ve ark. 2000; Evans ve Maxwell 1994).). Donmuş sperma ile laparoskopik intraüterin tohumlamada; mevsime, senkronizasyon protokolüne, tohumlama zamanına ve sperma dozuna göre değişmekle birlikte %75' e ulaşan gebelik oranları sağlanabilmektedir (Dovenski ve ark. 2012; Kulaksız ve Arı 2016). Koyunlarda donmuş sperma ile laparoskopik intraüterin suni tohumlama uygulamaları ile Evans ve Maxwell (1987) %60-70, Windors ve ark (1994) %48 gebelik oranı elde ettiklerini, Eppleston ve ark. (1986) $5x10^6$ dozunda dondurulmuş-eritilmiş sperma ile %50 ve Vallet ve ark. (1992) ise $100x10^6$ dozunda dondurulmuş-eritilmiş sperma kullanarak %70,7 oranında gebelik tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Laparoskopik tohumlama yönteminde başarılı gebelik oranları elde edilmesine karşın; göreceli olarak ekonomik olmaması, birçok prosedür içermesi, özel ekipman gerektirmesi, deneyimli teknik personel gerekliliği, invazif müdahale içermesi, operasyon ve sonrasında bazı komplikasyon risklerinin bulunması gibi nedenler yetiştiricinin bu yönteme karşı önyargılı olmasına neden olmaktadır (Demirci 2002; Kulaksız ve Arı 2016).

2.3.3. Koç Spermatozoonun Yapısı İle İlgili Faktörler

Spermatozoonlar, kriyopreservasyon ve çözdürme işlemleri sırasında meydana gelen birtakım fiziko-kimyasal değişikliklere maruz kalmaktadırlar. Spermatozoon membran yapısındaki kolesterol-fosfolipid oranı, spermanın donmasındaki başarıyı belirleyen ana faktörlerden birisi olarak kabul edilmektedir (White 1993). Donma ve eritme işlemleri sırasında membran stabilizasyonunu koruyan ve soğuk şokuna karşı dirençli kılan bu oran koç spermatozoonunda oldukça düşüktür (0,37). Ayrıca, koç spermatozoon membranının fosfolipid (doymamış yağ asidi) miktarı oransal olarak yüksektir ve donma sırasında oluşan faz değişiklikleri hücre içi molekül kayıplarına sebep olur. Sonuç olarak da geri dönüşü olmayan membran hasarları ve motilite kayıpları ortaya çıkar (Drobnis ve ark. 1993).

Spermanın dondurulması sırasında, hücrenin yapısını ve fonksiyonel özellikleri üzerinde olumsuz etkileyen diğer bir faktör ise ortamda reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması sonucu oluşan oksidatif dejenerasyondur (Watson 2000). Membran yapısında yer alan doymamış yağ asitleri, karasız durumdaki oksijen bileşikleri ile bağlanma eğilimi göstermekte ve membran yapısında peroksit formasyonları oluşmaktadır. Peroksidasyon sonucu spermatozoon membranının yapısal ve işlevsel bütünlüğü hasar görmekte ve geçirgenliği düzensizleşmektedir. Meydana gelen hasarın boyutuna göre DNA fragmentasyonu oluşabilmekte, fertilizasyon kapasitesi kaybolmakta, hatta hücre ölümü gerçekleşebilmektedir (Banday ve ark. 2017).

Günümüze kadar, donma ve çözdürme işlemlerinin olumsuz etkileri karşısında spermatozoonun daha dirençli olabilmesi için çok sayıda araştırma yapılmış ve halen yapılmaktadır. Araştırmacılar, yoğun olarak sulandırma, soğutma, donma yöntemleri ile sulandırıcılara ilave edilen katkı maddeleri (hormon, antioksidan, kriyoprotektif madde şeker, eksojen kolesterol, vitamin vb.) üzerinde çalışmışlardır (Ak ve ark. 2010; Gökçen ve ark. 1985; Chen ve ark. 1993).

2.4. Koçlarda Spermatogenezis

Spermatogenezis, endokrin sistem kontrolü altında, hücre bölünmeleri ve yapısal farklılaşmalar sonucunda erkek gamet hücresinin (spermatozoon) oluştuğu evreleri tanımlar. Spermatositogenezis ve spermiogenezis (olgunlaşma) adı verilen iki faz dönemden oluşan karmaşık bir süreçtir (Birler 1999). Spermatogenezis sürecinde testosteron, folikül stimüle edici hormon (FSH), lüteinleştirici hormon (LH) ve androjen

bağlayıcı proteininin (ABP) aktif rolü vardır (Doğantekin ve Özcan 2016). Puberta dönemine girilmesiyle hipofiz ön lobundan salınan LH, testis tubulusları arasındaki bağ dokuda bulunan Leyding hücrelerinden testosteron salgılanmasını indüklemektedir. Sistemik dolaşım yolu ile tubulus seminiferusa gelen testosteron hormonu, ABP ile birleşerek spermatogoniumlarda mitozun başlamasını tetikler. FSH spermatogenezisin stimüle edilmesinde, LH ve testosteron ise devamlılığında rol almaktadır (O'shaughnessy ve ark. 2010; Chowdhury 1979).

Memeli hayvanlarda spermatositogenezis, testisin tubulus seminiferus bazal membranında, kendini yenileyebilen ve farklılaşma yeteneği üst düzeyde olan primitif germ hücrelerinin (spermatogonium) mitotik bölünmeleri ile başlamaktadır. Mitotik bölünmeler, mayotik bölünmeler ile devam etmekte ve hücrenin sahip olduğu diploid (2n) kromozom sayısı haploid (n) kromozom sayısına indirgenerek olgun olmayan spermatid hücresi oluşmaktadır. (Birler 1999; Öztürk ve ark. 2018)

Spermiogenezis döneminde ise, spermatid hücreleri tubulus seminiferus lümeninden ayrılmakta, rete testis boyunca ilerleyerek epididimise ulaşmaktadır (epididimal göç). Bu göç sırasında, hücrenin morfolojisi, nukleusu ve stoplazmasında birtakım değişiklikler meydana gelmekte, hücre nihai spermatozoon şeklini almakta ve motilite yeteneği kazanmaktadır (Çoyan ve ark. 2002).

Koçlarda spermatogenezis süresi yaklaşık 46-49 gündür. Spermatogenezis ırk ve yaş ile doğrudan ilişkili olmakla birlikte ısı, nem, bakım ve gün ışığının uzunluğu gibi çevresel faktörlerden etkilenir. Radyoaktif elektromanyetik radyasyon, östrojen analogları, dioksinler, ağır metaller, pestisitler gibi faktörler sperma üretim sürecine zarar verir. Selenyum, çinko, vitamin A, E, C, arginin, koenzim Q10, karnitin, L karnitin, glutatyon içeren maddelerin ise spermatogenezis üzerine olumlu etki yapar (Doğantekin ve Özcan 2016; Saleh 1997).

2.5. Koç Spermatozoonun Membran Yapısı

Spermatozoonlar, sahip olduğu yapı ve fonksiyonlar açısından diğer somatik hücreler ile birçok açıdan ayrışmaktadır. Spermatozoon membran yapısı ihtiva ettiği lipid kompozisyonu bakımından diğer hücrelerden farklılık göstermektedir. Spermatozoon membranı yapısal olarak başlıca lipid, karbonhidrat ve proteinlerden oluşmaktadır. Membran yapısının büyük bir kısmını oluşturan lipidlerin ana görevi; membran stabilizasyonunu ve bütünlüğünü korumaktır. Fonksiyonel olarak maturasyon, akrozom

reaksiyonu ve spermatozoon – oosit membran füzyonunda rol oynarlar (Zülfikaroğlu ve ark. 2010). Membranları yüksek oranda PUFA (polyunsaturated fatty acid; doymamış yağ asidi), özellikle de diPUFA (phospholipids esterified with two PUFA) içermektedir ki bu yapı sadece spermatozoon membranı haricinde sadece retina ve bazı beyin bölümlerinde bulunmaktadır (Ladha 1998; Wassall ve Stillwell 2009). Membran yapısının en ana fraksiyonunu fosfolipidler (sefalin, sfingolipid, lesitin) oluşturmaktadır (Mandal ve ark. 2014). Spermatozoon membran yapısındaki diğer önemli bir lipid türevi olan kolesterol, membran bütünlüğünü korumada ve yarı geçirgenliğinde görev alır (Zülfikaroğlu ve ark. 2010).

Epididimal olgunlaşma sırasında spermatozoon membranında birtakım değişiklerin meydana geldiği gösterilmiştir (Parks ve Hammerstedt 1985). Koç spermatozoon membran yapısındaki başlıca değişiklikler; kolesterol, total lipid (Dawson ve Scott 1964; Scott ve ark. 1967), kolesterol/fosfolipid, fosfotidilserin, fosfotidiletanolamin, kardiyolipin, etanolamin ve plazmalojen (Scott ve ark. 1967; Quinn ve White 1967) konsantrasyonlarında azalma ile doymamış yağ asidi (Scott ve ark. 1967) oranındaki artışlardır. Araştırmacılar, ejakülasyon sonrası elde edilen spermanın, testiküler spermaya göre soğuk şokuna daha duyarlı olmasını, epididimal olgunlaşma sırasındaki membran lipid değişikliklerine bağlamışlardır (Hammerstedt ve ark. 1979; Voglmayr ve ark. 1967).

Spermatozoon membran yapısındaki lipidler ve kombinasyonu hayvan türleri arasında farklılık göstermesinin yanında, aynı tür içinde fertil ve subfertil olanlar arasında da farklılık gösterebilmektedir. Spermatozoon plazma membranında, lipidlerin dışında karbonhidratlar (monosakkaritler, disakkaritler) ve aminoasitler (tirozin, triptofan. histidin) bulunmaktadır (Zülfikaroğlu ve ark. 2010).

2.6. Koçlarda Spermatolojik Özellikler

Koçlarda spermatolojik özellikler yaş, ırk, beslenme, mevsim, sperma alma yöntemi ve sıklığına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Evans ve Maxwell 1987). Genel olarak, sağlıklı ve ergin bir koçun sperma rengi beyazdan krem rengine kadar değişebilmektedir. Ortalama 1 ml hacminde olan spermanın pH değeri 6,2-6,9 arasındadır. Spermatozoon konsantrasyonu 2-3x10^9/ml, mass (kitle) aktivite ++++, motilite %80-90 ve anormal spermatozoon oranını %5-15 arasındadır (Ak 2005a). Koç spermatozoonu toplam uzunluğunun 60 μm, hacminin 31 μm^3, yüz ölçümünün 42 μm^2

olduğu; baş uzunluğu, genişliği ve kalınlığının sırası ile 8,3 µm, 4 µm ve 1 µm olduğu; boyun kısmının 1 µm, orta kısmın 8-10 µm, kuyruk bölümünün 40-50 µm ve kuyruk ucu uzunluğunun ise 3 µm olduğu bildirilmiştir (Curry ve ark. 1994). Ak (2005c), bir spermatozoonun toplam ağırlığının %50' lik kısmının baş, %15' lik kısmının orta kısımda geri kalan kısmın da kuyruk bölümünde olduğunu, ağırlığını 11-13x10^{-8} mg, kuru ağırlığı ise 2,0-2,5x10^{-8} mg olarak belirtmiştir.

Kıvırcık ırkı koçlarda yapılan çalışmalarda; Ak ve ark. (1995), beş baş koçtan elektroejakülatör yardımı ile elde ettikleri spermanın ortalama hacimi 0,89 ml, mass aktiviteyi 4-5+, spermatozoon yoğunluğunu1,87x10^{9}/ml, motiliteyi %87,3 ve morfolojik olarak anormal spermatozoon oranını da %16,5 olarak saptamışlardır. Güleryüz (1995), üç baş Kıvırcık koçtan suni vajina ile elde ettiği spermada gerçekleştirdiği araştırmada, sperma hacmini 1,12-1,28 ml, spermatozoon motilitesini %88-90, yoğunluğu 2,9-3,1x10^{9}/ml ve anormal spermatozoon oranını %4,6-6,46 olarak tespit etmiştir.

Merinos ırkı koçların kullanıldığı çalışmalarda, Tümen ve ark. (1991), motilite oranını %80-90, anormal spermatozoon oranını %2,1-5,7 olduğunu; Gökçen (1977), ortalama sperma hacmini 1,48 ml, spermatozoon konsantrasyonunu 3x10^{9}/ml, normal spermatozoon oranını %95 olduğunu; Aksoy ve ark. (1993), ortalama sperma miktarını 0,9 ml, motiliteyi %76,7, spermatozoon yoğunluğunu 2,68x10^{9}/ml, anormal spermatozoon oranını %6,17 olarak bildirmişlerdir. Merinos ırkı koçlarda, sperma alma yöntemleri olan suni vajina ve elektroejakülatör uygulamaları karşılaştırılmış, hacim ve canlı spermatozoon oranlarının her iki yöntemde benzer olduğu, kitle hareketi ve yoğunluk değerlerinin suni vajina yönteminde daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir (Mattner ve Voglmayr 1962).

2.7. Koçlarda Sperma Alma Yöntemleri

Koçun yetişkin beden ağırlığının %40-60'ına ulaşıldığı 4-6 aylık yaşta, alınan ejakulatlarda canlı spermatozoonların varlığı gözlemlenmektedir (Hafez 1993). Koçlardan farklı yöntemlerle sperma almak mümkündür. Ancak genel olarak, diğer ruminantlarda da olduğu gibi koçlardan da suni vajina ve elektroejakülatör yardımı ile sperma alınmaktadır. Bu yöntemlerin yanı sıra, günümüzde pek tercih edilmeyen normal aşım sonrası vajinaya bırakılan spermanın geri toplanmasıyla da sperma almak mümkündür.

2.7.1. Suni Vajina Yardımı İle Sperma Alma

Suni vajina yöntemi, koçlarda sperma toplamada uygulanan en başarılı yöntemdir. Koç suni vajinası 5 cm iç çapında ve 19-20 cm uzunluğunda silindirik bir şekle sahiptir. Sert plastik yapıdan oluşan dış bölüm, kauçuk yapıya sahip yumuşak iç lastik, irtibat hunisi ve ucunda da dereceli bir toplama tüpünden oluşmaktadır. Suni vajina üzerinde, uygun basıncı ve sıcaklığı sağlamak için bir vana bulunmaktadır. Sperma alma işleminde kullanılacak olan suni vajinanın iç sıcaklığı 41-44 ºC olmalıdır. Hayvanlar arası çapraz kontaminasyonun önüne geçebilmek için suni vajinalar bireysel olarak hazırlanmalı ve her kullanımdan sonra sterilize edilmelidir. Koçlardan suni vajina yardımı ile sperma alabilmek için ortamda östrusta olan bir koyunun olması zaruridir. Koç, hareketi kısıtlanmış koyunun bulunduğu ortama serbest bırakılır ve koyuna yaklaşmasına, genital bölgesini koklamasına izin verilir. Libidosu uyarılan koç aşım öncesi kendine özgü sesler çıkartır ve flehmen hareketi yapar. Koyunun arkasına geçen koçun, bel bölgesi ve kuyruğunda gözlemlenen tik benzeri hareketler aşım yapmaya hazırlandığının göstergesidir. Bu aşamada, sperma alacak kişinin koçu izlemesi ve hazır bir şekilde beklemesi gerekmektedir. Aşım çok seri gerçekleşir ve koçlarda kopulasyon esnasında friksiyon hareketi gerçekleşmez. Bu sebepten dolayı uygulamayı yapan kişi, penisin vajinaya girmesini fırsat vermeden prepisyumundan tutmalı ve suni vajinaya yönlendirmelidir. Tekniğine uygun olarak hazırlanmış suni vajinaya glans penis temas ettiği anda koç yüklenme hareketini yapar ve ejakülasyon gerçekleşir. Yüklenme hareketi sonrası suni vajina penisten hemen çıkartılmaz, koçun koyundan inmesi beklenir. Koçun koyundan inmesi sonrası suni vajina penisten çıkartılır ve içerisindeki spermanın geri akmaması için yere vertikal pozisyonda 10-15 saniye süre tutulur. Ardından, suni vajinanın vanası açılarak içerisindeki basınç azaltılır ve spermanın toplama kadehine daha hızlı akması sağlanır (Ak 2005a).

Avantajları ve dezavantajları (Ak 2005a):

- Doğal aşıma en yakın olan yöntemdir ve suni vajina yardımı ile alınan spermanın kalitesi, diğer yöntemlere göre daha yüksektir.
- Uygulamayı yapabilmek için bir veya en fazla iki personel yeterlidir.
- Bu yöntem ile erişkin ve deneyimli bir koçtan günde 3-8 kere sperma alınabilir.
- Sperma alabilmek için mutlaka östrusta olan bir koyuna ihtiyaç vardır.

- Koçun sperma alma işlemine deneyimli olması gerekmektedir. Bunun için de koçun puberta sonrası suni vajina ile sperma vermeye alıştırılması gerekmektedir. Alışma süresi bireysel olarak farklı süreler alabilmekte ve bu süre için de ayrıca iş gücü ve mesai gerekmektedir. Buna rağmen, bazı koçlar alıştırma dönemi sonrasında sperma vermeyi reddedebilir.

- Uygulama esnasındaki en ufak dikkatsizlikte çiftleşme riski bulunmaktadır.

- Özellikle soğuk havalarda, sperma alma süresi uzadığı taktirde, suni vajinanın yenisi ile değiştirilmesi veya tekrardan hazırlanması gerekmektedir.

2.7.2. Elektroejakülatör Yardımı İle Sperma Alma

Sağlıklı bir koç herhangi bir sebepten dolayı aşım yeteneğini kaybetmişse (arka ekstremite problemleri vb.) veya suni vajina ile sperma alma işlemini kabul etmiyorsa kullanılan bir yöntemdir. Yöntemin prensibi, raktal yolla elektrik akımı verilerek ejakülasyon merkezinin stimüle edilmesi ve ereksiyon olmaksızın spermanın toplanmasına dayanmaktadır (Ak 2005a).

Uygulama öncesinde sperması alınacak olan koç, ksilazin, detomidin vb. aneljezik-sedatif etki gösteren bir ilaç ile sakinleştirilir (Marco-Jiménez ve ark. 2005) ve sağ tarafı altta olacak şekilde yatırılarak zapt-ı raptı sağlanır. Testis, özellikle de kauda epididimis palpasyon ile muayene edilir. Sperma toplama işlemine başlamadan önce, kontaminasyon kaynağı olabilecek partiküllerin uzaklaştırılması için prepisyum ucu ve etrafında bulunan kılların bir makas yardımı ile uzaklaştırılması sağlanır ve bölge serum fizyolojik ile temizlenerek kurulanır. Elektroejakülatör cihazının bipolar probu (uzunluk x çap;19 x 3,5 cm) ince bir vazelin katmanı ile kayganlaştırılır ve üzerine serum fizyolojik sıkılarak koçun rektumuna 8-10 cm girecek şekilde dikkatlice yerleştirilir. Elektrik akımının ejakülasyon merkezini uyarabilmesi için prob üzerinde bulunan elektrotların ventral pozisyona bakmasına ve rektum içerinde gaita olmamasına dikkat edilir. Elektriksel uyarım 2 volt elektrik akımın verilmesi ile başlanır ve 2-3 saniye aralıklarla kademeli olarak 5 veya 8 volta kadar çıkılır. Bu şekilde 7 ile 10 uyarım sonrasında ejakülasyon gerçekleşir. Steril bir dereceli toplama kadehine alınan spermanın çevre koşullarından (soğuk şoku, güneş ışığı vb.) etkilenmeden muayene edilmek üzere laboratuvara ulaştırılması sağlanır (Ak 2005a).

Avantajları ve dezavantajları (Ak 2005a; Alçay 2015):

- Spermanın alınabilmesi için östrusta olan bir koyuna ihtiyaç yoktur.
- Aşım yeteneği olmayan koçlardan sperma almak mümkündür.
- Uygulamaya alışık olmayan koçlar ilk zamanlarda direnç gösterseler de alıştıktan sonra kolayca sperma verirler. Hatta bazı koçlarda şartlı reflekse bağlı olarak, probun rektuma yerleştirilmesi ardından çok az sayıda elektrik akımı verilmesi sonrası sperma alınabilmektedir.
- Suni vajina yardımı ile elde edilen spermaya yakın kalitede sperma elde edilir.
- Koçun latero-lateral pozisyonda yatırılması ve zapt-ı raptı için fazla sayıda personele ihtiyaç vardır,
- Uzmanlık gerektiren ve deneyimli kişilerce uygulanması gereken bir yöntemdir .

Günümüzde koçlardan sperma alma yöntemi olarak en çok tercih edilen suni vajina ve elektroejakülatör yöntemleri karşılaştırıldığında; elektroejakülatör yardımı ile alınan spermanın hacimsel olarak daha fazla olduğu (Doğan ve ark. 2005; Dziuk ve ark. 1954; Quinn ve White 1966; Pineda ve ark. 1987; Pineda ve Dooley 1991; Matter ve Voglamyr 1962; Salamon ve Morrant 1963) bildirilmiştir. Bunun sebebi uygulanan elektrik akımının erkek eklenti bezlerinin salgılarını artırması olarak açıklanmaktadır (Platz ve ark. 1976; Dooley ve Pineda 1986). Ancak, sperma hacminin artması ile doğru orantılı bir şekilde elde edilen toplam spermatozoon sayısının artmadığı (Dziuk ve ark. 1954; Pineda ve ark. 1987) ve spermatozoon yoğunluğunun suni vajina yardımı ile elde edilen spermaya göre elektroejakülatör yönteminde daha düşük olduğu bildirilmiştir (Hulet ve ark. 1964). Suni vajina ile elde edilen spermanın, elektroejakülatör yardımı ile elde edilen spermaya göre soğuk şokuna karşı daha dayanıklı olduğu vurgulanmaktadır (Quinn ve ark. 1968). Jimenez-Rabadan ve ark. (2016); teke ve koç sperması ile yaptıkları çalışma sonucunda, teke spermanın dondurulması eritilmesi sonrası elektroejakülatör yardımı ile alınan spermanın soğuk şokuna karşı daha duyarlı olduğunu, bu sebepten dolayı elektroejakülatör ile alınan teke spermasının dondurulmasında farklı dondurma ve sulandırma yöntemlerinin kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, koç sperması dondurulmasında her iki sperma alma yöntemini karşılaştırmışlar, ancak eritme sonrası spermatolojik özellikler bakımından bir fark tespit etmemişlerdir.

2.7.3. Aşım Sonrası Spermanın Vajinadan Geri Toplanması

Günümüzde tercih edilen bir yöntem değildir. Bu yöntemde vajinaya ejaküle edilen spermanın tamamen geri alınması mümkün değildir ve kullanılan koyunun östrus döneminde olmaması gerekmektedir. Böylece, istenmeyen gebeliklerin önüne geçilmesinin yanında östrus döneminde olan koyunun vajinal sekresyonlarının spermaya karışması engellenir. Koçlar östrus döneminde olmayan koyunlara aşım yapma eğilimi göstermezler. Bu sebepten dolayı, koç öncelikle östrusta olan bir koyun ile aynı ortama bırakılır, birkaç kez koyuna atlamasına müsaade edilir, ancak kopulasyonun gerçekleşmesine izin verilmez. Daha sonra, libidosu artırılan ve aşım yapmaya kararlı hale gelen koç, spermanın vajinasından geri alınacak koyuna atlatılır. Uygulama öncesi koyunun vajinasının temizlenmesi gerekmektedir. Spermanın geri toplanması için özel pipetler kullanılır. Bu yöntem ile spermanın belli bir miktarı geri alınabilse de damızlık koçlardan verimli bir şekilde faydalanmak mümkün değildir (Ak 2005a).

2.8. Koç Spermasının Muayenesi

Koç spermasının değerlendirilmesine yönelik çok sayıda test bulunmaktadır. Bunlar fizikokimyasal, makroskobik ve mikroskobik muayeneler olmak üzere sınıflandırılabilir.

2.8.1. Spermanın Makroskobik Muayenesi

Spermanın değerlendirilmesinde mikroskop veya başka bir cihaza gerek duyulmaksızın görsel olarak gerçekleştirilen muayenelerdir. Hacim, renk, viskosite (kıvam), koku ve kitle hareketi, koç spermasının makroskobik olarak incelenebilen muayene çeşitleridir. Koç spermasında kitle hareketi muayenesi hem makroskobik hem de mikroskobik olarak gerçekleştirilebilir.

2.8.1.1. Hacim

Bir ejakülasyonda elde edilen sperma miktarıdır. Sperma toplama kadehleri, üzerlerinde ml cinsinden hacmi gösteren derecelere sahiptirler. Sperma alındıktan sonra kadeh üzerindeki derecelerin okunması ile hacim belirlenir. Diğer çiftlik hayvanlarına kıyasla koç spermasının hacmi düşüktür. Yetişkin bir koçun sperma hacmi 0,7-1,2 ml (ortalama 1 ml) arasındadır (Maxwell ve Salamon 1993). Bu değer çevre koşullarına, mevsime, ırka, yaşa, beslenmeye, genel sağlık durumuna, koçun kondisyonuna, ortamda koyun varlığına, sperma alma yöntemine ve sıklığına göre farklılık gösterebilmektedir

(Hafez 1993; Mattner ve Voglmayr 1962; Trimberger 1974; Evans ve Maxwell 1987; Gökçen 1990; Tekin ve ark. 1991).

2.8.1.2. Renk

Sağlıklı koç spermasının rengi; spermatozoon yoğunluğu, eklenti bezlerinin salgısı ve spermanın kıvamı ile ilişkili olarak açık kremden koyu kreme kadar değişebilmektedir. Riboflavine preparatlarının kullanımı sonrası ve rasyonun β-karotenden zengin olması sonucunda sperma rengi sarı-yeşil olarak gözlemlenebilir. Patolojik olarak, spermanın kırmızı-kahverengi olması ejakülatın kan (hemospermie), sarı renk olması idrar (ürospermie), sarı-yeşilimsi bir renk olması da irin (pyospermie) ile kontamine olduğunun göstergesidir (Çoyan ve ark. 2002).

2.8.1.3. Viskozite (Kıvam, Akışkanlık)

Sıvıların akmaya karşı gösterdiği dirence viskozite denilmektedir. Spermanın kıvamı viskometre cihazı ile ölçülmektedir. Bazı araştırmacılar ise kıvam muayenesini viskometre cihazı kullanmadan 0-5 arası skalada subjektif olarak değerlendirebilmektedir (Mert ve ark. 2016). İçerdiği yoğun spermatozoon miktarından dolayı normal bir koç spermasının kıvamı koyu niteliktedir (Çoyan ve ark. 2002). Kıvam akışkanlıkla ters, yoğunlukla doğru orantılıdır. Deneyimli araştırmacılar kıvamın subjektif değerlendirmesi ile spermanın sahip olduğu spermatozoon konsantrasyonu hakkında fikir sahibi olabilirler (İleri ve ark. 2000; Ömür 2015). Viskozitenin yüksek olduğu sperma içerisinde, progresif motil spermatozoonların ilerleme hızları daha düşüktür (Alçay 2015).

2.8.1.4. Koku

Spermanın kendine özgü bir kokusu vardır ve bunun dışındaki kokuların varlığı patolojik bir durumun göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Sönmez 2013).

2.8.1.5. Kitle Hareketi (Mass Aktivite)

İçerdiği yoğun spermatozoon sayısı nedeniyle koç spermasında kitle hareketi makroskobik olarak incelenebilir (Çoyan ve ark. 2002). Sperma alınmasının ardından, şeffaf toplama kadehi ışığa tutulur ve spermatozoonların toplu hareketinden kaynaklanan girdap ve kaynama benzeri hareketler gözlemlenir. Değerlendirmede ++++ puanlama sistemi (+, ++, +++, ++++) kullanılır. Kitle hareketinin derecesi ile spermatozoon yoğunluğu arasında pozitif bir korelasyon vardır (Evans ve Maxwell 1987; İleri ve ark. 2000).

2.8.2. Spermanın Mikroskobik Muayenesi

Spermanın değerlendirilmesinde ayrı bir öneme sahip testlerdir. Ağırlıklı olarak spermatozoonların canlılığı ve morfolojisi mikroskop altında değerlendirilir.

2.8.2.1. Kitle Hareketi (Mass Aktivite)

Koç spermasının değerlendirilmesinde kullanılan kitle hareketi makroskobik ve mikroskobik olarak incelenebilir. Taze ve sulandırılmamış sperma örneğinden bir damla lam üzerine damlatılır ve üzerine lamel kapatılmaksızın ısıtma tablalı mikroskop ile 50 veya 100 büyütmede incelenir. Damlanın periferinde gözlemlenen dalgalanma, kaynama veya girdap benzeri hareketler derecelendirilerek puanlanır. Bazı araştırmacılar değerlendirmede 0-5 veya 0-10 arası puanlama kullanmaktadır (İleri ve ark. 2000; Ak 2005b). Yetişkin ve sağlıklı bir koçun kitle hareketi +++ veya ++++'dür. Kitle hareketi muayenesi ile spermatozoon motilitesi, yoğunluğu ve potansiyel fertilite yeteneği hakkında bilgi sahibi olunur (Hafez 1993). Alçay ve ark. (2014), Kıvırcık ve İvesi ırkı koçlarda gerçekleştirdikleri çalışmada, kitle hareketi ile motilite ve spermatozoon fonksiyonel membran bütünlüğü arasında pozitif; akrozom bozukluğu ve DNA fragmentasyonu arasında ise negatif korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir.

2.8.2.2. Motilite Muayenesi

Spermatozoonlarda başlıca dört hareket şekli gözlemlenmektedir (ileriye/progresif, dairesel/sirküler, yerinde titreşme/vibratör ve geriye/revers) (Hafez 1993). İleri ve doğrusal hareket eden spermatozoonların tüm spermatozoonlara oranı motilite olarak tanımlanmaktadır (%). Bu yeteneğe sahip olan spermatozoonlara da motil spermatozoon denir. Subjektif bir muayene yöntemi olan motilite yüzdesel olarak değerlendirilmektedir. Bilgisayar destekli sperma analiz cihazlarında ise objektif olarak değerlendirilmektedir.

Koç spermasında spermatozoon yoğunluğu oldukça yüksektir. Motilite muayenesi için ilk olarak sperma ile aynı sıcaklıktaki izotonik ve tampon solüsyonlarla spermanın sulandırılarak seyreltilmesi gerekmektedir. Sulandırılan örnekten alınan bir miktar (3-5 µl) sperma lam üzerine damlatılır ve üzeri lamel ile kapatılır. Spermatozoonları doğal sıcaklıklarına benzer ortamda hareketlerini izlemek ve soğuk şokundan korumak amacı ile tüm işlemler mikroskoba adapte edilmiş ısıtma tablası üzerinde gerçekleştirilir. Hazırlanan preparat faz kontrast mikroskopta 200 veya 400 büyütmede değerlendirilir. Preparatın en az üç sahası incelenerek ileriye doğrusal hareket

eden spermatozoonlarının oranı değerlendirilir (Ak 2005b; Ömür 2015). Taze koç spermasının motilite oranı %85-90'dır (İleri ve ark. 2000; Hafez 1993). Suni tohumlamada kullanılacak olan spermanın motilite oranı en az %70 olmalıdır (Evans ve Maxwell 1987).

Spermatozoonun potansiyel fertilite yeteneğini belirlemede motilite muayenesi büyük önem taşımaktadır. Gerçekleştirilen birçok çalışmada motilite ile fertilizasyon arasında güçlü bir ilişkinin olduğu bildirilmiştir (İleri ve ark. 2000; Hafez 1993; Anderson 1945). Wiemer ve Ruttle (1987), motilite ile anormal spermatozoon oranı arasında negatif ilişki olduğunu, Alçay ve ark. (2014) ise motilite oranı ile spermatozoon membran bütünlüğü arasında pozitif, DNA hasarı oranı arasında ise negatif korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir.

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

2.8.2.3. Spermatozoon Yoğunluğu

Spermatozoon yoğunluğu, birim hacimde yer alan spermatozoon sayısını tanımlamaktadır. Yoğunluk tayini hemositomerik, elektronik sayaç ve fotolometrik gibi çeşitli yöntemlerle yapılabilmektedir. Taze koç spermasının yoğunluğu 2-3x10^9/ml'dir. Spermanın konsantrasyon tayinin yapılması suni tohumlama uygulamalarında kullanılacak tohumlama dozunun ayarlanması için gerekli sulandırıcının hesaplanması için gereklidir (Hafez 1993). Spermatozoon yoğunluğu mevsim, hayvanın yaşı, beslenme durumu, sperma alma yöntemi ve sperma alma sıklığına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Elektroejakülatör yardımı ile alınan spermada seminal plazmanın hacimsel olarak fazla olmasından dolayı birim hacimdeki spermatozoon yoğunluğu düşük olmaktadır (Platz ve ark. 1976; Dooley ve Pindeda 1986).

2.8.2.4. Ölü/Canlı ve Morfolojik Bütünlük Muayenesi

Doğal olarak her ejakülat içerisinde belli oranda morfolojik bütünlüğünü ve/veya canlılığını kaybetmiş spermatozoonlar bulunur. Damızlık olarak kullanılacak bir koçun sperması içerisinde ölü ve morfolojik bozukluğa sahip spermatozoon oranının %15-20'yi geçmemesi gerekmektedir (Ak 2005b).

Morfolojik bozukluklarının identifikasyonunda değişik sınıflandırmalar kullanılmaktadır. Kimi araştırmacılar spermatozgenezis sırasında meydana gelen bozuklukları (armut başlı, dar başlı, çift başlı, abaksiyal, paraksiyal, retroaksiyal bağlanma, keskin kıvrık, fibrilli kuyruk vb.) primer bozukluk olarak tanımlamışlardır. Kuyruksuz baş, proksimal ve distal damlacıklık, kıvrılmış kuyruk gibi spermatozoonların kanal sisteminden geçiş esnasında meydana gelen bozukluklara da sekonder bozukluk olarak sınıflandırılmıştır. Kimi araştırmacılar ise morfolojik bozukluğun derecesine göre majör ve minör bozukluk olarak sınıflandırma yapmışlardır (Marrow 1986). Diğer bir sınıflandırma yönteminde ise morfolojik bozukluklar birincil, ikincil ve üçüncül bozukluklar şeklinde gruplandırılır. Bu sınıflandırma yöntemine göre spermatogenezis sırasında meydana gelen bozukluklara birincil, kanal sistemi geçişinde meydana gelen bozukluklara ikincil ve ejakülasyon sırasında veya sonrasında meydana gelen bozukluklara da üçüncül bozukluklar denilmektedir (Hafez 1993). Günümüzde ise morfolojik bozuklukların sınıflandırılmasında genel olarak bozukluğun yer aldığı lokalizasyon dikkate alınmaktadır. Bunlar; akrozom, baş, implantasyon çukurluğu, başın orta bölüme bağlanması ile ilgili, orta bölüm ve kuyruğa ait bozukluklardır (Ak 2005b).

Ölü canlı oranı veya morfolojik bozuklukların tespitinde faz kontrast ve ışık mikroskobunun yanı sıra detaylı morfolojik muayene için elektron mikroskobu da kullanılmaktadır. Ölü spermatozoonların tespitinde eosin-nigrosin boyama yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Vital bir boya olan eosin, ölü spermatozoonun membranını geçerek stoplazmayı pembe-kırmızı renkte bayarken, canlı spermatozoonun hücre membranı eosin boyasını geçirmediği için stoplazma boyanmaz. Nigrosin lam üzerinde negatif kontrast oluşturması için kullanılan fon boyasıdır. Morfolojik bozukluk oranını belirlemede çeşitli boyama tekniklerinin (rose bengal, çini mürekkebi, giemsa, metilviolet, opal mavisi vb.) yanında tespit solüsyonlarından da (Hancock solüsyonu vb.) yararlanılır (Ak 2005b).

2.8.3. Hipoozmotik Şişme Testi

HOST (hypo-osmotic swelling test: hipo-ozmotik şişme testi); spermatozoonlarda fonksiyonel membran bütünlüğünün tespitinde kullanılan muayene yöntemidir. Spermatozoonlar düşük ozmotik basınca sahip ortamlarda membransal reaksiyon göstererek hücre içerisindeki ve çevresindeki ozmotik basıncı dengelemeye çalışırlar. Ekilibrasyon sırasında su spermatozoon membranı içerisine girer ve özellikle kuyruk

bölgesinde var olan fibrillerin dinamiğini bozarak kıvrılmaya neden olur. Sperma hipoozmotik ortamda bir süre tutularak reaksiyon veren membranı fonksiyonel spermatozoon oranları belirlenmektedir (Bacinoglu ve ark. 2008; Cirit ve ark. 2013).

2.8.4. Gelişmiş Spermatolojik Muayene Yöntemleri

Son yıllarda meydana gelen biyoteknolojik gelişmeler sayesinde daha güvenilir ve detaylı sonuçlar verebilen spermatolojik analiz yöntemleri kullanıma girmiştir. Bu yöntemlerden biri olan akış (flow) sitometrisi yönteminde cihazın kapillar kanal sistemine yönlendirilen çok sayıdaki spermatozoonların ayrıntılı muayenesi yapılabilmektedir. Bu sistemde, spermatozoonlar muayene türüne özgü floresan boyalar ile işaretlenmekte (Kanev ve Muranlı 2016) ve 5.000-10.000 gibi yüksek sayıda hücrenin değerlendirilmesi kısa sürede tamamlanmaktadır (Gillan ve ark. 2005). Günümüzde, spermatozoon membranı, akrozom membranı, mitokondriyal aktivite, kapasitasyon, DNA fragmentasyonu, canlılık, oksidatif stres gibi birçok spermatolojik analizde floresan ataçmanlı faz kontrast mikroskobu ve akış sitometrisi kullanılmaktadır.

Spermatozoon membranının fiziksel ve fonksiyonel bütünlüğünde var olan hasarlar, spermatozoonun fertilizasyon yeteneğinde oluşan azalmanın göstergesidir (Silva ve Gadella 2006). Spermatozoon membran bütünlüğü muayenesinde kullanılan floresan boyalar iki kategoriye ayrılmaktadır. Birincisi, floresan ışık altında direkt olarak ışıma yapan boyalardır (Hoechst 3358, PI, YoPro-1 vb.). Diğer grup boyalar ise tek başlarına floresan ışık altında yansıma göstermezler (CFDA, SYBR-14 vb.). Bu boyalar sağlam ve fonksiyonel membrandan geçebilme özelliğine sahiptirler ancak ışıma yapabilmeleri için hücre içerisinde bulunan enzimler tarafından hidrolize olmaları gerekmektedir (Farah ve ark. 2013). Koç spermatozoonu membran bütünlüğünün tespitinde ikili boyama yöntemi CFDA-PI (5(6)-carboxyfluorescein diacetate-propidium iodide) kombinasyonu yaygın olarak tercih edilmektedir. Araştırmacılar iki boyayı birlikte kullanarak daha güvenilir sonuçlar elde etmeyi amaçlamaktadırlar. Hücre içine giren 5(6)-carboxyfluorescein diacetate, esteraz enzimi tarafından "yeşil renkte floresan ışıma kapasitesine sahip 6-carboxyfluorescein'e" dönüştürülür. 6-carboxyfluorescein imperbeabl özelliğinden dolayı hücre içerisinde uzun süre kalmakta ve bu sayede daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir. PI floresan boyası ise membran bütünlüğünü kaybetmiş ölü hücrelerin membranlarından geçebilmektedir. Hücre içerisine giren PI spermatozoonun genetik materyaline bağlanarak kırmızı renkte ışıma yapmaktadır

(Garner ve ark. 1986). CFDA-PI boyaması ile hücre canlılığı ve membran bütünlüğü muayenesinin yanında, hücre içi enzimatik aktivite kontrolü de sağlanmış olur.

Spermatozoon akrozom bütünlüğü, fertilizasyon için esastır. Çeşitli floresan olmayan boya veya tespit solüsyonları ile akrozom bütünlüğünün muayenesi gerçekleştirilebilse de günümüzde floresan boyama teknikleri araştırmacılar tarafından daha çok tercih edilmektedir. Bu amaçla; FITC-PNA (fluorescein isothiocyanate labeled peanut agglutinin) (Lee ve ark. 2010; Marco-Jiménez ve ark. 2005) ve FITC-PSA (fluorescein isothiocyanate labeled pea plant agglutinin) (Collodel ve ark. 2012) floresan boyaları daha çok tercih edilmektedir. Bu boyalar da PI ile kombine olarak kullanılmakta ve akrozomu "sağlam-canlı", "akrozomu hasarlı-canlı", "akrozomu sağlam-ölü" ve "akrozomu hasarlı-ölü" spermatozoon oranları tespit edilmektedir (Alvarez ve ark. 2012).

Spermatozoonun orta bölümünde lokalize olan aksanom ve fibril yapıları mitokondrial heliks ile çevrilmiştir. Mitokondrinin başlıca görevi hücre içi ATP kaynakları vasıtası ile enerji üretmek ve motilitenin devamlılığını sağlamaktır (Garner ve Hafez 1993). Spermatozoon mitokondriyal aktivitesinin belirlenmesinde Rhodamine 123 (R123), MitoTracker^{TM} (MITO) ve 5,50,6,60-tetrachloro-1,10,3,30-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) floresan boyaları kullanılmaktadır. JC-1 boyasının avantajı; mitokondriyal aktivite gösteren spermatozoonların tespitinin yanı sıra aktivitenin derecesini de (düşük ve yüksek aktivite) belirleyebilmesidir (Garner ve ark. 1997).

Spermada sulandırma işlemi, sulandırıcıdaki kimyasallar, membran lipid oksidasyonu, soğutma, dondurma ve eritme aşamalarında oluşan stresler spermatozoonlarda erken kapasitasyon veya kapasitasyon benzeri olumsuz değişikliklere neden olurlar. Kapasitasyon sonucunda spermatozoonlarda hiperaktivasyon meydana gelir (Yanagimachi 1994). Hiperaktivasyon, spermatozoonların ovidukt epitel hücreleri arasından geçmesi, fertilizasyon bölgesine ulaşabilmesi ve zona pellusidaya penetre olabilmesi için gereklidir (Demott ve Suarez 1992; Katz ve ark. 1978). Kapasitasyonun mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte spermatozoon membranında meydana gelen kolesterol kaybı sonrası permeabilitenin bozulduğu ve hücre içi Ca^{++} iyonu girişine neden olduğu bilinmektedir (Harrison ve ark. 1992). Kapasitasyonun muayenesi membran Ca^{++} iyonlarının işaretlenmesi ile yapılabilmektedir. Bu amaçla CTC (chlortetracycline) boyama yöntemi uygulanmaktadır. Bir Ca^{++} iyonu şelatörü olan CTC

(Saling ve Storey 1979), kalsiyumla birleşince aktive olarak floresan ışıma özelliği kazanmakta ve membran üzerindeki Ca^{++} iyonlarının lokalizasyonu belirlenerek kapasitasyon durumu değerlendirilebilmektedir (Fraser ve ark. 1995). CTC boyaması ile spermatozoon baş kısmının tamamen boyanması "F patern" (F: full, non-kapasite), post akrozomal bölgenin boyanması "B patern" (B: banded, kapasite) ve ekvetoryal bölgenin boyanması "AR patern" (AR: akrozom reaksiyonu) olarak isimlendirilir (Fraser ve ark. 1995; Cormıer ve ark. 1997).

2.9. Spermanın Kriyoprservasyonu

Reprodüksiyon biyoteknolojisinin temeli ve en yaygın kullanılan yöntemi suni tohumlama biyoteknolojisidir. Hayvan ıslahı, damızlık erkek hayvan besleme gerekliliğinden kurtulma, değerli erkek damızlık hayvanlardan coğrafi olarak geniş yelpazede yararlanma, veneral olarak bulaşıcı hastalıklardan korunma hatta eradikasyonu bu yöntemle mümkün olabilmektedir (Özkoca 1984; Hafez 1993; İleri ve ark. 2000). Suni tohumlama biyoteknolojisinden yaralanabilmek için öncelikle spermanın başarılı bir şekilde kriyopreservasyonu gerekmektedir.

Spermanın kriyoprezervasyonu; türe özgü medyumlarla sulandırılması, 5°C'ye soğutulması, dondurulması ve eritilmesi işlemlerini kapsamaktadır (Holt 2000; Curry ve ark. 2000; Arıcı 2017). Tüm bu aşamalar, spermatozoonlar üzerinde fiziksel ve kimyasal stres faktörlerinin oluşmasına neden olmaktadır. Spermatozoonların bu streslere karşı göstereceği direnç türe özgü olarak farklılık göstermektedir. Koç sperması donma-eritme işlemlerinin zararlı etkilerine karşı oldukça hassastır. Bunun sebebi; spermatozoon membranının doymamış yağ asitlerinden (fosfolipit) zengin olması nedeniyle kolesterol/fosfolipit oranının düşük olmasıdır (Watson 1981). Bu yapısal farklılık, ani sıcaklık değişimlerinde ve faz geçişlerinde spermatozoon membranında dönüşü olmayan hasarlara sebebiyet vermektedir (Watson 1995).

2.9.1. Sperma Sulandırıcıları ve Özellikleri

Spermanın başarılı bir şekilde dondurulması kullanılan sulandırıcı içeriğiyle doğrudan ilişkilidir. Uygun bir sperma sulandırıcısı; spermatozoonu soğuk şokunun zararlı etkilerine karşı korumalı, enerji kaynaklarını içermeli, uygun elektrolit dengesine sahip olmalı, ortam pH dengesini ve ozmotik basınç balansını sağlayabilmeli, mikrobiyal üremeyi baskılamalı, spermatozoon kaynaklı metabolit artıklar ile serbest radikalleri

elimine edebilmeli ve dişi genital kanalda zararlı etki oluşturmamalıdır (İleri ve ark. 2000; Hafez 1993).

Spermatozoon metabolizması, içerisinde bulunduğu ortamda pH değişikliklerine neden olmaktadır. Bu sebepten dolayı sulandırıcı içerisinde Tris, Na sitrat vb. pH tampon maddelerinin bulunması elzemdir. Boğa, domuz ve koç sperması dondurulmasında Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) bazlı sulandırıcılar ile başarılı sonuçlar alınmıştır (Visser 1975). Salamon ve Visser (1972), koç spermatozoonlarının 250-400 mM arası Tris konsantrasyonu tolere edebildiği ve fruktoz, laktoz veya rafinozdan ziyade glikoz ilavesinin uygun olacağını açıklamışlardır. Tris bazlı sulandırıcılarda glikoz, sakkaroz ya da laktoz ilaveleri ile daha başarılı *in vitro* sonuçların elde edildiğini savunan çalışmalar da mevcuttur (Zamfirescu ve ark. 1980). Fischer (1990), ozmotik basıncı 375 mOsm/kg olan ve %2 yumurta sarısı içeren Tris bazlı sulandırıcının eritme sonrası motilite ve akrozomal bütünlüğü koruduğunu bildirmiştir.

Yapısında spermatozoonu sağuk şokundan koruyan herhangi bir madde olmamasından dolayı Tris bazlı sulandırıcılar genellikle yurmurta sarısı ile kombine edilerek hazırlanmaktadırlar (Kulaksız ve ark. 2010). Yumurta sarısı, taşıdığı düşük yoğunluktaki lipoproteinler (LDL; low density lipoproteins) sayesinde spermatozoon membranındaki fosfolipit bütünlüğünü korur ve hücrenin soğuk şokuna karşı direncini artırır (Ak 2005d). Bu maddelerin sahip olduğu koruyucu etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Blackshaw 1954; Banaszac ve ark. 1991). Ancak genel olarak spermatozoon membranına bağlanarak yapısal değişiklere neden oldukları düşünülmektedir (Madden 1979). LDL, donma esnasında hücre zarında cereyan eden faz değişimi sırasında membran ile etkileşime girerek, seminal plazma kökenli katyonik peptitlerin zararlı etkilerini hafifletmektedir (Vishwanath ve ark. 1992; Drobnis ve ark. 1993; Nauc ve Manjunath 2000; Manjunath ve ark. 2002). Ayrıca, yumurta sarısı içerisinde var olan hemopeksin ve transferrin gibi proteinlerin antioksidan özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Pini ve ark. 2018).

Etki ve optimal konsantrasyonu üzerine birçok çalışma yapılmış olan yumurta sarısı, günümüzde birçok hayvan türünde yaygın olarak kullanılmaktadır (Salamon ve Maxwell 2000). Yumurta sarısının etkinliği sulandırıcı kompozisyonuna bağlı olarak değişmektedir. Bu alanda gerçekleştirilen ilk çalışmalar sonucunda %30-50 oranında yumurta sarısının sulandırıcı içerisine ilave edilmesi önerilmiştir. Ancak, sonraki

çalışmalarda daha düşük oranlardaki yumurta sarısının da etkili olduğu kanıtlanmıştır (Salamon ve Maxwell 2000). Bazı araştırmacılar %1,5-3,75 arasındaki yumurta sarısının yeterli olabileceğini savunurken, kimi araştırmacılar ise bu oranı yetersiz bulmuşlardır (Graham ve ark. 1978). Milovanov ve ark. (1985), geliştirdikleri sakkaroz-EDTA-$CaNa_2$ sulandırıcısında %4-5 gibi düşük oranda yumurta sarısının yeterli olduğunu; Abdelhakeam ve ark. (1991) ise %25-30 oranında yumurta sarısı kullanarak gliserol ilavesi olmadan koç spermasının başarılı bir şekilde dondurulabileceğini ifade etmişlerdir. Watson ve ark. (1976), yüksek oranda kullanılan yumurta sarısının, akrozomal ve membran stabilizasyon bozukluklarına, erken kapasitasyon veya kapasitasyon benzeri değişiklere neden olduğunu bildirmişlerdir.

Süt içerdiği proteinler, laktoz ve diğer identifiye edilmemiş maddeler sayesinde soğuk şokunun zararlı etkilerine karşı spermatozoonları korumaktadır (Ari ve ark. 2011). Bazı araştırmacılar süt bazlı sulandırıcıları, içerdikleri zengin kriyoprotektif maddelerden dolayı, Tris bazlı sulandırıcılara göre daha başarılı bulmuşlardır (Gordon 1999). Sütün sahip olduğu primer protein kazeindir. Donma-eritme işlemleri sırasında kazein proteinleri, seminal plazma proteinleri ile birleşerek seminal plazma proteinlerinin neden olduğu membrandaki lipid kayıplarını azaltırlar. Bu nedenle, kazein proteininin fiziksel etkiden ziyade daha çok kimyasal bir kriyoprotektif özelliğe sahip olduğu kabul edilir. Ayrıca, kazein antioksidan özellik göstermektedir. Sütte bulunan diğer laktoalbubin ve lipoproteinler de donma eritme aşamalarında spermatolojik özelliklerin korunmasında olumlu etki yaparlar (Ollero ve ark. 1998; Ak 2005c; Bergeron ve ark. 2007). Süt bazlı sulandırıcıların, eritme sonrası motilite, akrozom bütünlüğü ve canlı spermatozoon oranlarını artırdığı bildirilmiş (D'Allessandro ve ark. 2001; D'Alessandro ve Martemucci 2005), sütlü sulandırıcılara özellikle %5 oranında yumurta sarısının ilave edilmesi önerilmiştir (El-Alamy ve Foote 2001; Olafsson 1980; Van Wagtendonk-de Leew ve ark. 2000).

2.9.2. Spermanın Sulandırılması

Sulandırıcı çeşidi ve içeriğinin yanında sulandırma oranı da başarıyı etkileyen önemli bir faktördür. Sulandırma oranı bir payette veya tohumlama dozunda olması istenilen spermatozoon sayısı dikkate alınarak hesaplanır. Spermanın düşük oranda sulandırılması, donmanın zararlı etkilerine karşı spermatozoonlarda yeterli korumayı sağlayamaz. Yüksek sulandırma oranları spermatozoon fertilizasyon kapasitesinin

düşmesine neden olur. Koç sperması yüksek sulandırma oranlarına karşı daha hassastır. Tohumlama hacminin artışı intraservikal tohumlamalarda sorun teşkil eder (D'Allessandro ve ark. 2001; Prathalingan ve ark. 2006; Salamon ve Maxwell 2000; Gil ve ark. 2002; Gil ve ark. 2000; Gil ve ark. 2003). Koç spermasında farklı sulandırıcılar ile gerçekleştirilen çalışmalarda; Ak ve ark. (2010) 1:1 ve 1:3 (sperma:sulandırıcı) sulandırma oranı ile eritme sonrası %41,80±5,22 ve %25,60±5,94 akrozomal bozukluk; Ritar ve Ball (1993) 1:0,5 ve 1:2 sulandırma oranı ile eritme sonrası %37,90±0,81 ve %43,90±0,86 motilite oranı tespit etmişlerdir. Alvarez ve ark. (2012), koç spermasını 200, 400, 800 ve $1600x10^6$ spermatozoon/ml olacak şekilde dondurmuşlar, eritme sonrası $800x10^6$ spermatozoon/ml ve üzeri tohumlama dozlarında spermatolojik özelliklerin olumsuz etkilendiğini bildirilmişlerdir.

Koyunlarda uygulanan tohumlama tekniği dikkate alındığında, vajinal tohumlama için $100\text{-}400x10^6$, laparoskopik tohumlama için $25\text{-}50x10^6$ spermatozoon gerekliliği bildirilmiştir (Fiser ve ark 1987; D'Allessandro ve ark. 2001).

Spermanın sulandırılması tek veya iki aşamada gerçekleştirilir. Tek aşamalı sulandırma yönteminde, sperma kriyoprotektan ilave edilmiş sulandırıcı ile 26-32°C sıcaklıkta kademeli şekilde sulandırılır. İki aşamalı sulandırma yönteminde ise sulandırıcı kriyoprotektan madde içermeyen sulandırıcı A ve kriyoprotektan madde içeren (gliserol, DMSO vb.) sulandırıcı B kullanılır. Sperma 26-32°C sıcaklıkta sulandırıcı A ile kademeli olarak sulandırıldıktan sonra sıcaklığı 5°C' ye düşürülür. Sulandırıcı B ile sulandırma (gliserolizasyon) işlemi yine kademeli şekilde gerçekleştirilir (İleri ve ark. 2000; Hafez 1993; Çoyan ve ark. 2002). Gliserollü sulandırıcının sperma üzerine ilave edilme zamanı, sıcaklığı ve kademeleri ile ilgili birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (Ak ve ark. 2010; Bacınoğlu ve ark. 2007). Araştırmacılar, koç spermasının sulandırılmasında gliserolizasyon işleminin spermatozoon metabolizmasının daha yavaş olduğu düşük sıcaklıklarda olması gerektiğini bildirmektedir (Nur ve ark. 2010; Ak ve ark. 2010; Soylu ve ark. 2007).

2.9.3. Spermanın Soğutulması

Spermanın soğutulması işleminin başlıca amacı spermatozoon metabolizma hızını yavaşlatmak ve hücreleri donma sürecine hazırlamaktır. Bu sayede, spermatozoonlar sahip oldukları enerji kaynaklarını daha uzun süre muhafaza edebilmekte ve daha az metabolit oluşumu sağlanmaktadır (Salamon ve Maxwell 2000).

Spermanın soğutulması süreci koçtan alındığı andan itibaren başlamaktadır. Ejakülasyon sonrası sperma vücut ısısına yakın bir sıcaklığa sahiptir. Metabolizmanın yavaşlatılması amacıyla, alınan sperma 26-32°C sıcaklıktaki su banyosu içerisine yerleştirilir. Gerekli muayenelerin gerçekleştirilmesi sonrası sulandırma işlemleri sırasında spermanın 26-32°C' ye soğuması sağlanır. Koç spermasının 5°C sıcaklığa soğutulma hızı araştırmacılar arasında farklılık göstermektedir. Genellikle 1-3 saat arası sürelerde spermanın soğutulması sağlanır. Spermanın 30°C sıcaklıktan 15°C sıcaklığa soğutma hızının yüksek olması (2°C/dakika) spermatozoon üzerinde önemli ölçüde olumsuz etkiye sebep vermez. Ancak 10°C, 5°C ve 0°C gibi daha düşük sıcaklıklara ulaşmak amacıyla uygulanan hızlı soğutma işlemleri eritme sonrası spermatozoon motilitesine zarar verir (Fiser ve Fairfull 1986; Demir ve ark. 2015). Drobnis ve ark. (1993), 15°C ile 5°C arası sıcaklıklarda spermatozoonun soğuk sokuna karşı oldukça hassas olduğunu ve soğutmaya bağlı membransal yapı elemanlarında yıkımların oluştuğunu bildirmişlerdir. Holt ve ark. (1986), membran yapısında gelişen lethal faz değişimlerin çoğunlukla 17-22°C arası sıcaklıklarda oluştuğunu, Wolf ve ark. (1990), ise aynı etkinin 26°C sıcaklıktan itibaren başladığını rapor etmişlerdir. Fiser ve Fairfull (1986), özellikle 17°C ve daha düşük sıcaklıkların spermatozoonlar için kritik olduğunu, Yavaşca ve ark. (1999), soğuk şokuna bağlı hücrede oluşan olumsuz etkilerin oda sıcaklığında dahi başlayabileceğini vurgulamışlardır. Bu sebeplerden dolayı spermanın kriyoprotektan içermeyen medyumlar ile sulandırılması sonrası 5°C'ye soğutulma sürecinin yavaş ve kademeli bir şekilde, 2 saat ve üzeri sürelerde olması önerilmektedir (Evans ve Maxwell 1987; Salamon ve Maxwell 1995a). Demir ve ark. (2015), koç spermasında gerçekleştirdikleri çalışmada, spermayı 26°C'den 5°C sıcaklığa düşürmede farklı soğutma hızlarını (0,3°C/dk., 0,6°C/dk. ve 0,9°C/dk.) karşılaştırmışlar, 0,3°C/dk. üzerindeki soğutma hızlarının eritme sonrası total ve progresif motilite oranlarını olumsuz etkilediğini tespit etmişlerdir.

İki aşamalı sulandırma yönteminde, sperma 2-5°C sıcaklığa soğutulduktan sonra gliserol içeren sulandırıcı ile tekrar sulandırma işlemine tabi tutulur. Bu sulandırma işlemine gliserolizasyon denir (Salamon ve Maxwell 2000).

Ekilibrasyon, donma öncesi dönemde spermatozoonlar ile gliserolün etkileşimi için gerekli olan süredir. Bu süreç dahilinde gliserol hücre içerisine girmekte, intraselüler ortam ve ekstraselüler ortam arasında ozmotik basınç dengelenmektedir. Ekilibrasyon

aşamasında, gliserolün yanı sıra sulandırıcı içerisinde yer alan diğer maddelerin de aktif rol oynadığı belirtilmektedir. Koç sperması dondurulmasında ekilibrasyon süresi yaklaşık 1-3 saatdir (Salamon ve Maxwell 2000).

2.9.4. Spermanın Dondurulması

Günümüzde farklı türlere ait spermalar dondurulabilmekte ve spermatozoonların fertilite yeteneklerinden uzun süre fayda sağlanabilmektedir. Spermanın fertilite yeteneğinin uzatılması düşüncesinin 18. ve 19. yüzyıla kadar dayanmaktadır. 1776 yılında, İtalyan bilim insanı Lazzaro Spallanzani ilk kez suni tohumlama prosedürünü köpekler için tanımlamış, insan, kurbağa ve aygır spermasının kar içerisinde soğutulabildiğini ve ısıtma sonrası motilite yeteneğinin tekrar kazanıldığını fark etmiştir. Paolo Mantegazza 1866 senesinde insan spermasında sıcaklığın düşmesi ile spermatozoon motilitesi arasındaki ilişkiyi açıklamıştır. Sonraki yıllarda yürütülen çalışmalarla spermanın dondurularak saklanması düşüncesi giderek kuvvetlenmiştir (Holt ve ark. 2014). Ancak, kriyobiyoloji bilim alanının gerçek anlamda önem kazanması ve bu alanda yürütülen çalışmaların hız kazanması, gliserolün kriyoprotektif etkisinin keşfedilmesi ile başlamıştır (Polge ve ark. 1949).

Spermatozoonların 5°C sıcaklığa soğutulması ile metabolizma hızları önemli ölçüde yavaşlatılmakta ve böylece canlı kalma süreleri uzatılabilmektedir. Ancak kısıtlanmış olsa da devam eden metabolik aktiviteler nedeniyle zamanla hücre yaşlanmakta ve bir süre sonra canlılığını kaybetmektedir. Gerçekleştirilen çalışmalar, spermatozoonların yaşlanma hızını önemli ölçüde azaltmanın yolunun, çok daha düşük sıcaklıklarda donma teknikleri ile mümkün olacağını göstermiştir. Spermanın -110°C ile -130°C'de dondurulması ve -196°C'deki sıvı azot içerisinde depolanması sayesinde spermatozoon yaşlanma hızı önemli ölçüde sınırlanır ve uygun eritme yöntemleri sonrası fertilite yeteneklerini uzun yıllar koruyabilir (Medeiros ve ark. 2002).

Donma süreci, spermatozoonlar üzerinde fiziksel, biyokimyasal ve fonksiyonel hasarlara neden olmaktadır. Koç spermatozoonunda daha çok akrozom, hücre membranı ve mitokondriyal heliksin bulunduğu orta kısımda fiziksel hasarlar meydana gelmektedir (Salamon ve Maxwell 2000; Bailey ve ark. 2000). Donma sürecinde hücre içinde oluşan dehidrasyon, büyük çaplı kristalleşme, yoğunluk artışı ve hücre dışı ortamın donması ile oluşan ozmotik basınç değişimleri nedeniyle hücre membranı ve akrozomda protein ve lipoprotein yapıları zarar görür (Hafez 1993).

Morris ve Farrant (1972), kristalizasyon oluşumunun genellikle -6°C ve -10°C sıcaklıklar arasında başladığını bildirmişlerdir. Koç spermatozoonlarında kristalizasyona bağlı oluşan hasarlar ise genellikle -10°C ve -25°C sıcaklıklar arasında meydana gelir (Salamon ve Maxwell 1995b).

Ekstraselüler ortamda kristalizasyonun başlaması, donmamış fraksiyon içerisindeki tuz ve diğer komponentlerin konsantrasyonunda artışa neden olur. Buna bağlı olarak hücre dışı ortamın ozmotik basıncı önemli ölçüde artar ve spermatozoonlar içerisindeki suyun hücre dışı ortama çıkması tetiklenir. Bu durum, uygun olmayan donma hızlarında iki farklı zarara neden olur. Donma hızı yavaş uygulanır ise; hücre uzun süre hipertonik solüsyona maruz kalır, hücresel lipit ve protein kayıpları meydana gelir ve ROS üretimi artar. Donma hızının yüksek olması durumunda ise, termal şok şekillenir, hücresel dehidrasyon yeterince gelişemez ve hücre içi lethal kristal oluşumları meydana gelir (Holt ve ark. 2014; Hafez 1993). Donma sırasında oluşan kristalin yapısı; soğutma hızına, hücre içi ve dışındaki süspansiyonlara, sulandırıcı viskozitesine, membran geçirgenliğine ve meydana gelen ilk kristallere bağlı olarak değişir. Hücresel hasarları minimize etmek için kristallerin küçük hacimde ve çok sayıda olması gerektiği bildirilmektedir (Ak ve ark. 2010).

Koç spermasının dondurulması amacıyla farklı yöntemler kullanılmaktadır. Tatmin edici sonuçların payet yönteminde elde edildiği, spermanın 17-18°C donma hızı ile sıvı azot buharında (110°C -120°C) dondurulması gerektiği bildirilmiştir (Ak 2005c). Spermanın 5°C ile -25°C sıcaklıklar arası; yavaş (0,5°C/dakika) ve hızlı (5°C/dakika) donma hızları karşılaştırılmış, eritme sonrası canlılık, akrozom bütünlüğü, mitokondriyal aktivite ve gebelik oranları hızlı dondurma yönteminde daha başarılı bulunmuştur (O'Neill 1998; Byrne ve ark. 2000).

2.9.5. Spermanın Eritilmesi

Spermatozoon canlılığının devamı ve fertilite yeteneğinin korunmasında donma prosedürü kadar eritme prosedürü de önem arz etmektedir. Payet içerisindeki spermanın erime sürecinde (-196°C'den 37°C sıcaklığa ulaşmasında) -60°C ve -15°C arası kritiktir. Belirtilen bu dönemde spermatozoonlarda ani sıcaklık değişimleri gelişmekte, buna bağlı olarak hücre içi biyokimyasal ve fonksiyonel hasarlar oluşmaktadır (Salamon ve Maxwell 1995b).

Spermanın eritilmesinde hücre içi rekristalizasyon oluşumları meydana gelmektedir. Donma aşamasına benzer olarak, tekrar oluşan bu kristal yapılar hücrelerde hasarlara neden olmaktadır. Rekristalizasyona bağlı oluşabilecek hasarları önlemek için spermanın hızlı bir şekilde eritilmesi gerekmektedir (Holt ve North 1994; Salamon ve Maxwell 2000). Ayrıca, hızlı eritme yönteminde hücre içi ve dışı ortam arasındaki ekilibrasyon daha hızlı sağlanmakta ve spermatozoonların hücre dışı hiperozmotik ortama maruz kalma süreleri kısalmaktadır (Salamon ve Maxwell 2000).

Araştırmacılar, spermanın farklı sıcaklıklarda ve sürelerde eritilmesi ile ilgili birçok çalışma gerçekleştirmişleridir (Pontbriand ve ark. 1989; Salamon ve Maxwell 2000; Holt 2000; Paulenz ve ark. 2004). Konvensiyonel yöntem olarak koç spermasının eritilmesinde, payetin 37°C sıcaklığa sahip su içerisinde 30 saniye süreyle bekletilmesi prosedürü kullanılmaktadır.

2.10. Sperma Dondurulmasında Sulandırıcıya İlave Edilen Kriyoprotektanlar

Gamet hücreleri veya diğer hücre ve dokuların dondurulmasında sulandırıcı içerisinde kriyoprotektif özellik gösteren maddelerin yer alması gerekir.

Kriyoprotektanlar (kriyoprotektif maddeler), donma esnasında meydana gelen ani sıcaklık değişimlerine, hücre içi kristalizasyon ve dekristalizasyon oluşumlarına ve hücre membranı destabilizasyonuna karşı hücreyi koruyan maddelerdir. Etkilerini genellikle ortamda bulunan donmamış fraksiyon miktarını artırmak ve iyon konsantrasyonunu azaltmak suretiyle gösterirler. Donma öncesinde hücreler, kendisine özgü kriyoprotektif maddeler içeren medyumlarda belli süreliğine inkübasyona bırakılır ve intraselüler dengenin oluşması (ekilibrasyon) sağlanır. Optimal oran ve sürelerde uygulandığında, düşük moleküler ağırlığa sahip kriyoprotektif maddeler, hücrelerde fazla toksik etki göstermezler (Payne ve ark. 1994; Palasz ve Mapletoft 1996).

Hücrenin başarılı şekilde donmasında “plazma membranında yer alan protein yapıdaki su kanalları (aquaporin)” kriyoprotektan madde ile suyun basit difüzyonu ve hızlı transport geçişi anahtar rol oynamaktadır. Bu proteinlerin dondurma medyumlarına ilave edilmesi ile hücrelerin sıcaklık ve ozmotik basınç şoklarına karşı daha dirençli olabileceği bildirilmiştir (Edashige ve ark. 2003). Kriyoprotektanlara bağlı toksik etkinin azaltılması için, plazma membranından geçme özelliği olmayan kriyoprotektanların kullanımı ve hücrenin kriyoprotektan maddelere maruz kalma süresinin düşürülmesi gibi çalışmalar yürütülmektedir (Massip 2001).

Kriyoprotektan maddeler gösterdikleri etki mekanizmasına göre genellikle hücre plazma membranından geçebilen (internal, permeable) ve hücre plazma membranından geçemeyen (eksternal, non-permeable) olmak üzere sınıflandırılırlar.

2.10.1. İnternal Kriyoprotektanlar

Plazma membranından geçebilen kriyoprotektanlar başlıca; gliserol, DMSO (dimetilsülfoksit), etilen glikol, 1,2 propanediol, metanol ve acetamide'dir (Bucak ve Tekin 2007). İnternal kriyoprotektanlar donma sırasındaki koruyucu etkilerini; ortamda bulunan elektrolit yoğunluğunu azaltarak, dehidrasyonu düzenleyip hücresel protein yapıları koruyarak ve düşük sıcaklıklara bağlı oluşan ozmotik stresi azaltarak gösterirler (De Leeuw ve ark. 1993; Holt 2000; Mcgann 1978).

Gliserol: Gliserol yüksek oranda hidrofilik özelliğe sahip bir poliol bileşiğidir. Yapısındaki karbon/hidroksit (C/OH) oranının eşit olması, donmanın zararlı etkileri karşısında spermatozoon üzerindeki koruyucu etkinliğini artırmaktadır (Salamon ve Maxwell 1995b). Gliserol, hücrelerde dehidrasyona neden olarak hücre içi büyük çaplı kristal oluşumunu önler (Sayre ve Lewis 1997). Bunun yanında, donma sırasında plazma membranını stabilize ettiği, esneklik sağlayarak ozmotik basınç değişikliklerine karşı membranı koruduğu, membran füzyonunu indüklediği, membran akışkanlığı ve su geçirgenliğini artırarak birtakım faz geçişlerinde yarar sağladığı belirtilmektedir (Noiles ve ark. 1995; Katkov ve ark. 1998). Ayrıca, hücre içi protein ve enzimlerin denatüre olmasını engelleyerek daha sağlıklı bir donma sağladığı, fakat bu etkinin koç sperması dondurulmasında belirgin olmadığı bildirilmektedir (Mann ve White 1957).

Gliserolün hücre üzerinde sahip olduğu birçok koruyucu etkisi yanında toksik etkisinin olduğu da bilinmektedir. Bu etki gliserolün metabolize olması sonucu ortaya çıkan methlglycosal'un hücre membranı biyoenerji balansını değiştirmesi ve ozmotik strese neden olması ile oluşur. Türe bağlı olarak değişen bu etki, özellikle aygır, kanatlı, balık ve tavşanda oldukça belirgindir. Gliserol bu türlere ait spermaların dondurulmasında kontraseptif etki göstererek fertilizasyonu engeller (Katkov ve ark. 1998; Woods ve ark. 2000; Alvarenga ve ark. 2000). Ayrıca, gliserolün dişi genital kanalı mukozasında irritasyona sebep verdiği ve fertilizasyon oranını düşürdüğü bildirilmektedir (Abdelhakeam ve ark. 1991). Gliserole ait olumsuz etkiler dondurma medyumunun içeriğine, gliserolizasyon yöntemine ve soğutma-dondurma hızına göre değişiklik gösterebilmektedir (Fahy 1986; Salamon ve Maxwell 1995b).

Gliserolün kriyoprotektif madde olarak Polge ve ark. (1949) tarafından keşfedilmesinden günümüze kadar sperma kriyobiyolojisi alanında birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda, farklı türlere özel birçok sulandırıcı çeşidi geliştirilmiştir. First ve ark. (1957), farklı oranlarda (%6, %9, %12, %15) gliserol içeren süt bazlı yumurta sarılı sulandırıcısı ile koç spermasını dondurmuş ve eritme sonrası spermatozoon canlılığı oranını en yüksek %6 ve %9 gliserol içeren gruplarda saptamışlardır. Ak (1990), boğa spermasında gerçekleştirdiği çalışmada, süt bazlı yumurta sarılı sulandırıcı içerinde %5, %7 ve %9 oranlarındaki gliserol varlığının eritme sonrası spermatolojik özellikler üzerine etkisini incelemiş ve %5 ve %7 gliserol oranlarını daha başarılı bulduğunu bildirmiştir. Angora, Kilis ve Saanen ırkı tekelerde yürütülen diğer bir çalışmada, %3, %5, %7 ve %9 gliserol konsantrasyonu karşılaştırılmış, eritme sonrası spermatolojik parametreler açısından optimal konsantrasyonun Angora ırkı için %5, Kilis ırkı için %5-9 ve Saanen ırkı için de %7 olduğu tespit edilerek aynı tür içerisinde farklı ırklar arasında da gliserol oranının değişebileceği vurgulanmıştır (Kulaksız ve ark. 2013).

Koç sperması dondurulmasında kullanılan gliserol oranının optimal olarak %4-6 arasında olduğu, ancak bu oranın sulandırıcı ozmotik basıncına bağlı olarak değişebileceği bildirilmektedir (Fiser ve Fairfull 1984; Gökçen ve ark. 1983). Ak ve ark. (2010), koç sperması dondurulmasında gliserol ilavesiz yüksek ozmotik basınca sahip sulandırıcılar ile eritme sonrası daha başarılı motilite oranları tespit etmişler ve gliserolsüz sulandırıcıların *in vitro* fertilizasyon çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Birçok araştırmacı tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, gliserol ile spermatozoon etkileşiminin metabolizmanın yavaşladığı düşük sıcaklıklarda (5°C) olmasının daha sağlıklı olduğu gösterilmiştir (Colas 1975; Soylu ve ark. 2007; Nur ve ark. 2010; Ak ve ark. 2010).

Etilen glikol: Birçok türde gerçekleştirilen çalışmalarda etilen glikolün sperma dondurmadaki etkinliği gliserol ile benzer bulunmuştur. 2 M etilen glikolün aygır spermasının dondurulmasında kullanılması, gliserole kıyasla daha az toksik etkiye neden olduğu tespit edilmiştir (Ball ve Vo 2001; Alvarenga ve ark. 2000).

Etilen glikolün koç sperması dondurulmasındaki etkinliği hakkında yeterince çalışma bulunmamaktadır (Molinia ve ark. 1994). Silva ve ark. (2012b), %3 ve %5

oranında asetamid, %3 ve %5 oranında etilen glikol ve %5 oranında gliserol içeren sulandırıcılar ile koç spermasını dondurmuşlardır. Çalışmacılar eritme sonrası en başarılı motilite oranını %3 etilen glikol ve %5 gliserol gruplarında, akrozom bütünlüğü açısından %5 etilen glikol grubunda saptamışlardır. Benzer olarak Najafi ve ark. (2017), %7 gliserol ve %3, 5, 7 etilen glikol içeren soya lesitini bazlı sulandırıcıların koç sperması dondurulmasındaki etkinliğini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, eritme sonrası total ve progresif motilite, canlılık, membran bütünlüğü ve mitokondriyal aktivite oranlarının %7 gliserol ve %3-5 etilen glikol gruplarında benzer olduğunu tespit etmişlerdir.

Amid türevi kriyoprotektanlar: Amid türevi kriyoprotektanlar, özellikle tavşan, alabalık, kanatlı vb. gliserole duyarlı türlere ait spermaların dondurulmasında tercih edilmektedir. Ayrıca, aygır spermasının dondurulmasında kullanıldığında gliserole kıyasla daha az kontraseptif etkiye neden olduğu ve eritme sonrası daha başarılı spermatolojik parametreler sağlandığı rapor edilmektedir. Sperma sulandırıcılarına %3-5 oranında ilave edilmesi spermatozoonları donmanın zararlı etkilerine karşı koruduğu ve eritme sonrası birçok spermatolojik değerde iyileşme sağladığı bildirilmektedir. Amidler, gliserol ile karşılaştırıldığında daha düşük viskosite ve moleküler ağırlığa sahiptir. Bu özelliklerden dolayı daha yüksek permeabilite yeteneğine sahip oldukları ve daha az ozmotik strese neden oldukları düşünülmektedir (Gomes ve ark. 2002; Alvarenga ve ark. 2005).

DMSO (Dimetilsülfoksit): DMSO, kimyasal yapısında (C_2H_6OS) sahip olduğu bir polar ve iki apolar grup sayesinde hem hidrofilik hem de hidrofobik özellik gösteren (amfipatik) bir bileşiktir. Bu özelliğinden dolayı su bazlı ve organik sulandırıcılar içerisinde rahatlıkla çözünebilmektedir. Düşük moleküler ağırlığa sahip olması sayesinde hızlı bir şekilde plazma membranından geçebilmektedir. Spermanın dondurulmasında DMSO'nun kriyoprotektif etkinliği birçok çalışmada incelenmiş ve türler arasında farklılık gösterdiği bulunmuştur. Tavşan ve alabalık spermalarında gerçekleştirilen çalışmalarda %10-15 oranında DMSO' nun eritme sonrası motilite oranlarını iyileştirdiği bulunmuştur (Vicente ve Viudes-de-Castro 1996; Tekin ve ark. 2003). Arı spermasının dondurulmasında sulandırıcıya %6 oranında ilave edilen DMSO ile karşılaştırıldığında; gliserol, 1,2 propanediol ve etilen glikolün aynı oranlarında spermatozoon motilitesi ve membran fonksiyonel bütünlüğü (HOST) oranları azalmıştır (Alçay ve ark. 2015). Kanatlı sperması ile yapılan çalışmalarda ise DMSO' nun oldukça yüksek toksik etkiye

neden olduğu ve kriyoprotektan olarak tercih edilmemesi gerektiği bildirilmiştir (Chalah ve ark. 1999; Donoghue ve Wishart 2000).

2.10.2. Eksternal Kriyoprotektanlar

Eksternal (non-permeable) kriyoprotektanlar, hücre membranının intrastoplazmik sıvı ve katyonlara karşı permeabilitesini artırarak ozmotik stres karşısında daha dayanıklı ve esnek hale getirirler. Ayrıca, donma-çözünme sırasında oluşan lipit peroksidasyonu gelişimini engellemeye meyillidirler. Eksternal kriyoprotektanlar, hücre içerisine girebilen kriyoprotektanlara göre daha az hücresel zarara neden olmaktadır. Spermanın dondurulmasında internal kriyoprotektanlara olan gereksinimi azaltmaktadır. Böylece, internal kriyoprotektanların neden olduğu toksik etkiler hafifletilmekte, donma-çözünme sonrası spermatozoonlarda oluşacak zararlar azaltılmaktadır (Arav ve ark. 1993; Cabria ve ark. 2001).

Eksternal kriyoprotektanlar, "sakkaritler ve makromoleküller" olmak üzere iki başlık altında sınıflandırılabilmekedir (Bucak ve Tekin 2007).

Sakkaritler: Sperma donma medyumlarına ilave edilen başlıca sakkaritler, monosakkaritler (glikoz, fruktoz ve galaktoz), disakkaritler (laktoz, sükroz ve trehaloz) trisakkaritler (raffinoz, melezitoz) olarak ele alınabilir. Sakkaritlerin donma ve çözünme esnasında sağladıkları kriyoprotektif etkileri farklıdır (Yildiz ve ark. 2000; Panyaboriban ve ark. 2015) Sakkaritler hücreler için enerji kaynağı olmakla birlikte ekstraselüler ortamın ozmotik basıncını artırarak donma öncesi hücresel dehidrasyona neden olurlar. Hücre içi sıvı miktarının azalması ile donma sırasında hücre içi lethal kristal oluşumları engellenir (Rudolph ve Crowe 1985; McWilliams ve ark. 1995; An ve ark. 2000; Aisen ve ark. 2002). Sakkaritlerin plazma membranı yapısında bulunan fosfolipidler ile etkileşime girmesi sonucunda yüzey alanında genişleme meydana gelir. Yüzey alanının artması, çözünme sırasında oluşan ozmotik strese karşı spermatozoonu daha dayanıklı kılar (McGann 1978; McWilliams ve ark. 1995). Sakkaritler ayrıca fosfolipitlerde gelişen sıcaklık değişimlerini azaltarak ve fosfolipit açil zincirleri arasında yer alan Van Der Waal's bağ etkileşimlerini azaltarak donma-çözünme sırasında hücre membranını korurlar. Medyum içerisinde Ca^{+2} iyonlarının yer alması şekerlerin koruyucu etkinliğini desteklemektedir (Bakas ve Disalvo 1991; De Leeuw ve ark 1993).

Monosakkaritler, koç seminal plazma içerisinde spermatozoonlar için temel enerji verici maddeler olarak yer alırlar. Bu sebepten dolayı, monosakkaritlerin koç sperması

sulandırıcıları içerisine eksojen olarak ilave edilmeleri önerilmektedir (Salamon ve Maxwell 2000; Ak ve ark. 2010). Spermatozoonların birincil enerji kaynağı fruktozdur. Sulandırıcı içerisine ayrıca fruktoz ilave edilmesi halinde glikoz ve mannozun da metabolize edilerek kullanılabildiği bilinmektedir (Salamon ve Maxwell 2000).

Disakkaritlerin kriyoprotektif etkinliği monosakkaritlere göre daha yüksektir (Purdy 2006). Memeli hayvan spermasının dondurulmasında eksternal kriyoprotektif madde olarak trehalozun kullanımı son yıllarda artmıştır. Sperma sulandırıcısında bulunan trehaloz, donma öncesi aşamalarda spermatozoonda dehidrasyon oluşturarak hücre içi kristalizasyonu engeller (Schmehl ve ark. 1986; Molinia ve ark. 1994; Storey ve ark. 1998). Trehalozun eritme sonrası motilite, membran ve akrozom bütünlüğünü koruduğu ayrıca antioksidan kapasiteyi artırarak membran lipit peroksidasyonu azalttığı bildirilmektedir (Cirit ve ark. 2013; Aboagla ve Terada 2003; Aisen ve ark. 2000; Aisen ve ark. 2002; Bucak ve ark. 2007a; Purdy 2006). Diğer bir disakkarit olan sükroz (sakkaroz), yapısındaki hidrojen bağları ile membran fosfolipitlerini düzenler, plazma membranını sağlamlaştırır ve hücrenin maruz kaldığı ozmotik strese karşı koruma sağlar (Liu ve Foote 1998). Bir mol glikoz ve bir mol fruktozun birleşimi olan sükroz; eritme sonrası glikoz, fruktoz ve laktoza kıyasla akrozomal bütünlüğü daha iyi koruduğundan sentetik sulandırıcılarda tercih edilmektedir. Ayrıca, sükrozun membran doymamış yağ asitleri üzerinde oksidasyona karşı koruyucu etkisinin olduğu belirtilmektedir (Salamon ve Maxwell 2000).

Makromoleküller: Sperma dondurma sulandırıcılarında eksternal kriyoprotektan olarak tercih edilen başlıca makromoleküller; BSA (bovine serum albümin), mannitol, ficoll 70, polietilen glikol, dekstran ve polivinilprolidon'dur (Arıcı 2017).

2.11. Serbest Radikaller

Atomlar, proton ve nötrondan oluşan bir çekirdek ile etrafında spinleri birbirine zıt iki elektrondan oluşmaktadır. Orbital boşlukta hareket eden bu elektronlara "eşleşmiş elektron" ya da "ortaklanmış elektron" adı verilir (Dikici 1999). Yapılarında eşleşmiş elektron ihtiva eden atom veya moleküller kararlı bir yapı gösterirler (Halliwell 1987; Fırat 1997). Elektron eşleşmesinin bozulması durumunda, molekül veya atom kararsızlaşarak reaktif özellik kazanır ve serbest radikal halini alır. Diğer bir söylemle; dış orbital boşluğunda tek sayıda elektrona sahip veya proton sayısı ile elektron sayısı eşit

olmayan atom veya moleküllere “serbest radikaller” adı verilir (Halliwell ve Chirico 1993; Akkuş 1995).

Serbest radikaller; oldukça kısa ömürlü, eşleşmemiş elektrona sahip ve kimyasal olarak kararlılık kazanabilmek için fazladan elektrona ihtiyaç duyan molekül, atom veya iyonlardır. Çok hızlı reaksiyona girebilme yeteneğine sahip olan serbest radikaller, diğer moleküllere saldırarak onların elektronunu çalarlar. Böylece, saldırıya uğrayan molekül de serbest radikal haline dönüşür. Bu zincirleme reaksiyon, antioksidan sistemler tarafından inhibe edilinceye kadar birbiri ardına devam eder (Kılınç 1985; Holley ve ark. 1993; Mercan 2004; Karabulut ve Gülay 2016).

Serbest radikaller genel olarak; reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNT) ve reaktif sülfür türleri (RST) olarak gruplandırılırlar (Lü ve ark. 2010; Fehrenbach ve Northoff 2001). Canlı organizmalarda fizyolojik veya patolojik etkiye neden olan en önemli serbest radikaller oksijenden oluşmuş reaktif oksijen türleridir. Başlıca ROS olarak; organizmada çeşitli reaksiyonlar sonucunda oluşan süperoksit (O^{-}_{2}), hidroksil (OH^{-}), hidrojen peroksit (H_2O_2) radikalleridir. Bunların yanında, serbest radikallerin reaksiyonları sonucu oluşan peroksil radikali, alkoksil radikali ile oksijen kaynaklı olmayan diğer radikaller de vardır (Cheseseman ve Slater 1993; Erenel ve ark. 1993; Fehrenbach ve Northoff 2001).

Reaktif oksijen türleri hücresel faaliyetlerin devamlılığında gerekli olmakla birlikte, fazla miktarları hücre yapısı ve fonksiyonlarında hasarlara neden olmaktadır. Normal bir hücrede reaktif oksijen türlerinin varlığı çeşitli antioksidan sistemler ile dengede tutulmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin aşırı artması veya antioksidan sistemlerinin yetersiz kalması durumunda, reaktif oksijen türleri lehine denge bozulabilmektedir. Sonuçta hücreler oksidatif strese maruz kalmaktadır. Oksidatif stresin yoğun veya uzun süreli olması hücrede lethal hasarlara neden olabilmektedir (Battal ve ark. 1995; Pham-Huy ve ark. 2008). Bu hasarlar yoğunlukla hücrenin temel yapı bileşenlerini oluşturan lipit, karbonhidrat ve proteinler ile nükleik asit ve enzimler üzerinde gözlemlenir (Yu 1999).

2.11.1. Serbest Radikallerin Spermatozoon Üzerindeki Etkileri

Düşük seviyelerdeki ROS, spermatozoonun fizyolojik faaliyetlerinin düzgün şekilde ilerlemesi için gerekli iken seviyesi organizmanın antioksidan sistemlerinin baş edebileceği düzeylerin üzerine ulaştığında patolojik etkilere neden olur. Patolojik etkinin

şiddeti, spermatozoonun maruz kaldığı ROS' un tipine, miktarına ve süreye bağlı olarak değişmektedir (Kothari ve ark. 2010).

Spermatozoonlarda ROS kaynaklı hasarların meydana geldiği primer bölge hücre membranında lipit yapı birimleridir. Spermatozoon membran yapısı somatik hücre ile kıyaslandığında oldukça farklıdır. Bilayer tabakadan oluşan plazma membranı, içerisinde yüksek oranda fosfolipitler, steroller, doymuş ve doymamış yağ asitleri barındırmaktadır (Türk 2015). Spermatozoon membranının yaklaşık %50'si her bir molekülünde 6 adet doymamış çift karbon bağı bulunan dokosaheksaenoik asitten (DHA) oluşmaktadır. Hücre membranında yer alan yüksek miktardaki doymamış yağ asidi, spermatozoon-oosit füzyonu için anahtar role sahip membran akışkanlığını sağlamaktadır. Ayrıca, spermatogenezis, epididimal olgunlaşma, dişi genital kanal içerisindeki kapasitasyon süreci ve akrozom reaksiyonunda membran lipitlerinin kompozisyonunda birçok değişiklik meydana gelmektedir (Wathes ve ark. 2007; Surai ve ark. 2001; Sanocka ve Kurpisz 2004). Çoklu doymamış asitleri, diğer membran lipitlerine göre gerçekleşen membran fonksiyonları açısından daha etkilidirler (Ogbuewu ve ark. 2010).

Spermatozoon membranının yüksek oranda doymamış yağ asidi içermesi, plazma membranı lipit peroksidasyonu için yatkınlık oluşturmaktadır. Lipit peroksidasyonu, spermatozoon membranının ihtiva ettiği çoklu doymamış yağ asitlerinde karbonlar arası çift bağlardan elektron çalınması şeklinde tanımlanmaktadır. Lipit peroksidasyonu; başlama, yayılma ve bitiş olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. Başlama aşamasında, ROS doymamış yağ asitleri alfa-metilen gruplarının açil zincirlerinden hidrojen atomunun ayrılmasına neden olur. Hidrojen atomunun ayrılması sonucunda karbon bağında yer alan ve eşleşmemiş elektrona sahip lipit radikali (alkil radikali) O_2 ile tepkimeye girer ve sonucunda peroksil radikali (ROO) açığa çıkar. Peroksidasyonun yayılma aşamasında, ROO etrafındaki doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomunun ayrılmasına ve lipit hidroperoksit (ROOH) radikalinin oluşmasına neden olur. Antioksidatif süpürücü sistemlerinin yetersiz olması ve ortamda demir, bakır gibi geçiş metallerinin bulunması durumunda ROOH, alkoksil veya peroksil radikali oluşumuna neden olarak peroksidasyon sürecini hızlandırır. Süreç sonunda alkol, aldehit, keton ve eterlerin ayrışması kolaylaşır, son ürün olarak malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinoneal oluşur. Ortamda artan MDA, spermatozoon membranı iyon permeabilitesi ve enzim aktivitesi üzerinde olumsuz sonuçlara neden olur. Lipit peroksidasyonunun bitiş

safhasında, radikal-radikal etkileşimi veya radikal-antioksidan sistem etkileşimi ile süreç sonlanır. Lipit peroksidasyonunun başlatılmasında OH temel radikal olarak görev alırken, O_2 ve H_2O_2 radikali peroksidasyonun başlatılması için yeterli güce sahip değildir (Southorn ve Powis 1988; Young ve Parthasarathy 1994; Alvarez ve Storey 1995; Türk 2015).

Peroksidasyon sonucunda plazma membranı yağ asitlerinde %60' a varan kayıplar meydana gelmekte, hücre fonksiyonları doğrudan etkilenmektedir (Kothari ve ark. 2010). Membran akışkanlığının bozulması, spermatozoon oosit kaynaşması oranını bariz şekilde düşürmektedir (Aitken ve ark. 1993). Diğer yandan, hidrojen peroksitin (H_2O_2), glikolizis sürecinde rol oynayan glikoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimini inhibe etmesi, mitokondriyal ATP üretimini düşürerek meydana gelen motilite kayıplarının sebebi olarak ileri sürülmektedir (Bilodeau ve ark. 2000; Maneesh ve Jayalekshmi 2006).

Serbest radikaller, hücre protein yapılarındaki aminoasit kompozisyonuna bağlı olarak farklı şiddetlerde etki yaparlar. Trozin, histidin, metiyonin ve sistein gibi aminoasitler, doymamış ve sülfür içeren moleküllere sahip olduklarından serbest radikallerin olumsuz etkilerine kolayca maruz kalırlar. Serbest radikaller; protein molekül yapılarında kümeleşmeler, bölünmeler ve karşı bağ oluşumları meydana getirirler (Freeman ve Crapo 1982). OH radikalinin etkisi ile okside olan trozin kalıntıları, proteinler arası çapraz bağlanmaya neden olarak modifikasyona ve kümelenmeye neden olur. Çapraz bağlanma ile bitrozin meydana gelmekte, bu durum, trozin fosforilasyonunu engelleyerek trozin kinaz aracıklı sinyalizasyon mekanizmalarını bozmaktadır (Du ve Gebicki 2004). Azalan protein fosforilasyon olayları özellikle akrozom reaksiyonu, kapasitasyon, hiperaktivasyon ve fertilite oranlarında düşmelere neden olmaktadır (Türk 2015).

Serbest radikallerinin etkisiyle karbonhidrat yapılarında da hasarlar oluşabilmekte, glikoz, mannoz ve deoksi şekerlerde meydana gelen fizyolojik oksidasyon sonucu süperoksit ve hidrojen peroksit radikalleri meydana gelmektedir (Thornalley 1985). Lipit ve proteinlere kıyasla karbonhidratlar ROS ataklarına daha dirençlidir veya bu saldırılar ile daha az karşılaşırlar (Türk 2015).

Serbest radikallerin DNA baz kayıplarına, baz dizilimi değişikliklerine, tek ve çift zincir kırılmalarına yol açtığı bildirilmektedir (Moraes ve ark. 1990; Erenel ve ark. 1993).

Spermatozoon mitokondriyal DNA'sı histon ve protaminler ile sarılı olmamakla birlikte çekirdek DNA'sı ile kıyaslandığında daha gevşek bir yapıya sahiptir. Diğer yandan, spermatozoon tarafından üretilen O_2 radikalinin ana kaynağı mitokondriyumdur. Mitokondriyal iç membranda, oksijenli solunum sonucunda hücre içi ROS' un yaklaşık %90'lık bölümü üretilmektedir (Wei ve Pang 2005). Tüm bu sebepler ROS atakları karşısında mitokondriyal DNA yapısını, çekirdek DNA yapısına göre daha duyarlı hale getirmektedir (Venkatesh ve ark. 2009; Dinesh ve ark. 2012).

ROS karşısında, spermatozoonun diğer somatik hücrelere göre daha az dirençli olmasının diğer bir nedeni sahip olduğu stoplazma hacminin az olmasıdır. Bu durum stoplazma içerisinde bulunan katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan özellikli enzim etkinliği düşürmektedir. Doğal şartlarda, spermatozoonlar dış ortam koşullarına veya oksijen basıncına maruz kalmazlar. Antioksidan sistemlerinin yetersiz olması bu nedenle kabul edilebilir bir durumdur. Ancak, donmuş sperma ile yapılan suni tohumlama uygulamalarında sperma direkt olarak çevresel faktörlerin olumsuz etkilerine maruz kalmaktadır. Bu durum, reaktif oksijen türlerine bağlı oluşan hücresel hasar oranının artmasına neden olmaktadır (Kulaksız 2009; De Lamirande ve Gagnon 1992a; De Lamirande ve Gagnon 1992b).

Donma-eritme işlemleri, ROS oluşumunu tetiklemekle birlikte spermanın sahip olduğu antioksidan sistemlerinin kapasitesini düşürmektedir. Sulandırma işlemi sonrası seminal plazma oranı azaldığından, donma sırasında ani sıcaklık değişimleri ve atmosferik oksijene bağlı oluşan ROS'un zararlı etkileri daha fazla olur. Spermatozoon membran lipit peroksidasyonu ve buna bağlı olarak oluşan ROS üretimi spermanın eritilmesi esnasında en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Spermatozoonun çözünme esnasında gelişen sıcaklık artışı, plazma membranı lipit yapıları ve dağılımlarında farklılaşmaya neden olarak ROS'un aşırı üretimine neden olmaktadır. Çözünme esnasında spermatozoonun yüksek oranda oksijen kullanması serbest radikal oluşumuna neden olan önemli bir etkendir (Bailey ve ark. 2003; Kulaksız 2009).

Serbest radikaller endojen veya eksojen kaynaklı olabilmektedir. Sperma, olgun ve olgunlaşmamış spermatozoonları, epitel hücrelerini, bakterileri ve patojenlerle mücadele eden lökositleri içermektedir. Bu hücreler arasında lökositler ile olgunlaşmasını tamamlamamış spermatozoonlar ROS üretiminden başlıca sorumludurlar. Lökositlerin (makrofaj ve nötrofiller) patojen fagositozisinde kullandığı nikotinamid adenin

dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz sistemi sonucunda yüksek miktarda ROS üretimi oluşmaktadır (Türk 2015). Benzer şekilde, normal spermatozoonların hücre membranına bağlı NADPH oksidaz süreci sonucunda ve mitokondriyum yapısında NADPH' a bağımlı oksido redüktazlar vasıtasıyla ROS üretilmektedir. Stoplazmik damlacıklı (olgunlaşmamış) spermatozoonlar, NADPH aracılığıyla elektron kaynağı olarak rol almakta ve ROS düzeyinin artmasını hızlandırmaktadır (Maneesh ve Jayalekshmi 2006; Kothari ve ark. 2010; Bansal ve Bilaspuri 2010).

2.12. Antioksidanlar ve İşlevleri

Organizmalar serbest radikallerin neden olduğu zararlı etkilerden korunmak için sahip oldukları koruyucu mekanizmaları kullanırlar. Bu koruyucu/savunma mekanizmalara "antioksidanlar" veya "antioksidan savunma sistemleri" ismi verilmektedir. Her bir antioksidanın koruyucu mekanizması farklı olmakla birlikte, etkilerini genellikle serbest radikal oluşumunu engelleme veya serbest radikalin neden olduğu zararı bertaraf etme yoluyla gösterirler (Akkuş 1995; Dikici 1999; Şener ve Yeğen 2009).

Antioksidanlar etki mekanizmasına göre (serbest radikal oluşumunu engelleyenler ve mevcut serbest radikal etkisini inhibe edenler), kaynağına göre (endojen ve eksojen) ve yapısına göre (enzimatik ve nonenzimatik) olmak üzere farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır (Di Moscio ve ark. 1991; Frei 1994; Çınar 2019). Kimi araştırmacılar ise aralarındaki etkileşime (sinerjizma) göre primer ve sekonder olmak üzere antioksidanları iki sınıf altında değerlendirmektedir (Ömür 2011).

Organizmada bulunan başlıca enzimatik antioksidanlar; süperoksiti H_2O_2'e dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), H_2O_2'nin suya indirgenmesini sağlayan katalaz (CAT) ve organik peroksit detoksifikasyonunda rol alan glutatyon peroksidaz (GSH-Px)' dır (Guemouri ve ark. 1991). Nonenzimatik yapıda olan antioksidanlar ise; glutatyon, α-tokoferol (vitamin E), askorbik asit (vitamin C), sistenin, β-karoten, melatonin, ürik asit, hyaluronik asit, selenyum, albümin, koenzim Q10, α-lipoik asit, seruloplazmin vb. dir (Kulaksız 2009; Çınar 2019).

Antioksidan savunma mekanizmaları bağımsız veya birbirlerini tamamlayıcı özellikte olabilir. Genel olarak antioksidan savunma sistemlerinin serbest radikaller karşısındaki etkileri; radikal oluşumunu engellemeleri, peroksidasyon zincir reaksiyonu engellemeleri veya devam eden zincir reaksiyonunu kırmaları, ortamdaki peroksitleri

parçalamaları ve lokal oksijen konsantrasyonunu düşürmeleri şeklinde özetlenebilir (Cheeseman ve Slater 1993).

Memeli spermatozoonları, özellikle orta bölümlerinde SOD ve GSH-Px olmak üzere enzimatik antioksidanları, plazma membranında ise vitamin A ve E, seruloplazmin ve transferrin gibi birkaç nonenzimatik yapıda antioksidanları barındırmaktadır. Ayrıca, seminal plazma içerisinde birçok enzimatik ve nonenzimatik yapıda antioksidanlar (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, vitamin E, C ve A, taurin, hipotaurin, piruvat, albümin, ürik asit, askorbat vb.) yer almaktadır (Agarwal ve ark. 2004; Wai-Sum ve ark. 2006; Vernet ve ark. 2004). Gerçekleştirilen çalışmalarda tüm bu antioksidan savunma sistemlerinin; ejakülasyon sonrası dönemde oksidatif strese karşı spermatozoonları koruduğu, anormal spermatozoon oranını azalttığı, DNA fragmentasyonunu önlediği, erken gelişen kapasitasyonu engellediği ve genel olarak donmanın zararlı etkilerini azaltarak spermatozoon kalitesini artırdığı saptanmıştır (Cocuzza ve ark. 2007).

Sperma her ne kadar endojen antioksidan sistemlere sahip olsa da yeterli seviyede koruyuculuk sağlanamamakta ve spermatozoonlar ROS' un neden olduğu oksidatif stres karşısında yeterli direnç göstermemesine neden olmaktadır. Memeli türleri içerisinde özellikle de koç spermatozoonları, membran yapısındaki kolesterol / fosfolipid oranının düşük olması ve PUFA oranının yüksek olması nedeniyle donma çözdürme işlemlerinden kolayca etkilenir (Bucak ve ark. 2007b) ve özellikle ölü spermatozoonların sebep olduğu oksidatif strese yeterince direnç gösterememektedir (Dowling ve Simmons 2009).

Donma prosedürlerinde oluşan oksidatif stresin neden olduğu zararlı etkileri azaltmak, spermatozoonların yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü korumak, fertilizasyon için gerekli olan süreçlerin devamlılığını sağlamak amacıyla sulandırıcı içerisine endojen veya eksojen kaynaklı antioksidanlar ilave edilmektedir. Al-Mutary (2020), sperma sulandırıcılarına ilave edilen ve oksidatif stresin neden olduğu zararlı etkileri baskılamada en etkili antioksidanları türlere göre sınıflandırmıştır. Buna göre sistein (koç, manda, domuz), melatonin (koç, aygır), katalaz (boğa, aygır, deve), L-arjinin (boğa, koç, teke, manda), sisteamin (manda, koç, boğa), iodiksanol (manda, boğa, koç), quarsetin (manda, teke, aygır), glutatyon (boğa, köpek, domuz, geyik) ve resveratrol (teke, koç, manda, domuz) antioksidanlarının donma sonrası spermatozoonların korunmasında daha başarılı olduğunu bildirmiştir.

Resveratrol

Resveratrol (trans-resverarol; trans-3,4,5-trihydroxy-trains-stilbene), stilben ailesine ait moleküler olarak bir metil köprüsü ile iki aromatik halkadan oluşan bir bileşiktir. Resveratrol ilk olarak 1940 senesinde akçöpleme (Veratrum grandiflorum O. Loes) bitkisinin kökünde yer alan bir madde olarak tanımlanmıştır (Takaoka 1939). Günümüzde ise varlığı 72 bitki türünde tespit edilmiştir. Yenilebilir diyet kaynağı olarak yerfıstığı ve yağı, üzüm (özellikle kırmızı üzüm kabuğu) ve şarapta bulunur. Antioksidan ve antiproliferatif etkiye sahip bir fitoaleksindir. Mikrobiyal ve fungal hastalıklara, UV ışın kaynaklı radyasyon ve ağır metallere karşı bitkiyi korumaktadır (Hillis ve ark. 1974; Pace-Asciak ve ark. 1995; Uguralp ve ark. 2005).

Güney Fransa'da, insanlar diyetlerinde yüksek oranda doymuş yağları kullanmaktadır. Bununla birlikte bölgedeki koroner kalp hastalığı insidansı oldukça düşüktür. Bu olgu "Fransız Paradoksu" olarak tanımlanmaktadır. Bilim insanları, bölgede yüksek miktarda tüketilen resveratrolün kalp-damar hastalıkları görülme sıklığını düşürdüğünü belirtmişlerdir. Fransız Paradoksunun aydınlatılması ile araştırmacıların dikkatini çeken resveratrol, bilimsel çalışmalarda yoğun olarak incelenmeye başlanmış ve muhtemel yararları üzerine çalışmalar yürütülmüştür (Ahmad ve ark. 2000).

Resveratrol $C_{14}H_{12}O_3$ şeklinde moleküler formülasyona ve 228,5 g/mol moleküler ağırlığa sahip, 253-255°C sıcaklık aralığında eriyebilen kirli beyaz renkli toz yapıda bir maddedir. Trans ve cis şeklinde iki yapısal formda bulunur. Trans formu biyolojik olarak daha aktif ve yaygındır (Aggarwal ve Shishodia 2005).

Resveratrol hidroksil ve süperoksit radikallerini yakalama özelliğine sahip olduğundan antioksidan etki gösterir. *İn vivo* ortamda güçlü bir antioksidan kapasiteye sahip iken, *in vitro* ortamda ROS yakalama yeteneği zayıftır. Ayrıca, biyolojik sistemlerde var olan doğal antioksidanların hücre içi yoğunluklarının sürekliliğinde de rol alır (De La Lastra ve Villegas 2007).

İn vivo ve *in vitro* çalışmalarda, resveratrolün antioksidan özelliğinin yanında anti-kanserojenik, anti-viral, nöroprotektif, kardiyoprotektif, anti-inflamatuvar, anti-diyabet, anti-obezite ve yaşlanma geciktirici etkileri de gösterilmiştir (Sinan 2019). Resveratrolün sağlık alanında bu denli geniş spektrumda etkili olması, gıdalar ve farmasötik ürünler içerisine biyoaktif bir ajan olarak kullanılmasına neden olmaktadır (Brown ve ark. 2009).

Organik bir polifenol olan resveratrol, spermatozoonlarda mitokondriyal aktivite kaynaklı ROS oluşumunu azaltır, apoptozis oranını düşürür, süperoksit radikallerini süpürür, lipit peroksidasyonunu inhibe eder, antioksidan kofaktörleri ile enzimleri düzenler (Pervaiz ve Holme 2009; Li ve ark. 2018).

Resveratrol, hücrelerde 5'AMP-aktive protein kinaz fosforilasyonunu teşvik etmekte, böylece antioksidatif savunma sistemlerinin gelişmesini sağlayarak ROS üretimini azaltmaktadır (Zhu ve ark. 2019).

Li ve ark. (2018), *in vitro* fertilizasyonda kullandıkları cinsiyeti belirlenmiş boğa spermasında çalışmışlardır. Yıkama ve fertilizasyon medyumları içerisine 0, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} ve 10^{-6} M resveratrol ilave etmişlerdir. 10^{-4} M resveratrol içeren grupta daha düşük ROS miktarı ve MDA konsantrasyonu saptayan araştırmacılar, mitokondriyal fonksiyonların ve akrozom bütünlüğünün korunduğunu ve blastosist oranının arttığını bildirmişlerdir ($p<0,05$).

Bucak ve ark. (2015), boğa sperma sulandırıcısına ekledikleri 1 mM resveratrol ve $1x10^{-3}$ g ml^{-1} lycopene maddelerinin etkilerini eritme sonrası incelemişler, her iki antioksidan maddenin DNA hasarını azalttığını ($p<0,05$), fakat spermatozoon hareket parametreleri, akrozom bütünlüğü, canlılık ve oksidatif stres parametrelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir.

Langobardi ve ark. (2017), manda boğası sperması ile gerçekleştirdikleri çalışmada, BioXcell ticari sulandırıcı içerisine farklı oranlarda (0 µM, 0,5 µM, 1 µM, 10 µM ve 50 µM) resveratrolün eritme sonrası spermatozoon canlılığı, motilite, kapasitasyon oranı, membran bütünlüğü, total antioksidan kapasite, ROS - lipit peroksidasyon tayini ve *in vitro* / *in vivo* fertilizasyon oranlarına etkilerini araştırmışlardır. Çalışmacılar kontrol grubuna göre 50 µM resveratrol içeren grubu; kapasitasyon benzeri değişiklikler ($p<0,01$), oksidatif stres ($p<0,05$), membran stabilitesi ($p<0,05$) ve in vitro fertilizasyon yeteneği ($p<0,05$) açısından daha başarılı bulmuşlardır. Manda boğası sperması ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada, daha yüksek oranlarda resveratrol (10 µM, 20 µM, 50 µM ve 100 µM) kullanılmış, özellikle yüksek konsantrasyonların (50 µM ve 100 µM) eritme sonrası spermatolojik parametreleri iyileştirdiği, 100 µM resveratrolün enzimatik antioksidanların konsantrasyonunu artırdığı belirlenmiştir (Ahmed ve ark. 2020).

Lv ve ark. (2019), teke sperması dondurulmasında resveratrolün etkisini araştırmak amacıyla Optidyl® ticari sulandırıcı içerisine 10, 50, 100, ve 250 µM

oranlarında resveratrol ilave etmişlerdir. Eritme sonrası 10 ve 50 µM resveratrol gruplarında kontrol grubuna göre total motilite, progresif motilite, membran ve akrozom bütünlüğü ve mitokondriyal aktivite oranlarının iyileştiğini ($p<0,05$), ROS üretim miktarının düştüğünü ($p<0,05$) saptamışlardır. 10 ve 50 µM resveratrol gruplarında canlı spermatozoon oranı diğer gruplara göre daha yüksek ($p<0,05$) bulunmuştur.

Resveratrolün domuz sperması kriyopreservasyonundaki etkileri üzerine yapılan çalışmada Zhu ve ark. (2019), 50 µM resveratrolün eritme sonrası spermatolojik parametreleri olumlu etkilediğini, glutatyon peroksit, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerini aktive ettiğini, lipit peroksidasyonu ve ROS oranı ile apoptozis oranını düşürdüğünü saptamışlardır. Araştırmacılar, ayrıca resveratrolün 5'AMP-aktive protein kinaz fosforilasyonunu uyardığını ve bu durumun koruyucu etkide önemli bir rol oynadığını vurgulamışlardır. Gadani ve ark. (2017), eritilmiş domuz spermasını 37°C sıcaklıkta 0,5, 1, ve 2 mM resveratrol içeren eritme medyumları içerisinde 1 saat inkübe etmişler, 2 mM resveratrolün *in vitro* spermatozoon-oosit penetrasyon oranını artırdığı bildirmişlerdir.

Bang ve ark. (2020), değişik miktarlarda resveratrolün (100, 200 ve 400 µM) köpek sperması dondurulmasında oldukça etkili olduğunu, resveratrolün plazma membranı bütünlüğü, mitokondriyal aktivite, akrozom ve DNA bütünlüğü oranlarını korumada başarılı bulunduğunu ($p<0,01$), canlılık ve motilite oranları bakımından 200 µM resveratrolün kontrol grubuna göre etkili ($p<0,01$) bulduklarını açıklamışlardır.

Fertil ve infertil insanlardan elde edilen spermalar ile yürütülen çalışmada, resveratrolün kriyopreservasyon kaynaklı oksidatif stres hasarlarını baskıladığı, motilite üzerinde herhangi bir olumlu etkiye neden olmadığı rapor edilmiştir (Garcez ve ark. 2010). Shabani Nashtaei ve ark. (2017), resveratrolün insan spermatozoonlarında 5'AMP-aktive protein kinaz fosforilasyonu ve mitokondriyal aktiviteyi tetiklediğini, eritme sonrası apoptoz benzeri değişiklikler ile ROS miktarını azalttığını, ancak canlılık ve motilite kaybını kompanse edemediğini bildirmişlerdir. Resveratrolün insan sperması dondurulmasında, membran ve DNA bütünlüğünü koruma amaçlı kullanılabileceğini bildiren diğer araştırmalar da mevcuttur (Branco ve ark. 2010).

Giaretta ve ark. (2014), aygır spermasını farklı dozlarda (10 µM, 20 µM, 40 µM ve 80 µM) resveratrol içeren sulandırıcı içerisinde 4°C ve 10°C sıcaklıklarda muhafaza etmişlerdir. 24 saat sonra gerçekleştirdikleri muayenelerde resveratrolün sperma kalitesi

üzerinde olumlu bir etki yaratmadığını, 40 µM ve 80 µM dozlarının spermatozoon fonksiyonlarına zarar verdiğini bildirmişlerdir.

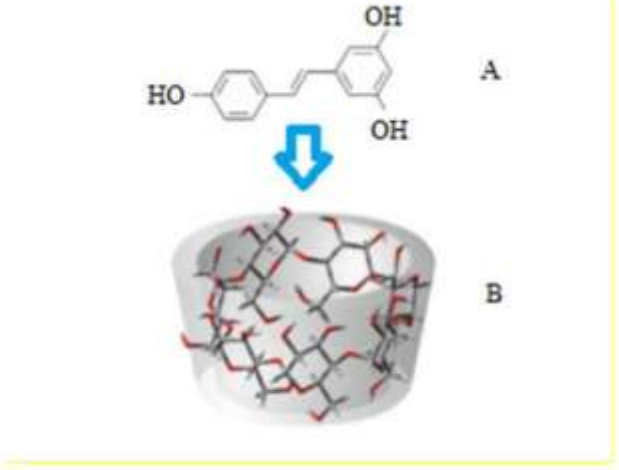
Koç sperması sulandırıcılarına ilave edilen glutatyon, sisteamin, metiyonin, katalaz, likopen, taurin, askorbik asit, troloks, trehaloz vb. antioksidanlar sayesinde ROS' un neden olduğu oksidatif stres nedenli hasarlar azaltılabilmektedir. Ancak, koç spermasının soğutularak kısa süreli saklanması veya dondurulmasında resveratrolün etkinliğini gösteren çalışmalar oldukça kısıtlı sayıdadır (Al-Mutary ve ark. 2020). Koç spermasının soğutularak kısa süreli saklanmasında, Sarlos ve ark. (2002), 15 µg resveratrol ve 0,5 mg Aromex® kombinasyonunun (10^9 spermaozoon/ml) antioksidan olarak başarıyla kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Al-Mutary ve ark. (2020), 200 µM (45,65 µg/ml) ve 400 µM (91,30 µg/ml) resveratrolün koç spermasının soğutularak kısa süreli saklanmasında spermatozoon baş morfolojisi, kinetik hareket parametreleri ve *in vitro* fertilizasyon oranlarında olumlu etki yarattığını belirtmişlerdir. Resveratrolün koç sperması dondurulmasındaki etkinliğini araştıran Silva ve ark. (2012a), 5-20 µg/ml doz aralığındaki resveratrolün eritme sonrası mitokondriyal aktiviteyi olumsuz etkilediğini, akrozom ve membran bütünlüğü ile progresif motilite oranlarını iyileştiremediği bildirmişlerdir.

Resveratrol bileşiğinin suda çözünme kapasitesi oldukça düşüktür. Resveratrol, normal oda koşullarında, oksijene ile temas durumunda, ısı ve ışık değişimlerinde bütünlüğünü ve saflığını kaybederek cis formuna dönüşmektedir (Baur ve Sinclair 2006).

Suda çözünme yeteneği düşük olan antioksidanların çözünme kapasitesini artırmak amacıyla genellikle DMSO veya etanol kullanılmaktadır. Bu durum *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda embriyotoksik etkilere neden olabilmektedir (Adler ve ark. 2006). Son senelerde, başta farmakoloji, kozmetik ve gıda endüstrisi alanlarında ilaç, vitamin ve gıda renklendiricisi gibi birçok maddenin çözünürlüğünü artırmak için çeşitli taşıt maddeleri kullanılmaktadır (Torres ve ark. 2018). Bu amaçla kullanılan methl-β-siklodekstrinlerin yeri önem arz etmektedir. Methl-β-siklodekstrin, yapısı gereği internal hidrofobik ve eksternal hidrofilik kaviteye sahip bir grup siklik oligosakkaritten meydana gelmektedir. Sahip olduğu bu özellik iç kavitesinde birçok organik veya inorganik maddeyi taşıyabilmesine, artı olarak taşıdığı maddenin su içerisinde daha homojen çözünmesine olanak sağlamaktadır (Astray ve ark. 2009).

Son dönemde, siklodekstrinin farklı türlerde sperma dondurma çalışmalarında kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Özellikle sulandırıcı içerisine ilave edilen siklodekstrin-kolesterol kompleksinin eritme sonrası sperma kalitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Antioksidan madde olarak ise vitamin E haricindeki bir maddenin siklodekstrin ile oluşturduğu kompleksinin sperma çalışmasında kullanıldığına dair bilgiye rastlanılmamıştır. Benhenia ve ark. (2016), epididimal koç sperması dondurulmasında sulandırıcı içerisine ilave edilen methl-β-siklodekstrin-vitamin E kompleksinin, saf olarak ilave edilen vitamin E'ye göre eritme sonrası daha başarılı spermatolojik parametreler sağladığını tespit etmişlerdir. Benhenia ve ark. (2018), methl-β-siklodekstrin-vitamin E kompleksin 2 mg/120x10^6 dozunda koç sperması dondurulmasında yararlı etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Methl-β-siklodekstrin-resveratrol kompleksinin (CD-RES) resveratrolün bulunduğu ortamdaki çözünürlüğünü, stabilitesini, biyoyararlanımını ve antioksidan kapasitesini artırdığı rapor edilmiştir (Torres ve ark. 2018).



Şekil 2- 1: Resveratrol bileşiğinin siklodekstrin iç kavitesine yüklenmesi.

A: Resveratrol (RES), B: Siklodekstrin-resveratrol kompleksi (CD-RES) (Troche-Pesqueira ve ark. 2013)

CD-RES kompleksinin, özellikle spermanın dondurulması ve eritilmesi süreçlerinde şiddetlenen oksidatif strese karşı göstereceği etkinliği üzerine bir çalışma bulunmamaktadır.

Sunulan çalışma, 10, 20 ve 40 µg/ml resveratrol ve aynı miktarlarda resveratrol içeren CD-RES komplekslerinin koç sperması dondurulmasındaki etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma 2020 yılı Ocak-Mayıs ayları arasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Etik Kurul Onayı ve İzinler

"İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Rektörlüğü Veteriner Fakültesi Birim Etik Kurulu Başkanlığı'nın" 12.09.2018 tarihli 56090 sayılı yazısı.

3.2. Çalışmada Kullanılan Hayvan Materyali

Koçlara ait bireysel spermatolojik ön çalışmalar ve doktora çalışmaları üreme sezonu dışında (Ocak-Mayıs ayları içerisinde) gerçekleştirildi.

Çalışma kapsamında aday 10 baş Kıvırcık ırkı koç, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Eğitim-Öğretim Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nden temin edilerek Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'na ait hayvan barınaklarında eşit bakım-besleme şartlarına tabi tululdular. Koçlar, üzeri sundurma ile kapalı ve gezinme alanına sahip yarı açık alanda (25 m^2) serbest halde barındırıldı. Çalışma süresince sabah ve akşam olmak üzere toplam iki öğün besleme yapıldı. Koç başına günlük 1 kg kesif yem ve kaliteli kaba yem verildi. Ayrıca, önlerinde bulunan su günlük olarak tazelenerek, koçların içilebilir nitelikte ve temiz suyu *adlibitum* olarak almaları sağlandı.

Çalışmada kullanılmak üzere barındırılan 10 baş aday koçun sağlık ve androlojik muayeneleri belirli aralıklarla tekrarlandı. Çalışmalar başlamadan 15 gün önce her bir koçtan haftada 2 kez olmak üzere toplam 4 ejakülat alındı. Koçların bireysel spermatolojik özellikleri incelendi ve kontrol grubu sulandırıcısında dondurulduu. Eritme sonrası yapılan muayeneler sonucunda 2-5 yaş arası 5 baş koç belirlendi.

3.3. Spermanın Elde Edilmesi

Çalışmanın üreme mevsimi dışında yürütülmesi ve suni vajina ile sperma alınamaması nedeniyle koçlardan elektro-ejakülatör (P-T Electronics, Model 302, Boring, Oregon, USA) yardımı ile tekniğine uygun olarak haftada bir kez sperma alındı. Sperma alma işleminden 15 dakika önce koça 0,2 mg/kg dozda intramuskular ksilazin enjeksiyonu yapılarak sedasyonu sağlandı (Marco-Jiménez ve ark. 2005). Koç sağ tarafı altta olacak şekilde lateral pozisyonda yatırıldı. Ön ve arka ekstremiteleri sabitleme

bağları ile bağlanarak koçun zapt-ı raptı sağlandı. Sperma alma uygulamasına geçilmeden önce testis, özellikle de kauda epididimis bölümünün palpasyon ile muayenesi gerçekleştirildi. Kontaminasyon sebebi olabilecek etkenlerin uzaklaştırılması için prepisyum ucu ve etrafındaki kıllar bir makas yardımı ile kesildi. Ardından bölge serum fizyolojik ile temizlendi ve kurulandı.

Her uygulama öncesinde elektro-ejakülatın bipolar probu distile su ile yıkandı ve kurulandı. Kayganlaşmasını sağlayarak rektuma rahat girebilmesi ve rektum mukozasının zarar görmesini engellemek için probun uç kısmına bir miktar katı vazelin sürüldü. Prop yavaş ve dikkatli bir şekilde rektumun 8-10 cm içerisine, elektrotların bulunduğu yüzey hayvanın ventraline bakacak şekilde yerleştirildi.

Fleksura sigmoidea' nın manipule edilerek düzleştirilmesi ve prepisyumun geriye doğru çekilmesi ile glans penis dışarıya çıkartıldı. Penis, öncesinde 37°C sıcaklıkta mufaza edilen 50 ml. lik steril dereceli santrifüj tüpü içerisine yönlendirildi. Ejakülasyonun sağlanması amacıyla 3 saniye aralıklarla 3'er saniye elektrik akımı verildi. Verilen elektrik akımına 2 Volt ile başlandı ve elektrik akımı kademeli olarak 5-8 Volta kadar yükseltildi. Elde edilen spermanın soğuk şokundan korunması için toplama tüpü avuç içinde muhafaza edildi. Spermanın alınmasının ardından tüp üzerine koça ait kulak numarası yazılarak identifikasyonu sağlandı. Çevresel koşulların zararlı etkilerinden korumak amacıyla, alınan sperma hızlıca androloji laboratuvarına gönderildi ve bireysel spermatolojik muayenesi gerçekleştirildi.

Her koça ait bireysel sperma örneği bulunan tüpler 26°C sıcaklığa sahip su banyosu içerine yerleştirildi. Hacim, kitle hareketi, spermatozoon motilitesi ve spermatozoon yoğunluğu incelemeleri sonrası spermanın çalışmada kullanılabilecek özellikte olup olmadığına karar verildi. Sperma hacmi 1 ml.lik otomatik pipet yardımıyla belirlendi. Kitle hareketi muayenesi için ısıtılmış lam üzerine bir damla taze sperma örneği damlatıldı. Örnek, üzerine lamel kapatılmaksızın ısıtma tablasına sahip faz-kontrast mikroskobunda 100 büyütmede muayene edildi. Değerlendirmede damlanın periferindeki kitlesel hareketlerin karekteri incelendi ve +4 puanlama skalası kullanıldı (Ak ve ark. 2010). Spermatozoon motilitesi muayenesi ve yoğunluk tayini 1:40 oranında sulandırılmış spermanın "bilgisayar destekli spermatozoon analiz cihazında" (CASA) ("12.3 IVOS, Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA") incelenmesi ile gerçekleştirildi.

Bireysel olarak en az 0,5 ml hacim, +++ ve üzeri kitle hareketi, %80 ve üzeri spermatozoon motilite oranı ve $1x10^9$/ml ve üzeri spermatozoon yoğunluğuna sahip örnekler çalışmada kullanıldı. Pooling sonrası spermatozoon motilitesi ve yoğunluğu muayeneleri tekrar gerçekleştirildi.

3.4. Sulandırıcıların Hazırlanması

Çalışmada, her bir grup için 20 adet 0,25 ml'lik payet dondurulduve payet içerisinde $50x10^6$ adet motil spermatozoon olacak şekilde sulandırma oranı hesaplandı.

Pooling hacmi 10 eşit hacime pay edilerek gruplar oluşturuldu. Gruplar; Tris-yumurta sarısı (TYS) sulandırıcısında ilave edilen resveratrol (RES), siklodekstrin (CD) ve siklodekstrine yüklenmiş resveratrol (CD-RES) oranlarına göre oluşturuldu.

Sulandırıcılarda kullanılan kimyasal maddelerin tamamı Sigma Chemical Co. firmasından (Saint Louis, MO, USA) temin edildi.

Yumurta Sarısı (YS) Solüsyonunun Hazırlanması: 20 ml yumurta sarısı üzerine ultrapure su ilave edilerek hacim 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan karışım manüel olarak karıştırılarak mümkün olduğunca homojenize olması sağlandı. Yumurta sarısı içerisindeki kaba partiküller, soğutmalı santrifüjde (Nüve, NF400) (5°C) 45 dk süre 12000 rpm. de santrifüje edilerek elimine edildi. Elde edilen süpernatant 45 µm. lik porlara sahip tek kullanımlık filltrelerden (Millex gp, 0,45 µm) geçirildi (Demir ve ark. 2015).

Tris Bazlı Yumurta Sarısı (TYS) Sulandırıcısının Hazırlanması: YS solüsyonu Tris bazlı yumurta sarısı sulandırıcısının hazırlanmasında kullanıldı. Tablo 3-1'de belitilen kimyasalların ilavesi sonrası TYS sulandırıcısının ozmotik basıncı 305-315 mOsm/kg ve pH'sı 6,8-6,9' a kalibre edildi (Cirit ve ark. 2013). Hazırlanan sulandırıcı 45 µm. lik porlara sahip tek kullanımlık filltrelerden geçirildi ve steril 50 ml. lik tüpler içerisinde -20°C sıcaklıkta muhafaza edildi. Çalışmanın tekrarlarında aynı depo sulandırıcı kullanıldı ve sonraki aşamalarda sulandırıcı hazırlanmasına bağlı oluşabilecek farklılıkların engellenmesi amaçlandı (Arıcı 2017).

Tablo 3- 1: Tris bazlı yumurta sarısı (TYS) sulandırıcısının formülasyonu.

İçerik	Miktar
Tris	27,1 g/lt
Sitrik Asit	14 g/lt
Fruktoz	10 g/lt
Penisilin	1000000 IU/lt
Streptomisin	1000 mg/lt

TCG Sulandırıcısının Hazırlanması: Çalışma gruplarına ilave edilen resveratrol, siklodekstrin ve siklodekstrine yüklenmiş resveratrol maddelerinin çözdürülmesi amacıyla Tris-sitrik asit-glikoz sulandırıcısı kullanıldı (Tablo 3-2).

Tablo 3- 2: Tris-sitrik asit-glikoz (TCG) sulandırıcısının formülasyonu

İçerik	Miktar
Tris	25 mM/ml
Sitrik Asit	8 mM/ml
Glikoz	7 mM/ml

Siklodekstrin Molekülüne Resveratrol Yüklenmesi (CD-RES): Resveratrolün siklodekstrin molekülüne yükleme işlemi, Silva ve ark. (2014) tarafından belirtilen yöntemin modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi. 178,65 mg metil-β-siklodekstrin cam deney tüpü içerisinde üzerine 1 ml deiyonize su ilave edilerek çözdürüldü. Bu karışımın üzerine 10 mg resveratrol ilave edildi. Elde edilen solüsyon ağzı kapalı şekilde 250 rpm. de 24 saat süre ile karıştırıldı. Ayrıca tüpün etrafı alüminyum folyo ile sarılarak ışık görmesi engellendi. Süre sonunda cam petri içerisine aktarılan karışım -50°C' de dondurulduktan ve 0,203 Torr atmosfer basıncında liyofizasyonu (Telstar, Lyo Quest) sağlandı.

3.5. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması

Bireysel spermatolojik muayeneler sonrası çalışmaya dahil edilen sperma örnekleri 26°C sıcaklığa sahip su banyosu (Nüve, BM 30) içerisinde eşit hacimlerde birleştirilerek pooling yapıldı. Pooling sonrası koçlara ait spermaların homojen olarak karışmasını sağlamak için 1 ml. lik otomatik pipet ile hafifçe çekme ve boşaltma işlemi uygulandı. Örnek içerisinden 5 µl sperma alınarak 1:40 oranında TYS sulandırıcısı ile sulandırıldı. Sulandırılan spermanın motilite muayenesi ve yoğunluk tayini CASA sisteminde gerçekleştirildi. Elde edilen motilite ve yoğunluk verileri dikkate alınarak sulandırma oranı hesaplandı. Bir payet içerisinde $50x10^6$ motil spermatozoon olacak şekilde her grup için 20 adet mini payet (0,25 ml) hazırlandı.

Ön sulandırma prosedürleri 26°C sıcaklığa sahip su banyosunda gerçekleştirildi. Hazırlanan pooling 10 eşit hacime ayrıldı ve herbir hacim 14 ml.'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüm gruplar (Tablo 3-3) içerisinde farklı dozlarda RES, CD ve CD-RES maddelerinin bulunduğu eşit hacimde (200 µl) TCG sulandırıcısı ile sulandırıldı. Kontrol grubuna da aynı hacimde TCG ilave edilerek gruplar arasında sulandırma oranı farklılığı önlendi. Ön sulandırma işlemi sonrası tüm gruplar 26°C sıcaklığa sahip su banyosu içerisinde 15 dk. süreyle inkübasyona bırakıldı.

Ön sulandırma işlemi ve inkübasyon sonrası tüm gruplar %20 yumurta sarısı içeren TYS sulandırıcısı (Sulandırıcı A, gliserolsüz) ile sulandırıldı ve motil spermatozoon oranı $400x10^6$ /ml olarak hesaplandı. Sulandırıcı A ile sulandırma işlemi kademeli olarak 2 dakika aralıklarla gerçekleştirildi. Sulandırıcı A; sırasıyla %10, %20, %30 ve %40'lık oranlarda ilave edildi. Su banyosu içerisinde (26°C) gerçekleşen işlemlerin tamamlasından sonra tüm gruplar, 26°C sıcaklığa ayarlanmış proglamlanabilir otomatik soğutma cihazına (BioCool III) yerleştirildi. Sulandırılmış spermalar dakikada 0,2°C soğutma hızı ile 105 dakikada 5°C'ye soğutuldu (Ak ve ark. 2010).

5°C'ye soğutulmuş olan gruplar aynı sıcaklığa sahip %10 gliserol (v/v) ilave edilmiş TYS sulandırıcısı (Sulandırıcı B) ile 1:1 oranında sulandırıldı (gliserolizasyon). Sulandırıcı B dk. 8'er dakika aralıklarla %10, %20, %30 ve %40 olmak üzere kademeli olarak sulandırılmış spermaya ilave edildi. Gliserolizasyon 5°C'lik soğuk vitrin içerisinde gerçekleştirildi. Gliserolizasyon sonrası tüm gruplarda final gliserol oranı %5 oldu. Her payetteki spermatozoon sayısı $50x10^6$ olarak gerçekleşti (Ak ve ark. 2010; Cirit ve ark. 2013).

Tablo 3- 3: Çalışma grupları ve sulandırıcı içerikleri

Gruplar	***Sulandırıcı**
Kontrol	TCG ön sulandırma + TYS
RES10	10 µg/ml RES (toplam hacimde) içeren TCG ile ön sulandırma + TYS
RES20	20 µg/ml RES (toplam hacimde) içeren TCG ile ön sulandırma + TYS
RES40	40 µg/ml RES (toplam hacimde) içeren TCG ile ön sulandırma + TYS
CD10	10 µg/ml RES (toplam hacimde) yüklenmesi için gerekli olan CD (toplam hacimde 178,65 µg/ml) içeren TCG ile ön sulandırma + TYS
CD20	20 µg/ml RES (toplam hacimde) yüklenmesi için gerekli olan CD (toplam hacimde 357,30 µg/ml) içeren TCG ile ön sulandırma + TYS
CD40	40 µg/ml RES (toplam hacimde) yüklenmesi için gerekli olan CD (toplam hacimde 714,60 µg/ml) içeren TCG ile ön sulandırma + TYS
CD-RES10	10 µg/ml RES yüklenmiş CD (toplam hacimde 10 µg/ml RES+178,65 µg/ml CD) içeren TCG ile ön sulandırma + TYS
CD-RES20	20 µg/ml RES yüklenmiş CD (toplam hacimde 20 µg/ml RES+357,30 µg/ml CD) içeren TCG ile ön sulandırma + TYS
CD-RES40	40 µg/ml RES yüklenmiş CD (toplam hacimde 40 µg/ml RES+714,60 µg/ml CD) içeren TCG ile ön sulandırma + TYS

*TCG: Tris, sitrik asit, glikoz sulandırıcısı; TYS: Tris bazlı yumurta sarısı sulandırıcısı; RES: Resveratrol; CD: Siklodekstrin; CD-RES: Resveratrol yüklenmiş siklodekstrin

Ekilibrasyon işlemi proglamlanabilir otomatik soğutma cihazında 60 dakikada gerçekleştirildi. Ekilibrasyon sonrasında tüm gruplarda objektif (CASA) motilite muayeneleri tekrarlandı. Sulandırılmış sperma örneklerinin 0,25 ml. lik payetler içerisine doldurulmasında vakumlu manuel payet paketleme cihazı kullanıldı. Paketleme işlemi 5°C ortamda soğuk vitrin içerisinde gerçekleştirildi. Payet içerisine çekilmesi sonrası payetin açık ucunun kapatılmasında toz polivinil alkol (PVA) kullanıldı. Toz PVA'nın sertleşmesi için payet uçları 5°C sıcaklıktaki su içerisine daldırıldı ve kurulandı. Daha sonra payetler birbirine temas etmeyecek şekilde payet dizme rafına yerleştirildi. Donma

işleminin ortalama -120°C sıcaklığa sahip azot buharınında sağlanması amacıyla payet rafı sıvı azot yüzeyinin 4 cm üzerinde 10 dk. süre ile yerleştirildi (Özmen 2015; Arıcı 2017). Dondurulan payetler sıvı azot (-196°C) içerisine aktarıldı ve identifikasyon amaçlı üzerine çalışma bilgileri etiketlenmiş gobletlerde konteyner içerisinde depolandı.

3.6. Spermanın Eritilmesi

Spermanın eritilmesi ve eritme sonrası spermatolojik muayenelerin gerçekleştirilmesi için dondurulan payetler en az iki hafta süre sıvı azot konteynerleri içerisinde muhafaza edildi.

Gruplara ait spermaların eritilmesi, payetlerin 37°C sıcaklıktaki su içerisinde 30 saniye bekletilmesi ile sağlandı (Ak ve ark. 2010).

3.7. Spermatolojik Muayeneler

3.7.1. Donma Öncesi Gerçekleştirilen Spermatolojik Muayeneler

Pooling ve ekilibrasyon sonrasında spermatozoon motilite muayeneleri gerçekleştirildi.

Spermatozoon kinetik hareket parametreleri ve objektif motilite incelemelerinde CASA sistemi kullanıldı. Muayene öncesinde CASA cihazında koç spermasının değerlendirilmesi için gerekli standart tür değerlerin kalibrasyonu yapıldı (Demir ve ark. 2015). Isıtma tablası üzerinde gruplara ait örneklerinden 3 µL sperma numunesi (pooling sperması için 1:40 oranında sulandırılmış) alınarak makler lamının (Makler counting chamber, Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) sayım hücresine konuldu. Örnekte kabarcık ve/veya köpürme olmamasına dikkat edildi. Daha sonra makler sayım kamarasının üzeri kendisine ait özel lameli ile kapatılarak 37°C sıcaklığa ayarlanmış hazne içerisine yerleştirildi. Değerlendirme 3-10 farklı objektif alanında en az 600-800 spermatozoonun sayılması ile gerçekleştirildi. Elde edilen total motilite (%), progresif motilite (%) ve kinetik hareket parametreleri (VSL, VCL, VAP, ALH, BCF, LIN, STR) CASA sistemi içerisinde ayrı bir klasörde sınıflandırılarak depolandı.

Kinetik Hareket Parametreleri (KHP): Spermatozoonun birim zamanda gösterdiği lokalizasyon değişikliği esnasından sahip olduğu hız ve hareket şekli ile ilgili tanımlamalardır (Amann ve Waberski 2014) (Şekil 3-1).

VAP (Velocity Average Path; Eğrisel Ortalama Yol Hızı): Spermatozoon başının katettiği ortalama yoldaki hızıdır (µm/sn).

VSL (Velocity Straight Linear; Doğrusal Yol Hızı): Spermatozoon başının iki nokta arasında birim zamanda katettiği doğrusal (kuşuçuşu) mesafedir (µm/sn).

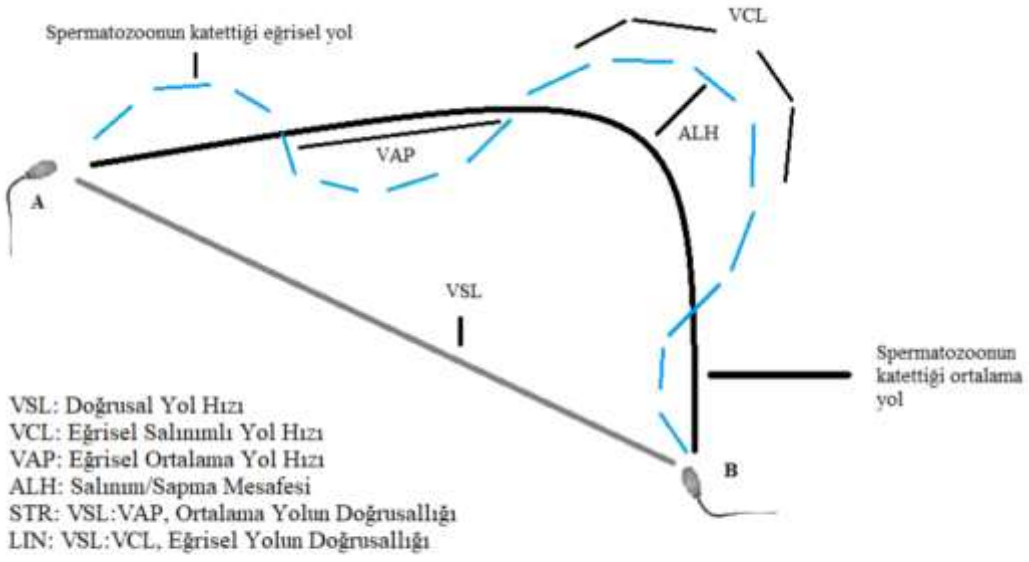
VCL (Velocity Curve Linear; Eğrisel Salınımlı Yol Hızı): Spermatozoon başının 2-boyutlu gerçek eğrisel yoldaki hareketi esnasında katettiği hızıdır (µm/sn). VCL spermatozoon canlılığının göstergesi olarak kabul edilir.

ALH (Lateral Head Amplitude; Sapma/Salınım Mesafesi): Spermatozoonun izlediği ortalama yol üzerinden başın laterale doğru ortalama sapma mesafesidir (µm).

BCF (Beat Cross Frequency; Çapraz Geçiş Frekans Ritmi): Spermatozoonun katettiği eğrisel yolun ortalama yoldan geçme frekansıdır (Hz).

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

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



A: Hareketin başlangıç noktası, B: Birim zamanda hareketin bitiş noktası

Şekil 3- 1: Spermatozoona ait birim zamanda gözlemlenen kinetik hareket parametreleri

3.7.2. Eritme Sonrası Gerçekleştirilen Spermatolojik Muayeneler

3.7.2.1. Motilite Muayenesi

Eritme sonrası spermatozoon motilite muayenesinin gerçekleştirilmesinde aynı çalışma gününe ait çalışma gruplarından ikişer adet payet 37°C sıcaklıktaki su banyosu içerisinde 30 saniye süre bekletilerek spermanın erimesi sağlandı. Kurulama işlemi sonrası payetlerin PVA ile kapatılmış uç kısmı makas ile kesildi. Aynı gruba ait iki payette bulunan sperma 0,5 ml. lik mikro santrifüj tüpü içerisine aktarılarak birleştirildi. Motilite muayeneleri Bölüm 3.7.1 ‘de belirtildiği üzere her grup için iki kez tekrarlanarak gerçekleştirildi .

3.7.2.2. Dayanıklılık Testi

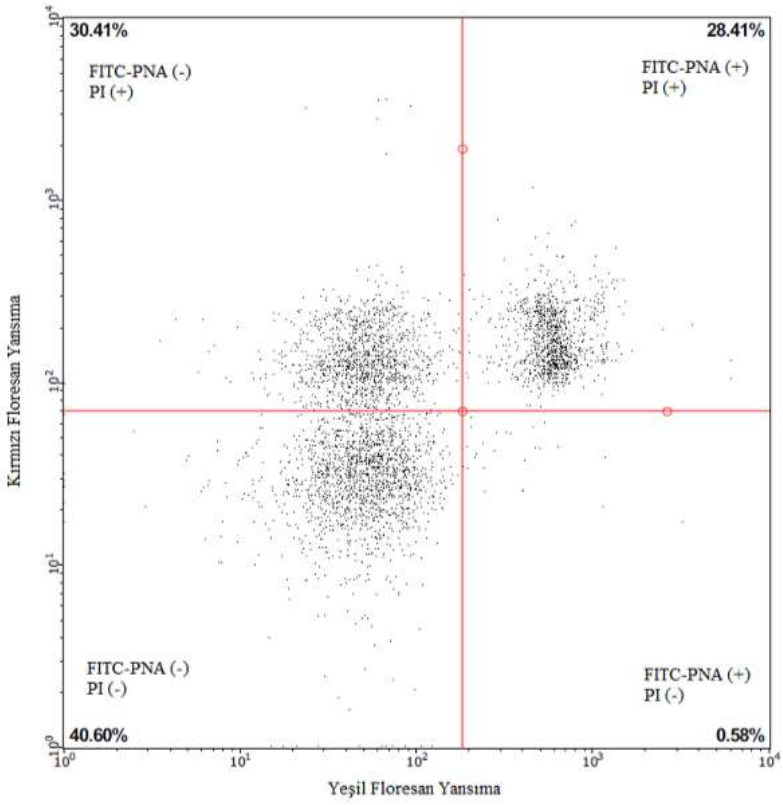
Dayanıklılık testi, spermanın potansiyel fertilitesinin ne kadar süre ile koruyabildiğini değerlendirmek amacı ile gerçekleştirildi. Eritme sonrası gruplara ait iki payet içerisindeki sperma 0,5 ml. lik mikro santrifüj tüpünde birleştirildi. Eritme işlemi bitimi (0. saat) motilite muayeneleri Bölüm 3.7.1’de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. 1., 2., ve 4. saatlerde motilite muayenelerini tekrar gerçekleştirmek üzere identifiye edilmiş mikro santrifüj tüpleri 37°C sıcaklıktaki etüv içerisinde 4 saat süreyle inkübasyona bırakıldı (Bag ve ark. 2002). İncelemeler her grup için 2 kez tekrar edildi.

3.7.2.3. Hipo Ozmotik Şişme Testi

Spermatozoon membranı fonksiyonel bütünlüğünün değerlendirilmesinde modifiye edilmiş hipoozmotik şişme testinden (HOST) yararlanıldı (Bacinoglu ve ark. 2008; Cirit ve ark. 2013). Muayene için aynı güne ait çalışma gruplarından tesadüfi olarak iki adet payet seçildi. Eritilen sperma içerisinden 20 µl örnek alınarak 0,5 ml. lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Sperma örneğinin üzerine 37°C sıcaklıktaki 50 mOsm/kg ozmotik basınca sahip 350 µl HOST solüsyonu (sodyum sitrat-fruktoz solüsyonu) ilave edildi. Hazırlanan örnek 45 dakika süreyle 41°C sıcaklığa sahip su banyosu içerisinde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda üzerine 50 µl Hancock tespit solüsyonu (Hancock 1952) ilave edilerek reaksiyonları durduruldu. Sperma örneklerinin incelenmesi faz-kontrast mikroskobunda üzerine lamel kapatılarak 400 büyütmede gerçekleştirildi ve 200 hücre değerlendirildi. Kuyruk kısımlarında kıvrılma, katlanma ve/veya sarmallaşma tespit edilen spermatozoonların hipoozmotik ortama reaksiyon verdikleri ve plazma membranlarının fonksiyonel bütünlüklerini korudukları kabul edildi (Cirit ve ark. 2013).

3.7.2.4. Spermatozoon Akrozom Bütünlüğünün Muayenesi

Akrozom bütünlüğü değerlendirilmesi FITC-PNA (fluorescein isothiocyanate labeled peanut agglutinin), PI (propidium iodide) boyalarının birlikte kullanılması ve Marco-Jimenez ve ark. (2005)' e ait boyama prosedürünün modifiye edilmesi ile gerçekleştirildi. Her grup için aynı çalışma gününe ait 2 adet payet içerisindeki sperma 37°C sıcaklığa sahip su banyosu içerisinde 30 sn. sürede eritildi. Eritilen sperma, yoğunluğu mililitrede $1x10^6$ spermatozoon olacak şekilde Tris bazlı tampon sölüsyonu ile sulandırıldı. Sulandırılan örnek 5 dk. süreyle 700 rpm. de santrifüje edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Mikro santrifüj tüpünün dibinde kalan pellet üzerine 1000 µl Tris bazlı tampon solüsyonu ilave edildi. Hafif pipetleme işlemi ile pelletin dağılması sağlandı. Örnek içerisinden 100 µl alınarak başka bir mikro santrifüj tüpüne aktarıldı. Bu aşamadan sonra boyama prosedürünün ışıktan etkilenmemesi için çalışmaya karanlık ortamda devam edildi. Örneğin üzerine sırası ile 100 µg/ml stok FITC-PNA boyasından 2 µl , Tris bazlı tampon solüsyonundan 200 µl ve 0,5 µg/ml stok PI boyasından 2 µl ilave edildi. Hazırlanan örnekten 300 µl alınarak 96 kuyucuklu mikroplakaya aktarıldı. Analiz, akış sitometrisinde (Guava®, EasyCyte) 519 nm-590 nm emisyon aralığında en az 5000 spermatozoonun sayılması ile gerçekleştirildi. Yeşil (FITC-PNA boyası alan) ve kırmızı (PI boyası alan) floresan yansıma göstermeyen spermatozoonlar (FITC-PNA -, PI -) canlı-akrozomu sağlam olarak kabul edildi. Elde edilen verilerin yüzdesel oranları, histogram ve data plot grafikleri kaydedildi.

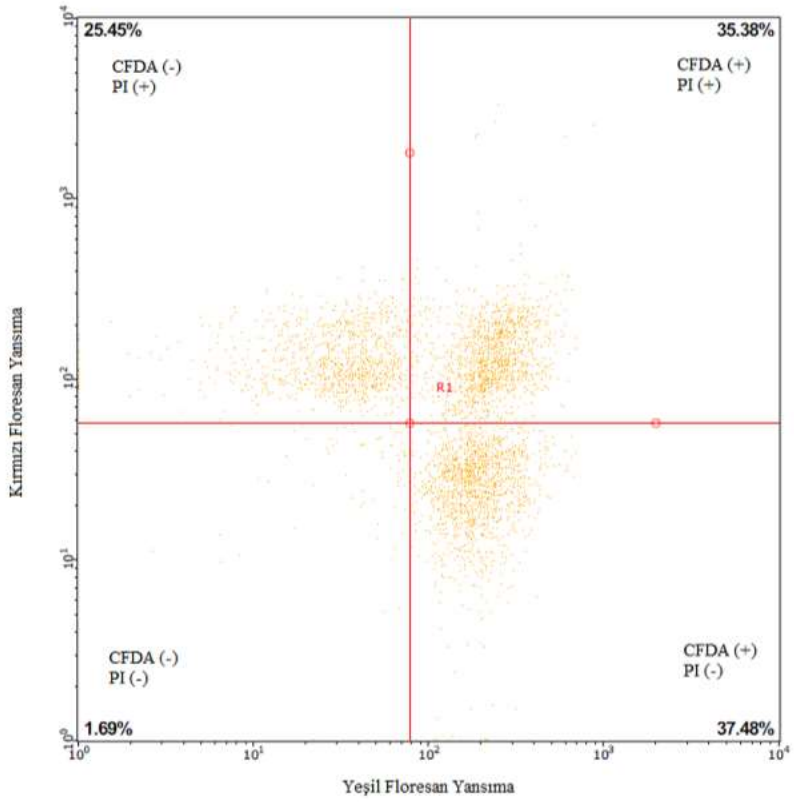


Şekil 3- 2: Akrozom bütünlüğü muayenesinde FITC-PNA ve PI floresan boyaları ile boyanan spermatozoonların dağılımı (Akış sitometrisi)

3.7.2.5. Spermatozoon Membran Bütünlüğünün Muayenesi

Spermatozoon membran bütünlüğü muayenesi carboxyfluorescein diacetate (CFDA) ve propidium iodide (PI) floresan boyalarının kombine kullanımı ile akış sitometrisinde gerçekleştirildi. Boyama protokolünün oluşturulmasında Camara ve ark. (2011)' nın bildirdiği yöntemden yararlanıldı. Her grup için aynı çalışma gününe ait 2 adet payet içerisindeki sperma 37°C sıcaklığa sahip su banyosu içerisinde 30 sn. sürede eritildi. Eritilen sperma, yoğunluğu mililitrede $1x10^6$ spermatozoon olacak şekilde Tris bazlı tampon sölüsyonu ile sulandırıldı. Sulandırılan örnek 5 dk. süreyle 700 rpm. de santrifüje edildi ve süre sonunda süpernatant uzaklaştırıldı. Mikro santrifüj tüpünün dibinde kalan pellet üzerine 1000 µl Tris bazlı tampon solüsyonu ilave edildi. Hafif pipetleme işlemi ile pelletin dağılması sağlandı. Örnek içerisinden 100 µl alınarak başka bir mikro santrifüj tüpüne aktarıldı. Bu aşamadan sonra boyama prosedürünün ışıktan etkilenmemesi için çalışmaya karanlık ortamda devam edildi. Örneğin üzerine sırası ile 0,5 µl CFDA (0,45 mg/ml stok) boyası, 200 µl Tris bazlı tampon solüsyonu ve 1 µl PI (0,5 mg/ml stok) boyası eklendi. Boyanan sperma örneklerinden 300 µl alınarak 96

kuyucuklu mikroplakalara nakledildi. Analiz, akış sitometrisinde (Guava®, EasyCyte) 519 nm-630 nm eksitasyon aralığında en az 5000 spermatozoonun sayılması ile gerçekleştirildi. Yeşil (CFDA boyası alan) floresan yansıma yapan fakat kırmızı (PI boyası alan) floresan yansıma göstermeyen spermatozoonlar (CFDA +, PI -) "canlı-membranı sağlam" olarak kabul edildi. Elde edilen verilerin yüzdesel oranları, histogram ve data plot grafikleri kayıt altına alındı.

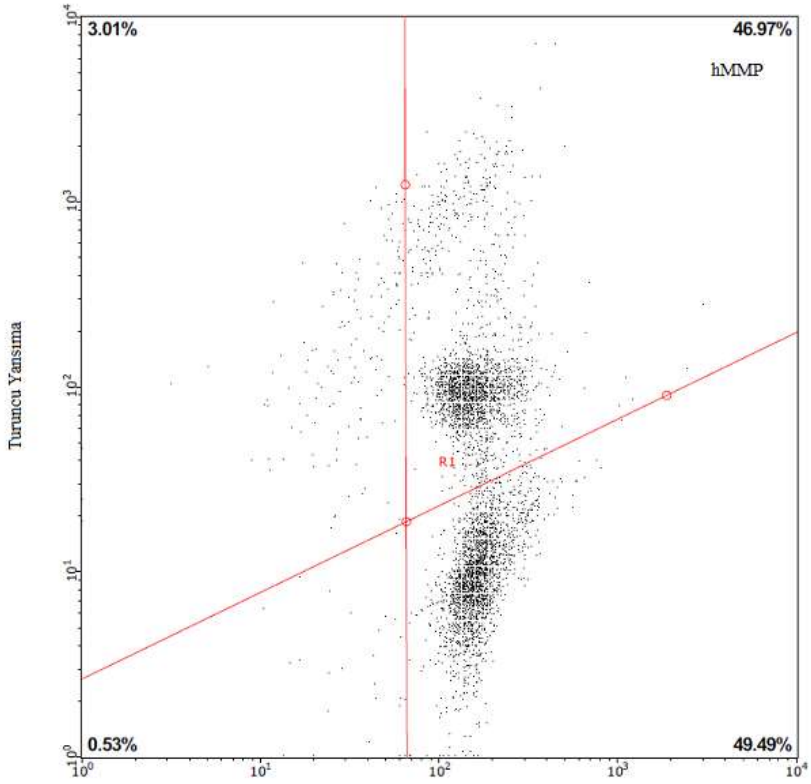


Şekil 3- 3: Membran bütünlüğü muayenesinde CFDA ve PI floresan boyaları ile boyanan spermatozoonların dağılımı (Akış sitometrisi)

3.7.2.6. Mitokondriyal Aktivite Muayenesi

Mitokondriyal membran potansiyelinin değerlendirilmesinde JC-1 (5,50,6,60-tetrachloro-1,10,3,30-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide) floresan boyası kullanıldı. İki adet payet içerisindeki sperma 37°C sıcaklığa sahip su banyosu içerisinde 30 sn. sürede eritildi. Eritme sonrası 1,5 ml. lik mikrosantrifüj tüpünde birleştirilen spermalar Tris bazlı tampon solüsyonu ile mililitrede $50x10^6$ spermatozoon olacak şekilde sulandırıldı. Örnek içerisinden 100 µl sperma alınarak ayrı bir 0,5 ml. lik

mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Karanlık ortamda üzerine ilk olarak 200 µl Tris bazlı tampon sulandırıcısı ve ardından 0,5 µl JC-1 stok çözeltisi (DMSO içerisinde 3 mM JC-1) ilave edildi. Boyanan sperma örnekleri 38°C sıcaklığa ayarlanmış su banyosu içerisinde 40 dk. inkübe edildi (Gillan ve ark. 2005). Süre sonunda her gruba ait sperma örneklerinden 300 µl alınarak akış sitometrisinde (Guava®, EasyCyte) incelenmek üzere 96 kuyucuklu mikroplakalara aktarıldı. Turuncu yansıma gösteren spermatozoonlar "yüksek mitokondriyal membran potansiyeline (hMMP)" sahip olarak değerlendirildi.

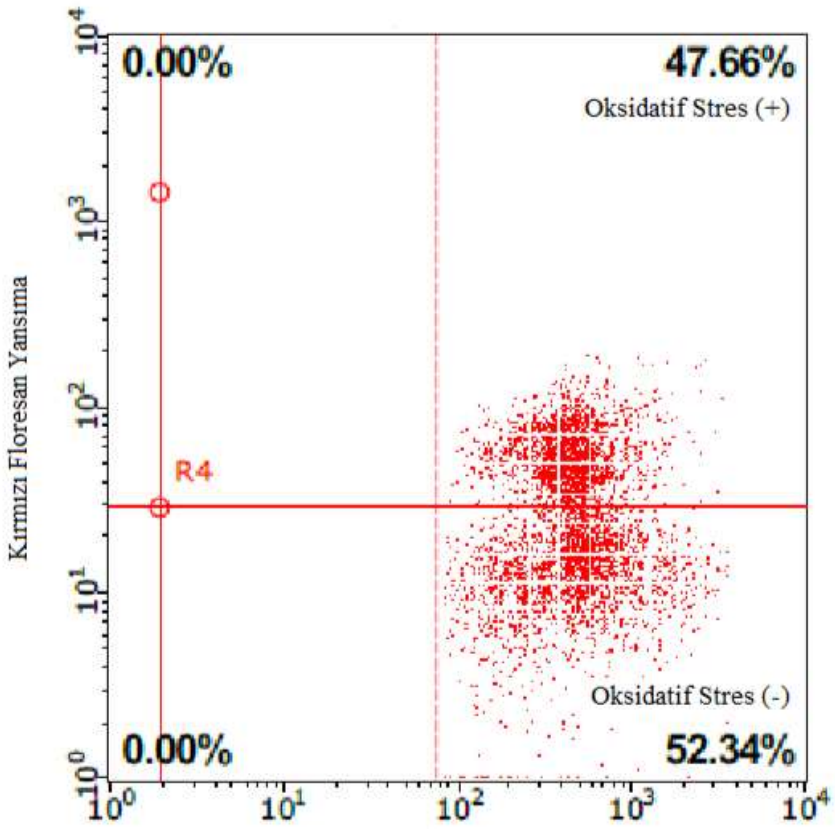


Şekil 3- 4: Mitokondriyal aktivite muayenesinde JC-1 floresan boyası ile boyanan ve yüksek mitokondriyal membran potansiyeline (hMMP) sahip spermatozoonların dağılımı (Akış sitometrisi)

3.7.2.7. Oksidatif Stres Muayenesi

Muayene, oksidatif stres altındaki spermatozoonların sahip oldukları süperoksit radikalleri başta olmak üzere reaktif oksijen türlerinin (ROS) kantitatif değerlendirilmesi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla Muse® "oksidatif stres kiti" kullanıldı. Kit içerisinde bulunan dihydroethidium (DHE) maddesi hücre içi ROS ile reaksiyona girer ve oksitlenerek ethidium bromide ortaya çıkar. Ethidium bromide DNA yapısına bağlanarak hücrenin kırmızı renkte floresan yansıma yapmasına neden olur (Mostek ve ark. 2017). Spermatozoonların boyama protokolü kite ait kullanma klavuzu rehber alınarak

uygulandı. Eritilen sperma mililitrede $100x10^6$ spermatozoon olacak şekilde Tris bazlı tampon solüsyonu ile sulandırıldı. Karanlık ortamda, içerisinden 10 µl sperma örneği alınarak başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 190 µl hazır kit solüsyonu eklendi. Hazırlanan numuneler 96 kuyucuklu mikroplakalara yerleştirildi. İnceleme akış sitometrisinde (Guava®, EasyCyte) gerçekleştirildi ve kırmızı renkte floresan yansıma yapan spermatozoonların yüzdesel oranları belirlendi.



Şekil 3- 5: Akış sitometrisinde gerçekleştirilen oksidatif stres muayenesinde spermatozoonların dağılımı

3.7.2.8. Kapasitasyon Muayenesi

Eritme sonrası spermatozoonlara ait kapasitasyon durumlarının değerlendirilmesinde floresan klortetrasiklin (CTC) boyası kullanıldı. Boyama protokolü Perez ve ark. (1996)'ın kullandıkları metodun modifiye edilmesi ile gerçekleştirildi. Muayene günlerinde taze olarak 5 ml Tris bazlı sulandırıcı (Ultrapure su içerisinde 20 mM Tris, 130 mM NaCl, 5 mM Cyteine) içerisine 2 mg toz yapıdaki CTC kimyasalı ilave edilerek çalışma solüsyonu hazırlandı. Çalışma solüsyonunun ışıktan etkilenmesini önlemek için beherin etrafı alüminyum folyo ile kapatıldı. Karanlık odada 0,5 ml. lik mikrosantrifüj tüp içerisine 10 µl sperma, üzerine 15 µl CTC çalışma solüsyonu ilave edildi. Hazırlanan örneklerin 5 dakika süreyle oda ısısında inkübasyonuna takiben üzerine reaksiyonu durdurmak amacıyla 0,5 µl Hancock eriyiği eklendi. Boyanan spermatozoonlar lam lamel arasında floresan ataçmanlı faz-kontrast mikroskobun 400'lük büyütmesinde incelendi. Her grup için 485/20 nm eksitasyon ve 580-630 nm emisyon filtrelerinde floresan yansıma yapan 100 hücrenin değerlendirilmesi yapılarak B pattern (kapasite) ve F pattern (non-kapasite) özellik sergileyen spermatozoonların (Şekil 3-6) yüzdesel oranları kaydedildi.



B pattern: Spermatozoon başının post akrozomal bölgesi dışında var olan floresan yansıma; kapasitasyon gerçekleşmiş.



F pattern: Spermatozoon baş bölgesinin tamamında var olan floresan yansıma; kapasitasyon gerçekleşmemiş.

Şekil 3- 6: CTC floresan boyamada B ve F pattern spermatozoonlar (floresan ataçmanlı faz-kontrast mikroskop).

3.8. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizlerin uygulanmasında “SPSS for Windows programı 22.0 versiyonu” kullanıldı (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Spermatolojik analizler sonucunda elde edilen verilerin gruplar arasındaki farklılıkların tespitinde “Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve farklılıkların önem kontrolünde Duncan’s Multiple Range testi” kullanıldı. Dayanıklılık testinin inkübasyon süreleri arasındaki istatistiksel farklılığın tespitinde “Tekrarlanan Ölçümlerde Tek Yönlü Varyans Analizi” kullanıldı. Veriler “Ortalama ± Standart Hata” şeklinde sunuldu.

4. BULGULAR

4.1. Donma Öncesi Elde Edilen Spermatolojik Bulgular

Çalışmada pooling sonrası (26°C) elde edilen total motilite ve progresif motilite değerleri sırasıyla %95,00±0,63 ve %61,40±2,10 olarak belirlendi. Pooling sonrası CASA ile belirlenen ortalama spermatozoon yoğunluğu 3,90±0,91x10^9 olarak bulundu.

Ekilibrasyon sonrası CASA ile saptanan total motilite oranlarında resveratrol içeren RES10, RES20 ve resveratrol+siklodekstrin kompleksi içeren CD-RES10, CD-RES20, CD-RES40 grupları istatistiksel olarak kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubu dışındaki tüm gruplar benzer bulundu. CASA ile belirlenen progresif motilite oranları ve kinetik haraket parametresi (KHP) değerlerinde istatistiksel bir fark tespit edilmedi. Ekilibrasyon sonrasında gerçekleştirilen muayenelere ait veriler Tablo 4-1'de gösterilmiştir.

Tablo 4- 1: Ekilibrasyon (5°C) sonrası saptanan motilite (%) ve kinetik hareket parametreleri özelliklerinin karşılaştırılması (n:10).

*Grup No	CASA								
	Total Motilite (%)	Progresif Motilite (%)	VAP (µm/sn.)	VSL (µm/sn.)	VCL (µm/sn.)	ALH (µm/sn.)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)
Kontrol	91,90±1,27[b]	51,20±2,99	122,58±5,27	102,25±4,92	191,85±9,09	6,56±0,28	35,93±1,14	82,10±1,33	56,10±1,98
RES10	96,20±0,64[a]	54,20±3,00	124,87±4,00	104,03±3,63	191,78±8,26	6,54±0,33	34,54±1,39	82,40±1,60	57,00±2,48
RES20	96,00±0,51[a]	52,00±3,23	123,91±4,17	102,02±3,84	192,49±8,25	6,64±0,40	34,78±1,17	81,60±1,51	55,90±2,28
RES40	94,10±1,40[ab]	51,90±2,96	123,37±3,70	101,60±3,56	192,09±8,06	6,54±0,35	33,84±1,28	81,40±1,58	55,50±2,68
CD10	93,30±0,96[ab]	50,60±2,54	122,38±3,53	102,01±3,15	189,46±6,44	6,40±0,28	35,38±1,27	82,40±1,38	56,40±2,14
CD20	93,30±1,35[ab]	51,80±3,15	123,26±3,89	103,25±3,94	189,74±6,77	6,42±0,35	35,54±1,42	82,50±1,68	56,60±2,67
CD40	93,40±0,74[ab]	53,50±2,67	126,23±3,86	105,98±4,12	192,93±5,24	6,44±0,29	34,85±1,31	82,70±1,31	57,10±2,30
CD-RES10	95,30±0,47[a]	50,90±3,50	124,97±4,63	102,46±5,09	191,99±6,23	6,52±0,31	33,05±1,37	80,90±1,68	55,50±2,65
CD-RES20	95,40±0,68[a]	53,50±3,00	126,63±4,27	105,05±4,25	190,88±8,14	6,18±0,37	33,64±1,05	82,60±1,60	58,30±2,81
CD-RES40	95,20±0,69[a]	52,10±2,97	126,96±5,16	104,56±4,57	192,44±9,53	6,36±0,34	34,20±0,81	82,00±1,57	57,70±2,75

*Gruplara ait tanımlamalar Tablo 3-3'te belirtilmiştir.

[ab-]: Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

4.2. Eritme Sonrası Elde Edilen Spermatolojik Bulgular

Tüm gruplara ait sperma örnekleri 37°C sıcaklıktaki su banyosu içerisinde 30 sn. sürede eritildi. Eritme sonrası 0. saatte total motilite, progresif motilite, kinetik hareket parametreleri, akrozom bütünlüğü, membran bütünlüğü, HOST, mitokondriyal aktivite, kapasitasyon ve oksidatif stres durumları incelendi. Ayrıca, tüm gruplar 4 saat süreyle 37°C sıcaklığa sahip etüv içerisinde dayanıklılık testine tabi tutuldu ve total motilite, progresif motilite ve KHP incelemeleri testin 1., 2. ve 4. saatlerinde tekrarlandı.

Eritme sonrası 0. saatte en yüksek total motilite oranına sahip RES20 (%62,65±3,26) ve CD-RES10 (%64,35±2,64) gruplarının CD40 (%51,50±3,70) grubuna göre yüksek olduğu saptandı ($p<0,05$). Eritme sonrası 0. saatte saptanan en yüksek progresif motilite oranı %32,65±1,44 değeri ile CD-RES10 grubunda tespit edildi ve RES10, CD10, CD40, CD-RES20, CD-RES40 gruplarında bulunan progresif motilite oranları CD-RES10 grubuna göre düşük bulundu ($p<0,05$). Gruplar, saptanan KHP özellikleri bakımından karşılaştırıldığında; %98,15±1,72 µm/sn VAP değerine sahip CD-RES10 grubunun %90,52±2,27 µm/sn VAP değeri tespit edilen RES10 grubuna göre yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Her iki grup ile diğer gruplar arasında istatistiksel fark bulunmadı. Diğer KHP verilerinde (VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN) tüm gruplar benzer bulundu (Tablo 4-2).

Tablo 4- 2: Eritme sonrası (37°C, 0. saatte) saptanan motilite (%) ve kinetik hareket parametreleri özelliklerinin karşılaştırılması (n:20).

*Grup No	CASA								
	Total Motilite (%)	Progresif Motilite (%)	VAP (µm/sn.)	VSL (µm/sn.)	VCL (µm/sn.)	ALH (µm/sn.)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)
Kontrol	59,65±3,66^{ab}	29,15±1,59^{ab}	95,35±2,84^{ab}	84,84±3,14	146,84±3,39	5,79±0,13	37,15±0,71	85,85±0,85	57,75±1,16
RES10	57,25±3,07^{ab}	26,30±1,90^{b}	90,52±2,27^{b}	79,78±2,34	140,77±3,38	5,99±0,16	34,97±0,64	84,95±0,78	56,70±1,08
RES20	62,65±3,26^{a}	30,45±1,23^{ab}	92,74±1,92^{ab}	82,14±2,30	142,27±2,66	5,81±0,20	35,69±0,72	85,90±0,94	58,05±1,46
RES40	60,90±2,56^{ab}	28,90±1,60^{ab}	93,10±2,16^{ab}	82,08±2,51	143,65±2,90	5,90±0,21	35,36±0,75	85,10±1,06	57,15±1,59
CD10	57,85±3,60^{ab}	26,75±1,63^{b}	92,37±1,99^{ab}	81,45±2,56	142,25±2,24	5,85±0,19	36,27±0,89	85,25±1,12	57,40±1,67
CD20	59,80±3,42^{ab}	28,90±1,55^{ab}	95,43±2,54^{ab}	85,02±2,73	149,05±3,90	5,90±0,16	37,39±0,60	85,60±0,89	56,80±1,23
CD40	51,50±3,70^{b}	26,20±2,24^{b}	95,50±1,94^{ab}	85,21±2,28	147,14±2,77	5,75±0,18	36,89±0,70	86,10±0,92	58,00±1,37
CD-RES10	64,35±2,64^{a}	32,65±1,44^{a}	98,15±1,72^{a}	87,61±2,00	148,10±2,84	5,70±0,18	37,25±0,52	85,95±0,87	59,25±1,62
CD-RES20	56,85±2,96^{ab}	26,70±1,08^{b}	94,61±2,59^{ab}	83,52±2,98	146,18±3,01	5,96±0,17	35,42±0,84	85,25±1,09	57,30±1,55
CD-RES40	57,00±3,20^{ab}	26,55±1,64^{b}	92,78±2,35^{ab}	81,12±2,92	143,71±2,64	5,94±0,20	35,42±1,02	84,05±1,21	56,20±1,53

*Gruplara ait tanımlamalar Tablo 3-3'te belirtilmiştir.

$^{ab-}$: Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

Eritme sonrası elde edilen HOST verileri Tablo 4-3'da gösterildiği gibidir. En yüksek HOST pozitif oranları %43,80±1,40, %44,65±1,11 ile RES10 ve RES20 gruplarında ve %41,40±1,53, %43,25±1,23, %42,95±1,25 ile CD-RES10, CD-RES20, CD-RES40 gruplarında saptandı ($p<0,05$).

Eritme sonrası floresan (CTC) boya ile gerçekleştirilen muayenede, en düşük F pattern (kapasitasyon gerçekleşmemiş spermatozoon) oranı %31,00±2,45, %29,70±2,99 ve %25,30±2,74 ile CD gruplarında (CD10, CD20, CD40) saptandı ($p<0,05$). F pattern spermatozoon oranı %59,10±2,08 olan RES20 grubu, tüm CD grupları (CD10, CD20, CD40) ve kontrol, RES40, CD-RES40 gruplarına kıyasla istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 4-3).

Canlı/membranı bütün spermatozoon oranı RES gruplarında (RES10, RES20, RES40) sırasıyla %34,81±2,61, %30,83±2,37, %28,82±2,05 olarak saptandı. CD-RES (CD-RES10, CD-RES20, CD-RES40) gruplarında ise; %36,43±1,39, %34,67±1,79, %33,48±2,67 oranları bulundu. Kontrol grubu (%30,03±1,87) ile RES ve CD-RES grupları benzer bulundu. RES ve CD-RES grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, CD-RES10 grubu (%36,43±1,39) RES40 grubuna (%28,82±2,05) göre yüksek bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4-3).

Eritme sonrası akış sitometrisinde belirlenen canlı/akrozomu sağlam spermatozoon oranları dikkate alındığında, %25,94±1,47 oranına sahip CD40 grubuna göre RES10, RES20, RES40, CD-RES20 ve CD-RES40 gruplarının daha yüksek orana (%32,43±2,01, %33,70±1,60, %33,55±1,68, %34,01±1,79 ve %32,86±2,76) sahip oldukları saptandı ($p<0,05$). %30,95±1,68 canlı/akrozomu sağlam spermatozoon oranına sahip kontrol grubu ile tüm gruplar arasında istatistiksel anlamlılıkta fark tespit edilmedi (Tablo 4-3).

Eritme sonrası yüksek mitokondriyal aktivite gösteren spermatozoon oranları incelendiğinde, CD20 (%64,76±1,51) ve CD40 (%65,77±2,89) gruplarının diğer gruplara göre yüksek olduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 4-3).

Oksidatif stres altındaki spermatozoon oranları bakımından tüm gruplar benzer bulundu (Tablo 4-3).

Tablo 4- 3: Eritme sonrası akış sitometrisinde saptanan canlı-akrozomu sağlam (n:10), canlı-membranı bütün (n:10), mitokondriyal aktivite gösteren (n:10), oksidatif stress altındaki spermatozoon oranları (n:10), faz-kontrast mikroskopta değerlendirilen Hipoozmotik Şişme Testi (HOST) pozitif oranları (n:20) ve floresan ataçmanlı faz-kontrast mikroskopta saptanan F pattern (kapasitasyon gerçekleşmemiş) spermatozoon oranları (n:10).

*Grup No	F pattern (%)	HOST pozitif (%)	Canlı Membranı Bütün (%)	Canlı Akrozomu Sağlam (%)	Mitokondriyal Aktivite (%)	Oksidatif Stres (%)
Kontrol	44,00±1,94^{b}	35,15±1,03^{b}	30,03±1,87^{abc}	30,95±1,68^{ab}	55,92±2,73^{b}	38,88±1,63
RES10	48,40±2,64^{b}	43,80±1,40^{a}	34,81±2,61^{ab}	32,43±2,01^{a}	55,22±2,63^{b}	37,63±1,58
RES20	59,10±2,08^{a}	44,65±1,11^{a}	30,83±2,37^{abc}	33,70±1,60^{a}	53,10±2,89^{b}	37,66±1,95
RES40	46,80±2,57^{b}	37,45±1,39^{b}	28,82±2,05^{bcd}	33,55±1,68^{a}	52,89±2,23^{b}	39,49±1,98
CD10	31,00±2,45^{c}	36,00±1,40^{b}	31,88±2,00^{abc}	29,58±1,87^{ab}	55,44±3,10^{b}	39,17±1,47
CD20	29,70±2,99^{c}	33,60±1,38^{b}	25,63±1,65^{cd}	28,78±1,44^{ab}	64,76±1,51^{a}	38,91±1,35
CD40	25,30±2,74^{c}	33,60±1,75^{b}	23,45±1,86^{d}	25,94±1,47^{b}	65,77±2,89^{a}	38,79±1,27
CD-RES10	52,40±4,05^{ab}	41,40±1,53^{a}	36,43±1,39^{a}	29,30±2,80^{ab}	54,52±2,97^{b}	36,96±2,30
CD-RES20	51,20±2,59^{ab}	43,25±1,23^{a}	34,67±1,79^{ab}	34,01±1,79^{a}	49,57±2,60^{b}	37,18±1,71
CD-RES40	46,10±2,72^{b}	42,95±1,25^{a}	33,48±2,67^{ab}	32,86±2,76^{a}	48,33±1,99^{b}	37,70±1,67

*Gruplara ait tanımlamalar Tablo 3-3'te belirtilmiştir. ^{ab}-: Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$)

Dayanıklılık testinin 1. saatinde RES10 (%54,45±3,27), RES20 (%57,80±3,71), RES40 (%60,60±3,40), CD10 (%54,45±2,69) ve CD-RES20 (%53,35±3,46) gruplarında tespit edilen total motilite oranları CD40 (%41,75±3,36) grubuna göre yüksektir ($p<0,05$). Ayrıca, %60,60±3,40 ile en yüksek total motilite yüzdesine sahip RES40 grubu, CD-RES10 (%47,80±3,15) grubuna göre yüksek bulundu ($p<0,05$). Dayanıklılık testi 1. saatinde tüm gruplarda progresif motilite oranları benzer bulundu. Saptanan KHP özelliklerine ait veriler Tablo 4-4'te gösterildiği gibidir.

Eritme sonrası dayanıklılık testinin 2. saatinde CASA ile belirlenen total motilite oranında en düşük yüzdeye sahip gruplar sırasıyla %37,40±2,23, %37,85±3,85, %34,15±3,02 değerleri ile siklodekstrin (CD) grupları (CD10, CD20, CD40) ve %28,75±2,52 oranı ile kontrol grubu olarak bulundu. %44,60±3,22, %45,45±3,55, %48,80±2,91 değerlerine sahip RES (RES10, RES20, RES40) grupları ve %43,00±2,79, %45,95±4,08, %43,05±3,47 oranları tespit edilen CD-RES grupları (CD-RES10, CD-RES20 ve CD-RES40) arasında istatistiksel bir fark bulunmadı. En yüksek total motilite oranına %48,80±2,91 yüzdesi ile sahip RES40 grubu, tüm CD grupları (CD10, CD20, CD40) ve kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($p<0,05$). Progresif motilite oranları incelendiğinde kontrol grubu dışında kalan tüm gruplar benzer bulundu. CD20 grubu haricindeki tüm gruplar ise kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($p<0,05$). Ancak progresif motilite açısından kontrol ve CD20 grupları arasında istatistiksel fark bulunmadı. Dayanıklılık testinin 2. saatine ait total motilite, progresif motilite ve diğer KHP özelliklerinin verileri Tablo 4-5'te sunulmuştur.

Dayanıklılık testinin son aşaması olan 4. saat sonunda elde edilen veriler Tablo 4-6'da gösterilmiştir. Total motilite oranları RES10, RES20, RES40 gruplarında sırasıyla %29,40±2,65, %32,25±2,67, %30,15±3,68, CD-RES10, CD-RES20, CD-RES40 gruplarında %33,50±3,16, %28,40±2,78, %28,55±3,84 olarak bulundu. %15,95±1,70 total motilite oranına sahip kontrol grubu ile kıyaslandığında; RES ve CD-RES gruplarına ait oranların yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,05$). En yüksek total motilite oranına sahip CD-RES10 (%33,50±3,16) grubun kontrol (%15,95±1,70) ve CD gruplarına (CD10: %22,15±2,15, CD20: %24,25±2,26, CD40: %23,05±3,10) göre yüksek olduğu saptandı ($p<0,05$). Progresif motilite oranı sırasıyla; %5,80±1,06, %6,05±0,91, %6,65±1,25 olarak saptanan RES10, RES20, RES40 gruplarına ait veriler ve %7,45±1,05, %6,05±0,82,

%5,75±0,89 olarak bulunan CD-RES10, CD-RES20, CD-RES40 gruplarına ait verilerin %2,30±0,52 progresif motilite oranına sahip kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlendi ($p<0,05$). Dayanıklılık testinin 4. saatinde gerçekleştirilen CASA progresif motilite değerlendirilmesinde tüm RES (RES10, RES20, RES40) ve CD-RES (CD-RES10, CD-RES20, CD-RES40) grupları benzer bulundu. Diğer KHP özelliklerine ait veriler Tablo 4-6'da sunulmuştur.

Eritme sonrası total motilite değerinin zamana bağlı olarak değiştiği gözlemlendi (Tablo 4-7). Total motilite bakımından kontrol grubunun eritme sonrası total motilite değeri ile ilk bir saat sonundaki değer kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli düzeyde düştüğü belirlendi. Deney grupları arasında CD20 ve CD-RES10 grupları hariç istatistiksel fark tespit edilmedi ($p>0,05$). 1. saat ile 2. saat karşılaştırıldığında, CD40, CD-RES10, CD-RES20 ve CD-RES40 gruplarının benzer olduğu gözlemlendi ($p>0,05$). Total motilite bakımından kontrol grubu ve deney gruplarında 4. saatte elde edilen değer, 0. saatte elde edilen değere göre daha düşüktür ($p<0,001$). Eritme sonrası 2. saat ile 4. saat karşılaştırıldığında CD-RES10 total motilite değerlerinin benzer olduğu saptandı ($p>0,05$).

Eritme sonrası progressif motilite değerinin de zamana bağlı olarak hızlıca düştüğü gözlemlendi. Progressif motilite bakımından sadece CD10 grubuna ait 0. saat değeri 1. saat değeri ile benzer olduğu gözlemlendi. Diğer grupların tümünün progressif motilite değeri 0-1., 0-2., 0-4. ve 2-4. saatlerinde istatistiksel bakımdan önemli düzeyde düştüğü bulundu.

Spermatozoanın hızla ilgili kinematik parametreleri (VAP, VSL ve VCL) ve spermatozoon başının lateral salınım mesafesi (ALH) ile ilgili bulguların zamana bağlı olarak değişimi Tablo 4-8'de verilmiştir. Hızla ilgili parametreler karşılaştırıldığında, özellikle eritme sonrası ilk iki saat içinde VCL'ye göre VAP ve VSL değerlerinin zamana bağlı olarak daha hızlı düştüğü gözlemlendi. Eritme sonrası spermatozoon başının salınım mesafesinin (ALH değeri) ile 1. saat karşılaştırıldığında RES10 ve CD-RES20 grupları hariç istatistiksel düzeyde bir artış gözlemlendi ($p<0,05$). Özellikle CD içeren gruplarda zamana (0., 1., 2. ve 4. saat) bağlı olarak ALH değeri sürekli yükselme göstermiştir. Bu yükseliş RES gruplarında görülmemiştir. 2. ile 4. saat karşılaştırıldığında elde edilen değerlerin genellikle birbirine yakın olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Spermatozoanın çapraz geçis ferkans ritmi (BCF) ve doğrusallıkla ilgili parametrelere (STR ve LIN) ait bulgular Tablo 4-9'da verilmiştir. Tüm gruplarda BCF'nin zamanla düştü görülmüştür. Bu düşüş özellikle 4. saat BCF değeri ile eritme sonrası karşılaştırıldığında daha belirgindir ($p<0,01$). RES20, RES40, CD20, CD40, CD-RES10 ve CDRES40 gruplarının STR değerinin eritme sonrası ilk bir saat içindeki düşüş hzının yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu düşüşün daha sonraki zaman dilimlerinde yavaşladığı hatta deneme gruplarının çoğunda 4. saate ait STR değerlerinde hafif bir yükseliş olduğu görülmüştür.

Eğrisel yolun doğrusallığı bakımından ilk bir saat içinde CD10 grubu hariç tüm gruplarda düştüğü, 0 ile 4. saat bulguları karşılaştırıldığında bu düşüşün daha belirgin olduğu gözlemlendi.

Tablo 4- 4: Dayanıklılık testi 1. saatte (37°C) saptanan motilite (%) ve kinetik hareket parametreleri özelliklerinin karşılaştırılması (n:20).

*Grup No	CASA								
	Total Motilite (%)	Progresif Motilite (%)	VAP (µm/sn.)	VSL (µm/sn.)	VCL (µm/sn.)	ALH (µm/sn.)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)
Kontrol	49,80±4,21^{abc}	16,40±1,62	77,49±2,10^{c}	65,40±2,00^{b}	129,18±3,72^{c}	6,58±0,24	32,41±0,81	82,75±0,88	51,85±1,15
RES10	54,45±3,27^{ab}	19,35±1,86	80,33±1,92^{bc}	67,86±2,13^{ab}	133,15±3,03^{bc}	6,45±0,25	33,15±0,96	82,50±1,21	51,75±1,42
RES20	57,80±3,71^{ab}	18,80±1,25	80,27±1,73^{bc}	67,24±2,11^{ab}	133,62±2,65^{bc}	6,31±0,19	33,00±0,78	81,80±1,18	51,15±1,30
RES40	60,60±3,40^{a}	21,85±2,11	82,92±2,86^{abc}	69,95±2,83^{ab}	135,87±4,22^{abc}	6,35±0,21	33,97±0,75	82,50±1,06	52,55±1,38
CD10	54,45±2,69^{ab}	20,95±1,93	86,24±2,22^{ab}	73,03±2,48^{a}	140,47±3,22^{ab}	6,49±0,24	33,05±0,96	82,65±1,00	53,05±1,36
CD20	50,05±3,63^{abc}	19,15±2,10	84,82±2,02^{ab}	70,71±2,22^{ab}	142,26±3,33^{ab}	6,85±0,23	32,42±0,88	81,35±1,12	50,65±1,30
CD40	41,75±3,36^{c}	17,65±2,14	86,79±2,04^{ab}	72,53±2,16^{ab}	147,03±3,75^{a}	6,80±0,21	32,75±0,70	82,05±1,04	51,25±1,12
CD-RES10	47,80±3,15^{bc}	17,90±1,53	85,27±2,07^{ab}	71,62±2,09^{ab}	141,97±3,75^{ab}	6,54±0,24	34,02±0,95	82,40±1,25	51,70±1,39
CD-RES20	53,35±3,46^{ab}	19,80±1,03	88,27±1,74^{a}	74,37±1,94^{a}	146,02±3,54^{a}	6,43±0,24	34,40±0,99	83,00±1,25	52,70±1,39
CD-RES40	50,65±3,17^{abc}	18,50±1,57	84,69±2,59^{ab}	70,56±2,61^{ab}	141,00±4,51^{ab}	6,66±0,25	32,71±0,97	81,45±1,40	51,05±1,40

*Gruplara ait tanımlamalar Tablo 3-3'te belirtilmiştir.

$^{ab-}$: Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

Tablo 4- 5: Dayanıklılık testi 2. saatte (37°C) saptanan motilite (%) ve kinetik hareket parametreleri özelliklerinin karşılaştırılması (n:20).

*Grup No	CASA								
	Total Motilite (%)	Progresif Motilite (%)	VAP (µm/sn.)	VSL (µm/sn.)	VCL (µm/sn.)	ALH (µm/sn.)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)
Kontrol	28,75±2,52^{d}	7,15±0,99^{b}	68,90±1,76^{b}	56,04±1,67^{b}	120,71±4,01^{b}	6,54±0,37$^{a b}$	30,04±0,94	80,70±1,39	48,70±1,60
RES10	44,60±3,22^{ab}	12,95±1,21^{a}	73,79±2,09^{ab}	61,02±1,73^{a}	126,68±4,12^{ab}	6,38±0,24^{ab}	31,71±1,08	81,60±0,94	49,85±1,15
RES20	45,45±3,55^{ab}	12,95±1,18^{a}	74,65±1,85^{a}	61,90±1,79^{a}	127,60±3,60^{ab}	6,30±0,23^{b}	31,01±0,94	81,55±1,17	50,00±1,22
RES40	48,80±2,91^{a}	13,25±1,25^{a}	74,32±1,49^{a}	61,26±1,50^{a}	126,79±2,90^{ab}	6,61±0,20^{ab}	30,63±0,88	81,10±1,04	49,55±1,27
CD10	37,40±2,23^{bcd}	11,25±1,31^{a}	75,69±1,70^{a}	61,98±1,78^{a}	128,04±3,52^{ab}	6,53±0,26$^{a b}$	31,15±1,17	80,50±1,30	49,65±1,19
CD20	37,85±3,85^{bcd}	10,10±1,35^{ab}	76,46±1,91^{a}	61,49±1,59^{a}	133,50±3,89^{a}	7,13±0,22^{a}	30,87±1,02	79,50±1,15	47,70±1,02
CD40	34,15±3,02^{cd}	11,25±1,36^{a}	78,73±1,75^{a}	64,43±1,53^{a}	136,91±3,86^{a}	6,80±0,22$^{a b}$	31,46±0,97	81,00±1,07	49,20±1,04
CD-RES10	43,00±2,79^{abc}	13,40±1,00^{a}	77,30±1,70^{a}	63,19±1,56^{a}	134,06±3,28^{a}	6,86±0,20^{ab}	30,78±0,88	80,30±1,09	48,30±0,93
CD-RES20	45,95±4,08^{ab}	12,90±0,91^{a}	77,39±1,78^{a}	63,24±1,51^{a}	135,19±3,78^{a}	6,98±0,21$^{a b}$	31,58±0,86	80,15±1,17	48,10±1,02
CD-RES40	43,05±3,47^{abc}	12,15±1,08^{a}	77,96±2,09^{a}	63,37±1,70^{a}	135,30±4,14^{a}	6,91±0,18^{ab}	30,19±1,02	80,20±0,96	47,95±0,97

*Gruplara ait tanımlamalar Tablo 3-3'te belirtilmiştir.

$^{ab-}$: Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

Tablo 4- 6: Dayanıklılık testi 4. saatte (37°C) saptanan motilite (%) ve kinetik hareket parametreleri özelliklerinin karşılaştırılması (n:20).

*Grup No	CASA								
	Total Motilite (%)	**Progresif Motilite (%)**	**VAP (µm/sn.)**	**VSL (µm/sn.)**	**VCL (µm/sn.)**	**ALH (µm/sn.)**	**BCF (Hz)**	**STR (%)**	**LIN (%)**
Kontrol	15,95±1,70^{d}	2,30±0,52^{c}	59,71±2,71^{b}	46,56±2,48^{b}	109,32±4,92^{b}	6,41±0,42	28,05±1,10	77,40±1,61^{d}	44,30±1,70^{d}
RES10	29,40±2,65^{abc}	5,80±1,06^{ab}	63,28±2,49^{ab}	52,93±2,20^{a}	110,57±3,79^{ab}	6,28±0,25	28,85±1,55	82,20±0,70^{ab}	48,75±0,78^{ab}
RES20	32,25±2,67^{ab}	6,05±0,91^{ab}	63,29±1,75^{ab}	53,12±1,56^{a}	109,46±2,72^{b}	6,38±0,21	29,98±0,88	83,05±0,65^{a}	49,65±0,70^{ab}
RES40	30,15±3,68^{abc}	6,65±1,25^{a}	62,86±2,41^{ab}	52,18±2,23^{a}	110,55±3,26^{ab}	6,18±0,37	29,63±1,13	81,35±1,12^{abc}	47,85±1,56^{abc}
CD10	22,15±2,15^{cd}	3,75±0,65^{bc}	66,20±2,24^{ab}	52,87±1,65^{a}	117,25±4,12^{ab}	6,65±0,20	29,30±1,05	79,75±1,14b^{cd}	46,85±0,93^{bcd}
CD20	24,25±2,26^{bcd}	3,85±0,65^{bc}	66,81±1,98^{a}	52,15±1,37^{a}	121,31±3,78^{a}	6,99±0,22	28,25±0,73	77,80±0,86^{d}	44,80±0,89^{cd}
CD40	23,05±3,10^{bcd}	3,35±0,60^{bc}	64,90±1,90^{ab}	51,11±1,35^{ab}	119,07±3,48^{ab}	6,78±0,28	29,50±1,15	79,10±1,02^{cd}	45,10±1,23^{cd}
CD-RES10	33,50±3,16^{a}	7,45±1,05^{a}	67,23±2,20^{a}	56,57±1,76^{a}	115,38±4,33^{ab}	6,43±0,25	30,71±0,91	83,60±0,75^{a}	50,75±1,15^{a}
CD-RES20	28,40±2,78^{abc}	6,05±0,82^{ab}	65,92±1,05^{ab}	55,66±1,04^{a}	113,25±2,09^{ab}	6,24±0,21	31,00±1,02	83,85±0,78^{a}	50,65±0,94^{a}
CD-RES40	28,55±3,84^{abc}	5,75±0,89^{ab}	63,26±1,71^{ab}	54,00±1,61^{a}	110,21±2,91^{ab}	6,63±0,21	29,51±1,04	84,10±0,79^{a}	50,15±0,99^{ab}

*Gruplara ait tanımlamalar Tablo 3-3'te belirtilmiştir.

$^{ab-}$: Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

Tablo 4- 7: Eritme sonrası 0. saat ve dayanıklılık testinin 1, 2 ve 4. saatlerinde saptananan total ve progresif motilite oranlarının istatistiksel etkileşimi.

Gruplar		Total Motilite			Progresif Motilite		
	Saat	1	2	4	1	2	4
Kontrol	0	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	1	-	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001
	2		-	<0,001		-	<0,001
RES10	0	>0,05	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	1	-	<0,05	<0,001	-	<0,05	<0,001
	2		-	<0,01		-	<0,001
RES20	0	>0,05	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	1	-	<0,05	<0,001	-	<0,01	<0,001
	2		-	<0,01		-	<0,001
RES40	0	>0,05	<0,01	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001
	1	-	<0,01	<0,001	-	<0,01	<0,001
	2		-	<0,001		-	<0,01
CD10	0	>0,05	<0,01	<0,001	>0,05	<0,001	<0,001
	1	-	<0,01	<0,001	-	<0,05	<0,001
	2		-	<0,01		-	<0,001
CD20	0	<0,05	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001
	1	-	<0,01	<0,001	-	<0,001	<0,001
	2		-	<0,01		-	<0,001
CD40	0	>0,05	<0,01	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001
	1	-	>0,05	<0,001	-	<0,01	<0,001
	2		-	<0,01		-	<0,001
CD-RES10	0	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	1	-	>0,05	<0,05	-	<0,05	<0,001
	2		-	>0,05		-	<0,001
CD-RES20	0	>0,05	<0,05	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001
	1	-	>0,05	<0,001	-	<0,001	<0,001
	2		-	<0,05		-	<0,001
CD-RES40	0	>0,05	<0,01	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001
	1	-	>0,05	<0,001	-	<0,001	<0,001
	2		-	<0,01		-	<0,001

*Gruplara ait tanımlamalar Tablo 3-3'te belirtilmiştir.

Tablo 4- 8: Eritme sonrası 0. saat ve dayanıklılık testinin 1, 2 ve 4. saatlerinde saptananan VAP, VSL, VCL ve ALH değerlerinin istatistiksel etkileşimi.

Gruplar		VAP			VSL			VCL			ALH		
	Saat	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
Kontrol	0	<0,01	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001	<0,05	>0,05	>0,05
	1	-	<0,01	<0,001	-	<0,01	<0,001	-	>0,05	<0,01	-	>0,05	>0,05
	2		-	<0,01		-	<0,01		-	<0,05		-	>0,05
RES10	0	<0,05	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001	>0,05	<0,05	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05
	1	-	<0,05	<0,001	-	<0,05	<0,001	-	>0,05	<0,001	-	>0,05	>0,05
	2		-	<0,001		-	<0,01		-	<0,001		-	>0,05
RES20	0	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	>0,05	<0,05	<0,001	<0,05	>0,05	>0,05
	1	-	<0,05	<0,001	-	<0,05	<0,001	-	>0,05	<0,001	-	>0,05	>0,05
	2		-	<0,001		-	<0,01		-	<0,001		-	>0,05
RES40	0	>0,05	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001	>0,05	<0,01	<0,001	<0,05	<0,001	>0,05
	1	-	<0,05	<0,001	-	<0,01	<0,001	-	>0,05	<0,001	-	>0,05	>0,05
	2		-	<0,001		-	<0,01		-	<0,001		-	>0,05
CD10	0	>0,05	<0,001	<0,001	>0,05	<0,001	<0,001	>0,05	<0,01	<0,001	<0,05	<0,05	<0,01
	1	-	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	-	<0,01	<0,001	-	>0,05	>0,05
	2		-	<0,01		-	<0,01		-	>0,05		-	>0,05
CD20	0	<0,05	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	1		<0,05	<0,001		<0,05	<0,001	-	>0,05	<0,001	-	>0,05	>0,05
	2		-	<0,001		-	<0,001		-	<0,01		-	>0,05
CD40	0	<0,05	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01
	1	-	<0,01	<0,001	-	<0,01	<0,001	-	<0,05	<0,001	-	>0,05	>0,05
	2		-	<0,001		-	<0,001		-	<0,001		-	>0,05
CD-RES10	0	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	>0,05	<0,05	<0,001	<0,01	<0,001	<0,05
	1	-	<0,01	<0,001	-	<0,01	<0,001	-	>0,05	<0,001	-	>0,05	>0,05
	2		-	<0,01		-	<0,05		-	<0,01		-	>0,05
CD-RES20	0	>0,05	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05	<0,001	>0,05
	1	-	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	-	>0,05	<0,001	-	<0,05	>0,05
	2		-	<0,001		-	<0,01		-	<0,001		-	<0,01
CD-RES40	0	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05	<0,001	<0,01	<0,01	<0,05
	1	-	<0,05	<0,001	-	<0,01	<0,001	-	>0,05	<0,001	-	>0,05	>0,05
	2		-	<0,001		-	<0,01		-	<0,001		-	>0,05

Tablo 4- 9: Eritme sonrası 0. saat ve dayanıklılık testinin 1, 2 ve 4. saatlerinde saptananan BCF, STR ve LIN değerlerinin istatistiksel etkileşimi.

Gruplar		BCF			STR			LIN		
	Saat	1	2	4	1	2	4	1	2	4
Kontrol	0	<0,01	<0,001	<0,001	>0,05	<0,05	<0,01	<0,05	<0,01	<0,001
	1	-	<0,05	<0,01	-	>0,05	>0,05	-	<0,05	<0,05
	2		-	>0,05		-	>0,05		-	>0,05
RES10	0	>0,05	<0,05	<0,01	>0,05	<0,05	>0,05	<0,01	<0,001	<0,001
	1	-	>0,05	>0,05	-	>0,05	>0,05	-	<0,05	>0,05
	2		-	>0,05		-	>0,05		-	>0,05
RES20	0	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001
	1	-	<0,05	<0,01	-	>0,05	>0,05	-	>0,05	>0,05
	2		-	>0,05		-	>0,05		-	>0,05
RES40	0	>0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,01	<0,001	<0,001
	1	-	<0,01	<0,05	-	>0,05	>0,05	-	<0,05	>0,05
	2		-	>0,05		-	>0,05		-	>0,05
CD10	0	>0,05	<0,001	<0,001	>0,05	<0,001	<0,001	>0,05	<0,001	<0,001
	1	-	>0,05	<0,05	-	>0,05	<0,05	-	<0,01	<0,001
	2		-	>0,05		-	>0,05		-	>0,05
CD20	0	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001
	1	-	>0,05	<0,001	-	>0,05	<0,05	-	<0,05	<0,001
	2		-	<0,05		-	>0,05		-	>0,05
CD40	0	<0,01	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	1	-	>0,05	>0,05	-	>0,05	>0,05	-	>0,05	<0,01
	2		-	>0,05		-	>0,05		-	<0,05
CD-RES10	0	<0,01	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	>0,05	<0,01	<0,001	<0,01
	1	-	<0,001	<0,01	-	>0,05	>0,05	-	>0,05	>0,05
	2		-	>0,05		-	>0,05		-	>0,05
CD-RES20	0	>0,05	<0,01	<0,01	>0,05	<0,01	>0,05	<0,05	<0,001	<0,01
	1	-	<0,01	<0,01	-	<0,05	>0,05	-	<0,01	>0,05
	2		-	>0,05		-	<0,01		-	<0,05
CD-RES40	0	<0,05	<0,01	<0,01	<0,05	<0,05	>0,05	<0,001	<0,001	<0,05
	1	-	>0,05	<0,05	-	>0,05	>0,05	-	<0,05	>0,05
	2		-	>0,05		-	<0,01		-	>0,05

*Gruplara ait tanımlamalar Tablo 3-3'te belirtilmiştir.

5. TARTIŞMA

Hayvansal ürünlerin verim ve kalitesinin artırılmasında en etkili yol biyoteknolojik yöntemler vasıtasıyla ıslahın hızlandırılmasıdır. Bu amaçla reprodüktif biyoteknolojik araçlardan, özellikle de suni tohumlama yönteminden faydalanılmaktadır. Bu tekniğin temel amacı, genetik açıdan üstün verim özelliği kanıtlanmış erkek damızlıklardan olabildiğince fazla yararlanmaktır.

Suni tohumlama uygulamasının etkinliği, spermanın başarıyla dondurulması ile doğrudan bağıntılıdır. Somatik hücreler ile kıyaslandığında, spermatozoonlar plazma membran yapılarında daha yüksek oranda doymamış yağ asitleri ihtiva etmektedirler. Bu durum, spermatozoonların donma-çözünme süreçlerinde daha hassas olmasının primer sebebi olarak kabul edilmektedir (Aitken 1994).

Taze sperma ile karşılaştırıldığında, donmuş spermayla tohumlama sonrası elde edilen gebelik oranları kriyopreservasyon kaynaklı hücresel hasarlardan dolayı olumsuz yönde etkilenmektedir (Watson 2000). Donma-çözünme işlemleri sırasında meydana gelen hücre içi ve dışı kristal oluşumları (Mazur 1977), ozmotik stres (Holt ve North 1994), soğuk şoku (Darin-Bennett ve White 1977) ve oksidatif stres (Agarwal ve ark. 2014; Aitken ve ark. 1991) normal spermatozoon yapısı ve fonksiyonlarına zarar vermektedir. Özellikle, hücresel homeostazın korunmasında önemli bir bariyer olan seçici geçirgen membran yapısının bozulması hücre içi tüm enzimatik aktivitelerin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır. Hücre fonksiyonlarındaki bu aksaklık nedeniyle antioksidan, enerji üretim ve hareket sistemlerinde meydana gelen bozulmalar sonucunda hücrede apoptoz ve DNA hasarı oluşmaktadır (Thundathil ve ark. 1999; Gürler ve ark. 2016; Ledesma ve ark. 2016). Ayrıca, hücre içinde artan ROS miktarı ve membran lipit peroksidasyonu tüm bu hasarların oluşum hızı ve oranını artırmaktadır (Da Silva Maia ve ark. 2010; Peris ve ark. 2007).

Koç spermatozoonu membran yapısındaki kolesterol / fosfolipid oranının düşük olması ve PUFA oranının yüksek olması, membran lipit peroksidasyonu için yatkınlık oluşturmaktadır (Bucak ve ark. 2007b; Özer Kaya ve ark. 2018). Maruz kalınan oksidatif stres, hücresel antioksidan savunma sistemleri tarafından dengelenmektedir. Ancak, spermatozoonların düşük sitoplazma hacmine sahip olması, bu sistemlerin yetersiz

kalmasına ve oksidatif stres karşısında yeterli direnç gösterememesine neden olmaktadır (Dowling ve Simmons 2009). Ayrıca, eklenti üreme bezlerinde bulunan ekstraselüler antioksidan savunma sistemlerinin yoğunlukları sulandırma aşamasında azalmakta ve ROS karşısındaki etkinlikleri olumsuz etkilenmektedir (Lv ve ark. 2019; Peris-Frau ve ark. 2020b).

Son yıllarda, ROS üretimini dengelemek ve oksidatif stres kaynaklı oluşan spermatolojik hasarları minimize etmek amacıyla sulandırıcı içerisine eksojen antioksidan madde ilaveleri yapılmaktadır (De Souza ve ark. 2019; Peris-Frau ve ark. 2020b). Sunulan çalışmada, antioksidan bir bileşik olan resveratrolün 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml dozlarının saf olarak ve siklodekstrine yüklenmiş formda (CD-RES) sulandırıcı içerisinde yer almasının koç sperması dondurulmasındaki etkinliği araştırılmıştır.

Araştırmada, elektro-ejakülatör yardımı ile Kıvırcık ırkı koçlardan elde edilen sperma örnekleri (≥ +++ kitle hareketi, ≥ %80 motilite, ≥ $1x10^9$ spermatozoon/ml) eşit hacimlerde birleştirilerek pooling işlemi gerçekleştirilmiştir (n=5). Pooling sonrası (26°C) CASA ile gerçekleştirilen spermatolojik muayenelerde total motilite, progresif motilite ve spermatozoon yoğunluğu değerleri sırasıyla %95,00±0,63, %61,40±2,10 ve $3,90±0,91x10^9$/ml olarak belirlendi. Sperma alma yöntemi ve sıklığı, beslenme durumu, mevsim ve hayvan ırkı alınan sperma kalitesini etkilediği bildirilmiştir (Evans ve Maxwell 1987). Kıvırcık ırkında yapılan çalışmalarda, elektro-ejakülatör ile alınan taze koç spermasının motilite ve yoğunluk bulguları sırasıyla Öztürkler ve ark. (1997) tarafından %87,00±2,58 ve $2,67±0,80x10^9$, Alçay ve ark. (2014) tarafından %72,59±2,24 ve $1,90±0,17x10^9$, Arıcı (2017) tarafından ise %88±,50±1,07 ve $3,62±1,03x10^9$ olarak bildirilmiştir. Çalışmalar arasındaki farklılıklar; koçların bireysel özelliklerinden, beslenme durumlarından ve mevsimsel değişikliklerden kaynaklanmış olabilir.

Donma öncesi dönemde spermanın işlem gördüğü sulandırıcının bileşenleri, sulandırma şekli, ısısı ve 5°C'ye soğutma hızı spermatolojik özellikleri etkiler (Salamon ve Maxwell 2000). Sperma sulandırıcıları uygun bir ozmotik basınç ve elektrolit denge sağlamalı, soğutma ve donma sırasında spermatozoonları soğuk şokuna karşı korumalıdır. Ayrıca kaliteli bir sperma sulandırıcısı; spermatozoonlar için gerekli olan enerji gereksinimini karşılamalı, bakteriyel üremeyi kontrol etmeli ve ortamın pH değerini dengeleyebilmelidir (Hafez 1993; İleri ve ark. 2000). Sunulan çalışmada pooling sonrası, çalışma gruplarını oluşturmak üzere sperma 10 eşit hacime ayrılmıştır. Tüm

gruplarda (Tablo 3-3), içerisinde farklı dozlarda RES, CD ve CD-RES bulunan eşit hacimde (200 µl) TCG sulandırıcısı ile ön sulandırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubuna da aynı hacimde TCG ilavesi yapılmıştır. Ön sulandırma işlemi sonrası tüm gruplar 26°C sıcaklığa sahip su banyosu içerisinde 15 dk. süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, tüm sperma örneklerinde sırasıyla Tris bazlı yumurta sarısı (TYS) sulandırıcısı ile sulandırma, 5°C'ye soğutma (0,2°C/dk) ve gliserolizasyon (5°C) işlemleri uygulanmıştır. 1 saatlik ekilibrasyon (5°C) sonrası örnekler, motilite ve kinetik hareket parametreleri yönünden değerlendirilmiştir.

Ekilibrasyon sonrası koç sperması total ve progressif motilitesinin taze spermaya göre daha düşük olduğu, total motilitenin %60 ile %93 (Özmen ve ark. 2020; Demir ve ark. 2015; Nur ve ark. 2010; Önder 2019; Yüksel 2019) ve progressif motilitenin ise %43 ile %54 arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Demir ve ark. 2015; Yüksel 2019).

Ekilibrasyon sonrası aşamada sperma sulandırıcısına eklenen katkı maddelerinin (RES, CD ve CD-RES) spermatozoon motilitesini desteklediği görüldü. Ekilibrasyon sonrası progresif motilite ve KHP gruplara göre farklılık göstermedi (Tablo 4-1). Total motilite değerlerinin genellikle kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu, RES40 ve CD grupları hariç istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek bulunduğu saptandı ($p<0,05$). Kontrol grubu haricindeki deneme grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında bulgular arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu durum, sulandırıcı içerisindeki resveratrolün ve siklodekstrin ile oluşturduğu kompleksinin donma öncesi dönemde spermatozoon canlılığına olumlu etki yaptığı şeklinde yorumlanabilir. Resveratrolün koç spermasının 4°C (Sarlos ve ark. 2002) ve 5°C (Al-Mutary ve ark. 2020) sıcaklıklarda 24 saat muhafazası sonrası motilite üzerine etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Sunulan çalışmada, donma öncesi dönemde gözlemlenen iyileşmenin antioksidan maddelerin dozuna ve uygulanma şekline (antioksidan maddenin sperma ile direkt muamelesi ve 15 dk. inkübasyona) bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir.

Progresif motilite oranlarının tüm gruplarda benzer bulunması Sarlos ve ark. (2002) ve Al-Mutary ve ark. (2020)'nin yaptıkları çalışmaları desteklemektedir. Diğer yandan Falchi ve ark. (2020), 10, 25 ve 50 µM resveratrol içeren medyum ile sulandırdıkları geyik spermasında ekilibrasyon sonrası (4°C) kontrol grubuna göre total motilite ve progresif motilite oranlarının benzer olduğunu, ancak KHP değerlerinden ALH'nin 25 ve 50 µM resveratrol grubunda diğer gruplara kıyasla doza bağlı düştüğünü

bildirmişlerdir. Spermatozoon başının lateral salınımı olarak tanımlanan ALH, istenmeyen bir durum olan erken kapasitasyon sonucunda hiperaktivasyon kazanmış spermatozoonlarda yükselmektedir (Santiago-Moreno ve ark. 2017). Sunulan çalışmadan farklı olarak, resveratrolün donma öncesi dönemde geyik sperması ALH değerinde gösterdiği etkinin muhtemel sebepleri; tür, sulandırıcı, reveratrolün dozu, donma öncesi aşamaya kadar yapılan işlemlerin farklı olması, özellikle de spermanın santrifüje edilerek yıkama işlemine tabi tutulması olabilir.

Dondurulan sperma örnekleri 37°C sıcaklıktaki su banyosunda 30 saniye sürede eritilmiş, saptanan total motilite, progresif motilite ve kinetik hareket parametreleri Tablo 4-2'de gösterilmiştir. Motilite ve KHP değerleri spermatozoonların fertilizasyon bölgesine gidebilmeleri için gerekli olan hareket kapasiteleri hakkında önemli bilgi verirler (Chenoweth 2002). Eritme sonrası en yüksek total motilite oranları RES20 ve CD-RES10 gruplarında, en düşük değer ise CD40 grubunda elde edilmiştir ($p<0,05$). Diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır. RES içeren gruplara ait eritme sonrası total motilite değeri ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Farklı türlerde gerçekleştirilen bazı çalışmalarda, resveratrolün eritme sonrası spermatozoon total motilite ve/veya progresif motilitesi üzerine olumlu etki yaptığı gösterilmiştir (Lv ve ark. 2019; Zhu ve ark. 2019; Bucak ve ark. 2015; Ahmed ve ark. 2020; Falchi ve ark. 2020; Assunção ve ark. 2021). Silva ve ark. (2012a) resveratrolün koç spermasında; Langobardi ve ark. (2017) ise manda spermasında eritme sonrası motilite ve progresif motilite oranlarında iyileşme sağlamadığını bildirmişlerdir.

Spermatozoonun ileri yönde doğrusal hareketi olarak tanımlanan progresif motilite spermanın potansiyel fertilitesinin belirlenmesinde kullanılan en önemli parametrelerdendir (Hafez 1993; Seidel 2018). Eritme sonrası progresif motilite oranlarında RES10 (%26,30±1,90), CD10 (%26,75±1,63), CD40 (%26,20±2,24), CD-RES20 (%26,70±1,08) ve CD-RES40 (%26,55±1,64) gruplarına göre en yüksek değer %32,65±1,44 ile CD-RES10 grubunda tespit edildi ($p<0,05$). Kontrol grubu ve deneme grupları progresif motilite oranları bakımından benzer bulundu ($p>0,05$). Total motilite ve progresif motilite CD40 grubunda başarılı bulunmamıştır. Buna karşın özellikle CD-RES10 olmak üzere RES20 grubunda tatmin edici sonuçlar alındığı söylenebilir.

Yapılan çalışmalarda VSL ve VAP değerleri ile ineklerdeki gebelik oranları arasında (Nagy ve ark. 2015), ALH değeri ile insanlardaki gebelik oranları arasında

pozitif ilişki olduğu belirtilmiştir (Fréour ve ark. 2010). Diğer yandan, ALH değerinin yüksek olması kapasitasyon sonucunda gelişen hiperaktivasyonun bir göstergesi olarak değerlendirilmekte ve bu durumun erken gelişmesi ile fertilizasyon oranlarının olumsuz etkilendiği bildirilmektedir (Santiago-Moreno ve ark. 2017). Sunulan çalışmada eritme sonrası 0. saatte çalışma gruplarının tüm KHP değerleri (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR ve LIN) kontrol grubu ile benzer bulunmuştur ($p>0,05$).

KHP'ler ele alındığında eritme sonrası saptanan bulgular Falchi ve ark. (2020) tarafından geyik spermasında yürütülen dondurma çalışma ile uyumludur. Benzer olarak Shabani Nashtaei ve ark. (2017), resveratrolün insan spermasında eritme sonrası KHP değerlerinde etki yapmadığını bildirmişlerdir. Ancak boğa sperması ile gerçekleştirilen çalışmalarda, Bucak ve ark. (2015), 1 mM resveratrolün ALH değerini artırdığını, diğer KHP değerlerinde ise etkisinin olmadığını bildirmişler, Assunção ve ark. (2021) ise 0,05 mM resveratrolün eritme sonrası VSL, VAP, BCF, LIN ve STR değerlerini yükselttiğini, VCL değerinde ise etkisinin olmadığını ve değerlerin doz artışından (0,1 ve 1 mM) olumsuz etkilendiğini bildirmişlerdir.

Kinetik hareket parametrelerinde elde edilen daha büyük değerler her zaman daha yüksek fertilizasyon ile ilişkilendirilemez (Assunção ve ark., 2021). Çalışmalar arasında total motilite, progresif motilite ve KHP değerlerinin farklı sonuçlar vermesi başlıca tür ve kullanılan resveratrol dozunun farklı olmasına bağlanabilir. Ayrıca çalışmalarda spermanın maruz kaldığı işlemler ve sulandırıcı çeşitleri de farklı sonuçlar oluşmasında etkili olabilir.

Sulandırıcıya ilave edilen siklodekstrinin spermatozoon hareketliliğine etkisi hakkında çalışmalar mevcuttur. Mocé ve ark. (2010), siklodekstrinin dondurulmuş-eritilmiş koç spermasında total motilite ve progresif motilite oranlarını olumsuz etkilediğini bildirmişler, bu durumun membran kolesterol kaybı nedeniyle hücrenin soğuk şokuna daha hassas hale gelmesi sonucu oluştuğunu açıklamışlardır. Sunulan çalışmada kontrol grubu ile kıyaslandığında sadece CD içeren grupların oransal olarak daha düşük total motilite ve progresif motiliteye sahip olduğu gözlemlendi ($p>0,05$). Diğer yandan Benhenia ve ark. (2016), eritme sonrası koç epididimal spermasında methly-β-cyclodextrin'in motilite ve kinetik hareket parametrelerini (VAP, VSL, VCL) olumlu etkilediğini saptamışlardır. Benzer olarak Zeng ve Terada (2000; 2001) methly-β-cyclodextrin ve 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin'in eritme sonrası domuz sperması

hareket parametrelerini iyileştirdiği bildirmişlerdir. Siklodekstrinler, spermatozoon membranındaki kolesterolü deplase ederek uzaklaştırırlar (Ilangumaran ve Hoessli 1998). Kimi araştırmacılar, kolesterol kaybına bağlı artan membran akışkanlık ve geçirgenliğinin, donma esnasında oluşan intraselüler buz kristali miktarını azaltabileceğini ve spermatozoonların donma-çözünme sürecinde daha az zarar görebileceğini düşünmektedirler. Özellikle aynı ırk ile yapılan çalışmalarda gözlemlenen farklı bulgular, siklodekstrin çeşidine, dozuna ve sperma ile muamele süresine, ayrıca sulandırıcı kompozisyonuna bağlı olarak değişiklik gösterebilir (Benhenia ve ark. 2016; Iborra ve ark. 2000; Nagao ve ark. 2010).

Eritme sonrası, RES10 ve CD-RES10 grupları kıyaslandığında progresif motilite oranı ve VAP değeri RES10 grubunda sırasıyla %26,30±1,90 ve 90,52±2,27 µm/sn.; CD-RES10 grubunda ise sırasıyla %32,65±1,44 ve 98,15±1,75 µm/sn. olarak bulunmuştur. RES10 grubuna göre, aynı miktarda resveratrol içeren CD-RES10 grubunun daha başarılı bulunması oldukça dikkat çekicidir ($p<0,05$). Bu durum, siklodekstrine yüklenmiş 10 µg/ml resveratrolün spermatozoon hareketliliği açısından iyileştirici etki yaptığının bir göstergesidir. RES20 ve RES40 grupları ile siklodekstrine yüklenmiş formları olan CD-RES20 ve CD-RES40 grupları arasında benzer bir durum gözlemlenmemiştir. Siklodekstrinler yapısı gereği resveratrol bileşiklerinin optimal olarak %30-40'nı enkapsüle edebilmektedir (Ansari ve ark. 2011). İç kavitesine resveratrol yüklenmemiş siklodekstrinler ortamdaki lipit yapılara (özellikle spermatozoon membranı yapısındaki kolesterole) affinite gösterebilmektedir (López ve ark. 2011). Bu sebepten dolayı CD-RES20 ve CD-RES40 gruplarındaki artan serbest siklodekstrin oranı membran üzerinde bir ölçüde zararlı etki yaratmış olabilir. RES10 grubundaki saf resveratrol ile kıyaslandığında, CD-RES10 grubundaki siklodekstrine yüklü resveratrolün; çözünürlüğünün, biyolojik ömrünün ve kimyasal stabilitesinin daha yüksek olduğu, ışık ve oksidasyondan etkilenme oranının azaldığı ve artan etkinlik sonrası spermatozoon membran yapısı ile daha iyi etkileşime girdiği ifade edilebilir (López-Nicolás ve ark. 2006). Sonuç olarak, CD-RES10 grubunda her ne kadar siklodekstrin kaynaklı membran kolesterol kaybı olsa da bu miktarın yüksek olmaması (CD-RES20 ve CD-RES40'a göre) ve RES10 grubuna göre antioksidan olarak daha başarılı olması sayesinde daha yüksek progresif motilite oranı ve spermatozoon hızı değeri elde edildiği düşünülebilir.

Spermatozoon membranının fiziksel ve işlevsel bütünlüğü fizyolojik olarak devam eden süreçlerin (metabolizma fonksiyonları, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu, oosit penetrasyonu) sağlıklı olarak sürdürülmesinde önemlidir (Hafez 1993; Gadella ve Luna 2014). Kriyopreservasyon aşamasında oluşan hücre içi düzensiz ve büyük buz kristalleri (Morris 2006), oksidatif stres ve özellikle soğuk şoku sırasında membran lipit yapılarında şekillenen faz değişimleri spermatozoon membran yapısında geri dönüşü olmayan hasarlara neden olmaktadır (Aitken ve ark. 1991). Ayrıca spermanın dondurulması sırasında artan ROS miktarının membranda soğuk şokuna benzer hasarlar meydana getirmesi, eritme sonrası canlılık ve membran bütünlüğü gibi birçok özelliği olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle araştırmacılar, ROS kaynaklı membran hasarlarını minimize etmek için sperma sulandırıcıları içerisine antioksidan maddeler ilave etmektedirler. Resveratrol de süpürücü etkisiyle ROS' ları temizleyebilmekte, aynı zamanda hücre içi antioksidan kofaktör ve enzim aktivitesini artırarak membran lipit peroksidasyon oranını düşürmektedir (Li ve ark. 2018).

Sunulan çalışmada, eritme sonrası membran bütünlüğü muayenesi CFDA-PI floresan boyama yöntemi sonrası akış sitometrisinde incelenmiştir. Canlı/membranı bütün spermatozoon oranında en düşük değerler %25,63±1,65 ve %23,45±1,86 değerleri ile sırasıyla CD20 ve CD40 gruplarında tespit edilmiştir. Bu gruplara ve RES40'a göre CD-RES10 grubunun membran bütünlüğü oranının yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$) (Tablo 4-3). Resveratrol içeren gruplar (RES ve CD-RES) ve kontrol grubu arasında fark bulunmamıştır. Rakamsal olarak %36,43±1,39 oranı ile en yüksek veriye sahip 10 µg/ml resveratrol yüklenmiş siklodekstrinin (CD-RES10) spermatozoon membran yapısını olumlu etkilediği söylenebilir. İstatistiksel olarak önemli olmasa da CD-RES gruplarında eritme sonrası motilite (total ve progresif) verilerinde doza bağlı artan olumsuz etki, canlı/membranı bütün spermatozoon oranlarında da gözlemlenmiştir. Bu durum, artan siklodekstrinin dozlarının spermatozoonu olumsuz etkilediği tezini desteklemektedir.

Sunulan çalışma ile uyumlu olarak, Silva ve ark. (2002a), koç spermasında kullandıkları 5, 10, 15 ve 20 µg/ml resveratrolün eritme sonrası membran bütünlüğünü etkilemediğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar eritme sonrası elde ettikleri membran bütünlüğü oranlarını kontrol grubunda (0 µg/ml resveratrol) %35,08±3,00, 10 µg/ml resveratrol grubunda %37,10±6,20 ve 20 µg/ml resveratrol grubunda ise %36,30±7,30

olduğunu bildirmişlerdir. Bu değerlere benzer olarak sunulan çalışmadaki oranlar sırasıyla %30,03±1,87, %34,81±2,61 ve %30,83±2,37 olarak bulunmuş ve istatistiksel fark tespit edilmemiştir. Diğer yandan domuz (Zhu ve ark. 2019) ve geyik (Falchi ve ark. 2020) spermasında yapılan çalışmalarda resveratrolün eritme sonrası membran bütünlüğünün korunmasında etkili olduğu bildirilmiştir.

Fonksiyonel membran bütünlüğü muayenesinde (HOST), kontrol ve CD gruplarına göre RES10, RES20 ve CD-RES gruplarında daha yüksek oranlar bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4-3). Manda boğası spermasında 50 ve 100 µM resveratrolün eritme sonrası HOST pozitif spermatozoon oranını artırdığı bildirilmiştir (Ahmed ve ark. 2020). RES40 grubuna ait HOST (+) oranının diğer RES gruplarına göre düşük olması ve aynı durumun her ne kadar istatistiksel anlamlılık olmasa da canlı/membranı bütün spermatozoon oranında da kısmi olarak gözlemlenmesi yüksek dozdaki (40 µg/ml) resveratrolün spermatozoon membran yapısında olumsuz etki yaptığı şeklinde yorumlanabilir. Sunulan çalışma ile benzer olarak teke spermasında 10 ve 50 µM resveratrolün fonksiyonel membran bütünlüğünü koruduğu, ancak artan doza bağlı bu etkinin olumsuz yönde değiştiği bildirilmiştir (Lv ve ark. 2019).

Sunulan çalışmada kontrol grubunda eritme sonrası elde edilen HOST pozitif oranı (%35.15±1,03) Cirit ve ark. (2013) ve Arıcı (2017)'nın elde ettiği oranlar ile yakın değerde iken Banday ve ark. (2017), Bucak ve ark. (2009), Benhenia ve ark. (2018) ve Alçay (2015)'nın saptadığı oranlardan düşük olduğu görülmektedir. Koç spermasında yapılan bu çalışmalarda elde edilen farklı sonuçların başlıca sebepleri olarak donma ve eritme işlemleri sırasında spermatozoonlarda oluşan fiziko-kimyasal hasarların derecesi ve bunun yanında testin uygulamasındaki farklılıklar (inkübasyon süresi ve sıcaklığı, ozmotik basınç farklılığı) olabilir.

Çalışmada saptanan HOST (+) oranların, CFDA-PI boyaması ile elde edilen oranlara göre daha yüksek olması; HOS testinin biyokimyasal olarak aktif ve hipoozmotik ortama reaksiyon veren spermatozoonları belirlemesi, vital boya olan CFDA' nın ise mikro fiziksel hasarları tespit edebilmesinden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca, CFDA boyama protokolü esnasında spermanın santrifüj ve yıkama işlemlerine maruz kalması membranı bütün spermatozoon oranını düşürmüş olabilir.

Canlı/akrozomu sağlam spermatozoon oranları floresan boyama (FITC PNA-PI) yöntemi ile akış sitometrisinden belirlenmiştir. Sarlos ve ark. (2002), koç spermasının soğutularak saklanmasında (5°C) sulandırıcıya ilave ettikleri 15 µg/ml resveratrolün, 6. günden itibaren akrozom hasarı oranını azalttığını bildirmişlerdir. Silva ve ark. (2002a), koç sperması dondurulmasında resveratrolün akrozom bütünlüğü oranlarında etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Silva ve ark. (2002a), sperma sulandırıcısına ilave ettikleri 10 µg/ml resveratrol grubunda %65,90±6,90, 20 µg/ml resveratrol grubunda %65,00±8,60, kontrol grubunda ise %61,40±8,40 oranında eritme sonrası canlı/akrozomu sağlam spermatozoon oranı olduğunu bildirmişlerdir. Bu oranların sunulan çalışmada elde edilen oranlardan (RES10: %32,43±2,01, RES20: %33,70±1,60, kontrol: %30,95±1,68) yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumun muhtemel sebebi; her iki çalışmada kullanılan floresan boyanın aynı olmasına karşın muayene yönteminin farklı olmasıdır. Araştırmacılar akrozom bütünlüğü muayenesinde floresan ataçmanlı faz kontrast mikroskobu kullanmışlardır. Sunulan çalışmada ise daha hassas sonuçlar verebilen akış sitometrisi kullanılmıştır. Diğer türlerde yapılan çalışmalar incelendiğinde; Assunção ve ark. (2021) boğa spermasında 0,05 mM resveratrolün eritme sonrası akrozom bütünlüğünü koruduğunu bildirmişlerdir. Benzer olarak, Li ve ark. (2018) cinsiyeti belirlenmiş boğa spermasını eritme sonrası farklı dozlarda resveratrol içeren yıkama medyumları ile yıkamış ve yine aynı miktarda resveratrol içeren fertilizasyon medyumları içerisinde 1.5 saat inkübe etmişlerdir. Süre sonunda 10^{-4} M resveratrol grubunda akrozom bütünlüğünün başarıyla korunduğunu tespit etmişlerdir. Ancak, Bucak ve ark. (2015) ise boğa sperması dondurulmasında sulandırıcıya ilave ettikleri 1 mM resveratrolün eritme sonrası akrozom bütünlüğü oranlarını etkilemediğini bildirmişlerdir. Ahmed ve ark. (2020) manda boğasında gerçekleştirdikleri çalışmada 100 µM resveratrolün eritme sonrası akrozom bütünlüğünde olumlu sonuçlar verdiğini tespit etmişlerdir. Domuzda yapılan çalışmalarda 50, 75 ve 100 µM resveratrolün eritme sonrası akrozom bütünlüğünü koruduğu (Zhu ve ark. 2019), eritme medyumuna ilave edilen 0,5, 1 ve 2 mM resveratrolün ise akrozom bütünlüğünü korumada etkili olmadığı bildirilmiştir (Gadani ve ark. 2017). Lv ve ark. (2019) teke spermasında yaptıkları çalışmada 10 ve 50 µM resveratrolün eritme sonrası akrozom bütünlüğünü korumada olumlu etki yaptığını tespit etmişlerdir. Köpek sperması sulandırıcısı içerisine ilave edilen 200 ve 400 µM resveratrolün eritme sonrası akrozom bütünlüğünü kontrol grubuna göre daha iyi

koruduğu bildirilmiştir (Bang ve ark. 2020). Sunulan çalışmada akrozom bütünlüğü muayenesinde CD gruplarında özellikle de CD40 grubunda başarısız sonuçlar elde edilmiş, haricindeki diğer grupların (kontrol, RES ve CD-RES grupları) benzer olduğu saptanmıştır (Tablo 4-3).

Memeli spermatozoonları fertilizasyon kabiliyeti kazanabilmek adına kapasitasyon olarak adlandırılan oldukça karmaşık bir seri fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler geçirmek zorundadır (Austin 1952). *İn vivo* ortamda, kapasitasyon dişi genital kanalda gelişmekte (Rodriguez-Martinez 2007), süreç içerisinde membran yapısında yeniden düzenlenmeler, hiperpolarizasyon, hücre içi iyon konsantrasyonlarında değişiklikler, enerji metabolizmasında artış ve cAMP' a bağlı protein fosforilasyon aktivasyonu gelişmektedir (Brener ve ark. 2003; Brewis ve ark. 2004; Visconti ve ark. 2011; Grasa ve ark. 2006; Leemans ve ark. 2019). Tüm bu değişimlerin akabinde, spermatozoonların hareket kabiliyetinde değişiklikler meydana gelmekte, ovidukt epitelyasından çıkma, oviduktu katetme, kumulus hücrelerini aşma ve oosit penetrasyonu için gerekli olan hiperaktivasyon yeteneği gelişmektedir (Yanagimachi 1970; Cummins 1982; Freitas ve ark. 2017).

Kriyoprezervasyon, spermatozoon membran kompozisyonu ve permeabilitesinde fonksiyonel bozukluklara, aşırı miktarda ROS üretimine ve lipit peroksidasyonuna, dolayısıyla motilite, canlılık ve DNA bütünlüğünde kayıplara neden olmaktadır (Bailey ve ark. 2000; Bailey ve ark. 2000; Gürler ve ark 2016; Grötter ve ark. 2019). Özellikle donma sürecinde, koç spermatozoonu membran lipitlerindeki faz değişiklikleri (sıvı fazdan jel faza geçiş) plazma membranından yaklaşık %14 oranında kolesterol kaybına neden olmaktadır (Moce ve ark. 2010). Bu kayıp, spermatozoon membran akışkanlığını bozarak geçici porların oluşmasına neden olur. Bu porlardan intraselüler ortama Ca^{++} girişinin artmasına bağlı olarak kapasitasyon benzeri değişiklikler meydana gelir. *İn vitro* ortamda soğuk şokuna bağlı olarak gelişen bu durum "kriyo-kapasitasyon" olarak adlandırılmaktadır ve spermatozoonların fertilizasyon yeteneğinin düşmesine neden olan başlıca etkenlerdendir (Watson 1995; Gillan ve ark. 1997).

Koç dahil birçok memeli hayvanda, protein tirozin fosforilasyonunun kapasitasyon sürecinde arttığı gösterilmiştir (Satorre ve ark. 2009; Pommer ve ark. 2003; Visconti ve ark. 1995; Tardif ve ark. 2001; Kadirvel ve ark. 2011; Peris-Frau ve ark. 2020a). Hücre içi artan Ca^{++} konsantrasyonu ile kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu için

gerekli olan protein tirozin fosforilasyonu arasında pozitif korelasyonun olduğu bildirilmektedir (Visconti ve ark. 1995; Leclerc ve ark. 1998; Naz ve Rajesh 2004).

Mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olsa da resveratrolün manda boğası spermatozoonlarında erken kapasitasyonu engellediği bildirilmiştir (Longobardi ve ark. 2017b). Benzer durum, sunulan çalışmada sulandırıcısında 20 µg/ml resveratrol barındıran RES20 grubunda saptanmış, RES20 grubunun (%59,10±2,08) kontrol grubuna (%44,00±1,94) göre erken / kriyo kapasitasyonu engellediği tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca, CD-RES10 ve CD-RES20 gruplarında elde edilen %52,40±4,05 ve %51,20±2,59 oranları, kontrol ve diğer resveratrol içeren gruplar ile benzer olmasına karşın erken kapasitasyon oranlarını kısmen azalttığı görülmüştür (Tablo 4-3). RES20 grubunda elde edilen başarının RES10 ve RES40 grubunda gözlemlenmemesi; RES10 grubunda resveratrol dozunun yetersiz olması, RES40 grubunda ise doz aşımına bağlı gelişmiş olabilir. CD-RES10 ve CD-RES20 gruplarındaki başarılar yine resveratrolün varlığına bağlanabilir. Çalışmada, erken kapasitasyonun engellenmesinde resveratrolün olumlu etkisi saptansa da bu etkinin medyumdaki konsantrasyondan büyük ölçüde etkilendiği görülmüştür.

Resveratrolün kapasitasyon benzeri değişiklikleri engellemesindeki muhtemel nedenler; ortamdaki ROS miktarını düşürmesi ve ROS varlığında regüle olan protein tirozin fosforilasyonunu azaltması olarak düşünülmektedir (Longobardi ve ark. 2017b). Ayrıca, rat ventriküler kas hücrelerinde yürütülen bir çalışmada, resveratrolün hücre membranı kalsiyum kanallarını inhibe ederek hücre içi serbest Ca^{++} konsantrasyonunu düşürdüğü, dolayısıyla tirozin kinaz enziminin etkinliğini azalttığı ve protein tirozin fosforilizasyonunu engellediği rapor edilmiştir (Liu ve ark. 2005). Resveratrol, hücre içi Ca^{++} regülasyonunda gösterdiği bu etkisini spermatozoon üzerinde de yaratmış olabilir. Desroches ve ark. (2005), gerçekleştirdikleri çalışmada, resveratrol ile benzer polifenol bir bileşik olan quarcetinin kapasitasyonu "reversibl" olarak engellediğini; Longobardi ve ark. (2017b)'a ait çalışmada, mandalarda eritme sonrası erken kapasitasyon oranını düşüren resveratrolün *in vitro* fertilizasyon oranlarını olumsuz etkilemediği bildirilmiştir. Kapasitasyon, fertilizasyon olgusunda spermatozoonlar adına gerçekleşmesi gereken bir süreçtir (Jaiswal ve Eisenbach 2002). Bu sebepten dolayı, resveratrol muamelesi görmüş koç spermatozoonlarının *in vivo* / *in vitro* fertilizasyonda gösterecekleri başarı

araştırmaya muhtaç bir konudur. Ayrıca resveratrolün koç spermatozoonlarında çözünme sonrası erken kapasitasyon oranını düşürdüğüne dair literatür bilgisine ulaşılamamıştır.

Mitokondriyal aktivitenin devamlılığı spermatozoon motilitesi için gerekli olmakla birlikte, aşırı artması durumunda oksidatif fosforilizasyona bağlı ROS miktarı yükselecek (Turrens 2003) ve enerji kaynaklarının erken tükenmesi ile spermatozoonun yaşam ömrü kısalacaktır (Ma ve ark. 2011). Spermatozoonların primer enerji üretim yöntemi mitokondriyal oksidatif fosforilizasyondur ve düzenlenmesi kalsiyum varlığında gerçekleşmektedir (McCormack ve ark. 1990).

Boğa (Bucak ve ark. 2015), manda boğası (Ahmed ve ark. 2020), domuz (Zhu ve ark. 2019), teke (Lv ve ark. 2019) ve horoz (Najafi ve ark. 2019) spermasının dondurulmasında kullanılan resveratrolün, eritme sonrası mitokondriyal aktiviteyi artırdığı; koç spermasında ise mitokondriyal aktiviteyi olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Silva ve ark. 2012a). Sunulan çalışmada, eritme sonrası tüm gruplara ait sperma örnekleri, JC-1 floresan boyama işlemine tabi tutulmuştur. Örnekler, 40 dakika 38°C sıcaklıkta inkübasyondan sonra akış sitometrisinde incelenmiştir. En yüksek mitokondriyal aktivite oranları %64,76±1,51 ve %65,77±2,89 ile CD20 ve CD40 gruplarında saptanmıştır ($p<0,05$). Diğer gruplarda istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. CD20 ve CD40 gruplarına ait spermatozoon membran bütünlüğü, akrozom bütünlüğü ve kriyo/erken kapasitasyon oranları göz önüne alındığında, siklodekstrine bağlı membran kolesterol kaybının membran yapısında değişiklilere ve hücre içi kalsiyum girişine neden olduğu ve sonuçta mitokondriyal aktiviteyi artırdığı şeklinde yorumlanabilir. CD10 grubunda ise mitokondriyal aktivitenin yüksek olmaması daha düşük miktarda siklodekstrin içermesi ile açıklanabilir. Ancak, erken kapasitasyonun engellendiği RES20 grubunda, hücre içi kalsiyum girişinin azalması sonucu mitokondriyal aktivitenin de azalması öngörülmesine rağmen kontrol grubuna göre fark elde edilmemiştir. Buna rağmen, resveratrolün olduğu RES ve CD-RES gruplarında artan doza bağlı az da olsa mitokondriyal aktivite oranlarında azalma dikkati çekmektedir.

Eritme sonrası akış sitometrisinde gerçekleştirilen oksidatif stres muayenesinde tüm gruplara ait oranlar benzer bulunmuştur. Kullanılan metot, hücre içi ROS'un dihydroethidium maddesi ile tespitine dayanmaktadır. Dihydroethidium, özellikle süperoksit radikalinin (O_2) tespitinde kullanılan bir boyadır (Guthrie ve Welch 2006).

Çalışmada, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmaması, 10, 20 ve 40 µg/ml resveratrolün koç spermatozoonlarında hücre içi O_2 radikaline etkisinin olmadığını göstermektedir. Longobardi ve ark. (2017a; 2017b), gerçekleştirdikleri çalışmalarda manda sperması dondurulmasında kullandıkları antioksidan maddelerin (karnitin, resveratrol) hücre içi O_2 radikalini azalttığı, ancak lipit peroksidasyonunda (LPO) etkili olmadığını bildirmişlerdir. Diğer yandan, Merati ve ark. (2018)' ait koç epididimal sperması çalışmasında, minocycline maddesinin eritme sonrası hücre içi O_2 oranına etkili olmamasına rağmen, hücre içi H_2O_2 ve membran LPO'nun son ürünü olan MDA miktarını azaltmada etkili olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada, oksidatif stres değerleri, saptanan diğer spermatolojik bulgular (özellikle HOST, kısmen membran ve akrozom bütünlüğü) ile değerlendirildiğinde, resveratrolün ilavesinin yararlı olduğu söylenebilir. Bu durum, resveratrolün spermatozoon membran yapısında koruyucu etki yaptığını göstermektedir. Boğa (Bucak ve ark. 2015), manda boğası (Ahmed ve ark. 2020) ve geyik (Falchi ve ark. 2020) spermasında yapılan çalışmalarda reveratrolün LPO son ürünü olan MDA miktarını azalttığı bildirilmiştir. Bu sebepten dolayı resveratrolün koç sperması dondurulmasında LPO üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi amacıyla MDA ölçümü yapılması önerilebilir.

Spermatozoonların motil kalma süresi fertilizasyonda önemli rol oynar (Saacke ve White 1972). 37°C sıcaklıkta gerçekleştirilen 4 saatlik dayanıklılık testinde total motilite bakımından kontrol grubuna ait eritme sonrası total motilite değeri ilk bir saat sonundaki değerle kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli düzeyde düştüğü belirlendi (Tablo 4-7). İlk bir saat diliminde deney grupları arasında CD20 ve CD-RES10 grupları hariç istatistiksel fark tespit edilmedi ($p>0,05$). 1. saat ile 2. saat karşılaştırıldığında CD40, CD-RES10, CD-RES20 ve CD-RES40 içeren grupların istatistiksel olarak benzer olduğu gözlemlendi ($p>0,05$). Eritme sonrası 2. saat ile 4. saat karşılaştırıldığında CD-RES10 total motilite değerlerinin benzer olduğu saptandı ($p>0,05$). İnkübasyon sonrası bulgular genel olarak ele alındığında eritme sonrası ilk iki saate kadar en başarısız total motilite oranları CD40 grubunda tespit edildi. Benzer durum 4. saatte kontrol grubundan sonra CD10 grubu için söylenebilir. Total motilite bakımından CD-RES10 grubu diğerlerine göre motilitesini daha uzun süre koruduğu gözlemlendi ($p>0,05$).

Spermatozoonlarda donma ve eritme işlemleri sırasında meydana gelen zararlar eritme sonrası inkübasyon süresi uzadıkça daha da belirginleşir ve spermatolojik

parametreler zamana bağlı olumsuz yönde etkilenir (Ustüner ve ark. 2016). Eritme sonrası progresif motilite değerinin de zamana bağlı olarak hızlıca düştüğü gözlemlendi (Tablo 4-7). Progresif motilite bakımından sadece CD10 grubuna ait 0. saat değeri 1. saat değeri benzer olduğu gözlemlendi. Diğer grupların tümünde progresif motilite değeri 0-1., 0-2., 0-4. ve 2-4. saatler arasında istatistiksel bakımdan önemli düzeyde düştüğü bulundu. Spermanın dondurulup eritilmesi, metabolizması, ortamda bulunan olgunlaşmamış spermatozoonlar, epitel hücreleri ve bakteriler gibi ortam kirleticileri ROS'un başlıca kaynaklarını oluşturur (Maneesh ve Jayalekshmi 2006; Kothari ve ark. 2010; Bansal ve Bilaspuri 2010). Aşırı artan ROS seviyesi motilite ve dolaylı olarak KHP değerlerini olumsuz etkiler (John Aitken ve ark. 1989). İnkübasyon sonrası progresif motilite değerleri genel olarak değerlendildiğinde RES ve CD-RES kompleksi gruplarının nispeten başarılı olduğu söylenebilir. Bu olumlu etki RES'in antioksidatif özelliklerinden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca inkübasyonun 4. saatinde de RES içeren grupların tümü kontrol ve yanlız CD içeren gruplara göre daha üstün olduğu görülmektedir. Taze koç sperması kullanarak yapılan iki çalışmada farklı düzeyde RES içeren sulandırıcılarla sulandırılıp düşük ısılarda 24 saat bekletildiğinde RES'in spermatozoon motilitesi üzerinde etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Sarlos ve ark. 2002; Al-Mutary ve ark. 2020).

Özellikle CASA ile saptanan spermatozoon motilite ve kinetik hareket parametre değerlerinin fertilite ile ilişkili olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Foote 2003; İnanç ve ark. 2017). Çoğu spermatozoon KHP değeri (özellikle VCL ve VAP); spermatozoonun serviks bariyerini aşma yeteneği ve servikal mukus içinde ilerme kabiliyeti ile ilişkilendirilmektedir (Robayo ve ark. 2008). Spermatozoonların hiperaktivasyonu VCL ve ALH'nin yükselmesine neden olur (Van Der Horst ve ark. 2018). Hızla ilgili parametreler karşılaştırıldığında, özellikle eritme sonrası ilk iki saat içinde VCL'ye göre VAP ve VSL değerlerinin zamana bağlı olarak daha hızlı düştüğü gözlemlendi. Sadece RES içeren grupların genellikle daha düşük VCL değerine sahip olduğu görülmektedir. Boğa sperma sulandıcısına 0,05 mM resveratrol ilavesinin VSL, VAP, LIN ve STR üzerinde olumlu etkisinin olduğu bildirilmiştir (Assunçãove ark., 2021). Spermatozoon başının lateral salınımı olarak tanımlanan ALH değerinin fertilizasyona yakın dönemde yükselmesi istenen hiperaktivasyonun göstergelerindendir (Santiago-Moreno ve ark. 2017). Eritme sonrası 0. saat ile 1. saat ALH değeri

karşılaştırıldığında RES10 ve CD-RES20 hariç istatistiksel düzeyde bir artış gözlemlendi ($p<0,05$). CD içeren gruplara ait ALH değerinin sadece RES içeren gruplara göre zamanla daha hızlı yükseldiği gözlemlendi. Özellikle CD içeren gruplarda zamana (0., 1., 2. ve 4. saat) bağlı olarak ALH değeri sürekli yükselme göstermiştir. Bu yükseliş RES gruplarında görülmemiştir. ALH değerinin daha stabil kalması RES ilavesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Fertilite ile ilişkili BCF (Larsen ve ark. 2000) değerinin tüm gruplarda zamanla düştüğü görülmüştür. Bu düşüş özellikle 4. saat ile eritme sonrası BCF değerleri karşılaştırıldığında daha belirgindir ($p<0,05$). Eritme sonrası ilk bir saat diliminde RES10, RES40, CD10 ve CD-RES20 BCF değerlerinin eritme sonrası değerler benzer bulundu. 4. Saat sonunda CD-RES içeren grupların tümü kontrol, CD ve RES içeren gruplara göre hafif düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi.

STR (ortalama yolun doğrusallığı) değeri ile ejakulatın fertilite yeteneği arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır (Larsen ve ark. 2000**)**. RES20, RES40, CD20, CD40, CD-RES10 ve CD-RES40 gruplarının STR değerinin eritme sonrası ilk bir saat içindeki düşüş hzının yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu düşüşün daha sonraki zaman dilimlerinde yavaşladığı görülmüştür. 4. Saat sonunda CD-RES içeren grupların tümü kontrol ve CD içeren gruplara göre daha üstün olduğu görülmüştür.

LIN (eğrisel yolun doğrusallığı) spermatozoonun dişi genital kanalındaki migrasyonu ve fertilite ile ilişkilidir. Çoğu memelide spermatozoon hiperaktivasyonu LIN değerini düşürür (Van Der Horst ve ark., 2018). LIN değerinin ilk bir saat içinde CD10 grubu hariç tüm gruplarda düştüğü, 0. ve 4. saat bulguları karşılaştırıldığında ise bu düşüşün daha belirgin olduğu gözlemlendi. 4. saat sonunda resveratrol ve siklodekstrin+resveratrol içeren grupların tümü kontrol ve CD içeren gruplara göre hafif düzeyde daha yüksek olduğu görüldü. Özellikle CD-RES10 ve CD-RES20 gruplarının kontrol ve yalnızca siklodekstrin içeren gruplardan daha üstün olduğu gözlemlendi.

Özet olarak sunulan çalışmada; eritme sonrası spermatolojik bulgular değerlendirildiğinde;

- Eritme sonrası aşamada resveratrolün (RES), kontrol grubuna göre motilite ve hareketle ilgili diğer kinematik parametreleri istatistiksel düzeyde etkilemediği görüldü. Koç sperma sulandırıcısına ilave edilen 20 µg/ml resveratrolün eritme sonrası erken gelişen kapasitasyonu baskıladığı tespit edildi ($p<0,05$). Düşük dozlarda RES ilavesinin (10 ve 20 µg/ml) plazma membranının fonksiyonel bütünlüğünü koruduğu gözlemlendi ($p<0,05$). 4 saatlik inkübasyon sonrasında RES varlığının total motilite ($p<0,05$), progresif motilite ($p<0,05$), VAP ($p>0,05$), VSL ($p<0,05$), VCL ($p>0,05$), STR ($p<0,05$) ve LIN ($p<0,05$) kinematik hareket parametrelerinde devamlılığı uzattığı bulundu.
- Eritme sonrası aşamada sulandırıcı içerisinde siklodekstrin (CD) varlığının kontrol grubuna göre motilite ve hareketle ilgili kinematik parametreleri istatistiksel düzeyde etkilemediği görüldü. CD ilavesin eritme sonrası erken gelişen kapasitasyonu indüklediği ($p<0,05$), plazma membran fonksiyonel bütünlüğünü koruyamadığı ($p>0,05$) ve yüksek konsantrasyonlarda (357,30 ve 714,60 µg/ml) mitokondrial aktiviteyi artırdığı ($p<0,05$) gözlemlendi. 4 saatlik inkübasyon sonrasında kontrol grubuna göre total ve progresif motilite, VAP, VSL ve VCL gibi kinetik hareket parametrelerin devamlılığını kısmi olarak olumlu etkilediği belirlendi.
- Eritme sonrası aşamada resveratrol siklodekstrin kompleksinin (CD-RES), kontrol grubuna göre motilite ve hareketle ilgili kinematik parametreleri istatistiksel düzeyde etkilemediği görüldü. Genel olarak kapasitasyonu sınırlı derecede baskıladığı ($p>0,05$), plazma membran fonksiyonel bütünlüğü koruduğu ($p<0,05$) tespit edildi. 4 saatlik inkübasyon sonrasında CD-RES ilavesinin kontrol grubuna göre total motilite ($p<0,05$), progresif motilite ($p<0,05$), VAP ($p>0,05$), VSL ($p<0,05$), VCL ($p>0,05$), STR ($p<0,05$) ve LIN ($p<0,05$) kinematik hareket parametrelerin devamlılığını olumlu yönde etkilediği saptandı.

Sonuç olarak; koç spermasının dondurulmasında sperma sulandırıcılarına CD ilavesinin yararlı olmadığı kanısına varıldı. Özellikle resveratrol-siklodekstrin kompleksi ve resveratrol ilavelerinin yararlı olduğu ancak artan yoğunluklarda (20 ve 40 µg/ml) spermatolojik parametrelerin olumsuz etkilendiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

Abdelhakeam, A. A., Graham, E. F. ve Vazquez, I. A. (1991). Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology*, 28(1), 36-42.

Aboagla, E. M. E. ve Terada, T. (2003). Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction*, 69(4), 1245-1250.

Adler, S., Pellizzer, C., Paparella, M., Hartung, T. ve Bremer, S. (2006). The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation. *Toxicology in vitro*, 20(3), 265-271.

Agarwal, A., Nallella, K. P., Allamaneni, S. S. ve Said, T. M. (2004). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive biomedicine online*, 8(6), 616-627.

Agarwal, A., Virk, G., Ong, C. ve Du Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The world journal of men's health*, 32(1), 1.

Aggarwal, B. B. ve Shishodia, S. (Eds.). (2005). *Resveratrol in health and disease*. CRC Press.

Ahmad, A., Asad, S. F., Singh, S. ve Hadi, S. M. (2000). DNA breakage by resveratrol and Cu (II): reaction mechanism and bacteriophage inactivation. *Cancer letters*, 154(1), 29-37.

Ahmed, H., Jahan, S., Ullah, H., Ullah, F. ve Salman, M. M. (2020). The addition of resveratrol in tris citric acid extender ameliorates post-thaw quality parameters, antioxidant enzymes levels, and fertilizing capability of buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa. *Theriogenology*, 152, 106-113.

Aisen, E. G., Alvarez, H. L., Venturino, A. ve Garde, J. J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*, 53(5), 1053-1061.

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(7), 1801-1808.

Aitken, R. J. (1994). Pathophysiology of human spermatozoa. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 6(2), 128-135.

Aitken, R. J., Harkiss, D. ve Buckingham, D. (1993). Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *Reproduction*, 98(1), 257-265.

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 infertility. *American journal of obstetrics and gynecology*, 164(2), 542-551.

Ak, K. (1990). Süt Tozu ile Sulandırılan Sulandırıcılar ile Dondurulan Boğa Spermasının Ülkemizde Kullanılabilirliği Üzerinde Araştırmalar. *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi*, İstanbul.

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

Ak, K. (2005b). Spermanın Muayenesi. 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, 75-90.

Ak, K. (2005c). Spermanın Saklanması. 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, 100-110.

Ak, K. (2005d). Spermatozoonların Ayrıntılı Yapısı. 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, 69-74.

Ak, K., Ak, S., Gürel, A., Hasöksüz, M. ve Baran, A. (1995). Koçlarda mycoplasma agalactiae'nin spermatolojik özelliklere deneysel araştırmalar. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 26 (2), 139-155.

Ak, K., Cirit, Ü., Nur, Z., Bacınoğlu, 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.

Akkuş, İ. (1995). *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Mimoza Yayınları, Konya, 1, 57-63.

Aksoy, M., Tekeli, M., Çoyan, K. ve Karaca, F. (1993). Konya Merinosu Koçlarının Spermatolojik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 3(2), 126.

Alçay, S. (2015). Hücre içine girebilen bazı kriyoprotektanlarla dondurulan koç spermasının in vitro embriyonik gelişim üzerine etkisi. *Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi*, Bursa

Alçay, S., Toker, B., Ustuner, B., Nur, Z., Sagirkaya, H. ve Soylu, M. K. (2014). Investigation of relationships between DNA integrity and fresh semen parameters in rams. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(5), 793-798.

Alçay, S., Üstüner, B., Çakmak, İ., Çakmak, S., Nur, Z. (2015). Effects of various cryoprotective agents on post-thaw drone semen quality. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21 (1), 31-35.

Allai, L., Benmoula, A., da Silva, M. M., Nasser, B. ve El Amiri, B. (2018). Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal reproduction science*, 192, 6-17.

Al-Mutary, G. M. (2020). Use of antioxidants to augment semen efficiency during liquid storage and cryopreservation in livestock animals: A review. *Journal of King Saud University-Science*.

Al-Mutary, M. G., Al-Ghadi, M. Q., Ammari, A. A., Al-Himadi, A. R., Al-Jolimeed, A. H., Arafah, M. W., ... ve Swelum, A. A. A. (2020). Effect of different concentrations of resveratrol on the quality and in vitro fertilizing ability of ram semen stored at 5° C for up to 168 h. *Theriogenology*, 152, 139-146.

Alvarenga, M. A., Alvarenga, F. C., Moreıra, R. M. ve Cesarıno, M. M. (2000). Acrozomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packing systems. *Equine Veterinary Journal*, 32, 541-545.

Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-alvarenga, F. C. ve Medeiros, A. S. L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal Reproduction Science*, 89 (1), 105-113.

Alvarez, J. G. ve Storey, B. T. (1995). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular reproduction and development*, 42(3), 334-346.

Alvarez, M., Tamayo-Canul, J., Anel, E., Boixo, J. C., Mata-Campuzano, M., Martinez-Pastor, F., ... ve de Paz, P. (2012). Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram semen. *Theriogenology*, 77(6), 1111-1118.

Amann, R. P. ve Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5-17.

An, T. Z., Iwakiri, M., Edashige, K. ve Takashi, M. (2000). Factors affecting the survival of frozen mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 40, 237-249.

Anderson, J. (1945). The semen of animals and its use for artificial insemination.

Ansari, K. A., Vavia, P. R., Trotta, F. ve Cavalli, R. (2011). Cyclodextrin-based nanosponges for delivery of resveratrol: in vitro characterisation, stability, cytotoxicity and permeation study. *Aaps Pharmscitech*, 12(1), 279-286.

Arav, A., Hehu, D. ve Mattioli, M. (1993). Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Infertility*, 99, 353-358.

Arıcı, R. (2017). Farklı sulandırıcılarla dondurulan koç spermasının in-vitro fertilite yeteneğinin tespiti. *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi*, İstanbul

Ari, U. C., Kulaksiz, R. ve Öztürkler, Y. (2011). Freezability of tushin ram semen extended with goat or cow milk based extenders. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(6), 975-979.

Assunção, C. M., Mendes, V. R. A., Brandão, F. Z., Batista, R. I. T. P., Souza, E. D., de Carvalho, B. C., ... ve Camargo, L. S. A. (2021). Effects of resveratrol in bull semen extender on post-thaw sperm quality and capacity for fertilization and embryo development. Animal Reproduction Science, 226, 106697.

Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R. ve Simal-Gandara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1631-1640.

Ataman, M.B. (1996). Koyunların donmuş-çözünmüş sperma kullanarak laparoskop yardımı ile intraüterin tohumlanması. *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi*, Konya

Austin, C. R. (1952). The 'capacitation'of the mammalian sperm. *Nature*, 170(4321), 326-326.

Bacinoglu, S., Taş, M., Cirit, Ü., Özdaş, Ö. B, ve Ak, K. (2008). The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine. *Animal reproduction science*, 104(1), 38-46.

Bacinoğlu, S., Cirit, Ü., Zakeriya, N. U. R., ve Kemal, A. K. (2007). Eritilmiş Koç Spermasında Farklı Gliserol Katma Tekniklerinin ve Soğutma Hızının Spermatolojik Özelliklere Etkisi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 33(1), 11-21.

Bag, S., Joshi, A., Naqvi, S. M. K., Rawat, P. S., Mittal, J. P. (2002). Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 72 (3), 175-183.

Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., ve Cormier, N. A. T. H. A. L. Y. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of andrology*, 21(1), 1-7.

Bailey, J., Morrier, A. ve Cormier, N. (2003). Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Canadian journal of animal science*, 83(3), 393-401.

Bakas, L. S. ve Disalvo, E. A. (1991). Effect of Ca2+ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology*, 28(4), 347-353.

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.

Banaszac, L., Sharrock, W. ve Timmins, P. (1991). Structure and function of alipoprotein: Lipovitellin. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 20, 221-246.

Banday, M. N., Lone, F. A., Rasool, F., Rashid, M. ve Shikari, A. (2017). Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. *Cryobiology*, 74, 25-30.

Bang, S., Qamar, A. Y., Tanga, B. M., Fang, X. ve Cho, J. (2020). Effects of Resveratrol Supplementation on the Motility, Structural Integrity, and Mitochondrial Function of Freeze-Thawed Dog Sperm.

Bansal, A. K. ve Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary medicine international*, 2011.

Battal, A., Baykal, Y., ve Erikçi, Y., Sağlam, K., Ünal, T., Kocabalkan, F., Aydın, A., Işşımer, A. (1995). Serbest radikal temizleyici süperoksit dismutaz enziminin ve serum bakır, çinko, selenyum düzeylerinin diabetes mellitus' un kronik komplikasyonları ile ilişkisi. *Gülhane Askeri Tıp Akademisi Bülteni*, 37(2), 218-222.

Baur, J. A. ve Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews Drug discovery*, 5(6), 493-506.

Benhenia, K., Lamara, A., Fatmi, S. ve Iguer-Ouada, M. (2016). Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen. *Small Ruminant Research*, 141, 29-35.

Benhenia, K., Rahab, H., Smadi, M. A., Benmakhlouf, H., Lamara, A., Idres, T., ve Iguer-Ouada, M. (2018). Beneficial and harmful effects of cyclodextrin-vitamin E complex on cryopreserved ram sperm. *Animal reproduction science*, 195, 266-273.

Bergeron, A., Brindle, Y., Blondin, P. ve Manjunath, P. (2007). Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biology of reproduction*, 77(1), 120-126.

Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C. ve Sirard, M. A. (2001). Thiols prevent H_2O_2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56(2), 275-286.

Birler, S. (1999). Reprodüktif Fizyoloji. 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: 112, 16-26.

Birler, S., Pabuccuoğlu, S., Demir, K., Cirit, Ü., Kahraman, E., Bacınoğlu, S. ve ark. (2010). Production of cloned lambs: Transfer of early cleavage stage embryos to final recipients. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 36 (1), 1-8.

Blackshaw, A. W. (1954). The prevention of temperature shock of bull and ram semen. *Australian journal of biological sciences*, 7(4), 573-582.

Branco, C. S., Garcez, M. E., Pasqualotto, F. F., Erdtman, B. ve Salvador, M. (2010). Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, 60(2), 235-237.

Brener, E., Rubinstein, S., Cohen, G., Shternall, K., Rivlin, J. ve Breitbart, H. (2003). Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of reproduction*, 68(3), 837-845.

Brewis, I. A., Boerke, A., Tsai, P. S. ve Gadella, B. M. (2004). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 473-480.

Brown, L., Kroon, P. A., Das, D. K., Das, S., Tosaki, A., Chan, V., ... ve Feick, P. (2009). The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(9), 1513-1523.

Bucak, M. N. ve Tekin, N. (2007). Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54, 67-72.

Bucak, M. N., Ataman, M. B., Başpınar, N., Uysal, O., Taşpınar, M., Bilgili, A., ... ve Akal, E. (2015). Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. *Andrologia*, 47(5), 545-552.

Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varışlı, Ö., Yüce, A., Tekin, N. ve Akçay, A. (2007a). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*, 67(5), 1060-1067.

Bucak, M. N., Tekin, N. ve Kulaksız, R. (2007b). Koç Spermasının Kısa Süreli Saklanmasında Antioksidanların Etkisi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü*

Dergisi, 47(2), 15-21.

Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sarıözkan, S., ve Ulutaş, P. A. (2009). Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research*, 81(1), 13-17.

Byrne, G. P., Lonergan, P., Wade, M., Duffy, P., Donovan, A., Hanrahan, J. P. ve Boland, M. P. (2000). Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal reproduction science*, 62(4), 265-275.

Cabria, E., Anel, L. ve Herraez, M. P. (2001). Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 52, 623-635.

Camara, D. R., Silva, S. V., Almeida, F. C., Nunes, J. F., Guerra, M. M. P. (2011). Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, 76(2), 342-350.

Chalah, T., Seigneurin, F., Blesbois, E. ve Brillard, J. P. (1999). In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by threee different techniques and relationship with subsequent fertility in vitro. *Cryobiology*, 39, 185-191.

Cheeseman, K. H. ve Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*, 49(3), 481-493.

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*, 30, 423-431.

Chenoweth, P. J. (2002). Electroejaculators and Probes. In Proceedings, The Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle Workshop September 5-6. Semen Quality Assessment (pp. 247-255).

Chowdhury, A. K. (1979). Dependence of testicular germ cells on hormones: A quantitative study in hypophysectomized testosterone-treated rats. *Journal of Endocrinology*, 82(3), 331-NP.

Cirit, Ü., Bağış, H., Demir, K., Agca, C., Pabuccuoğlu, S., Varışlı, Ö., Agca, Y. (2013). Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose and cysteamine on ram semen. *Animal Reproduction Science*, 139, 38-44.

Cocuzza, M., Sikka, S. C., Athayde, K. S. ve Agarwal, A. (2007). Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *International braz j urol*, 33(5), 603-621.

Colas, G. (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep frozen ram semen. *Journal of Reproduction and Infertility*, 42, 277-285.

Collodel, G., Cardinali, R., Moretti, E., Mattioli, S., Ruggeri, S. ve Castellini, C. (2012). Role of rabbit prostate granules on sperm viability and acrosome reaction evaluated with different methods. *Theriogenology*, 77(5), 1021-1026.

Cormıer, N., Sırard, M. A. ve Baıley, J. L. (1997). Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *Journal of andrology*, 18(4), 461-468.

Cummins, J. M. (1982). Hyperactivated motility patterns of ram spermatozoa recovered from the oviducts of mated ewes. *Gamete research*, 6(1), 53-63.

Curry, M. R., Kleinhans, F. W. ve Watson, P. F. (2000). Measurement of the water permeability of the membranes of boar, ram, and rabbit spermatozoa using concentration-dependent self-quenching of an entrapped fluorophore. *Cryobiology*, 41(2), 167-173.

Curry, M.R., Millar, J.D. ve Watson, P.F. (1994). Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations. Biology of Reproduction, 51, 1014-1021.

Çınar, E. M. (2019). Koç spermasının modifiye edilmiş sperma sulandırıcıları ile dondurulması. *İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Doktora Tezi*, İstanbul.

Çoyan, K., Ataman, M. B., Kaya, A. ve Karaca, F. (2002). *Evcil Hayvanlarda Döllerme ve Suni Tohumlama*. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi.

D'Alessandro, A. G. D. ve Martemucci, G. (2005). Post-thaw survival and acrosome integrity of spermatozoa of Leccese rams frozen in different seasons with a milk-egg yolk extender. *Italian Journal of Animal Science*, 4, 139-148.

D'Allessandro, A. G. D., Martemucci, G., Collanna, M. A. ve Bellini, A. (2001). Post thaw survival of ram spermatozoon and fertility after insemination as affected by

prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*, 55, 1159-1170.

Da Silva Maia, M., 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. *Animal Reproduction Science*, 122(1-2), 118-123.

Darin-Bennett, A., ve White, I. G. (1977). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14(4), 466-470.

Dattena, M., Gallus, M., Loi, P. Branca, A. Cappai, P. ve Casu, S. (1992). Artificial insemination in ewe lambs: effect of the insemination technique on fertility. İçinde *Proceedings of the 10th Symposium SIPAOC*, 276-277.

Dawson, R. M. C. ve Scott, T. W. (1964). Phospholipid composition of epididymal spermatozoa prepared by density gradient centrifugation. *Nature*, 202(4929), 292-293.

De La Lastra, C. A. ve Villegas, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1156-1160.

De Lamirande, E. ve Gagnon, C. (1992a). Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effect on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonems. *J. Androl.*, 13: 368-378.

De Lamirande, E. ve Gagnon, C. (1992b). Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J. Androl*., 13: 379-386.

De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B. ve Verkleij, A. J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30(1), 32-44.

De Souza, C. V., Brandão, F. Z., Santos, J. D. R., Alfradique, V. A. P., Dos Santos, V. M. B., da Cruz Morais, M. C., ... ve Souza-Fabjan, J. M. G. (2019). Effect of different concentrations of l-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. *Cryobiology*, 89, 104-108.

Demir, K., Öztürk, G. B., Cirit, Ü., ve Bozkurt, H. H. (2015). Effects of cooling rate on membrane integrity and motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21(1), 61-67.

Demirci, E. (2002). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları, *Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ders Teksiri* No: 53, 21-86, Elazığ.

Demott, R. P. ve Suarez, S. S. (1992). Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biology of reproduction*, 46(5), 779-785.

Desroches, N. R., McNiven, M. A., Foote, K. D. ve Richardson, G. F. (2005). The effect of blueberry extracts and quercetin on capacitation status of stored boar sperm. *Cell Preservation Technology*, 3(3), 165-168.

Di Mascio, P., Murphy, M. E. ve Sies, H. (1991). Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *The American journal of clinical nutrition*, 53(1), 194S-200S.

Dikici, İ. (1999). Akut viral hepatitlilerde interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlilerde oksidatif stresin araştırılması. *Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi*, Konya.

Dinesh, V., Shamsi, M. ve Dada, R. (2012). Supraphysiological free radical levels and their pathogenesis in male infertility. *Reprod Sys Sexual Disorders*, 1(114), 2.

Dogan, İ., Nur, Z., Gunay, U. ve Soylu, M. K. (2005). Semen characteristics during the transition. *Indian Veterinary Journal*, 82, 1080-1082.

Doğantekin, E. ve Özcan, S. (2016). Çevresel etkenler ve spermatogenez. *Erkek Üreme Sağlığı, Derleme, Androloji Bülteni*, 18(66), 183-187.

Donoghue, A. M. ve Wishart, G. J. (2000). Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 213-232.

Dooley, M.P., Pindeda, M.H. (1986). Effect of Method of Collection on Seminal Characteristics of The Domestic Cat. *American Journal of Veterinary Research*, 47: 286-292.

Dovenski, T., Trojacanec, P., Petkov, V., Popovska-Percinic, F., Kochoski, L., ve Grizelj, J. (2012). Laparoscopy-promising tool for improvement of reproductive efficiency of small ruminants. *Macedonian Veterinary Review*, 35(1), 5-11.

Dowling, D. K. ve Simmons, L. W. (2009). Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1663), 1737-1745.

Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchordoguy, T. J., Overstreet, J. W., ve Crowe, J. H. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*, 265(4), 432-437.

Du, J. ve Gebicki, J. M. (2004). Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(11), 2334-2343.

Dun, R. B. (1955). The cervix cf the ewe. Its importance in artificial insemination of sheep. *Australian Veterinary Journal*, 31(4), 101-103.

Dziuk, S.P., Graham, F.E., Donker, D.J., Marion, B.G. ve Peterson, E.W. (1954). Some observations in collection of semen from bulls, goats boars and rams by electrical stimulation. *Veterınary Medıcıne*, 69, 455-458.

Edashige, K., Yamaji, Y., Kleinhans, F. W. ve Kasai, M. (2003). Artificial expression of aquaporin-3 ımproves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 68, 87-94.

El-Alamy, M. A. ve Foote, R. H. (2001). Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Animal Reproduction Science*, 65(3-4), 245-254.

Emsen, E. ve Koşum, N. (2009). Koyunculukta yeni üretim teknikleri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23, 33-42

Eppleston, J. (1992). Studies on the fertility for frozen-thawed ram semen. PhD. *thesis, University of New South Wales*.

Eppleston, J., Maxwell, W., M.C. Battye, K.M. ve Robers, E.M. (1986). Effect of thawed motility and intrauterine dose of motile sperm on fertility in ewes. *Proc. 18th Annu. Conf. Aust. Soc. Reprod. Biol*., Canberra, 18-19.

Erenel, G., Erbaş, D., Arıcıoğlu, A. (1993). Free radicals and antioxidants systems. *Mat. Med. Pol., Fasc*. 1 (85).

Evans, G. ve Maxwell, V.M.C. (1987). Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney. 19, 91-141.

Fahy, G. M. (1986). The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, 23, 1-13.

Falchi, L., Pau, S., Pivato, I., Bogliolo, L. ve Zedda, M. T. (2020). Resveratrol supplementation and cryopreservation of buck semen. *Cryobiology*, 95, 60-67.

Farah, O. I., Cuiling, L., Jiaojiao, W. ve Huiping, Z. (2013). Use of fluorescent dyes for readily recognizing sperm damage. *Journal of reproduction & infertility*, 14(3), 120.

Fehrenbach, E. ve Northoff, H. (2001). Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exercise Immunology Review*, 7, 66-89.

Fırat, S. (1997). Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi. *Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya AB Dalı, Uzm. Tezi*, Ankara, 95s.

First, N. L., Henneman, H. A. ve Williams, J. A. (1957). The influence of glycerol and various diluents on low temperature survival of ram spermatozoon. *Journal of Animal Science*, 16, 1106.

Fischer, P., Nehring, H., ve Müller, K. (1992). Passage of deep frozen ram semen in the cervix of the ewe. *12. International Congres on Animal Reproduction*, 1, 450-451.

Fischer, T. (1990). Computerized videomicrography applied to deep-frozen ram semen, with reference to osmolality of the diluent and morphology of the spermatozoal head cap. *Inaugural-Dissertation, Fachbereich Veterinarmedizin, Freie Universitat*, Berlin. A.B.A. No.3712.

Fiser, P. S. ve Fairfull, R. W. (1984). The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoon frozen in straws. *Cryobiology*, 21, 542-551.

Fiser, P. S. ve Fairfull, R. W. (1986). Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoon. *Theriogenology*, 25 (3), 473-484.

Fiser, P. S., Ainsworth, L. ve Fairfull, R. W. (1987). Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 28(5), 599-607.

Foote, R. H. (2002). The history of artificial insemination selected notes and notables. *Journal of Animal Science*, 80, 1-10.

Fraser, L. R., Abeydeera, L. R. ve Niwa, K. (1995). Ca2+-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Molecular reproduction and development*, 40(2), 233-241.

Freeman, B. A. ve Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 47(5), 412-426.

Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The American journal of medicine*, 97(3), S5-S13.

Freitas, M. J., Vijayaraghavan, S. ve Fardilha, M. (2017). Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biology of Reproduction*, 96(1), 2-12.

Fréour, T., Jean, M., Mirallié, S., Dubourdieu, S. ve Barrière, P. (2010). Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 149(2), 186-189.

Fukui, Y. (1977). Effect of nonsurgical intrauterine insemination on fertility at first estrus synchronized with prostaglandin F2α. *The Japanese Journal of Animal Reproduction*. 23(3), 116-127.

Fukui, Y., ve Roberts, E. M. (1978). Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. *Theriogenology*, 10(5), 381-393.

Gadani, B., Bucci, D., Spinaci, M., Tamanini, C. ve Galeati, G. (2017). Resveratrol and Epigallocatechin-3-gallate addition to thawed boar sperm improves in vitro fertilization. *Theriogenology*, 90, 88-93.

Gadella, B. M. ve Luna, C. (2014). Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology*, 81(1), 74-84.

Garcez, M. E., dos Santos Branco, C., Lara, L. V., Pasqualotto, F. F. ve Salvador, M. (2010). Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertility and sterility*, 94(6), 2118-2121.

Garner, D. L., Pinkel, D., Johnson, L. A. ve Pace, M. M. (1986). Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*, 34(1), 127-138.

Garner, D. L., Thomas, C. A., Joerg, H. W., DeJarnette, J. M. ve Marshall, C. E. (1997). Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of reproduction*, 57(6), 1401-1406.

Garner, D.L. ve Hafez, E.S.E. (1993) Spermatozoa and seminal plasma. In: *Reproduction in Farm Animals*. Hafez ESE (ed). Lea & Febier, Philadelphia, PA, pp 165–187.

Giaretta, E., Bucci, D., Mari, G., Galeati, G., Love, C. C., Tamanini, C. ve Spinaci, M. (2014). Is resveratrol effective in protecting stallion cooled semen?. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(11-12), 1307-1312.

Gil, J., Rodriguez-Irazoqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L. ve Rodriguez-Martinez, H. (2003). Fertility of ram semen frozen in bioexcell and used for cervical artificial insemination. *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 insemination. *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

Gillan, L., Evans, G. ve Maxwell, W. M. C. (1997). Capacitation status and fertility of fresh and frozen–thawed ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 9(5), 481-488.

Gillan, L., Evans, G. ve Maxwell, W. M. C. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2), 445-457.

Gomes, GM., Jacop, J. C. F., Medeiros, A. S. L., Papa, F. O. ve Alvarenga, M. A. (2002). Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the mangalarga marchador breed. *Theriogenology*, 58, 277-279.

Gordon, I. (1999). Fixed time sheep artificial insemination, preparation and processing of semen. İçinde: Gordon, I. (ed.), *Controled Reproduction in Sheep and Goat*. University Press, Cambridge, UK, pp. 123– 124.

Gökçen, H. (1977). Koç spermasının kimi özellikleri, dondurulması ve dondurulan spermanın döl verimi üzerine araştırmalar. *Doktora Tezi. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü*, Yayın No:48.

Gökçen, H. (1990). Koyunlarda sun'i tohumlama, İçinde Aytuğ, C.N (ed), *Koyun-keçi hastalıkları ve yetiştiriciliği*. İstanbul: 485-501; Teknografik Matbaası

Gökçen, H., Aştı, R. N. ve Kozandağı, M. (1983). Çeşitli ekilibrasyon süreleri ve çözme ısılarının donmuş koç spermatozoonlarının motilitesi ve akrozom bozuklukları üzerine etkisi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2 (1), 51-58.

Gökçen, H., Aştı, 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. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 4, 1-3.

Gökdal, Ö., Yılmaz, O. (2014). Üreme Biyoteknolojileri. İçinde Koyun-Keçi Genetik Islah Çalıştayı, Uşak: *TÜDKİYEB Yayını*, Yayın No:1, 94-135

Graham, E. F., Crabo, B. G. ve Pace, M. M. (1978). Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *Journal of animal Science*, 47(suppl_II), 80-119.

Grasa, P., Cebrián-Pérez, J. A. ve Muino-Blanco, T. (2006). Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction*, 132(5), 721-732.

Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E., ve Ferré, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 655-665.

Guemouri, L. Y. B. C. G. G., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G. ve Siest, G. (1991). Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clinical chemistry*, 37(11), 1932-1937.

Guthrie, H. D. ve Welch, G. R. (2006). Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of animal science*, 84(8), 2089-2100.

Gülyüz, F. (1995). Kıvırcık Irkı Koçlarda Dölverimi Özellikleri. *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(2), 16-19.

Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J. P. ve Bollwein, H. (2016). Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86(2), 562-571.

Hafez, E. S. E. (1993). *Reproduction in Farm Animals*. (6th ed), Philadelphia. 503-525.

Halliwell, B. (1987). Free radicals and metal ions in health and disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 46(1), 13-26.

Halliwell, B. ve Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 57(5), 715S-725S.

Hammerstedt, R. H., Keith, A. D., Hay, S., Deluca, N. ve Amann, R. P. (1979). Changes in ram sperm membranes during epididymal transit. *Archives of biochemistry and biophysics*, 196(1), 7-12.

Hancock, J. L. (1952). The morphology of bull spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, 29(3), 445-453.

Harrison, R. A., Jacques, M. L., Minguez, M. L. ve Miller, N. G. (1992). Behaviour of ejaculated spermatozoa from bull, boar and ram during thin-layer countercurrent partition in aqueous two-phase systems. *Journal of cell science*, 102(1), 123-132.

Hillis, W. E., Hart, J. H. ve Yazaki, Y. (1974). Polyphenols of Eucalyptus sideroxylon wood. *Phytochemistry*, 13(8), 1591-1595.

Holley, A. E. ve Cheeseman, K. H. (1993). Measuring free radical reactions in vivo. *British Medical Bulletin*, 49(3), 494-505.

Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47-58.

Holt, W. V. ve North, R. D. (1986). Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *Reproduction*, 78(2), 447-457.

Holt, W. V. ve North, R. D. (1994). Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 51(3), 414-424.

Holt, W. V., Penfold, L. M., Chenoweth, P. ve Lorton, S. (2014). Fundamental and practical aspects of semen cryopreservation. *Animal andrology: Theories and applications*, 76.

Hulet, C.V., Foote, W.C. ve Blackwell, R.L. (1964). Effects of natural and electrical ejaculation on predicting fertility in the ram. *Journal of Animal Science*, 23, 418-424.

Iborra, A., Companyó, M., Martínez, P. ve Morros, A. (2000). Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. *Biology of reproduction*, 62(2), 378-383.

Ilangumaran, S. ve Hoessli, D. C. (1998). Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochemical Journal*, 335 (2), 433-440.

İleri, İ.K., Ak, K., Pabuccuuoğlu, S. ve Birler, S. (2000). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını*, Ders Notu No: 112, İstanbul.

İnanç, M. E. , Güngör, Ş., Ata, A. (2017). Spermatozoa motilitesinin değerlendirilmesinde bilgisayar destekli sperm analiz sistemi'nin kullanımı. *Turkiye Klinikleri Journal of Reproduction and Artificial Insemination-Special Topics*, 3 (2), 73-78.

Jaiswal, B. S. ve Eisenbach, M. (2002). Capacitation. In *Fertilization* (pp. 57-117). Academic Press.

Jiménez-Rabadán, P., Soler, A. J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., ... ve Garde, J. J. (2016). Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal reproduction science*, 167, 103-108.

John Aitken, R., Clarkson, J. S., ve Fishel, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of reproduction*, 41(1), 183-197.

Kadirvel, G., Kathiravan, P. ve Kumar, S. (2011). Protein tyrosine phosphorylation and zona binding ability of in vitro capacitated and cryopreserved buffalo spermatozoa. *Theriogenology*, 75(9), 1630-1639.

Kanev, M. ve Muranlı, F. G. (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(1), 33-38.

Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş. (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1).

Katkov, I. I., Katkova, N., Crister, J. K., Mazur, P. (1998). Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, 37, 325-338.

Katz, D. F., Yanagimachi, R. ve Dresdner, R. D. (1978). Movement characteristics and power output of guinea-pig and hamster spermatozoa in relation to activation. *Reproduction*, 52(1), 167-172.

Keskin, M., Biçer, O. ve Gül, S. (2002). Sık kuzulatma sistemleri. *Mustafa Kemal Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 7 (1-2), 89-94.

Kılınç, K. (1985). Serbest oksijen radikallerinin biyokimyasal etkileri ve metabolizması. *Biyokimya Dergisi*, 2, 60-89.

Koşum, N. (2006). Koyun ve keçilerde yapay tohumlama. *Hasad, Aylık Gıda, Tarım ve Hayvancılık Dergisi*, Yıl: 22, Sayı: 259.

Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A. ve Du Plessis, S. S. (2010). Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J. Exp. Biol.*, 48(5): 424-35.

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

Kulaksız, R. ve Arı, U. Ç. (2016). Koyun ve Keçilerde Laparoskopik Suni Tohumlamada (LST) Doğrular/Yanlışlar. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*.

Kulaksız, R., Çebi, Ç., Akçay, E. ve Daşkın, A. (2010). The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small ruminant research*, 88(1), 12-15.

Kulaksiz, R., Ari, U. C., Daşkin, A. ve Üner, A. G. (2013). The effect of different glycerol concentrations on freezability of semen from Angora, Kilis and Saanen goats. *Slovak Journal of Animal Science*, 46(2), 39-44.

Ladha, S. (1998). Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *The Journal of membrane biology*, 165(1), 1-10.

Larsen, L., Scheike, T., Jensen, T. K., Bonde, J. P., Ernst, E., Hjollund, N. H., ... ve Danish First Pregnancy Planner Study Team. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reproduction*, 15(7), 1562-1567.

Leboeuf, B., Restall, B. ve Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal reproduction science*, 62(1-3), 113-141.

Leclerc, P., de Lamirande, E. V. E. ve Gagnon, C. (1998). Interaction Between Ca2+, Cyclic 3 ‘, 5’Adenosine Monophosphate, the Superoxide Anion, and Tyrosine Phosphorylation Pathways in the Regulation of Human Sperm Capacitation. *Journal of andrology*, 19(4), 434-443.

Ledesma, A., Fernández-Alegre, E., Cano, A., Hozbor, F., Martínez-Pastor, F. ve Cesari, A. (2016). Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. *Animal reproduction science*, 173, 35-41.

Lee, T. H., Liu, C. H., Shih, Y. T., Tsao, H. M., Huang, C. C., Chen, H. H. ve Lee, M. S. (2010). Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Human Reproduction*, 25(4), 839-846.

Leemans, B., Stout, T. A., De Schauwer, C., Heras, S., Nelis, H., Hoogewijs, M., ... ve Gadella, B. M. (2019). Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species?. *Reproduction*, 157(5), R181-R197.

Li, C. Y., Zhao, Y. H., Hao, H. S., Wang, H. Y., Huang, J. M., Yan, C. L., ... ve Zhao, X. M. (2018). Resveratrol significantly improves the fertilisation capacity of bovine sex-sorted semen by inhibiting apoptosis and lipid peroxidation. *Scientific reports*, 8(1), 1-10.

Liu, Z., Foote, R. H. ve Brockett, C. C. (1998). Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology*, 37(3), 219-230.

Liu, Z., Zhang, L., Ma, H., Wang, C., Li, M. ve Wang, Q. (2005). Resveratrol reduces intracellular free calcium concentration in rat ventricular myocytes. *Acta Physiologica Sinica-Chinese Edition-*, 57(5), 599.

Longobardi, V., Salzano, A., Campanile, G., Marrone, R., Palumbo, F., Vitiello, M., ... ve Gasparrini, B. (2017a). Carnitine supplementation decreases capacitation-like changes of frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Theriogenology*, 88, 236-243.

Longobardi, V., Zullo, G., Salzano, A., De Canditiis, C., Cammarano, A., De Luise, L., ... ve Gasparrini, B. (2017b). Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. *Theriogenology*, 88, 1-8.

López, C. A., de Vries, A. H. ve Marrink, S. J. (2011). Molecular mechanism of cyclodextrin mediated cholesterol extraction. *PLoS comput biol*, 7(3), e1002020.

López-Nicolás, J. M., Núñez-Delicado, E., Pérez-López, A. J., Barrachina, A. C. ve Cuadra-Crespo, P. (2006). Determination of stoichiometric coefficients and apparent

formation constants for β-cyclodextrin complexes of trans-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography* A, 1135(2), 158-165.

Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q. ve Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 840-860.

Lv, C., Larbi, A., Wu, G., Hong, Q. ve Quan, G. (2019). Improving the quality of cryopreserved goat semen with a commercial bull extender supplemented with resveratrol. *Animal reproduction science*, 208, 106127.

Ma, H., Quan, F., Chen, D., Zheng, Y., Zhang, B., Wang, Y. ve Zhang, Y. (2011). Protective function of alpha-lipoic acid on sperm motility and mitochondrial function during goat sperm-mediated gene transfer. *Small Ruminant Research*, 99(2-3), 191-198.

Madden, T. D., Quinn, P. J. ve Chapman, D. (1979). Cholesterol modulates activity of calcium-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Nature*, 279(5713), 538-541.

Mandal, R., Badyakar, D. ve Chakrabarty, J. (2014). Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation. *Advances in Andrology*, 2014.

Maneesh, M. ve Jayalekshmi, H. (2006). Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 21(2), 80-89.

Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A. ve Ménard, M. (2002). Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*, 67, 1250-1258.

Mann, T. ve White, L. G. (1957). Glycerol metabolism by spermatozoon. *Biochemistry*, 65.

Marco-Jiménez, F., Puchades, S., Gadea, J., Vicente, J. S., Viudes-de-Castro, M. P. (2005). Effect of semen collection method on pre-and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*, 64(8), 1756-1765.

Massip, A. (2001). Cryopreservation of embryos of farm animal. *Reproduction in Domestic Animals*, 36, 49-55.

Mattner, P. E. ve Voglmayr, J. K. (1962). A comparison of ram semen collected by the artificial vagina and by electro-ejaculation. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 2(4), 78-81.

Maxwell, W. M. C. ve Salamon, S. (1993). Liquid storage of semen a review. *Reproduction Fertility and Development*, 5, 613-638.

Mazur, P. (1977). The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14(3), 251-272.

McCormack, J. G., Halestrap, A. P. ve Denton, R. M. (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiological reviews*, 70(2), 391-425.

McGann, L. E. (1978). Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*, 15(4), 382-390.

McKelvey, W. A. C., Robinson, J. J., ve Aitken, R. P. (1985). The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology*, 24, 519-535.

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., Oliverira, A. T. D. ve Rodriques, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57, 327-344.

Merati, Z., Farshad, A., Farzinpour, A., Rostamzadeh, J. ve Sharafi, M. (2018). Anti-apoptotic effects of minocycline on ram epididymal spermatozoa exposed to oxidative stress. *Theriogenology*, 114, 266-272.

Mercan, U. (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1), 91-96.

Mert, N., Mert, H., Aygün, T. ve Tariq, M. (2016). Relationship between Vitamin Composition and Spermatological Characteristics in Semen of Different Ram Breeds of Turkey. *Pakistan Journal of Zoology*, 48(4), 969-975.

Milovanov, V. K. (1962). Biology of Reproduction and Artificial Insemination of Animals. Seljhozizdat, Moscow, *Win Russian*, 696.

Milovanov, V. K., Varnavskaja, V. A. ve Shajdullin, I. N. (1985). Medium for deep-freezing of semen. Zhivotnovodstvo, 39-41.

Mocé, E., Purdy, P. H. ve Graham, J. K. (2010). Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal reproduction science*, 118(2-4), 236-247.

Molinia, F. C., Evans, G., Casares, P. I. ve Maxwell, W. M. C. (1994). Effect of monosaccharides and disaccharides in tris based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 36, 113-122.

Moraes, E. C., Keyse, S. M. ve Tyrrell, R. M. (1990). Mutagenesis by hydrogen peroxide treatment of mammalian cells: a molecular analysis. *Carcinogenesis*, 11(2), 283-293.

Morris, G. J. (2006). Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Human Reproduction*, 21(8), 2075-2083.

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.

Morrow, D. A. (1986). Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals, 330-339.

Mostek, A., Dietrich, M. A., Słowińska, M. ve Ciereszko, A. (2017). Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins. *Theriogenology*, 92, 95-102.

Nagao, Y., Ohta, Y., Murakami, H. ve Kato, Y. (2010). The effects of methyl-[beta]-cyclodextrin on in vitro fertilization and the subsequent development of bovine oocytes. *Zygote*, 18(4), 323.

Nagy, Á., Polichronopoulos, T., Gáspárdy, A., Solti, L. ve Cseh, S. (2015). Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. Acta Veterinaria Hungarica, 63(3), 370-381.

Najafi, A., Daghigh-Kia, H., Dodaran, H. V., Mehdipour, M. ve Alvarez-Rodriguez, M. (2017). Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean

lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 177, 35-41.

Najafi, A., Kia, H. D., Hamishehkar, H., Moghaddam, G. ve Alijani, S. (2019). Effect of resveratrol-loaded nanostructured lipid carriers supplementation in cryopreservation medium on post-thawed sperm quality and fertility of roosters. *Animal reproduction science*, 201, 32-40.

Nauc, V. ve Manjunath, P. (2000). Radio-immuno assay for bull seminal plasma and proteins (BSP-A1/A2., BSP-A3., BSP-30kDa) and their quantification inseminal plasma and sperm. *Biology of Reproduction*, 63, 1058-1066.

Naz, R. K. ve Rajesh, P. B. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 1-12.

Noiles, E. E., Bailey, J. ve Storey, B. T. (1995). Temperature dependence of the water permeability, LP of murine sperm shows a discontinuity between 4℃ and 0℃. *Cryobiology*, 32, 220-238.

Nur, Z., Zik, B., Ustuner, B., Sagirkaya, H. ve Ozguden, C. G. (2010). Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*, 73(9), 1267-1275.

O'Neill, D. J. (1998). Studies on the cryopreservation of ram spermatozoa. *M Sc (agric) Thesis, National University of Ireland*, Ireland.

Ogbuewu, I. P., Aladi, N. O., Etuk, I. F., Opara, M. N., Uchegbu, M. C., Okoli, I. C. ve Iloeje, M. U. (2010). Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm. *Res. J. Vet. Sci*, 3, 138-164.

Olafsson, T. (1980). Insemination of sheep with frozen semen. Results obtained in a field trial in Norway. *Zuchthygiene*, 15(2), 50-59.

Ollero, M., Perez-pe, R., Muino-Blanco, T. ve Cebrian-Perez, J. A. (1998). Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology*, 37, 1-12.

O'shaughnessy, P. J., Monteiro, A., Verhoeven, G., De Gendt, K. ve Abel, M. H. (2010). Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient

hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reproduction (Cambridge, England)*, 139(1), 177.

Ömür, A. D. (2011). Sezon içi ve sezon dışında koç spermasının dondurulmasında antioksidanların etkisi. *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, Konya.

Ömür, A. D. (2015). Koç spermasının dondurulmasında antioksidanların etkisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 10 (1), 61-69.

Önder, N. T. (2019). L-karnitin ve alfa lipoik asitin koç sperması dondurulabirliği üzerine ve çözdürme sonrası yaşam süresi üzerine etkileri. *Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi*, Bursa.

Özer Kaya, Ş., Gür, S., ve Kaya, E. (2018). Effect of l-arginine addition on long-term storability of ram semen. *Andrologia*, 50(4), e12945.

Özkoca, A. (1984). Çiftlik Hayvanlarında Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, 93.

Özmen, M. F. (2015). İodixanol'ün farklı kombinasyonlarının koç spermasının dondurulması üzerindeki etkileri. *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi*, İstanbul.

Özmen, M. F., Cirit, Ü., Arıcı, R., Demir, K., Kurt, D., Pabuccuoğlu, S. ve Ak, K. (2020). Evaluation of synergic effects of iodixanol and trehalose on cryosurvival of electroejaculated ram semen. *Andrologia*, 52(9), e13656.

Öztürk, Ş., Çakına, S., Yeşil, H. ve Tuğlu, M. İ. (2018). Spermatogenezis ve Dinamik Kök Hücreler. *Journal of Awareness*, 3(5), 857-864.

Öztürkler, Y., Ak, K. ve İleri, İ. K. (1997). Kıvırcık koçlarinda donma ve eritme sonrasi spermatolojik özellikler üzerine mevsimin etkisi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3(1), 73-79.

Pace-Asciak, C. R., Hahn, S., Diamandis, E. P., Soleas, G. ve Goldberg, D. M. (1995). The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet

aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clinica chimica acta*, 235(2), 207-219.

Palasz, A. T. ve Mapletoft, R. J. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes recent advances. *Biotechnology Advances*, 14, 127-149.

Panyaboriban, S., Suwimonteerabutr, J., Phutikanit, N., Swangchan-Uthai, T., Tharasanit, T. ve Techakumphu, M. (2015). Effect of various combinations of sugar supplementation in the extender on frozen-thawed ram semen quality and fertility. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 45(2), 229.

Parks, J. E. ve Hammerstedt, R. H. (1985). Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biology of Reproduction*, 32(3), 653-668.

Paulenz, H., Söderquist, L., Ådnøy, T., Nordstoga, A., Gulbrandsen, B., ve Berg, K. A. (2004). Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. *Theriogenology*, 61(9), 1719-1727.

Payne, S. R., Oliver, J. E. ve Upreti, G. C. (1994). Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 31, 180-184.

Perez, L. J., Valcarcel, A., de Las Heras, M. A., Moses, D. F. ve Baldassarre, H. (1996). In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. *Theriogenology*, 45(5), 1037-1046.

Peris, S. I., Bilodeau, J. F., Dufour, M. ve Bailey, J. L. (2007). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular reproduction and development*, 74(7), 878-892.

Peris-Frau, P., Martín-Maestro, A., Iniesta-Cuerda, M., Sánchez-Ajofrín, I., Cesari, A., Garde, J. J., ... ve Soler, A. J. (2020a). Cryopreservation of ram sperm alters the dynamic changes associated with in vitro capacitation. *Theriogenology*, 145, 100-108.

Peris-Frau, P., Soler, A. J., Iniesta-Cuerda, M., Martín-Maestro, A., Sánchez-Ajofrín, I., Medina-Chávez, D. A., ... ve Garde, J. J. (2020b). Sperm cryodamage in ruminants: understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2781.

Pervaiz, S. ve Holme, A. L. (2009). Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxidants & redox signaling*, 11(11), 2851-2897.

Pham-Huy, L. A., He, H. ve Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89.

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. *Veterinary Research*, 52, 307-313.

Pineda, M.H., Dooley, M.P. ve Hembrough, F.B. (1987). Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of rams. *Veterinary Research*, 48, 562-568.

Pini, T., Rickard, J. P., Leahy, T., Crossett, B., Druart, X. ve De Graaf, S. P. (2018). Cryopreservation and egg yolk medium alter the proteome of ram spermatozoa. *Journal of proteomics*, 181, 73-82.

Platz, C. C., Follis, T., Demorest, N. ve Seager, S. W. J. (1976). Semen collection, freezing and insemination in the domestic cat. In *Proceedings of VIII International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Cracow, 1053-1056.

Polatoğlu, M. G. (2010). Cumhuriyet Dönemi'nde Hayvancılığın Sanayiye Tatbikine Bir Örnek: Merinos Yetiştiriciliği. *Atatürk Araştırma Merkezi Dergisi*, 35(100), 585-620.

Polge, C., Smith, A. U. ve Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172), 666-666.

Pommer, A. C., Rutllant, J. ve Meyers, S. A. (2003). Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biology of reproduction*, 68(4), 1208-1214.

Pontbriand, D., Howard, J. G., Schiewe, M. C., Stuart, L. D. ve Wildt, D. E. (1989). Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26(4), 341-354.

Prathalingan, N. S., Holt, W. V., Revell, S. G., Jones, S. ve Watson, P. F. (2006). Dilution of spermatozoon results in improved viability following a 24 hours storage period but decreased acrosome integrity following cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 91, 11-22.

Purdy, P. H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63 (3), 215-225.

Quinn, P. J. ve White, I. G. (1967). Phospholipid and Cholesterol Content of Epididymal and Jaculated Ram Spermatozoa and Seminal Plasma in Elation to Cold Shock. *Australian journal of biological sciences*, 20(6), 1205-1216.

Quinn, P.J. ve White, I.G. (1966). Variation in semen cations in relation to semen quality and methods of collection. *Fertility and Sterility*, 17, 815-825.

Quinn, P.J., Salamon, S. ve White, I.G. (1968). The effect of cold shock and deepfreezing on ram spermatozoa collected by electrical ejaculation and by an artificial vagina. *Australian Journal of Biological Sciences*, 19, 119-128.

Rashidi, M. (2011). Koyunlarda dondurulmuş koç sperması ile trans servikal yapay tohumlama. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara

Ritar, A. J. ve Ball, P. D. (1993). The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. *Animal Reproduction Science*, 31(3-4), 249-262.

Ritar, A. J. ve Salamon, S. (1983). Fertility of fresh and frozen-thawed sperm of angora goat. *Australian Journal of Biology Science*, 36, 49-59.

Robayo, I., Montenegro, V., Valdes, C., ve Cox, J. F. (2008). CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(4), 393-399.

Rodriguez-Martinez, H. (2007). Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*, 68, S138-S146.

Rudolph, A. S. ve Crowe, J. H. (1985). Membrane stabilization during the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology*, 22, 367-377.

Saacke, R. G. ve White, J. M. (1972, April). Semen quality tests and their relationship to fertility. In Proc. 4th National Association of Animal Breeders, Tech. Conf. Artificial Insemination and Reproduction (pp. 22-27). National Association of Animal Breeders, Columbia, MO.

Salamon, S. ve Maxwell, W. M. C. (1995a). Frozen storage of ram semen I. processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37, 185-249.

Salamon, S. ve Maxwell, W. M. C. (1995b). Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and method of improvement. *Animal Reproduction Science*, 38, 1-36.

Salamon, S. ve Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 77-111.

Salamon, S. ve Visser, D. (1972). Effect of composition of Tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Australian journal of biological sciences*, 25(3), 605-618.

Salamon, S., ve Morrant, A. J. (1963). A comparison of two methods of artifical breeding in sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 3(8), 72-77.

Saleh, A. I. (1997). Seasonal variation in semen quality of local and crossbred rams raised in the United Arab Emirates. *Animal Reproduction Science*, 49, 161-167.

Saling, P. M. ve Storey, B. T. (1979). Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *The Journal of cell biology*, 83(3), 544-555.

Sanocka, D. ve Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 1-7.

Santiago-Moreno, J., Esteso, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Delgadillo, J. A. ve López-Sebastián, A. (2017). Seminal plasma removal by density-gradient centrifugation is superior for goat sperm preservation compared with classical sperm washing. Animal Reproduction Science, 181, 141-150.

Sarlos, P., Molnar, A., Kokai, M. ve et al. (2002). Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica*, 50(2), 235-245.

Satorre, M. M., Breininger, E., Beconi, M. T. ve Beorlegui, N. B. (2009). Protein tyrosine phosphorylation under capacitating conditions in porcine fresh spermatozoa and sperm cryopreserved with and without alpha tocopherol. *Andrologia*, 41(3), 184-192.

Sayre, B. L. ve Lewis, G. S. (1997). Fertility and ovum fertilization rate after laparosaopic or transcervikal intrauterine artificial insemination of oxytocin treated ewes. *Theriogenology*, 48, 267-275.

Schmehl, M. K., Vazquez, I. A. ve Graham, E. F. (1986). The effects of non penetrating cryoprotectants added to test yolk glycerol extender on the post thaw motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 23, 512-517.

Scott, T. W., Voglmayr, J. K. ve Setchell, B. P. (1967). Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. *Biochemical Journal*, 102(2), 456-461.

Seidel, G. E. (2018). Several insights on evaluation of semen. Animal Reproduction (AR), 9(3), 329-332.

Shabani Nashtaei, M., Amidi, F., Sedighi Gilani, M. A., Aleyasin, A., Bakhshalizadeh, S., Naji, M. ve Nekoonam, S. (2017). Protective features of resveratrol on human spermatozoa cryopreservation may be mediated through 5'AMP-activated protein kinase activation. *Andrology*, 5(2), 313-326.

Silva, E. C. B., Cajueiro, J. F. P., Silva, S. V., Soares, P. C., ve Guerra, M. M. P. (2012a). Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 77(8), 1722-1726.

Silva, E. C. B., Cajueiro, J. F. P., Silva, S. V., Vidal, A. H., Soares, P. C., Guerra, M. M. P. (2012b). In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide. *Animal Reproduction Science*, 132 (3), 155-158.

Silva, F., Figueiras, A., Gallardo, E., Nerín, C. ve Domingues, F. C. (2014). Strategies to improve the solubility and stability of stilbene antioxidants: a comparative study between cyclodextrins and bile acids. *Food Chemistry*, 145, 115-125.

Silva, P. F. N. ve Gadella, B. M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958-978.

Sinan, B. (2019). Resveratrol içeren mikroküre lerin hazırlanması ve karakterizasyonu. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Ankara.

Southorn, P. A. ve Powis, G. (1988). Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. İçinde *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 63, No. 4, pp. 381-389). Elsevier.

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-thawed ram semen. *Bulletin-Veterinary Institute In Pulawy*, 51(2), 241.

Sönmez, M. (2013). Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. *Fırat*

Storey, B. T., Noiles, E. E. ve Thompson, K. A. (1998). Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 37, 46-58.

Surai, P. F., Fujihara, N., Speake, B. K., Brillard, J. P., Wishart, G. J. ve Sparks, N. H. C. (2001). Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen-Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 14(7), 1024-1050.

Şener, G. ve Yeğen, B.Ç. (2009). İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi*. 22: 5-13.

Takaoka, M. (1939). Resveratrol, a new phenolic compound, from Veratrum grandiflorum. *Nippon Kagaku Kaishi*, 60, 1090-1100.

Tardif, S., Dubé, C., Chevalier, S. ve Bailey, J. L. (2001). Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biology of reproduction*, 65(3), 784-792.

Tekin, N., Secer, S., Akcay, E., Bozkurt, Y. (2003). Cryopreservation of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) semen. *Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgeh*, 55 (3), 208-212.

Tekin, N., Yurdaydın, N., Daşkın, A., Apel, A. R. G., Yavaş, Y., Keskin, O. ve Etem, H. (1991). Östrusları senkronize edilen koyunlarda sun'i tohumlama yöntemiyle elde edilen dölverimi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 38 (1-2), 60-73.

Thornalley, P. J. (1985). Monosaccharide autoxidation in health and disease. *Environmental Health Perspectives*, 64, 297-307.

Thundathil, J., Gil, J., Januskauskas, A., Larsson, B., Soderquist, L., Mapletoft, R. ve Rodriguez-Martinez, H. (1999). Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. *international journal of andrology*, 22(6), 366-373.

Torres, V., Hamdi, M., Millán de la Blanca, M. G., Urrego, R., Echeverri, J., López-Herrera, A., ... ve Sánchez-Calabuig, M. J. (2018). Resveratrol–cyclodextrin complex affects the expression of genes associated with lipid metabolism in bovine in vitro produced embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(4), 850-858.

Trimberger, W.G. (1974). *Artificial İnsemination Reproduction in Farm Animals*, 145-174. P., London

Troche-Pesqueira, E., Pérez-Juste, I., Navarro-Vázquez, A. ve Cid, M. M. (2013). A β-cyclodextrin–resveratrol inclusion complex and the role of geometrical and electronic effects on its electronic induced circular dichroism. *RSC advances*, 3(26), 10242-10250.

TUİK (2020). *Hayvansal Üretim İstatistikleri, Haziran 2020*. Ankara: Türkiye İstatistik Kurumu. Yayım Tarihi: 07.06.2020, http://www.tuik.gov.tr

Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552(2), 335-344.

Tümen, H., Gökçen H., Soylu, M.K., Doğan, İ., Karamustafaoğulları, M. (1991). Değişik düzeylerde Vit.-E katılarak sulandırılan koç spermasının spermatolojik özellikleri ve dölverimi üzerine araştırmalar. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10, 1-3

Türk, G. (2015). Reaktif oksijen türlerinin spermatozoon fonksiyonları üzerindeki fizyolojik ve patolojik etkileri. *Türkiye Klinikleri J. Reprod. Artif. Insemin. Special Topics.*, 1(3).

Uguralp, S., Usta, U. ve Mizrak, B. (2005). Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. *European Journal of Pediatric Surgery*, 15(05), 333-336.

Ustuner, B., Alcay, S., Toker, M. B., Nur, Z., Gokce, E., Sonat, F. A., ... ve Soylu, M. K. (2016). Effect of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) seminal plasma on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based or egg yolk-based extender. *Animal reproduction science*, 164, 97-104.

Ustuner, H., Ustuner, B., Toker, M. B., Alcay, S., Demir, K., Sagirkaya, H., ve Nur, Z. (2018). Administration time of misoprostol affects fertility rate in artificially inseminated Kivircik ewes with frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction (AR)*, 15(2), 156-160.

Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Elazığ, 237-287.

Vallet, J.C., Baril, G., Leboeuf, B. ve Perrin, J. (1992). Insemination artificielle intrauterine sous controle laparoscopique chez les petits ruminants domestiques. *Annales DeE Zootechnie*, 41, 305-309.

Van Der Horst, G., Maree, L. ve du Plessis, S. S. (2018). Current perspectives of CASA applications in diverse mammalian spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 875-888.

Van Wagtendonk-de Leeuw, A. M., Haring, R. M., Kaal-Lansbergen, L. M. T. E. ve Den Daas, J. H. G. (2000). Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology*, 54(1), 57-67.

Venkatesh, S., Deecaraman, M., Kumar, R., Shamsi, M. B., ve Dada, R. (2009). Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. *Indian Journal of Medical Research*, 129(2).

Vernet, P., Aitken, R. J. ve Drevet, J. R. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and cellular endocrinology*, 216(1-2), 31-39.

Vicente, J. S. ve Viudes-de-Castro, M. P. (1996). A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen. *Reproduction Nutrition Development*, 36 (5), 485-492.

Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P. ve Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121(4), 1129-1137.

Visconti, P. E., Krapf, D., De La Vega-beltrán, J. L., Acevedo, J. J. ve Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian journal of andrology*, 13(3), 395.

Vishwanath, R., Shannon, P. ve Curson, B. (1992). Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 29, 185-194.

Visser, D. (1975). Studies of factors affecting the survival and fertility of ram and boar spermatozoa following freezing in Tris-based diluents (*Doctoral dissertation, University of Sydney*).

Voglmayr, J. K., Scott, T. W., Setchell, B. P. ve Waites, M. (1967). Metabolism of testicular spermatozoa and characteristics of testicular fluid collected from conscious rams. *Reproduction*, 14(1), 87-99.

Wai-Sum, O., Chen, H. ve Chow, P. H. (2006). Male genital tract antioxidant enzymes—their ability to preserve sperm DNA integrity. *Molecular and cellular endocrinology*, 250(1-2), 80-83.

Wassall, S. R. ve Stillwell, W. (2009). Polyunsaturated fatty acid–cholesterol interactions: domain formation in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(1), 24-32.

Wathes, D. C., Abayasekara, D. R. E. ve Aitken, R. J. (2007). Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biology of Reproduction*, 77(2), 190-201.

Watson, P. F. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, 62 (2), 483-492.

Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871-891.

Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60, 481-492.

Watson, P. F. ve Martin, I. C. (1976). Artificial insemination of sheep the effect of semen diluents containing egg yolk on the fertility of ram semen. *Theriogenology*, 6, 559-564.

Wei, Y. H. ve Pang, C. Y. (2005). The Role of Mitocondria in human aging process. *Biotech International*, 17, 8-13.

White, I. G. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation a review. *Reproduction Fertility and Development*, 5, 639-658.

Wiemer, E.K. ve Ruttle, L.J. (1987). Semen characteristics, scrotal circumference, and bacterial isolates of fine wool range rams. *Theriogenelogy*, 28 (2), 625-637.

Windors, D.P., Szell, A.Z., Buschbeck, C. Edward, A.Y. Milton, J.T.B. ve Buckrell, B.C. (1994). Transcervical artificial insemination of Australian merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 41 (4), 145-157.

Wolf, D. E., Maynard, V. M., McKinnon, C. A. ve Melchior, D. L. (1990). Lipid domains in the ram sperm plasma membrane demonstrated by differential scanning calorimetry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(17), 6893-6896.

Woods, E. J., Gilmore, J. A. ve Liu, J. (2000). Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Human Reproduction*, 15, 335-343.

Yanagimachi, R. (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *Reproduction*, 23(1), 193-196.

Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. İçinde, *Physiology of Reproduction*, Knobil, E., Neill, J.D. (eds.), 2nd edition, New York: Raven Press, 189-317.

Yavasca, I., Ak, K. ve Ileri, I. K. (1999). Einwirkungen verschiedener umgebungstermperaturen und besamungszeiten auf die fertilität der nach paillettenverfahren tiefgefrorenen und aufgetauten bullenspermien. *J Fac Vet Med Istanbul Univ*, 25, 215-223.

Yıldırım, Y. (2006). *Kırmızı et sanayi sorunları ve çözüm önerileri*. İstanbul Ticaret Odası Yayını.

Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M. ve Tekeli, T. (2000). Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54(4), 579-585.

Young, S. G. ve Parthasarathy, S. (1994). Why are low-density lipoproteins atherogenic?. *Western Journal of Medicine*, 160(2), 153.

Yu, B. P. (1999). Approaches to anti-aging intervention: the promises and the uncertainties. *Mechanisms of ageing and development*, 111(2-3), 73-87.

Yüksel, H. (2019). Koç sperması dondurulmasında sulandırıcılara çiçek balı ve çam balı ilavesinin spermatolojik özelliklere etkisi. *İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü. Doktora Tezi*, İstanbul.

Zamfirescu, S., Vicovan, A. ve Barbulescu, I. (1980). Results obtained in the artificial insemination in sheep using congealed sperm. *Revista de cresterea animalelor* (Romania).

Zeng, W. X., ve Terada, T. (2000). Freezability of boar spermatozoa is improved by exposure to 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Reproduction, Fertility and Development*, 12(4), 223-228.

Zeng, W. X., ve Terada, T. (2001). Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. *Journal of andrology*, 22(1), 111-118.

Zhu, Z., Li, R., Fan, X., Lv, Y., Zheng, Y., Hoque, S. A., ... ve Zeng, W. (2019). Resveratrol Improves Boar Sperm Quality via 5AMP-Activated Protein Kinase Activation during Cryopreservation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.

Zülfikaroğlu, G., Özgür, H. ve Polaturkey, S. (2010). Kapasitasyonun moleküler temelleri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 19(1), 12-24.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

Koç Sperması Dondurulmasında Resveratrol, Siklodekstrin ve Kombinasyonlarının Eritme Sonrası Spermatolojik Özellikler Üzerine Etkisi

ORİJİNALLİK RAPORU

%6	%4	%2	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%2
2	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
3	toad.halileksi.net İnternet Kaynağı	<%1
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	veteriner.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	acikerisim.aku.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
8	scholar.sun.ac.za İnternet Kaynağı	<%1

azdoc.tips

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

SCI, SSCI, AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Atalla, H., Demir, K., Arıcı, R., Yağcıoğlu, S., **Eser, A.**, Ersoy, N., Coşkun, N., Alzuheir, I., Evecen, M., Birler, S., Pabuccuoğlu, S. (2018). Effect of cholesterol loaded methyl-β-cyclodextrin on ovine oocytes during chilling and vitrification. *Revue De Medecine Veterinaire*, 169, 241-246.

2. Atalla, H., Demir, K., Yağcıoğlu, S., Arıcı, R., Ersoy, N., **Eser, A.**, Coşkun, N., Armutak, E. I., Üvez, A., Evecen, M., Ak, K., Birler, S., Pabuccuoğlu, S. (2019). The effect of swim up and Percoll gradient separation on ram sperm parameters, DNA integrity and embryo development. *Revue De Medecine Veterinaire,* vol.170: pp.87-94.

3. Evecen, M., Demir, K., Arıcı, R., Yağcıoğlu, S., Ersoy, N., Coşkun, N., Armutak, E., Üvez, A., Gürel Gürevin, E., **Eser, A.**, Atalla, H., Ak, K., Pabuccuoğlu, S., Birler, S. (2018). Effects of ovary transport and storage temperature on *in vitro* maturation and cumulus cell apoptosis rates in cat oocytes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 24 (2): 301-306.

Diğer Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Atalla, H., **Eser, A.**, Demir, K., Yağcıoğlu, S., Arıcı, R., Ersoy, N., Evecen, M., Ak, K., Birler, S., Pabuccuoğlu, S. (2019). Impacts of supplementary royal jelly on characteristics of post-thawed ram semen. *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol*., 6 (1): 6-11.

Hakemli Kongre / Sempozyumların Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

1. Arıcı, R., **Eser, A.**, Yağcioğlu, S., Demir, K., Pabuccuoğlu, S., Ak, K., Alkan, S. "Determining The In-Vitro Fertilizing Ability Of Ram Semen Frozen With Different Extenders", 5th International Vet-Istanbul Group Congress and 8th International Scientific Meeting “DAYS OF VETERINARY MEDICINE 2018”, Ohrid, Makedonya, 23 Eylül-27 Ekim 2018, ss.35.
2. Atalla, H., Demir, K., Arıcı, R., Yağcıoğlu, S., **Eser, A.**, Ersoy, N., Coşkun, N., Alzuheir, I., Evecen, M., Birler, S., Pabuccuoğlu, S. "The Effect Of Cholesterol

Loaded Methyl-ß-Cyclodextrin On Sheep Oocytes During Chilling And Vitrification", 4th International VETIstanbul Group Congress 11-13 May 2017 Almaty Kazakhstan, Almaty, Kazakıstan, 11-13 Mayıs 2017, pp. 104-104.

3. Atalla, H., Demir, K., Yağcıoğlu, S., Arıcı, R., Ersoy, N., **Eser, A.**, Coşkun, N., Armutak, E. I., Üvez, A., Evecen, M., Ak, K., Birler, S., Pabuccuoğlu, S. "The Effect Of Swim Up And Percol Gradient Separation On Sperm Parameters And DNA Integrity And Embryo Development In Ram", The 5th International Vet-Istanbul Group Congress, Ohri, Makedonya, 23-27 Eylül 2018, ss.1-2.
4. Demir, K., Arici, R., Yağcıoğlu, S., Ersoy, N., Coşkun, N., **Eser A.**, et al., "Effects Of Recombınant Human Gonadotrophıns Durıng In Vıtro Maturatıon Of Domestıc Cat Oocytes", 4th International VETIstanbul Group Congress 11-13 May 2017 Almaty Kazakhstan, Almaty, Kazakıstan, 11-13 Mayıs 2017, pp. 28-28.
5. Evecen, M., Demir, K., Arıcı, R., Yağcıoğlu, S., Ersoy, N., Coşkun, N., Armutak, E., Üvez, A., Gürel Gürevin, E., **Eser, A.**, Atalla, H., Ak, K., Pabuccuoğlu, S., Birler, S. "Effects Of Ovary Transport And Storage Temperature On In Vitro Maturatıon And Cumulus Cell Apoptosıs Rate In Cat Oocytes", 4th International VETIstanbul Group Congress 11-13 May 2017 Almaty Kazakhstan, Almaty, Kazakıstan, 11-13 Mayıs 2017, pp. 35-35
6. Sandal, A. İ., Oruç, İ., Sevin, A., Tekdemir, E., Göksel, S., Altunay, D., Şenlikci, H., Arici, R., **Eser, A.**, Özdaş, Ö. B., Ak, K., "Modifiye Yumurta Sarılı Sulandırıcıların Soğutulan ve Dondurulan Koç Sperması Üzerine Etkileri", 19. Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Bilimsel araştırma Kongresi, İstanbul, Türkıye, 2-4 Mayıs 2017, pp. 72-73.
7. Yağcioğlu, S., Demir, K., Atalla, H., Ersoy, N., **Eser, A.**, Oruç, İ., Arıcı, R., Birler, S., Evecen, M., Pabuccuoğlu, S. "The Effect of Freezing Techniques on Viability and Membrane Integrity of Adult and Fetal Fibroblast Cells of Sheep", The 5th International Vet-Istanbul Group Congress, Ohri, Makedonya, 23-27 Eylül 2018, ss.109.

Katıldığı Bilimsel Kongre/Sempozyum ve Bilimsel Toplantılar

1. 8. ASDETAE GÜNLERİ “Bilim Yolculuğu”, İstanbul, Aralık 2016

2. 8. Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi, Antalya, Ekim 2016
3. The Buffalo Pre-Congress Workshop Programme, İstanbul, Eylül 2019

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Futbol, seyahat.