



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER FAKÜLTESİ  
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA  
ANABİLİM DALI



CEMAL DAYANIKLI

DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI

2023

**KOÇ SPERMASININ DONDURULMASINDA KULLANILAN  
GLİSEROLÜN HÜCRE İÇİNE GİRMEYEN BAZI  
KRİYOPROTEKTANLARLA İKAME EDİLMESİNİN ERİTME  
SONRASI SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLERE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

CEMAL DAYANIKLI

DOKTORA

BURSA-2023



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER FAKÜLTESİ  
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA  
ANABİLİM DALI



**KOÇ SPERMASININ DONDURULMASINDA KULLANILAN  
GLİSEROLÜN HÜCRE İÇİNE GİRMEYEN BAZI  
KRİYOPROTEKTANLARLA İKAME EDİLMESİNİN ERİTME  
SONRASI SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLERE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**CEMAL DAYANIKLI**

**(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN:**

**Prof. Dr. Zekariya NUR**

**Proje No- Destek Alınan Kuruluş  
TAGEM/13/07/01/01**

**BURSA-2023**

**T.C.**  
**BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETİK BEYANI**

Doktora tezi olarak sunduğum “**Koç spermasının dondurulmasında kullanılan gliserolün hücre içine girmeyen bazı kriyoprotektanlarla ikame edilmesinin eritme sonrası spermatolojik özelliklere etkilerinin araştırılması**” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

**Adı Soyadı**  
**Tarih ve İmza**  
**Cemal DAYANIKLI**

... / 01 / 2023

## TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

24 / 02 / 2023

**Adı Soyadı:** CEMAL DAYANIKLI

**Anabilim Dalı:** DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA A.B.D.

**Tez Konusu:** Koç spermalarının dondurulmasında kullanılan gliserolün hücre içine girmeyen bazı kriyoprotektanlarla ikame edilmesinin eritme sonrası spermatolojik özelliklere etkilerinin araştırılması

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>AÇIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

### DANIŞMAN ONAYI

**Unvanı Adı Soyadı:** Prof. Dr. Zekariya NUR

**İmza:**

## İÇİNDEKİLER

<b>DIŞ KAPAK</b>	
<b>İÇ KAPAK</b>	
<b>ETİK BEYANI</b> .....	<b>II</b>
<b>KABUL ONAY SAYFASI</b> .....	<b>III</b>
<b>TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU</b> .....	<b>IV</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>V</b>
<b>TÜRKÇE ÖZET</b> .....	<b>VIII</b>
<b>İNGİLİZCE ÖZET</b> .....	<b>IX</b>
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1.Suni Tohumlamanın Tarihçesi .....	4
2.2.Suni Tohumlama Uygulamalarının Yaygınlaşmama Nedeni .....	6
2.2.1.Koyuna bağlı sebepler .....	6
2.2.2.Koça Bağlı sebepler .....	7
2.3.Potansiyel Fertilitenin Saptanması .....	8
2.4.Spermasının Dondurulması ve Eritilmesi .....	10
2.5.Koçlardan Sperma Alınması .....	11
2.5.1.Suni vajina .....	11
2.5.2.Elektroejakülatör .....	13
2.5.3.Normal aşım sonrası vajinada birikmiş spermanın geri alınması .....	14
2.6.Spermatolojik Muayene ve Önemi.....	14
2.7.Makroskobik Muayene.....	16
2.7.1.Sperma miktarı (Hacim).....	16
2.7.2.Renk ve Koku.....	17
2.7.3.Kıvam (Vizkozite).....	18
2.8.Mikroskobik Muayene .....	18
2.8.1.Kitle Hareketi (Mass aktivite).....	18
2.8.2.Yoğunluk .....	19
2.8.3.Motilite .....	20
2.8.3.1.Bilgisayar Destekli Sperma Analiz Cihazı (CASA) .....	22
2.8.3.1.1.CASA Terminolojisi .....	26
2.8.4.Morfoloji .....	27
2.8.5.Ölü/Canlı oranı.....	30
2.8.6.DNA Bütünlüğü .....	33
2.9.Akış Sitometri .....	34
2.10.Mikrobiyolojik Analizler .....	35
2.11.Spermanın Sulandırılması .....	37
2.12.Kriyoprotektanlar .....	38
2.12.1.Kriyoprotektanların Keşfi .....	39
2.12.2.Kriyobiyojoloji Teorisi.....	40
2.12.2.1.Dondurma Sırasında Gerçekleşen Fiziksel Değişimler.....	40
2.12.3.Kriyoprotektanlar .....	41
2.12.3.1.Kriyoprotektif Ajanların Gelişimi.....	42

2.12.3.2.Kriyoprotektanların Sınıflandırılması .....	44
2.12.3.2.1.Hücre İçine Girebilen (Permeabl) Kriyoprotektanlar .....	46
2.12.3.2.1.1.Sülfoksitler .....	47
2.12.3.2.1.2.Amidler- İmidler .....	47
2.12.3.2.1.2.1.Formamid .....	47
2.12.3.2.1.2.2.Asetamid .....	48
2.12.3.2.1.2.3.Diğer Amidler .....	48
2.12.3.2.1.3.Alkoller (Monohidrik, diyoller, triyoller, poliyoller).....	48
2.12.3.2.1.3.1.Metanol .....	48
2.12.3.2.1.3.2.Propilen Glikol.....	49
2.12.3.2.1.3.3.Etilen glikol .....	49
2.12.3.2.1.3.4.Butilen glikol .....	49
2.12.3.2.1.3.5.Gliserol .....	50
2.12.3.2.1.3.6.Adonitol .....	51
2.12.3.2.1.3.7.Diğer alkoller .....	51
2.12.3.2.2.Hücre İçine Giremeyen (Nonpermeabl) Kriyoprotektanlar .....	51
2.12.3.2.2.1.Şekerler .....	54
2.12.3.2.2.1.1.Monosakkaritler .....	54
2.12.3.2.2.1.1.1.Glikoz .....	54
2.12.3.2.2.1.1.2.Galaktoz .....	55
2.12.3.2.2.1.1.3.Arabinoz .....	55
2.12.3.2.2.1.2.Disakkaritler .....	55
2.12.3.2.2.1.2.1.Sakkaroz .....	55
2.12.3.2.2.1.2.2.Trehaloz .....	56
2.12.3.2.2.1.2.3.Laktoz .....	56
2.12.3.2.2.1.2.4.Maltoz .....	57
2.12.3.2.2.1.3.Polisakkaritler .....	57
2.12.3.2.2.1.3.1.Rafinoz .....	57
2.12.3.2.2.1.3.2.Dekstran .....	58
2.12.3.2.2.2.Makromoleküller/polimerler .....	58
2.12.3.2.2.2.1.Ficoll .....	59
2.12.3.2.2.2.2.Polietilen glikol (PEG).....	59
2.12.3.2.2.2.3.Polivinilpirolidon (PVP) .....	60
2.12.3.2.2.2.4.Hiyaluronan .....	60
2.12.3.3.Kriyoprotektanların Toksisitesi.....	61
2.12.3.3.1.Kriyoprotektanlara maruz kalma süresi, yoğunluk ve ısının toksisite üzerindeki etkileri.....	62
2.12.3.3.2.Kriyoprotektan hasarı ve toksisitesinden korunma .....	63
2.12.3.4.Ekilibrasyon .....	64
2.13.Spermanın Dondurulması .....	64
2.14.Spermanın Dondurulmasında Genetik Etki .....	66
2.15.Spermanın Eritilmesi .....	67
<b>3.GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>69</b>
3.1.Hayvan Materyali.....	69
3.1.1.Kimyasal .....	69
3.2.Koçların sperma vermeye alıştırılması.....	69
3.3.Spermanın Alınması.....	69

3.4.Spermatolojik Muayeneler .....	70
3.4.1.Sperma Miktarı (Hacim) .....	70
3.4.2.Mass Aktivite (Kitle Hareketi):.....	70
3.4.4.Spermatozoon Motilitesi: .....	70
3.4.5.Floresan Temelli Morfolojik Muayeneler .....	71
3.4.5.1.Ölü/Canlı Muayenesi .....	72
3.4.5.2.Plazma ve Akrozom Membran Bütünlüğünün Muayenesi .....	73
3.4.5.3.Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Muayenesi.....	73
3.4.6.Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Fluorescein-(TUNEL): ....	74
3.5.Spermanın Sulandırılması ve Soğutulması .....	75
3.6.Spermanın Dondurulması .....	77
3.7.İstatistik Analiz .....	78
<b>4.BULGULAR .....</b>	<b>79</b>
<b>5.TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>87</b>
<b>6.KAYNAKLAR .....</b>	<b>108</b>
<b>7.SİMGELER VE KISALTMALAR .....</b>	<b>148</b>
<b>8.EKLER .....</b>	<b>150</b>
8.1.EK1 .....	150
8.2.EK2 .....	152
<b>9.TEŞEKKÜR .....</b>	<b>153</b>
<b>10.ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>154</b>

## TÜRKÇE ÖZET

Bu çalışma, gliserolün koç sperması üzerine olan olumsuz etkisini minimize etmek amacıyla gerçekleştirildi. Bunun için gliserolün sulandırıcısındaki final yoğunluğu sırasıyla (%4, %2 ve %0) düşürerek, yerine DEX (Dekstran), PVP (Polivinilpirolidon), veya PEG (Polietilen glikol) (%2, %4 ve %6) eklendi. Koyunculuk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü bünyesinde, aynı bakım ve besleme koşullarında barındırılan, 2-3 yaşları arasında 5 baş Karacabey Merinosu ırkı koçtan sperma alındı. Normospermik özellikteki ejakulatlar pooling yapılarak çift aşamalı sulandırma tekniği ile çalışma gruplarını oluşturan (Kontrol (%6 gliserol), DEX2 (%4 gliserol + %2 dekstran), DEX4 (%2 gliserol + %4 dekstran), DEX6 (%6 dekstran), PVP2 (%4 gliserol + %2 polivinilpirolidon) PVP4 (%2 gliserol + %4 polivinilpirolidon) PVP6 (%6 polivinilpirolidon), PEG2 (%4 gliserol + %2 polietilen glikol), PEG4 (%2 gliserol + %4 polietilen glikol) ve PEG6 (%6 polietilen glikol) sulandırıcılardan biri ile sulandırılarak payet metoduna göre otomatik dondurma cihazında donduruldu. Çalışmada; motilite muayenesi CASA, canlılık, plazma ve akrozom membran bütünlüğü ve mitokondriyal membran potansiyeli akış sitometri ve apoptotik indeks (TUNEL) floresan mikroskopta değerlendirildi. Çözüm sonrası aşamada saf kriyoprotektan içeren gruplar değerlendirildiğinde %6 gliserol içeren kontrol grubuna ait bulguları diğerlerine göre daha üstün olduğu belirlendi. Çalışmada kullanılan sulandırıcı içeriğine katılan eksternal kriyoprotektanların (DEX6, PVP6 ve PEG6) hiçbirinin tek başına koç spermasını, dondurmanın zararlı etkilerine karşı koruyamadığı görüldü. Çalışmada kullanılan kriyoprotektanların apoptotik indeksi etkilemediği, DEX ve PEG'nin düşük yoğunluklarda (%2) gliserolün yerine kullanılabilmesi değerlendirildi.

Sonuç olarak, DEX ve PEG'nin %2'den daha düşük yoğunluklarda gliserol yerine kullanılabilmesi, PVP'nin çalışmada kullanılan oranlarının koç sperması üzerine zararlı olduğu ve çalışma sonuçlarının fertilité ile doğrulanması gerektiği belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Koç, Sperma, Dondurma, Kriyoprotektan, Gliserol, Dekstran, Polivinilpirolidon, Polietilen Glikol



## İNGİLİZCE ÖZET

### INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF REPLACING THE GLYCEROL, USED IN FREEZING RAM SEMEN, WITH SOME NON-PERMEABLE CRYOPROTECTANTS TO POST-THAW SPERMATOLOGICAL PARAMETERS

This study was conducted to minimize the adverse effect of glycerol on the ram semen. For this purpose, glycerol's final density in the extender were decreased (4%, 2%, and 0%) respectively, by replacig with DEX (dextran), PVP (polyvinylpyrrolidone), or PEG (polyethylene glycol) (2%, 4%, and 6%), respectively. Semen was collected from 5 heads of Karacabey Merino ram between the ages of 2-3, breeding season hosted in Sheep Breeding Research Institute. Ejaculates with normospermic quality were pooled and diluted with (Control (6% Glycerol), DEX2 (4% Glycerol + 2% Dextran), DEX4 (2% Glycerol + 4% Dextran), DEX6 (6% Dextran), PVP2 (4% Glycerol + 2% Polyvinilpirolidone) PVP4 (2% Glycerol + 4% Polyvinilpirolidone), PVP6 (6 %Polyvinilpirolidone), PEG2 (4% Glycerol + 2% Polyethylene Glycol), PEG4 (2%Glycerol + 4% Polyethylene Glycol) or PEG6 (6% Polyethylene Glycol) according to two step dilution method and frozen via automatic freezing machine. In the study; sperm motility was evaluated via CASA, vitality, plasma, and acrosome membrane integrity, and mitochondrial membrane potential via flow cytometry, and the apoptotic index (TUNEL) under fluorescent microscopy. At the post-thaw stage; the control group containing 6 % glycerol was superior to the other groups containing pure cryoprotectant. None of the cryoprotectants (DEX6, PVP6, and PEG6) could protect the ram sperm alone against the harmful effects of freezing. It was evaluated that the cryoprotectants used in the study did not affect the apoptotic index. Also DEX and PEG could be used instead of glycerol at low concentration (2%).

Finally, it was founded that Presence of DEX and PEG lower than 2% is a useful strategy for the partial replacement of glycerol in semen extender. Presence of PVP in freezing extender has a harmful effect ram semen. Also it is recomended that the results of the study to be verified by fertility results.

**KEYWORDS:** Ram, Semen, Freezing, Cryoprotectant, Glycerol, Dextran, Polyvinylpyrrolidone, Polyethylene Glycol

## 1. GİRİŞ

Gamet hücrelerinin dondurulmasında kullanılan soğuk şoku ve donma sırasında gelişen hasarlara karşı hücelere koruma sağlayan maddelere kriyoprotektan maddeler denilir. Bilimsel ve modern anlamda canlı hücre dondurma çalışmaları; 1949 yılında Polge ve ark. (1949) tarafından gliserolün kriyoprotektan özelliğinin bulunması ile başlamıştır (Leibo, & Brandley, 1999; Polge, Smith, & Parkes 1949). Spermatozondaki membran yapıları (plazma membranı, dış akrozomal membran ve mitokondri membranı) donma/çözünme işlemine karşı son derece duyarlıdır. Spermatozoonların membran yapısı akıcı mozaik tarzında düzenlenmiş protein, glikoprotein ve glikolipitlerle bezeli iki sıralı fosfolipit katmanından oluşmuştur. Termodinamik özellikteki bu yapıların %65-70 oranında doymamış fosfolipitlerden (yağ asidi) oluşması, soğutulma sonucu membranların irreverzibl faz değişimine (sıvı fazdan jel fazına geçmesine) neden olur (Watson, 1995; Watson, 2000). Faz değişimi, membran içi enzimlerinin kinetiğinde değişime yol açarak çözüm sonu spermatozoonların canlılığını azaltır. Düşük ısılarda biçimlenen faz değişimleri sonrası membranların stabilizasyonu bozulur ve soğuk şoku (cryoinjury) gelişir (Holt, 2000a, 2000b; Watson, 1995). Kriyoprotektanlar, hücrenin dondurulmasında oluşan soğuk şokuna, intrasellüler kristal oluşumuna, çözüm sırasında oluşan yeniden buz kristallerinin oluşumuna (rekristalizasyon) ve membrandaki denge bozukluğuna (destabilizasyon) karşı koruyucu amaçlı olarak kullanılır. Koruyucu etkilerini genellikle ortamdaki donmamış fraksiyonu artırarak ve iyon miktarını azaltarak gösterirler (Chenoweth, & Lorton, 2014; Chian, & Quinn, 2010; Zhmakin, 2009).

Kriyoprotektanlar işlevsel olarak; hücre içine girebilen (permeabl) ve giremeyen (permeabl olmayan) kriyoprotektanlar olarak iki gruba ayrılmaktadır (Bucak, & Tekin, 2007). Hücre, dondurulmadan önce düşük ısılarda kriyoprotektanlarla inkübasyona bırakılarak, intrasellüler bakımdan dengeye gelmesi sağlanmaktadır. Kriyoprotektanların moleküler ağırlıklarının düşük olmasından dolayı toksik etkileri ancak belirli oranlarda katıldıklarında veya belli süreler sonrasında ortaya çıkmaktadır (Alvarenga, Landim-Alvarenga, Moreira, & Cesarino, 2000; Palasz, & Mapletoft, 1996). Hücre dondurma medyumundaki kriyoprotektanların toksisitesini azaltmak için, hücrelerin kriyoprotektanlara maruz kalma süresinin kısaltılması ve farklı özellikteki permeabl özelliği olan ve olmayan kriyoprotektanların

birlikte kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Benson, Woods, Walters, & Critser 2012; Curry, 2000; Jeyendran, & Graham, 1980; Massip, 2001; Pradiee ve ark., 2015; Rakha ve ark., 2017; Vafaei, Kohram, Zareh-Shahne, Ahmad, & Seifi-Jamadi 2019).

Sıvı saklama veya dondurma yöntemlerinde, kullanılan sulandırıcının içeriği ve kriyoprotektan çeşidi ve miktarının spermatozoon metabolizmasının sürdürülmesi üzerine önemli etkileri vardır (Bohlool, Mohammadi, Mehr, & Hossein-Zadeh, 2015; Cardoso, Silva, Uchoa, & Da Silva, 2003; Fiser, & Fairfull, 1990; Gil, Lundeheim, Söderquist, & Rodríguez-Martínez, 2003; Iaffaldano ve ark., 2016; Kim, Lee, Ji, & Kim, 2011; Najafi, Daghigh-Kia, Vaseghi Dodaran, & Mehdipour, 2017; Rota, Linde Forsberg, Vannozzi, Romagnoli, & Rodriguez Martinez, 1998). Bu etkileri minimize etmek için çeşitli pH tamponlayıcı maddeler (TRIS-sitrik asit, Test, HEPES, vb.), hücre zarını geçebilen düşük molekül ağırlıklı şekerler; (früktoz, glikoz vb.), membran koruyucu maddeler; (gliserol ve diğer polialkoller, DMSO, aminoasitler vb.), hücre zarını geçemeyen şekerler (laktoz, sükroz), makromoleküller; (polietilen glikol, ficoll 70, BSA, dekstran, mannitol ve polivinilpirolidon), antifriz proteinleri ve membran stabilizatörleri (yumurta sarısı, süt, lipitler ve aminoasitler) gibi maddeler kriyoprotektif amacıyla sulandırıcılarda kullanılmıştır (Aisen, Alvarez, Venturino, & Garde, 2000; Fiser, Ainsworth, & Fairwell 1987; Molinia, Evans, & Maxwell 1994; Salamon, & Maxwell, 1995a; Storey, Noiles, & Thompson 1998). Gliserol, ruminant ve primat spermasının dondurulmasında %4-8 oranında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Holt, 2000a; Katkov ve ark., 1998; Morrell, & Hodges, 1998). Gliserol yüksek oranda hidrofilik yapı gösteren bir polioll bileşiği olup hücre zarını geçebilen (permeabl) kriyoprotektanlar arasında yer almaktadır. Kimyasal yapısındaki C/OH oranının eşit olması onun spermatozoon üzerine olan koruyucu etkisini artırmaktadır. Gliserolün toksisitesi, metabolik dönüşümü sırasında açığa çıkan metil glikozdan kaynaklanmaktadır. Ayrıca gliserol, membranın biyoenerji dengesinde değişikliğe ve ozmotik strese yol açarak sitotoksik etki göstermektedir. Türe bağlı olarak farklı toksik etki gösteren gliserol, aygır, tavşan, kanatlı ve balık gibi bazı türlere spermatozoon fertilitasını düşürmekte hatta bazılarında kontraseptif özelliği olduğu bildirilmiştir (Alvarenga ve ark., 2000; Katkov, Katkova, Critser, & Mazur, 1998; Morrell, & Hodges, 1998).

Eksternal kriyoprotektanlar (permeabl olmayan), makromoleküller ve sakkaritler olarak ikiye ayrılır. Çalışmamızda kullanılan polietilen glikol, dekstran ve polivinilpirolidon makromoleküler yapıdaki eksternal kriyoprotektanlardır. Eksternal kriyoprotektanlar koruyucu etkilerini, (i) membranların sıvı ve katyonlara karşı permeabilitesini artırarak, (ii) ozmotik strese karşı hücre membranlarını daha esnek duruma getirerek ve (iii) hücrede donma-çözünme sırasında gelişen lipit peroksidasyonunu azaltarak üç farklı yöntemle oluşturur. Sulandırıcılarda düşük oranda permeabl kriyoprotektan kullanılmakta, bu işlem internal kriyoprotektanların olası toksik etkilerini azaltmaktadır (Arav, Shehu, & Mattioli, 1992; Cabrita, Anel, & Herraéz, 2001). Uzun zincirli bir karbonhidrat olan ve hücre içine giremeyen bir kriyoprotektan olan dekstranın memeli spermasının dondurulmasında kullanılabilceği gösterilmiştir. Dekstran çok sayıda OH grubu içerir. Bu nedenle donma sırasında oluşan büyük buz kristallerinin yapısında bulunan dört yüzlü H-bağlarını etkileyerek kriyoprotektif etkisini gösterir (Dupuy ve ark., 1982). Hücre üzerinde toksik etkisi az bir polimer olarak kabul edilen ve eksternal bir polimerik kriyoprotektan olan PVP'nin, memeli ve kanatlı spermasının dondurulması ve vitrifikasyonu amacıyla kullanılabilceği gösterilmiştir (Pradiee ve ark., 2015; Rakha ve ark., 2017). PVP ortamda çözünen molekül sayısına bağlı olarak, hücre zarını kaplayarak ve donma noktasını düşürerek kriyoprotektif etkisini gösterir (Rakha ve ark., 2017). Polietilen glikol (PEG), etanol ve dimetilsülfoksit (DMSO) gibi diğer eksternal kriyoprotektanlara göre spermatozoon motilitesi üzerine daha az etkilidir. Hidrofobik etkisini düşük yoğunlukta bile gösterir (Aboua, Du Plessis, & Brooks, 2007).

Sunulan çalışmamız, (i) değişik hayvan türlerine ait farklı somatik ve gamet hücrelerinin uzun süreli saklanmasında kullanılabilceği gösterilen kimi kriyoprotektanların koç spermasında kullanılabilirliğinin araştırılması, (ii) gliserolün yerine farklı oranlarda dekstran (DEX), polivinilpirolidon (PVP) ve polietilen glikol (PEG) kullanarak koç spermasının özellikleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Suni Tohumlamanın Tarihçesi

Suni tohumlama, spermanın dişi genital kanala herhangi bir araç ile aktarılması olarak tanımlanabilir. Bilinen en eski yardımcı üreme tekniğidir. İlk yıllarda suni tohumlama, çiftleşme (veneral) veya temas ile geçen bulaşıcı hastalıklardan korunma amacıyla uygulanmıştır. Daha sonra, sürünün genetik kapasitenin hızlı bir şekilde artırması ve tohumlama başına kullanılan sperma miktarının düşürülmesi ile üstün genetik kapasiteli damızlık babaların çok daha etkin olarak kullanımına yol açarak yetiştiriciler tarafından benimsenmiş ve yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Özellikle süt sığırı yetiştiriciliğinde dondurulmuş (cryopreserved) spermanın kullanımı sonrası yüksek fertilitte elde edilmeye başlanmasıyla suni tohumlama yüksek ekonomik değeri olan ticari bir sektör haline gelmiştir (Faigl ve ark., 2012; Özkoca, 1984).

Koyunlarda suni tohumlamaya yönelik çalışmalar Milovanov ve İvanov tarafından Rusya'da 20. yüzyılın başlarında başlatılmıştır (Foote, 2002). Daha sonra Dünya'nın çeşitli bölgelerine (Avrupa- 1945, Latin Amerika 1962) yayılmıştır (Foote, 2022). Rusya'da suni tohumlamanın gelişimi I. Dünya Savaşından sonra Avustralya'dan Merinos ırkının getirilmesi ile başlamış ve kitlesel bir program olarak uygulanmıştır. O dönemde tüm hayvan popülasyonunun yaklaşık %72-76'sını kapsayan 42-44 milyon koyun tohumlanmıştır.

Hayvancılık sektöründe vazgeçilmez önemi olan reproduksiyon biyoteknolojisi suni tohumlama, *in vitro* fertilizasyon, gen transferi ve klonlama gibi birtakım yenilikleri kapsamaktadır. Bu teknikler arasında en etkin ve yaygın olanı, değerli erkek gamet hücrelerinin dondurulması ve dişi hayvanların suni yolla tohumlanması esasına dayanan suni tohumlama biyoteknolojisidir (Gordon, 2004a). Koyunculuk alanında önemli yeri olan ülkeler, bu biyoteknolojik uygulamalar yardımıyla et ve süt verimi gibi farklı verim özellikleri olan koyun ve keçi ırkları geliştirmiştir. Geliştirilen bu ırklar dünya coğrafyası üzerinde yayılım göstermektedir (Gordon, 2004b; Hafez, & Hafez, 1993). Fransa gibi kimi Avrupa ülkelerinde genetik özelliklerini yavrularına aktarma yeteneği olan üstün koçlardan elde edilen spermanın yapay olarak dişilere transferi uygulamalarına dayalı (suni tohumlama) genetik çalışmalar sektör haline gelmiştir. Avustralya'da 1994-95 yılları arasında yaklaşık

500.000 dişi koyuna farklı yöntemler kullanılarak suni tohumlama uygulanmıştır. Bu oran toplam koyun popülasyonunun yaklaşık %30'u kadardır. Günümüzde bu oran çok daha yükseklere ulaşmıştır (Gordon, 2004a). Ülkemizde keçi suni tohumlaması uygulamaları akademik çevre tarafından gerçekleştirilen çalışmalarla sınırlı olup sahada yaygın olarak uygulanmamaktadır. Fransa gibi koyun ve keçi yetiştiriciliğinin yoğun olduğu çoğu Avrupa ülkesinde suni tohumlama yaygın olarak uygulanmaktadır. Fransa'da 2010 yılında koyunlarda yaklaşık 812.000 koyuna tohumlama uygulanmıştır. Bu tohumlamaların yaklaşık %95'i taze sperma kullanılarak gerçekleştirilmiştir (David, Bonnot, Raoul, & Lagriffoul, 2012). 1980'lerde laparoskopi yöntemi ile intrauterin suni tohumlamanın Avustralya'da geliştirilmesi sonucu taze veya donmuş sperma kullanarak tohumlanan koyun sayısında artış meydana gelmiştir (Gordon, 2004a, 2004b).

Ülkemizde ise 1926 yılında bir Rus veteriner hekimi (Prof. Mihailof) Türkiye'ye gelerek Karacabey Harası'nda koyunlarda suni tohumlama uygulamış ve Türk veteriner hekimlerine suni tohumlama eğitimi vermiştir. 1950'li yıllara gelindiğinde ise suni tohumlama ince yapıya gereksinimini karşılama amacı ile Merinosa dönüştürme projesi kapsamında geniş uygulama alanı bulmuş, tohumlanan hayvan sayıları 300.000'e kadar ulaşmıştır. Ancak 1980'lere gelindiğinde ekonomik nedenler ve vajinal tohumlama sonrasında başarı oranının düşük olması sonucu koyunlarda suni tohumlama çalışmaları kesintiye uğramıştır (Özkoca, 1984).

Koyun ve keçi yetiştiriciliği et, süt, yün, kıl, tiftik ve deri üretimi açısından diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemiz ekonomisinde de önemli yer tutmaktadır. Kırsal alanda yaşayan halkımız için kolay bir uğraş alanı ve aynı zamanda ekonomik güvence olan koyunculuk, en eski hayvansal üretim alanlarından biridir. 2021 yılı sonu itibarıyla ülkemizin toplam koyun sayısı 45.177.690 başa ulaşmış olup 385.933 ton et üretimi ile toplam kırmızı et üretiminin %19,80'i, 1.143.762 ton süt üretimi ile toplam süt üretiminin %4,90'ı koyunculuk faaliyetinden temin edilmektedir (Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK], 2022).

Koyun varlığımızın büyük çoğunluğunu, yetiştirildiği bölgelerin koşullarına iyi uyum göstermiş, ancak verim düzeyleri düşük verimli ırklar oluşturur. Koyun ve keçi yetiştiriciliğinde de tıpkı sığırlarda olduğu gibi genetik özelliği yüksek damızlık üretim birimlerinin oluşturulması ve bu birimlerde yetiştirilen damızlık hayvanlara ait

genetik kaynakların (canlı damızlık hayvan, sperma ve embriyo) yetiştiriciye dağıtılmasının, ayrıca kaliteli erkek damızlıklardan alınan spermanın dondurulması ve suni tohumlama uygulamalarının sahada yaygınlaştırılmasının genetik ıslah ve verim artışı açısından önemi yadsınamaz (Altinel, Evrim, Özcan, & Başpınar, 1998; Özkoca, 1984).

## **2.2. Suni Tohumlama Uygulamalarının Yaygınlaşmama Nedeni**

Suni tohumlama uygulamalarının sahada yaygınlaşmamasının nedenleri hayvanın fizyolojisinden kaynaklanan nedenler ve yetiştiriciye bağlı nedenler olmak üzere başlıca iki başlık altında değerlendirilebilir. Koyun keçi işletmelerin geleneksel yapıda olması, hayvanların verim kayıtlarının tutulmaması, işletme başına düşen hayvan sayısının az olması, işletmelerin ekonomik durumu, yetiştiricilerin eğitim düzeyinin düşük olması gibi birçok neden, suni tohumlamanın sahada yaygınlaşmasını aksatan ve çoğunluğu yetiştirici ile ilgili başlıca nedenlerdir. Hayvanın fizyolojisinden kaynaklanan nedenler ise koyun ve koça bağlı nedenler olarak sınıflandırılabilir.

### **2.2.1. Koyuna bağlı sebepler**

Yetiştiricilikte en önemli verim özelliği döl verimidir. Hayvanlardan sürekli ve iyi bir döl verimi alınabilmesi ise büyük ölçüde döl verimini etkileyen faktörlerin kontrol edilebilmesine bağlıdır (Aytuğ, Yalçın, Alaçam, Türker, & Gökçen, 1990; Kaymakçı, 2002; Sönmez, 2013).

Spermatozoonun aktif bir hücre çekirdeği ve organelleri bulunmasına karşın, biyosentez, kendini onarma, büyüme, bölünme ve yenilenme yeteneği olmamakla birlikte, fertilizasyon aşamasına kadar uzun süre fizyolojik aktivitesini korumak zorundadır (García-Vázquez, Gadea, Matás, & Holt, 2016; Hafez, & Hafez, 1993; Holt, & Fazeli, 2016; İleri, Ak, Pabuççuoğlu, & Birler, 2000; Nur, 2019). Vajinal ejakülasyonun gerçekleştiği koyunlarda, servikal kanal anatomik yapısı gereği spermatozoon bariyeri olarak işlev yapar. Serviks normal ve motil spermatozoonların geçişini desteklerken, mikropların ve immotil ve anormal yapıdaki spermatozoonların geçişini engeller. Koyunların serviksi 8-9 cm uzunluğunda olup huni şeklinde 5-7 halka içerir. Servikal halkalar düzensiz olup konsantrik olarak bağlantıları zayıftır ve yapıları serviksin geçilmesini engelleyecek kadar dardır (İleri ve ark., 2000).

İmmünolojik olarak aktif bir yapısı olan servikal kanal, ejakülasyonla birlikte ortamda bulunan patojenlere karşı immün sistemi uyararak nötrofil ve makrofajların bu bölgeye göçünü tetikler. Polimorf nükleer hücreler, öncelikle morfolojik bozukluğu olan, kapasite olmuş, immotil ve agoni durumundaki spermatozoonları fagosite etme eğilimindedirler. Ayrıca servikal sıvıların retrograt akışı, mekanik olarak spermatozoonlar için selektif olarak görev yapar. Koyunların serviks kanalının dar olmasından dolayı sperma, tohumlama kateterinin geçebildiği derinliğe bırakılır. Serviksin mekanik ve immünolojik bariyer özeliğinden dolayı servikal kanala bırakılan spermanın büyük bir kısmı servikal halkalara takılarak uterus ve tuba uterinaya ulaşamaz. Bu nedenle vajinal ve serviksin girişine bırakılarak yapılan suni tohumlama başarısı oldukça düşük kalmaktadır (Ritar, & Salam, 1983). Serviksin yapısı ırka ve doğum sayısına bağlı olarak değişmekle birlikte, tohumlama derinliğinde 1 cm'lik artışın gebelik başarısını %7-12 arasında arttığı bildirilmektedir (Eppleston, Salamon, Moore, & Evans, 1994). Aynı biçimde serviksin dış yapısı da (giriş kısmı) bireysel farklılık göstermektedir (Kershaw ve ark., 2005). Giriş yapılarındaki bu farklılıklar da uygulamayı güçleştirmekte ve elde edilen sonuçlarda varyasyonlara neden olmaktadır. Aynı zamanda serviks içerisindeki hacim oldukça yüksek hacimde sperma verilmesi durumunda spermanın reflüsüne neden olabilmektedir (Eppleston ve ark., 1994; Kershaw ve ark., 2005; İleri ve ark., 2000; Ritar, & Salam, 1983).

Sığırlardan farklı olarak koyunlarda kızgınlık belirtilerinin dışarıdan saptanması oldukça zor olmakla birlikte, koyun yetiştiriciliğinde sürü bazında planlama yapılmaktadır. Bu nedenle sığırlarda olduğu gibi bireysel tohumlama yerine aynı dönemde daha fazla koyunun tohumlanma gereksinimi doğmaktadır. Bu durum, uygulama açısından fazla iş gücü gerektirmektedir.

### **2.2.2. Koça Bağlı sebepler**

Spermatozoonların membran yapısı ve içeriği türler arası farklılık göstermektedir. Bu nedenle, türler hatta bireysel genetik farklılığa bağlı olarak farklı kriyotolerans söz konusudur (Hafez, & Hafez, 1993). Koç spermasının membran yapısının önemli bir bölümü çoklu doymamış yağ asitlerinden (fosfolipitler) oluşur. Koç spermasında bu yağ asitlerinin oranları insan, köpek ve horoz spermasına göre



farklı oranlarda bulunmasından dolayı ani sıcaklık değişimlerine daha duyarlıdır. Aynı zamanda kolesterolün düşük sıcaklıklarda membran yapısındaki sıvıların akışkanlığını korunmasında önemli rolü olduğu ve kolesterol/fosfolipit oranındaki farklılıkların kriyotoleransla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Salmon, Castonguay, Demers-Caron, Leclerc, & Bailey, 2017; White, 1993). Ayrıca membran yapısında bulunan yağ asitlerinin soğutma işlemleri sırasında sıvıdan jel faza geçmesi (faz değişimi) ile birlikte membran içi kinetiklerin değişmesine bağlı olarak spermatolojik özellikler etkilenmektedir (Watson, 1995). Soğutma, dondurma ve eritme işlemleri, erken kapasitasyon ve akrozom reaksiyonun uyarılmasına neden olur. Membran yapısında oluşan bu değişiklikler, makro düzeyde spermatozoon motilitesini etkilemese bile hücrenin yaşam süresini kısaltabilmekte ve potansiyel fertilitiyi sınırlandırmaktadır (Gökçen, 1980; Pontbriand, Howard, Schiewe, Stuart, & Wildt, 1989)

Koyunlarda suni tohumlama başarısını etkileyen bir diğer önemli faktör ise çözdürme sonrası diğer çiftlik hayvanlarına göre daha düşük spermatolojik özelliklerin elde edilmesidir (İleri ve ark., 2000). Koyunlarda servikal suni tohumlamada çözüldürülmüş sperma kullanıldığında elde edilen gebelik oranları taze sperma ile elde edilen gebelik oranlarına seyrek olarak ulaşılmaktadır (Salamon, & Maxwell, 2000).

Dondurulmuş koç sperması ile gerçekleştirilen tohumlamalardan elde edilen düşük gebelik oranları araştırmacıları farklı sulandırıcı formülasyonlarının geliştirilmesi ve sulandırıcılara çeşitli katkı maddelerinin (hormon, vitamin, şeker ve antioksidan) katılması konularında araştırmalar yapmaya yönlendirmiştir (Chen, Foote, & Brockett, 1993; Gökçen, Aştı, Çekgöl, & Şener, 1985).

### **2.3. Potansiyel Fertilitenin Saptanması**

Damızlık amacıyla kullanılan erkek aday, suni tohumlama teknolojisinin kullanılması ile kısa bir dönem içinde çok sayıda dişiyi tohumlar. Bu nedenle, erkek damızlıkta potansiyel fertilitite düşüklüğü dişilerdeki fertilitite düşüklüklerine göre çok daha fazla önemlidir (García-Vázquez, Gadea, Matás, & Holt, 2016; İleri ve ark., 2000; Nur, 2019).

Damızlık erkek adayı için fertilitite, sağlıklı dişi veya dişilerle uygun zamanda gerçekleşen aşım sonrasında dişileri gebe bırakabilme yeteneği olarak tanımlanabilir.

Bu erkek damızlıkların fertilitésinin önceden tahmin edilebilmesi olgusu “Potansiyel Fertilité” olarak adlandırılmaktadır. Spermanın potansiyel fertilitésinin belirlenmesinde spermanın motor sistemi, metabolizması ve membran bütünlüğü ile ilgili motilite, membran bütünlüğü, metabolik aktivite, hücre içi maddelerin salınımı ve servikal mukusa ve ovuma penetrasyon gibi çok sayıda farklı testler kullanılmaktadır (Nur, 2019).

Bir erkek adayının potansiyel fertilité gücünü tahmin etmek amacıyla çok sayıda teknik geliştirilmiştir. Bu tekniklerin kimileri için konusunda eğitim almış uzman personel, gelişmiş alet ve gereçlere gereksinim duyulmaktadır. Tüm bu koşullara karşın elde edilen sonuçların fertilité üzerine olan etkisi, uygulanan testin duyarlılığına bağlıdır. Laboratuvarlarda rutin uygulanan sperma analizleri yardımıyla potansiyel fertilité ile ilgili önemli bilgiler elde edilebilmesine karşın, floresan boyama teknikleri, HOST ve spermatozoon-oosit bağlanma testi gibi fonksiyon testlerinin de uygulanması gerektiğini bildirmiştir (Malmgren, 1997; Nur, 2019). Yoğunluk, morfoloji ve motilite gibi standart spermatolojik muayenelerde spermatozoonun görünümü ve canlılığı kolayca ortaya konmaktadır (García-Vázquez ve ark., 2016; Vincent ve ark., 2014). Ancak, bu muayenelerle birlikte spermatozoonun fizyolojik bütünlüğünün bir göstergesi olan hücrenin hareket biçimi, spermanın dışı kanalda ilerleme gücü, oosite bağlanma ve hücrenin donma yeteneği gibi testler mutlaka dikkate alınmalıdır (De Jonge, & Barratt, 2017; Murphy ve ark., 2018).

Spermanın potansiyel fertilitésinin saptanmasında *in vitro* fertilizasyon tekniği en çok kullanılan yöntemlerden biridir. *In vitro* fertilizasyon tekniği, motil ve kapasite olmuş spermatozoonlar ile metafaz II aşamasındaki oositlerin uygun medyumlarda ve ortamda bir araya getirilmesiyle yapılmaktadır. Bütün bu aşamalarda *in vitro* çevre koşullarının *in vivo* ortama eşdeğer şekilde ayarlanıp stabil edilmesi gerekmektedir (O’Meara ve ark., 2005).

Spermadan kaynaklanan fertilité kayıpları kendi içinde; (a) tohumlama dozundaki spermatozoon sayısının artırılması ile karşılanabilen nedenler ve (b) karşılanamayan nedenler olmak üzere iki ana başlık altında incelenmektedir. Tohumlama dozundaki spermatozoon sayısının artırılması ile karşılanabilen nedenler çoğunlukla spermatozoonların dışı genital kanalda ilerleme yeteneği ve yaşama süresi ile ilişkilendirilmektedir. Spermatozoon sayısının artırılması ile karşılanamayan

fertilite kayıpları ise enzimatik, morfolojik ve DNA bozuklukları gibi daha çok erken embriyonik ölümlerle ilişkilendirilmektedir (Nur, 2019; Saacke, 2008).

#### **2.4. Spermasının Dondurulması**

Hayvancılık sektöründe; gametlerin dondurulması, genomik analiz, suni tohumlama, *in vitro* fertilizasyon, gen ve embriyo transferi ve klonlama genetik ıslah açısından büyük önemi olan biyoteknolojik yöntemlerdir (Hafez, & Hafez, 1993). Bu teknikler arasında en etkin ve yaygın olanı, değerli erkek gamet hücrelerinin dondurulması ve dişi hayvanların suni yolla tohumlanması esasına dayanan suni tohumlama biyoteknolojisidir. Koyun yetiştiriciliğinde de sığırlarda olduğu gibi genetik ıslah bakımından genetik özelliği yüksek damızlıktan sperma alınarak dondurulmasının ve suni tohumlama uygulamalarının önemi yadsınamaz.

Günümüzde gamet hücrelerinin saklanması, 5 °C'de sıvı saklama ve dondurma olmak üzere başlıca iki yöntem kullanılmaktadır (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000). Sıvı saklama yönteminde sperma, uygun sulandırıcılarla sulandırıldıktan sonra 5 °C gibi düşük ısılarla saklanır. Sıvı saklama yönteminde sperma yaşamsal aktivitesini ancak 2-3 gün koruyabilmektedir. Spermanın 0 °C'den daha düşük ısılarla saklanması temeline dayanan dondurma yönteminde ise saklama koşulları optimum düzeyde tutulması koşulu ile sperma fertil yaşamını yıllarca korur (Széll, Bierbaum, Hazelrigg, & Chetkowski, 2013). Bu yöntemde spermayı soğuk şokunun etkilerinden koruyan kriyoprotektif maddeleri barındıran sulandırıcılarla sulandırılan sperma, ampul (etil alkol banyosunda (-79 °C)), pellet (-79 °C kuru buzda) veya payet (-110°C sıvı azot buharında) yöntemiyle dondurularak -196 °C'de saklanır (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000). Sıvı ve dondurma yöntemlerinde spermanın yaşamsal fonksiyonlarını korumak için sulandırılması gerekmektedir (Salamon, & Maxwell, 2000).

Spermanın dondurularak saklanması, spermanın alınması, muayenesi, tohumlama dozunun hesaplanması, sulandırılması, porsiyonlaması (payet), dondurulması, saklanması, çözündürülmesi ve çözündürme sonrası muayenelerinin yapılarak kullanıma uygunluğunun değerlendirilmesi aşamalarından oluşur (İleri ve ark., 2000).

## 2.5. Koçlardan Sperma Alınması

Koçlardan diğer çiftlik hayvanlarında olduğu gibi suni vajina, elektroejakülatör ve doğal aşım sonrası vajinaya bırakılan spermanın geri alınması gibi farklı yöntemler kullanılarak sperma alınabilmektedir (İleri ve ark., 2000). Koçlardan suni vajina ya da elektroejakülatör yardımıyla alınan spermanın kullanım açısından daha uygun olduğu, bu yöntemlerin birbirine göre avantajları ya da dezavantajları bulunmasına karşın, suni vajina yöntemi ile alınan spermanın kalite bakımından, diğer yöntemlere göre daha üstün olduğu bildirilmektedir (Gordon, 2004a).

### 2.5.1. Suni vajina

Koç 4-6 aylık yaşa ve ergin canlı ağırlığının %40-60'ına ulaştığında puberteye erişerek ejakülatı içinde canlı spermatozoonlar görülmeye başlar. Canlı spermatozoonlar ancak seksüel olarak erişkin koçlardan suni vajina yöntemine alıştırdıktan sonra alınabilir (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000).

Koç suni vajinası 15-20 cm uzunluğunda ve 5-6 cm iç çapında sert plastik boru, şişirme (basınç) valfi, elastik iç lastik, kauçuk toplama hunisi ve dereceli cam toplama kadehinden oluşur (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000). Koçlardan doğala yakın ve en kaliteli sperma suni vajina yöntemi ile alınmaktadır. Yapılan çalışmalarda, bu yöntem kullanılarak alınmış spermanın gerek saklanması gerekse yapılacak suni tohumlamalardan elde edilecek sonuçların diğer yöntemlerden daha iyi olduğu bildirilmektedir. Bu yöntemle 5-15 dakika aralıkla günde 3-8 kez sperma alınabildiği bildirilmektedir (Gordon, 2004b; İleri ve ark., 2000; Jiménez-Rabadána ve ark., 2016; Marco-Jiménez, Puchades, Gadea, Vicente, & Viudes-De-Castro, 2005; Sönmez, 2013).

Suni vajina yönteminin koçun suni vajinayı reddetmesi, koçun alıştırma süreci için zamana gerek duyulması ve deneyimsizlik nedeni ile spermanın alınamaması veya koyuna aşım gerçekleşmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bunun dışında, suni vajinanın özellikleri (sıcaklık basınç vb.), çevre ve uygulayıcıdan kaynaklanan farklılıklar da sperma alınmasını ve ejakülat kalitesini etkilemektedir (Gordon, 2004a, 2004b; Hafez, & Hafez, 1993).

Sperma almaya hazır durumdaki suni vajina, kayganlık, uygun sıcaklık ve basınç gibi kızgınlıktaki bir dişinin vajinal özelliklerini taşımalıdır. Sperma alma

anında suni vajinanın sıcaklığı 41-44 °C arasında olmalıdır. Vajinanın fazla sıcak olmasının ejakülasyonu engellemesinin yanı sıra spermatozoonlar üzerinde olumsuz etkileri de bulunmaktadır. Serin havalarda ise soğuk şokundan korunmak için sperma toplama hunisi ve kadehi spermanın alınmasından önce 30-37 °C'ye ısıtılmalı ve ortam sıcaklığından etkilenmemesi için uygun keçeli kılıflara yerleştirilmelidir. Gerekli basınç hava ile şişirilerek ayarlanmalı ve suni vajinanın penisin gireceği ucuna kayganlığı sağlamak amacıyla non-spermisidal kayganlaştırıcı (steril vazelin) sürülmelidir (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Nur, 2019).

Suni vajinaya koçların alıştırılması için başlangıçta koçun seksüel olarak dışarıdan uyarılmasına katkı sağlaması amacıyla kızgın koyunlar fantom olarak kullanılabilir. Suni vajinaya alışan koçlardan daha sonra hayvan görünümü verilmiş cansız fantom yardımı ile sperma alınabilmektedir (Gordon, 2004b; Hafez, & Hafez, 1993). Sperma alırken koyun ya da fantom bir travaya veya bakıcı tarafından zapturapta alınır. Koçun genital bölgeyi koklaması, flehmen reaksiyonu, ayak sürüme, koça özgü sesler çıkarmak gibi normal aşım davranışlarını sergilemesi beklenir. Bu nedenle koçun serbestçe gezinmesine izin verilmelidir. Koçun koyuna atlaması ile kopulasyonun gerçekleşmesi arasında geçen süre çok kısadır. Bu bakımdan, sperma alacak kişi penisin kontrolünü iyi sağlamalı ve doğal çiftleşme engellenmelidir. Bu nedenle koç atlar atlamaz prepusyumdan penisi tutmalı ve suni vajinaya yönlendirmelidir. Suni vajinanın olabildiğince penis doğrultusunda ve koyunun doğal vajinası yüksekliğinde bulunması gereklidir. Glans penis suni vajinaya değer değmez koç yüklenme yapar ve ejakülasyon gerçekleşir. Ejakülasyon sonrası penisin zarar görmemesi için suni vajina penisten hemen çekilmemelidir, koçun koyundan inmesine veya ereksiyonun bitmesi beklenmelidir. Bu sırada spermanın dışarı akarak boşa gitmesi engellenmelidir. Daha sonra suni vajina dik duruma getirilerek ve basıncı azaltılarak spermanın toplama kadehe toplanmasına yardımcı olunmalıdır (Gordon, 2004a, 2004b; Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000). Sperma alındıktan sonra dış ortamdan kaynaklanabilecek ısı değişimlerinden korumak için 30-34 °C sıcaklıktaki ılık su banyosuna yerleştirilmelidir (İleri ve ark., 2000).

### 2.5.2. Elektroejakülatör

Elektroejakülatör; rektal bir prop, probun üzerinde elektrik akımını ileten bir halka veya longitudinal tipte polar metal plakalar, probun bağlandığı ve uyarıları sağlayan ve kontrollü bir biçimde sabit veya değişen akım değerlerinde elektrik uyarımı üretebilen (0-12 V) kontrol ünitesinden oluşur. Ejakülasyon merkezinin ereksiyon olmaksızın yalnızca hayvanın bel ve sağrı bölümlerinden köken alan ve üreme organlarını kontrol eden sinirlere belirli oranlarda ve sürelerde elektrik akımı vererek ampulla duktus deferensin uyarılması temeline dayanır. Bu yöntem ile gerçekleşen refleks tam bir ejakülasyon olarak adlandırılmaz. Bu yöntemde spermanın damlalar veya fişkıma biçiminde önceden ısıtılmış toplama kadehine akması sağlanır (İleri ve ark., 2000; Marco-Jiménez ve ark., 2005; Sönmez, 2013).

Bu yöntemde koç yatırılarak elektrik uyarımları sırasında kuvvetli kasılmalar oluşacağından sıkıca zapturapta alınır. Probu ucuz vazelin ile ince bir katman oluşturacak biçimde kayganlaştırıldıktan sonra 8-10 cm derinliğinde rektuma yerleştirilir. Aralıklı olarak 2-3 saniye süre ile verilen elektriksel uyarımlar (5-8 V) ile sperma alınmaktadır. Verilen ilk uyarımdan sonra 30 saniye masaj yapılmalı, ardından voltaj aşamalı olarak artırılarak işlem yinelenmelidir. Sperma alınıncaya kadar her uyarımın ardından voltaj kademeli olarak düşürülmeli ve penis boyunca masaj uygulanarak (3-5 kez) sürdürülmelidir. Sperma vermeye alışmış koçlardan genelde bir iki uyarım sonrası sperma alınabilmektedir. Deneyimsiz koçlar için biraz daha fazla uyarım gerekebilmektedir (Shiple, Buckrell, Mylne, Pollard, & Hunton, 2007). Kimi araştırmacılar işlem hayvanda stres yaratacağından uygulama öncesinde sedatif uygulanması önermektedir (Coloma ve ark., 2011; Marco-Jiménez ve ark., 2005)

Yaşlanma, libido eksikliği, hayvanın aşım yapmasına engel olan eklem rahatsızlıkları gibi nedenlerle suni vajina ile sperma alınamayan koçlarda kullanılabilen bir yöntemdir (Foote, 2002). Bu yöntemin yılın her döneminde uygulanabilmesi, kızgın dişi veya fantoma gereksinim duyulmaması nedeniyle suni vajina yöntemine göre üstün tarafları bulunmaktadır. Sperma alırken daha fazla personele gereksinim duyulması, deneyim gerektirmesi, hayvanın yatırılması, daha düşük kalitede sperma elde edilmesi gibi kimi dezavantajları da bulunmaktadır (İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

Suni vajina yöntemi ile karşılaştırıldığında, elektroejakülatör ile alınan spermanın hacminin suni vajina ile alınanlara göre daha fazla olduğu, elektriksel uyarımla eklenti bezlerinin salgılarının normalden daha fazla salınmasına yol açması nedeniyle sperma yoğunluğunun daha düşük olduğu belirtilmektedir (Dogan, Nur, Gunay, & Soylu, 2005; McDonald, & Pineda, 1989; Shipley ve ark., 2007). Koçlardan elektroejakülatör yardımı ile alınan spermatozoonların donma işlemine karşı daha duyarlı olduğunu bildiren çalışmalar (Buffoni ve ark., 2015; Marco-Jiménez ve ark., 2005) olmakla birlikte, spermanın daha dirençli olduğunu (Quinn, Salamon, & White, 1968) veya benzer sonuçlar alındığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Jiménez-Rabadána ve ark., 2016).

### **2.5.3. Normal aşım sonrası vajinada birikmiş spermanın geri alınması**

Spermanın ejakülasyon bölgesinden pipet, sünger veya kaşık yöntemi ile toplanması temeline dayanır. Bu yöntemde sperma vajinadan kaynaklanan her türlü kontaminasyona açık olduğundan uygun olmadığı değerlendirilmektedir. Ayrıca bu yöntemde ejakülatın vajinadan tam olarak toplanması olanaksızdır. Bu yöntemin uygulanması durumunda vajinal akıntıların spermaya karışmasının engellenmesi amacıyla kızgın olmayan koyunlar yeğlenmelidir (İleri ve ark., 2000).

## **2.6. Spermatojik Muayene ve Önemi**

Doğal aşımında sperma, tür farklılıklarına bağlı olarak genellikle dişi genital kanalının vajina bölümüne bırakılır (İleri ve ark., 2000). Suni tohumlamada ise sperma, uygulanan yöntem ve tohumlama derinliğine göre vajina, serviks, uterus veya kornu uteriye bırakılır. Dişi genital kanala bırakılan spermatozoonların göçlerindeki bir sonraki durak dişi genital kanalın istmus bölgesidir. Bu bölgeye gelene kadar spermatozoonlar bir dizi morfolojik ve fonksiyonel değişimler geçirmektedir. Bu değişikliklere kapasitasyon adı verilmektedir (İleri ve ark., 2000). Ovidukt kriptlerinde ulaşan spermatozoonların kapasitasyon süresi türlere göre 2 ile 6 saat arasında değişmektedir (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000). Spermatozoonlar istmus bölgesine geldiklerinde hareketleri yavaşlar. Dişi genital kanalda ovulasyon sonrasında oluşan oositin çevresindeki kumulus hücrelerinden salgılanan kemotaksik maddelerin etkisiyle spermatozoonlar yeniden hızlanarak

ampullaya doğru gitmeyi sürdürürler. Akrozom reaksiyonu geçiren spermatozoon, oosit dışındaki kumulus ve korona radiata dış katmanlarını geçerek oositin zona pellusidasında gedik açarak oolemmaya penetre olur ve füzyon olayı gerçekleşir (İleri ve ark., 2000). Fertilizasyon olarak da açıklanan bu süreç sonunda, dişi gamet hücresinin sitoplazmasına girmiş olan erkek pronükleusu dişi pronükleus ile bir araya gelir ve diploit kromozom yapılı embriyonun gelişimi başlar (İleri ve ark., 2000).

Erkek fertilitesi damızlık adayın sağlık durumu, genetik, yaş, bakım ve besleme durumu, çevresel faktörler, sürüdeki koçlar arasındaki hiyerarşi ile birlikte uygulayıcı veya yetiştiriciye bağlı faktörlerden de etkilenmektedir (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Nur, 2019; Youngquist, & Threlfall, 2007).

Veteriner androlojide spermatolojik muayeneler damızlık hayvanın reproduktif organlarında olası patolojilerin ve damızlığın fertilizasyon yeteneğinin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır (Chenoweth, & Lorton, 2014). Fertilizasyon ile ilişkili spermatolojik parametrelere bakmadan önce hayvanın fertilitite yeteneğinin belirlenmesi için hayvanın fiziksel muayenesi, libidosunun ve aşım yeteneğinin muayenesi, iç ve dış üreme organlarının muayenesi gibi androlojik muayenelerin yapılması gerekir (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Nur, 2019).

Sperma kalitesinin belirlenmesi için hacim, yoğunluk, kitle hareketi (mass aktivite), motilite ve anormal spermatozoon oranı gibi temel spermatolojik muayeneler yapılmalıdır. Erkek damızlığın fertilitite yeteneğinin belirlenmesi amacıyla alınan spermanın kalite ve kantitesi, hayvanın sağlık durumu, sperma alma yöntemi, yaşı, sperma alma öncesi hayvanın boşa atılması, sperma alma sırasındaki ortamın sıcaklığı, kullanılan malzemenin asepsi ve antisepsisi, damızlığın beslenme rejimi, mevsim, sperma alma sıklığı gibi faktörlerden etkilenmektedir (İleri ve ark., 2000). Temel spermatolojik testlerin yanında, spermatozoonların farklı fonksiyon ve bölgeleri ile ilgili zonaya penetrasyon testleri, servikal mukus penetrasyon testi, farklı sıcaklıklarda termal dayanıklılık testleri, elektron veya floresan mikroskopiye dayalı testler gibi spermanın kendisinin veya organellerinin ayrıntılı olarak test edildiği yöntemler kullanılarak ileri sperm analizleri yapılmalıdır (Aisen ve ark., 2000; Bag, Joshi, Rawat, & Mittal, 2002; Barroso ve ark., 2006; Benchaib ve ark., 2003; Chenoweth, & Lorton, 2014; Hafez, & Hafez, 1993; Nur, 2019; Youngquist, & Threlfall, 2007). Elde edilen bulguların doğrulanması için testlerin yinelenmesi ve



diğer testlerle bir arada değerlendirilmesi fertilité ile ilgili kararlarda doğruluk derecesini artırır (Hafez, & Hafez, 1993). Normospermik bir koç ejakülatı ortalama hacim, yoğunluk, motilite ve sağlam morfoloji bakımından sırasıyla >0,5 ml,  $\geq 2 \times 10^9$  spermatozoa/mL,  $\geq 80\%$  ve  $\geq 80\%$  olmalıdır (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Nur, 2019).

DNA kalitesi, enzimatik aktivite, ozmotik stres testleri (Hypoosmotic Swelling Test; HOST), yüksek veya düşük ısılarda inkübasyon testleri, artırılmış akrozom reaksiyon oranı, mukus veya jel penetrasyon testi ve hamster yumurta penetrasyon testi gibi gelişmiş alet ve ekipman gerektiren analizlerinin bir bölümü spermatolojik muayene sistemiği içinde yer almaktadır (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Nur, 2019).

Çoğu eserde temel spermatolojik muayeneler, makroskobik muayene, mikroskobik muayene, mikrobiyal muayene ve spermanın fonksiyonel muayenesi olmak üzere dört ayrı başlık altında incelenmektedir (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Nur, 2019).

## **2.7. Makroskobik Muayene**

Hacim, renk, koku ve kıvam gibi göz veya diğer duyu organları ile muayene edilebilen özellikler makroskobik muayene başlığı altında değerlendirilmektedir (İleri ve ark., 2000; Nur, 2019). Kimi araştırmacılar koç ve teke spermasının kitle hareketi mikroskopa gerek duyulmaksızın göz ile muayene edilebildiğinden, bu muayeneyi makroskobik muayene altında değerlendirmektedir (İleri ve ark., 2000; Nur, 2019).

### **2.7.1. Sperma miktarı (Hacim)**

Ejakülat, testislerde üretilen spermatozoonlar ile testisten ve sayıları türlere göre değişebilen eklenti üreme bezlerinden kaynaklanan salgıların karışımından oluşmaktadır (İleri ve ark., 2000). Sperma hacmi, ejakülat miktarının kadeh skalasında mL olarak ölçülür (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

Erkek kuzularda 60-70. günlerde başlayan sperma üretimi damızlık bireyin 18 aylık yaşından başlayarak 4 yaşına kadar giderek artmaktadır. Ergin bir koçun sperma hacmi (normospermi) 0,5-2,0 mL arasında değişmekle birlikte, ortalama 1 mL'dir (İleri ve ark., 2000; Maxwell, & Salamon, 1993). Ejakülate ait hacim vb. özellikler

bireysel özellik gösterir (Hafez, & Hafez, 1993). Genel olarak koçlarda sperma hacmi; sperma alma yöntemine, sperma alma sıklığına, sperma alan teknisyene, yaşa, mevsime, bakım-idareye, ortamda dişi varlığına, hastalıklara, koçun huyuna ve kondisyonuna bağlı olarak değişir (Aytuğ ve ark., 1990; Evans, & Maxwell, 1987). Mevsime bağlı siklik aktivite gösteren hayvan türlerinde (küçük ruminant ve tek tırnaklılar) mevsimin sperma hacmi üzerinde önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir (Çoyan, Ataman, Kaya, & Karaca, 2002). Suni vajina ile elde edilen koç spermasının hacmi 0,8-1,31 mL (İleri ve ark., 2000; Özkoca, 1984); elektroejakülatör yöntemi ile elde edilen koç spermasının hacmi 0,89-1,4 mL (İleri ve ark., 2000; Mattner, & Voglmayr, 1962) arasında değişmektedir. Ejakülatın sperma içermemesi olgusuna aspermi adı verilir. Ejakülatın o tür için beklenen hacimden daha düşük olmasına hipospermi, daha yüksek olmasına hiperspermi denir (İleri ve ark., 2000; Nur, 2019).

### **2.7.2. Renk ve Koku**

Sağlıklı bir koçtan tekniğine uygun olarak alınan sperma, normalde kendine özgü kokusu olan, koyu kıvamda ve koyu krem rengindedir. Hastalıklar, spermaya yabancı madde karışması ve sperma alma sıklığının artması gibi durumlarda viskozite ve renk değişebilmektedir. Spermanın kıvamı ile yoğunluğu arasında pozitif bir korelasyon vardır (İleri ve ark., 2000). Sperma yoğunluğu normal değerlerde olan koç sperması, koyu krem rengindedir ve yoğunluktaki düşüğe bağlı olarak spermanın rengi açık krem rengi ya da bulanık görünüme dönüşmekle birlikte, yoğunluğun artması ile de rengi koyulaşmaktadır (İleri ve ark., 2000; Sevinç, 1977).

Ejakülat tür için kabul edilen normal renk dışındaki renk değişiklikleri patolojik olarak değerlendirilir. Spermaya ortamda bulunan idrar, kan veya diğer yabancı maddelerin karışması durumunda renk değişimi gözlenebilmektedir (Hafez, & Hafez, 1993). Spermada pembe renk yeni oluşan bir kanamayı (hemospermi), kahverengi ise eski bir kanamayı gösterirken, sarı renk idrarın (ürospermi), sarı-yeşil renk ise irinin (piyospermi) spermaya karışmış olabileceğini gösterir. Diğer yabancı maddeler ise spermada tortu veya partiküller biçiminde görülebilmektedir (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Sevinç, 1977; Sönmez, 2013).

### **2.7.3. Kıvam (Vizkozite)**

Bir sıvının akmaya karşı gösterdiği direnç vizkozite olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir yaklaşımla bir sıvının kalın ya da ince oluşunun nümerik ifadesi olarak ifade edilmektedir. Bu muayene viskozimetre ile ölçülmekte ve santipuz cinsinden tanımlanmaktadır. Viskozite, ejakülatta bulunan spermatozoon yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Spermanın görünümündeki opaklık kriterinde olduğu gibi, viskozitesi yüksek olan spermanın yoğunluğunun da yüksek olduğu ve akışkanlığının azaldığı bildirilmiştir (İleri ve ark., 2000). Sağlıklı bir koçtan tekniğine uygun olarak alınan sperma normalde koyu kıvamda olmakla birlikte; hastalıklar, spermaya yabancı madde karışması ve sperma alma sıklığının artması gibi durumlarda viskozite değişebilmektedir. Spermanın kıvamı ile yoğunluğu arasında pozitif bir korelasyon vardır (İleri ve ark., 2000).

## **2.8. Mikroskopik Muayene**

### **2.8.1. Kitle Hareketi (Mass aktivite)**

Taze alınan spermada spermatozoonların kitlesel olarak yapmış olduğu kaynama veya dalgalanma hareketine kitle hareketi (mass aktivite) adı verilir. Mass aktivite koç, teke, horoz gibi ejakülattaki spermatozoon yoğunluğu yüksek olan türlerde çıplak göz ile de görülebildiğinden, kimi araştırmacılar makroskopik muayene altında sınıflandırmışlardır (İleri ve ark., 2000).

Kitle hareketi muayenesinde, 37 °C'ye ısıtılmış temiz lam üzerine taze spermadan bir damla damlatılır. Hazırlanan lam, ısıtma tablalı ışık mikroskobu veya faz kontrast mikroskop altında x10'luk büyütmede incelenir. Spermanın yoğunluğu ve devinim hızına göre +, ++, +++ ve ++++ olarak değerlendirilir. En yüksek kitle hareketini (++++), kötü özellikteki spermayı ise (+) ifade etmektedir. Normal koç spermasının +++ ve üzeri kitle hareketi göstermesi beklenir (İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

Bazı araştırmacılar 0-5 veya 0-10 arası skalayı kullanmaktadır (David ve ark., 2015; Hafez, & Hafez, 1993; Hossain, Khatun, Islam, & Miazi, 2012). Bu sınıflandırma ile daha kolay yorum yapılabilir. Bu hareket; spermanın yoğunluğundan ve lamın üzerine konulan damlanın hacminden ve yayılmasından

etkilenmektedir. Bu nedenle, sonuçlar arası varyasyonu azaltmak için muayenede 5 µL hacimde sperma kullanılmalıdır (David ve ark., 2015). Mass aktivite, bir ejakülatın motilite, yoğunluk ve fertilité yeteneği hakkında önemli bilgiler verir (Hafez, & Hafez, 1993) İyi nitelikli taze spermada üç ve üzeri değerde olması istenmektedir. David ve ark. (2015), Fransa'da beş tohumlama istasyonunda yapılan 711.562 adet tohumlama sonuçlarının kitle hareketi ile ilişkisini analiz etmişler, kitle hareketinin 4'ten 5'e yükselmesi ile birlikte kuzulama oranının 0,62'den 0,67'e yükseldiğini bildirmişlerdir (David ve ark., 2015).

### **2.8.2. Yoğunluk**

Birim hacimde (mL veya µL) bulunan spermatozoon sayısına yoğunluk denir (Çoyan ve ark., 2002). Sperma yoğunluğu hemositometrik, fotometrik ve elektronik sayaç yöntemi gibi değişik yöntemlerle ölçülebilir. Sperma alma yöntemi, yetersiz seksüel uyarım, sperma alım sıklığı, spermanın alındığı mevsim, sperma veren hayvanın yaşı ve beslenme durumu sperma yoğunluğunu etkiler (Hafez, & Hafez, 1993; McDonald, & Pineda, 1989; Sönmez, 2013). Evans ve Maxwell (1987), iyi kaliteli damızlık bir koç spermasının 1 mL'sinde  $3,5-6 \times 10^9$  spermatozoon bulundurması gerektiğini vurgularken; Setchell (1991), koç sperması yoğunluğunun  $2-5 \times 10^9$  spt/mL arasında ortalama  $3,5 \times 10^9$ /mL olduğu bildirilmiştir (Evans, & Maxwell, 1987; Setchell, 1991). Suni vajina yöntemine ( $2,01-2,8 \times 10^9$  sp/mL) göre elektroejakülatör yardımı ile alınan spermanın yoğunluğu ( $1,87-3,56 \times 10^9$ /mL) eklenti üreme bezleri salgılarının fazla olmasına bağlı olarak daha düşüktür (Chenoweth, & Lorton, 2014; Özkoca, 1984).

Spermanın yoğunluğu hemositometrik yöntemde kan hücrelerinin sayımında kullanılan hemositometre ile ölçülmektedir. Bu amaçla sahada en çok hematolojiye özđü lamlar (Neubauer, Petroff-Hauser, Improved Neubauer, Makler® chamber, vb.) kullanılmaktadır. Genellikle sperma hareketlerini durdurmak ve sayımını kolaylaştırmak için sperma; 1-200 oranında tampon çözeltiler (Formol-saline, formol sodyum sitrat, glutaraldehit vb.) ile seyreltilmektedir. Homojenizasyon sağlandıktan sonra optik mikroskopta 100-200'lük büyütmede spermatozoonların baş bölümleri sayılır. Bu spesifik lamlarda 25 büyük kare, büyük karelerin içlerinde 16 küçük kare ve iki farklı sayım alanı bulunur. Varyasyonun azaltılması için en az 5 büyük karenin

sayılması önerilmektedir. Sayım işleminden sonra aşağıdaki formül ile spermatozoon yoğunluğu saptanır.

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

$A = \text{İki farklı alanda sayılan sperma sayısı}$

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

$N = \text{Sayılan büyük kare sayısı}$

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

Formül ile mm<sup>3</sup> hacimdeki spermatozoon sayısı elde edilmektedir. Bu sayının 1000 ile çarpılması ile birlikte mL'deki (cm<sup>3</sup>) sperm sayısı elde edilmektedir. Elde edilen sonucun ejakülat hacmi ile çarpılması ile de ejakülatta bulunan toplam spermatozoon sayısı elde edilir (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Nur, 2019).

Günümüzde sperma yoğunluğunu belirlemek amacıyla, kolaylık ve zaman sağladığı için geliştirilmiş otomatik aygıtlar; kolorimetreler, fotometreler ve spektrofotometreler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu aygıtların belirli aşamalarda; periyodik olarak, bakım ve ışık kaynağı değişimlerinin kalibre edilmeleri gerekmektedir. Bu aygıtlar; hemositometrik yönteme göre daha hızlı yinelenbilir doğrulukta sonuçlar vermektedir. Spermanın yoğunluğuna akış sitometri aygıtı ile de bakılabilmektedir (Evenson, Parks, Kaproth, & Jost, 1993). Cihazda sperma sıvı olarak akışa tabi tutulmakta ve sperm dışı partiküller göz ardı edilerek bireysel olarak spermatozoonlar, sayılabilmektedir. Bu yöntemlerin dışında günümüzde kullanılan bilgisayar destekli sperm analiz cihazlarında da (CASA) yoğunluk saptamak olasıdır. Bu yöntem, hemositometri gibi daha önce kullanılan yöntemlere göre daha hızlı bakılabilmesinin yanında, daha objektif veri elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Amann, & Waberski, 2014).

### **2.8.3. Motilite**

Spermatozoonun ilk Leewehoek ve Hartsoeker tarafından keşfinden bu yana, androloji laboratuvarlarında çeşitli türden alınan memeli sperması mikroskop

aracılığıyla görüntülenmiş ve çeşitli analizler aracılığıyla değerlendirilmiştir (Chenoweth, & Lorton, 2014; Seneda, Silva-Santos, & Marinho, 2016).

Mikroskop ile gözle yapılan motilite muayenesi, araştıracının hareketli hücrelere odaklanmasından dolayı oldukça sübjektiftir. Faz kontrast mikroskop kullanımı gibi tekniğinin geliştirilmesi ve spermanın izoozmotik solüsyonlarla seyreltilmesi muayeneyi kolaylaştırmakla birlikte sübjektifliği değiştirmemektedir (Chenoweth, & Lorton, 2014).

Başı yönünde düzgün bir biçimde ileriye doğru hareket eden spermatozoon sayısının popülasyondaki oranına motilite denir. Motilite, spermatozoonun dışı genital kanalı içinde fertilizasyon bölgesine ulaşması ve oosit yüzeyinde bulunan kumulus hücrelerini ve zona pellusidayı aşmasında etkilidir (Chenoweth, & Lorton, 2014). Sperma alma yöntemi, ortam sıvısının içeriği (seminal plazma, sulandırıcı), yoğunluğu, ozmotik basıncı, sıcaklığı, sulandırıcı içeriği ve genel hijyen gibi birçok faktör spermatozoon motilitesini etkiler (Hafez, & Hafez, 1993). Spermatozoonların metabolizması veya patolojik olaylar sonucu reaktif oksijen parçacıkları açığa çıkar. Açığa çıkan reaktif oksijen parçacıkları, hücre zarı fosfolipitlerine bağlanarak dejenere olmuş yağ asitlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Kısacası sperm metabolizması sonucunda açığa çıkan peroksitler veya diğer dejeneratif etkili ürünler spermanın motilitesini olumsuz etkiler (Nur, 2019).

Spermatozoon hareketleri; hareket yönüne göre, ileri doğru hareket (lineer), ileri hızlı (progressif), yerinde durarak dairesel hareket edenler (sirküler), yerinde durarak titreşenler (vibratör), geriye doğru hareket edenler (revers), hareketsiz (statik) olarak sınıflandırılır. Motilite muayenesi yapılırken spermatozoonların bireysel hareketlerinin kolayca değerlendirilebilmesi için izotonik tampon solüsyonlarla (%0,9 izotonik sodyum klorür çözeltisi veya sodyum-sitrat buffer solüsyonu vb.) örnek yoğunluk  $25 \times 10^6$  spermatozoon/mL olacak biçimde sulandırılır (Verstegen, Iguer-Ouada, & Onclin, 2002). Muayene amacıyla önceden ısıtılmış lam üzerine sperma damlatılıp üzeri lamel ile kapatılır. Ortamdaki akış durduktan sonra, ısıtma tablalı (37 °C) faz-kontrast mikroskopta x400 büyütmede değerlendirilir. Muayenede en az üç saha incelenerek ileriye doğru hareket eden spermatozoa oranı % olarak değerlendirilir (İleri ve ark., 2000). Spermatozoonların üst üste gelmesini engellemek adına büyük hacimli damla kullanılmamalıdır. Bu muayenenin uygulanmasında bireyler arasında

%30-60 gibi farklılıklar olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle muayeneler olabildiğince deneyimli ve aynı kişiler tarafından yapılmalıdır (Verstegen ve ark., 2002).

Sadece baş yönünde ileriye doğru hareket eden spermatozoonlar tüm yolu kat ederek fertilizasyon bölgesine ulaşabileceğinden, potansiyel fertilitiyi saptamada motilite muayenesi çok önemlidir (Çoyan ve ark., 2002; Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013). Birçok araştırmacı motilite ile fertilité arasında sıkı bir ilişkinin bulunduğu bildirilmiştir (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000). Taze koç spermasının motilitesi genellikle %80'in üzerindedir (İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013). Sperma alma yönteminin motiliteyi etkilediği ve suni vajina ile alınan koç spermasında %76-%94 (Buffoni ve ark., 2015; Özkoca, 1984), elektroejakülatör ile alınan spermada ise %78-%90 arasında motilite elde edildiği bildirilmiştir (Buffoni ve ark., 2015; İleri ve ark., 2000; Pontbriand ve ark., 1989). Sperm motilitesinin bu değerlerden düşük olması durumuna astenozoopermi denilmektedir (Nur, 2019).

#### **2.8.3.1. Bilgisayar Destekli Sperma Analiz Cihazı (CASA)**

Sperma kalitesinin belirlenmesinde mikroskop kullanılarak gözle yapılan motilite analizi sahada ilk ve en yaygın olarak kullanılan metotlardan birisidir. Ancak sübjektif olması, düşük yinelenebilme özelliği, az sayıda hücre analiz edilmesi, hareketlerin dış faktörlerden çok etkilenmesi, analiz için uzun zaman gerekmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (Foote, 2002). Spermanın objektif olarak muayenesi için ilk olarak Rothschild (1953) ve Elliott et al. (1973), mikroskop sahasındaki spermatozoonların 2 saniye ara ile klasik teknikler kullanarak fotoğraflarını çekmişler ve çektikleri fotoğraflarda hareketli ve duran spermatozoonları belirlemişlerdir (Elliott, Sherman, Elliott, & Sullivan, 1973). Makler (1978) ile Revell ve Wood (1978), Elliot Fotografik Prosedürünü modifiye etmişlerdir (Makler, 1978; Revell, & Wood, 1978). 1980'lerde Foote ve ark. analog kameralar ile sperma hareketlerini 15 saniye boyunca video kayıt altına almışlardır. Kayıtlar daha sonra televizyonlarda 3 ya da 4 kişi tarafından ayrı ayrı olarak numune bilgisi olmaksızın muayene edilmiştir (Foote, Arriola, & Wall, 1978). Bu tekniklerin uygulanması sonraki yıllarda bilgisayar sistemlerinin gelişmesi ile daha otomatik duruma getirilmiştir. Katz ve ark. (1985), spermatozoonların gerçek zamanlı motilitelerinin ve kinematik analizlerinin yapılabildiği bilgisayar destekli analiz bildirmiştir (Katz, Davis, Delandmeter, &

Overstreet, 1985). Bu sistemler genellikle ısıtma tablalı faz kontrast mikroskop, kamera ve bilgisayar ünitelerinden oluşmaktadır (Hafez, & Hafez, 1993). Bu sistemle yalnızca spermanın motilitesi değil aynı zamanda harekete bağlı; hız, hareket biçimi, yoğunluğu ve sulandırma oranı da belirlenebilmektedir (Hafez, & Hafez, 1993).

İlk CASA aygıtı Dott ve Foster tarafından 1979 yılında insan spermasının analizi için geliştirilmiştir. Aygıt yardımı ile her bir spermatozoonun bireysel hareketi analiz edilmekte ve istatistiki yönden objektif olarak raporlanmaktadır (Verstegen ve ark., 2002). Aygıt ile pek çok spermatozoon hareketi ayrıntılı olarak analiz edilerek belirli parametreler ile fertilité arasındaki ilişkiler aydınlatılmaya çalışılmıştır (Amann, & Waberski, 2014).

Kimi türlerde CASA parametreleri için sperma hareket indeksi (Sperm movement index; SMI) ve sperma hız indeksi (Sperm velocity index; SVI) hesaplanabilmektedir. Bu indekslerin, insanlar (Agarwal, Sharma, & Nelson, 2003) ve köpekler (Martínez, Morán, & Peña, 2006) için de kullanılabilceği gösterilmiştir. Davis ve ark. (1992) ve Mortimer (2000) CASA cihazlarında elde edilen sperm hareketlerin hakkında ayrıntılı bilgiler vermişlerdir (Davis, & Katz, 1992; Mortimer, 2000). Sistem aracılığıyla total spermatozoon motilitesi ve progressif spermatozoon motilitesi dışında algoritma yardımıyla yoğunluk ve çeşitli hız parametreleri de belirlenmektedir. Bu analizlerin yapılabilmesi amacıyla özel lamlar kullanılmakta olup bu lamların farklı bölgelerinde farklı sonuçlar alınabileceği, özel haznelerin yetersiz doldurulması, yoğunluk tahminlerinin etkilenebileceği bildirilmiştir (Douglas-Hamilton, Smith, Kuster, Vermeiden, & Althouse, 2005a, 2005b).

CASA sisteminin kullanılmasında laboratuvarlar arası sistemlerin standardize edilmesi gerekir. Farklı laboratuvarlardaki çeşitli kullanıcılar arasında ciddi varyasyonlar bulunmaktadır. Taze spermada donmuş spermaya göre daha fazla spermatozoon bulunması, spermatozoon dışındaki partiküllerin spermatozoon olarak algılanması analizlerin standardizasyonu zorlaştırmaktadır. Spermatozoonların partiküllerden ayrılması için DNA boyaları kullanılarak (Hoechst 33342) daha güvenilir sonuçlar elde edilmeye çalışılmıştır (Moustacas ve ark., 2011). CASA parametreleri analiz edilen sperma türüne (taze, donmuş), aynı zamanda kullanılan sistem (donanım, program), kamera görüntü alma frekansı, kullanılan lam, analiz sıcaklığı ve operatör deneyimi gibi faktörlerden etkilenmektedir. Kamera frekansı (12,



25, 50, 100, 200 Hz) ve kullanılan lam türü en önemli faktörlerdendir (Castellini, Dal Bosco, Ruggeri, & Collodel, 2011; Mortimer, 2000; Verstegen ve ark., 2002).

Sperma analiz sistemleri, morfometrik analizleri kısa süre içinde yüksek doğruluk ve yinelenbilme düzeyinde analiz edilebilmektedir. Analiz ile birlikte total motilite (%); progressif motilite (%); mean velocity (VAP -  $\mu\text{m/s}$ ); linear velocity (VSL -  $\mu\text{m/s}$ ); curvilinear velocity (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ); amplitude of lateral head displacement (ALH,  $\mu\text{m}$ ); frequency of head displacement veya beat cross frequency (BCF, Hz); mean coefficient (STR, %), ortalama yörüngeyi gösteren  $(\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100$ ; linear coefficient (LIN, %), ölçüm sırasında temel hareket yolunun ortalama yol etrafında salınımı oranı  $(\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$ ; ve yalpalama katsayısı (wobble coefficient)  $(\text{VAP}/\text{VCL} \times 100, \text{WOB} \text{ -}\%)$  gibi parametreler analiz edilebilmektedir. Ayrıca motilite değeri; VAP değerinin belirli eşik değerlerle (cut-off) ilişkisine göre hızlı, orta, yavaş ve statik olarak alt gruplandırma yapılabilmektedir (Foote, 2003; Malo ve ark., 2006; Verstegen ve ark., 2002).

Bilgisayar destekli sistemde total motilite, herhangi bir biçimde hareket yeteneği olan tüm spermatozoonların oranlarının toplamını göstermektedir. Progresif motil ise ileriye doğru ve özellikle düzgün doğrusal hareket eden spermatozoonları, nonprogresif motil spermatozoon ise hareketli fakat güçsüz, doğrusal olmayan ya da anormal bir yörüngede hareket eden spermatozoonları, immotil ise, tamamen hareketsiz spermatozoonları belirtmektedir (Foote, 2003; Malo ve ark., 2006; Verstegen ve ark., 2002).

Pek çok araştırmacı CASA parametreleri ile fertilitte ilişkisini domuzlarda (Evenson, Thompson, & Jost, 1994; Holt, Holt, Moore, Reed, & Curnock, 1997; Ruiz-Sánchez ve ark., 2006; Quintero-Moreno, Rigau, & Rodriguez-Gil, 2004); boğalarda (Budworth, Amann, & Hammerstedt, 1987; Farrell, Presicce, Brockett, & Foote, 1998; Kathiravan, Kalatharan, Karthikeya, Rengarajan, & Kadirvel, 2011; Palmer, & Barth, 2003); aygırlarda (Kirk, Squires, & Graham, 2005; Love, 2011; McKinnon, Squires, Vaala, & Varner, 2011) incelemişlerdir. Ancak bu çalışmalardan hiçbirinde CASA parametreleri ile fertilitte arasında ilişki net olarak ortaya konamamıştır. Bu durumun spermanın fertilitte üzerindeki etkisinin %10 olmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Chenoweth, & Lorton, 2014). Quintero-Moreno ve ark. (2004) ve diğer araştırmacılar CASA parametreleri ve diğer laboratuvar analizleri ile fertilitte arasında

korelasyon olduğunu bildirmiştir (Quintero-Moreno ve ark., 2004). Holt ve ark. (2007), CASA parametrelerinin yorumlanmasından çok sperma içerisindeki alt popülasyonların belirlenmesinin daha yararlı olacağını bildirmişlerdir (Holt, O'Brien, & Abaigar, 2007). Çeşitli araştırmacılar çalışmalarında sperma alt popülasyonlarını CASA sistemleri ile belirlenmişler ve elde edilen bilgilerin konvansiyonel yöntemlere göre sperma kalitesi, dondurabilirliği ve fertilitede daha fazla ek bilgi sağladığı kanısına varmışlardır (Abaigar, Holt, Harrison, & del Barrio, 1999; Núñez-Martínez, Moran, & Peña, 2006; Ortega-Ferrusola ve ark., 2009a; Peña ve ark., 2005). Su ve ark. (2012), sperm hareketlerinin büyük popülasyonlarda üç boyutlu olarak takip eden sistem geliştirmişler ve sistemin çıktılarının değerlendirilebilmesi için daha fazla çalışma gerektiği kanısına varmışlardır (Su, Xue, & Ozcan, 2012).

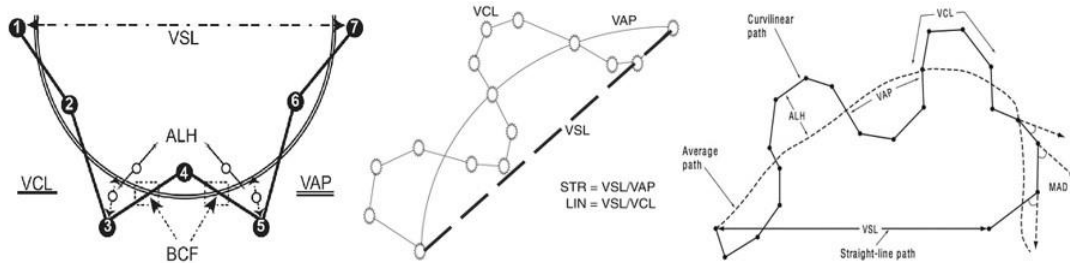
Spermatozoon hareketleri bireysel olarak insan gözüyle değerlendirilemeyeceğinden farklı özellikte kamera tipleri geliştirilmiştir. Günümüzde pek çok ticari CASA sistemleri var olup klasik motilite muayenesine göre daha objektif sonuçlar alınabilmektedir. Ticari olarak (Hamilton Thorn (Hamilton Thorn Research, Beverly, USA); IMAGESP® (VIMAS IMAGESP®, Barcelona, Spain); Hobson Sperm Tracker (Hobson Tracking Systems Ltda., Sheffield, England.); Sperm Class Analyzer® (SCA, Microptic SL, Barcelona, Spain), SM - CMATM (MTM Medical Technologies, Montreaux, Switzerland), QualiSperm™ - 1.3 (BioPhos, Pfäffikon, Switzerland), AndroVision® (Minitube, Germany), The Sperm Quality Analyzer (SQA®) (SQA V, Medical Electronic System, Hatavorzo, Israel) ISAS® (Pröiser, Spain) (Arruda ve ark., 2011), son yıllarda standart donanımlar için bilgisayar programları da ESAS® (Arı, Arı, & Arı, 2016), BASA-Sperm Aqua® (Özgür, Okumuş, & Kocamaz, 2019) farklı CASA sistemleri geliştirilmiştir.

Analiz sonuçlarının standardizasyonu amacıyla hacmi tanımlanmış farklı marka ve özellikte sayım lamları kullanılmaktadır. Leja® slide (IMV Technologies, France), Mackler® counting chamber (Sefi Medical Instruments Ltd., Irvine Scientific, USA), CELL-VU® (Millenium Sciences, Inc., Fisher Scientific, USA), ISAS Proiser (Pröiser, Spain), GoldCyto® (Spain) ve SCA counting chamber (SCA, Microptic SL, Barcelona, Spain) en çok kullanılan CASA sayım lamlarıdır.

### 2.8.3.1.1. CASA Terminolojisi

- VCL, eğri çizgisel hız (curvilinear velocity) ( $\mu\text{m/s}$ ). Mikroskopik gözlem altında iki boyutta algılandığı gibi, bir spermatozoon başının gerçek eğri çizgisel yolağı boyunca zamana göre ortalama hızı. Hücre canlılığının bir ölçümüdür.
- VSL, doğrusal hız (rectilinear velocity) ( $\mu\text{m/s}$ ). Bir spermatozoon başının, saptanan ilk konumuyla son konumu arasında çizilen düz çizgi boyunca zamana göre ortalama hızı.
- VAP, ortalama yol hızı (average path velocity) ( $\mu\text{m/s}$ ). Bir spermatozoon başının ortalama yolu boyunca zamana göre ortalama hızı. Bu yol, CASA aygıtlarındaki algoritmalara göre eğri çizgisel hız düzleştirilerek hesaplanır. Farklı CASA aygıtları farklı algoritmalar kullandığı için, sistemlerin saptadığı değerler karşılaştırılabilir düzeyde olmayabilir.
- ALH, spermatozoon başının lateral deplasman amplitüdü ( $\mu\text{m}$ ). Spermatozoon başının ortalama yoluna göre dış yana hareketinin boyutu. Ya maksimal değer veya bu deplasman amplitüdlерinin ortalaması olarak açıklanabilir. Farklı CASA aygıtları farklı algoritmalar kullanarak ALH'yi hesapladıkları için, sistemlerin saptadığı değerler karşılaştırılabilir düzeyde olmayabilir.
- LIN, doğrusallık (linearity). Eğri çizgisel yolun doğrusallığı, VSL/VCL.
- WOB, salınım hareketi (wobble). O anki spermatozoon hareket yolunun, ortalama yol etrafında salınım hareketinin ölçümü VAP/VCL.
- STR, doğrusallık (straightness). Ortalama hareket yolunun doğrusallık derecesi, VSL/ VAP.
- BCF, çaprazlama sıklığı (beat-cross frequency) (Hz). Eğri çizgisel yolun ortalama yolu çaprazlama sıklığı.

- MAD, ortalama açısız yer değiştirme (mean angular displacement) (derece). Spermatozoon başının eğri çizgisel yolu boyunca anlık dönüş açısının zamana göre ortalama mutlak değerleri.



şekil 1. Sperm hareketleri ve CASA terminolojisi görselleri

#### 2.8.4. Morfoloji

Morfolojik olarak anormal olan spermatozoonların fertilitte yeteneği yoktur. Bu nedenle ejakülatta bulunan morfolojileri sağlam spermatozoon oranının belirlenmesi en az motilite muayenesi kadar önemlidir. Sağlıklı ejakülat içinde her zaman %5-10 arasında morfolojik bozukluğu olan spermatozoon bulunmasına karşın, bu oran %20'yi geçmemelidir (Nur, 2019).

Spermatozoonların akrozom, baş, mitokondri, DNA yapısı gibi farklı bölümlerini değerlendirmek amacıyla Alkaline methyl-violet (Hackett, & Macpherson, 1965), AntPubquitin-FITO (fluorescein isothiocyanate) TRITC (thiol-reactive teenethyirhodamine-5-(-6)- isothiocyanate) (Kuster, Singer, & Althouse, 2004), Belling's iron aceto-carmine (Hackett, & Macpherson, 1965), Casarett stain (Casarett, 1953), Diff-Quik/Dip Quick (Boersma, Rasshofer, & Stolla, 2001), Eosin-nigrosin (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000), Giemsa (Hackett, & Macpherson, 1965), Harris' haematoxylin (Boersma ve ark., 2001), Heidenhain's iron haematoxylin (Hackett, & Macpherson, 1965), India ink (Hackett, & Macpherson, 1965), Papanicolaou (Boersma, Braun, & Stolla, 1999; Boersma ve ark., 2001), SpermBlue (Van der Horst, & Maree, 2010) gibi çeşitli boya ve boyama prosedürleri geliştirilmiştir. Bu prosedürler froti; basit mikroskopi, görüntü analiz sistemleri ile entegre yazılımlar veya sıvı fiksasyon ve florokrom boyalar kullanılarak ileri düzey faz ve floresan mikroskopi ve akış sitometri tekniğine dayalıdır.

Basit mikroskopiye dayalı morfolojik analizlerde genellikle sperma numunesinden froti hazırlanıp sonra çeşitli boyalar ile boyandıktan sonra ışık mikroskopi tekniğinin ile değerlendirilmektedir. Sıvı fikzasyon yöntemi ile yapılan morfolojik değerlendirmelerde faz kontrast mikroskopi tekniğinde yararlanılmaktadır. Bu prosedürler birbirinden farklı olsa da sürme froti hazırlanarak ya da hazırlanan sperma solüsyonunun lam üzerine damlatılıp üzerine lamel kapatılarak incelenmesiyle uygulanmaktadır. Mikroskop alanında bulunan hücrelerin ayrı ayrı gözlemlenmesi ve hatalı muayenelerin önüne geçmek için spermanın yeterince sulandırılması gerekmektedir (Sönmez, 2013). Bu yöntemlerde 40x veya 100x büyütmede spermatozoonların incelenmesi yapılır. Mikroskopiye dayalı yöntemlerde en az 200 hücre sayılarak bozukluk oranları saptanmaktadır (Çoyan ve ark., 2002; Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

Spermatozoon ve akrozom morfolojisi için; Spermac (Boersma ve ark., 2001), Anti-acrosin-FITC (Thomas, Garner, Mel DeJarnette, & Marshall, 1997), Chicago sky blue-Giemsa (Kútvolgyi, Stefler, & Kovács, 2006), Chlortetracycline (CTC) (Gillan, Evans, & Maxwell, 1997; Green, & Watson, 2001; Maxwell, & Johnson, 1997; Rathi, Colenbrander, Bevers, & Gadella, 2001), Fast Green FCF-eosin B (Wells, & Awa, 1970), Giemsa (Watson, 1975), Lectin conjugates – PSA (Pisum sativum agglutinin) PNA (peanut agglutinin) (Odhiambo, Sutovsky, DeJarnette, Marshall, & Sutovsky, 2011; Petrunkina, & Harrison, 2011), Lysotracker Green DND-26 (LYSO-G) (Thomas ve ark., 1997), Merocyanine 540 (Garcia-Macias ve ark., 2006), Naphthol yellow, S-aniline blue (Christensen, Whitfield, & Parkinson, 1994), Naphthol yellow S-erythrosin b (Christensen, Whitfield, & Parkinson, 1994) ve Nigrosin-eosin-Giemsa (İleri ve ark., 2000); Calcium influx/ acrosome reaction için Fluo-3 (Green, & Watson, 2001; Petrunkina, & Harrison, 2011) ve Fura-2 (Zhou, Shi, Chou, Oswald, & Haug, 1990) gibi boyaların kullanılabileceği bildirilirken, mitokondriyal fonksiyonların muayenesi için JC-1 (Celeghini, De Arruda, De Andrade, Nascimento, & Raphael, 2007; Garcia-Macias ve ark., 2006), Mito Tracker Red (Celeghini ve ark., 2007) ve Mito Tracker Green FM Rhodamine 123 (Celeghini ve ark., 2007) gibi boyaların kullanılabileceği bildirilmiştir. Spermatozoonların değişik kısımlarını görüntülemek için geliştirilen bu yöntemler ışık mikroskopi yanında ileri mikroskop tekniği ve görüntüleme sistemleri (faz ve floresan mikroskop) gerektirir.

Morfolojik bozuklukların sınıflandırılmasında değişik yaklaşımlar bulunmaktadır. Günümüzde morfolojik bozukluğun lokalize olduğu organellere göre sınıflandırma yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde göre morfolojik bozukluklar; akrozomal bozukluklar, başa ait bozukluklar, implantasyon çukurluğuna ait bozukluklar, başın orta bölüme bağlanması ile ilgili bozukluklar, orta bölüme ait bozukluklar ve kuyruk bozuklukları olarak sınıflandırılmaktadır (İleri ve ark., 2000).

Kimi araştırmacılar; morfolojik bozuklukları oluşum evrelerine göre, spermatojenez evresinde oluşan primer bozukluklar; anormal baş, orta kısmın şekillenmemesi, abaksiyal bağlanma, kuyruğun kuvvetli kıvrılması gibi, kanal sisteminde oluşan sekonder bozukluklar; ayrılmış baş, distal damlacık, kıvrık kuyruk gibi sınıflandırma yapmaktadır. Kimi araştırmacılar ise infertiliteye neden olan (majör) ve olmayan (minör) bozukluklar olmak üzere iki grupta sınıflandırma yapmaktadır (Chenoweth, Hopkins, Spitzer, & Larsen, 1993). Bazı araştırmacılar ise, spermatozoonlarda bulunan morfolojik bozuklukları birincil (spermatogenez sırasında); ikincil (kanal sisteminden geçerken) ve üçüncül (ejakülasyon sırasında ve sonrasında) olmak üzere sınıflandırmaktadır (Hafez, & Hafez, 1993).

Morfolojik muayene sonuçlarını sperma alma yöntemi, mevsim, hayvanın fizyolojik durumu, ortam sıcaklığı ve hayvanın ırkı direk olarak etkileyebildiği gibi muayenede kullanılan malzemelerin ısısı, pH, boyama süresi ve yöntemi gibi faktörler de sonuçları etkileyebilmektedir (İleri ve ark., 2000; Nur, 2019).

Fertilizasyondaki önemli rolü nedeniyle spermatozoonların başının büyük bölümünü kaplayan akrozomal yapının muayenesi oldukça önemlidir. Bu organel, fertilizasyon sırasında spermatozoonların oosit katmanlarını geçmesi için gerekli olan hiyaluronidaz, korona delici enzim, nöraminidaz ve tripsin gibi çok sayıda enzimleri içermektedir. Bu enzimler, akrozom reaksiyonu sonucu spermatozoonun ayrılıp penetrasyon öncesi etkilerini gösterir. Akrozomal yapı spermatozoonunun yaşlanması, sulandırılma, soğutma ve dondurma eritme gibi işlemlerden çokça etkilendiği için fertilite yeteneği bu işlemlerden oldukça etkilenmektedir (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000). Spermanın potansiyel fertilesinin belirlenmesinde, akrozomal bütünlüğün korunması kadar akrozom reaksiyonunun erken ya da geç gerçekleşmesi de fertilite yeteneğinin değişmesine neden olabilmektedir (Silva, & Gadella, 2006). Akrozom; spermanın Golgi cisimciği ve endoplazmik retikulumundan köken alan

asidik yapıda salgılar içeren bir organeldir (Chenoweth, & Lorton, 2014). Akrozomal yapının muayenesinde; Giemsa boyama, eozin-nigrozin boyama, klor tetrasiklin, ricinus communis aglütinin I, Pisum Sativum Aglütinin (FITC-PSA), peanut aglütinin (FITC-PNA), concanavalin A ve soybean aglütinin gibi lektin içeren floresan boyalar kullanılmaktadır (Hafez, & Hafez, 1993; Lybaert, Danguy, Leleux, Meuris, & Lebrun, 2009). Pisum sativum aglütinin (FITC-PSA) ve peanut aglütinin (FITC-PNA) gibi çeşitli lektinler memeli sperması akrozomunun değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Magargee, Kunze, & Hammerstedt, 1988). Bu lektinlerin, dış akrozomal membrandaki glikoproteinlere veya akrozomal matrikse bağlanma affinitesi bulunmaktadır. Bu özelliklerinden yararlanarak akrozomal bütünlük floresan olarak değerlendirilebilmektedir. FITC-PNA yalnızca dış akrozomal membrana bağlanırken, FITC-PSA akrozomun hem dış membranına hem de akrozomal matrikse bağlanmaktadır (Cheng ve ark., 1996; Flesch, Voorhout, Colenbrander, van Golde, & Gadella, 1998).

#### **2.8.5. Ölü/Canlı oranı**

Plazma membranı, seçici geçirgen zar yapısı ile hücre metabolizması için gerekli maddelerin (kimyasal içerikler, iyonlar ve diğer çözünebilir maddeler) geçişini sağlamanın yanı sıra tüm hücreyi sararak organelleri ve intrasellüler komponentlerin bir arada tutulmasını ve böylelikle canlılığın sürmesini sağlamaktadır (Silva, & Gadella, 2006). Motil spermatozoonlar canlı olarak nitelendirilse bile, membran geçirgenliği bozulmuş olabilir. Bu nedenle motilite muayenesi, canlılık veya plazma membran bütünlüğü testleri ile desteklenmelidir. Ölü spermatozoon oranının artması ile birlikte ortamda serbest reaktif oksijen türleri de artar. Bu artış spermatozoon için tolere edilebilir limiti aştıktan sonra ortamda bulunan sağlıklı spermatozoonların hücre zarları olumsuz etkilenir (Tekin, 1994). Ejakülat veya sperma içindeki ölü spermatozoonların ayırt edilmesinde eozin-nigrozin, propidyum iodid, karboksifluoresin diasetat gibi mikroskopiye dayalı ve hücre zarı geçirgenliği ile ilgili vital boyalardan yararlanır. Diğer bir yöntemde ise spermatozoon membran yapılarının fonksiyonel bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla hipotonik ortama tabi tutularak membran bütünlüğü değerlendirilmektedir (Nur, 2019; Sönmez, 2013).

Vital boyama tekniklerinden yararlanılan canlılık muayeneleri, ışık, faz kontrast veya floresan eklentili mikroskoplarda muayene edilebilmektedir (Hafez, & Hafez, 1993). Plazma membran bütünlüğünün saptanması için sağlam hücre membranından hücre içine geçemeyen vital boyalar (Eosin-Nigrosin, CFDA, CFDI, Hoescht 33258, YoPro-1, Propidium Iodide [PI], ToPro, TOTO vb.) kullanılır. Bu boyama tekniklerinde boyayı dışarıda tutan spermatozoonlar canlı olarak değerlendirilir (Silva, & Gadella, 2006; Ustuner ve ark., 2016). Son yıllarda klasik ölü/canlı oranı ve morfolojik bozuklukların saptanma tekniklerine (eosin-nigrosin) göre daha güvenilir sonuçlar verdiği düşünülen özel floresan boyama teknikleri geliştirilmiştir. Bu tekniklerde farklı renkte floresan boyaların kullanılması nedeniyle parametreler ayrı ayrı incelenebildiği gibi aynı anda birden fazla parametre de muayene edilebilmektedir (Dayanikli, Sengul, Bulbul, Ustuner, & Nur, 2022). Floresan boyama teknikleri kullanılan preparatlarda hücreler aldıkları renge göre ölü, canlı veya ölmek üzere (moribund) olarak sınıflandırılmaktadır. En sık kullanılan floresan boyama tekniklerinden biri CFDI/PI boyamadır. Bu yöntemde floresan mikroskop altında membranı sağlam canlı hücrelerin yeşil, membranı hasarlı hücrelerin kırmızı veya her iki renkte de floresan ışımaya yaptıkları görülmektedir (Cámara, Silva, Almeida, Nunes, & Guerra, 2011).

Akrozom bütünlüğünün muayenesi için PNA-FITC/PI gibi kombinasyonlar kullanılabilir (Marco-Jiménez ve ark., 2005). Membran bütünlüğüne göre farklı davranan bu boyalar, yöntem ve uygulayıcılar arası farklılıklar bulunsa da elde edilecek sonuçlar kullanılan boyanın miktarı, spermatozoon sayısı, lamın veya ortamın ısısı, froinin kalınlığı, kuruma sıcaklığı ve sperma sulandırıcısının yapısı gibi faktörlerden etkilenmektedir (Nur, 2019).

Plazma membran bütünlüğünün değerlendirildiği diğer yöntem olan HOS testi ise (Hypo-osmotic swelling test) son derece ekonomik ve az miktarda kimyasala gereksinim duyulması ile birlikte, spermanın potansiyel fertilesine dair önemli ipuçları sunabilmektedir (Hafez, & Hafez, 1993; Sönmez, 2013). Spermanın normal şartlar altında ozmotik basıncı 290-310 mOsm arasındadır. Bu nedenle 250 mOsm altındaki değerler hipotonik, 350 mOsm üzerindeki değerler ise hipertotonik ortam olarak kabul edilmektedir (Sönmez, 2013). HOS testinin amacı, spermanın hipotonik ortamlar içinde 30-60 dakika süre ile inkübasyonu sonucunda spermatozoonların bu



ortama tepki verme durumunun değerlendirilmesidir. Sağlıklı spermatozoonlar bu ortamda inkübe edildiklerinde baş bölümleri şişmekte kuyruk kısımları ise kıvrılarak deforme olmaktadır. Bu reaksiyonu gösteren hücrelerin oranı hesaplanarak değerlendirme yapılmaktadır (Hafez, & Hafez, 1993; Sönmez, 2013). Genel olarak araştırmacılar bu testte sodyum-sitrat ve früktozu belirli oranlarda karıştırarak 100 mOsm olan solüsyonları kullanmaktadır (Bacinoglu, Taş, Cirit, Özdaş, & Ak, 2008; Bucak, Ateşşahin, & Yüce, 2008; Gündoğan, 2009; Kulaksız, Çebi, Akçay, & Daşkın, 2010; Uysal, & Bucak, 2007). Bunun yanında, 75 mOsm (Cirit ve ark., 2013) veya 150 mOsm (Hafez, & Hafez, 1993) değerdeki solüsyonları kullanan araştırmacılar da bulunmaktadır. HOS testi ısıtıcılı tablalı (37 °C) faz-kontrast mikroskopta 40x veya 100x büyütmede en az 200 hücre değerlendirerek sağlıklı spermatozoon oranı hesaplanmaktadır (Kulaksız ve ark., 2010). Bu test boğalarda (Bredderman, & Foote, 1969; Quintero-Moreno, Rubio, & Gonzalez, 2008; Rota, Penzo, Vincenti, & Mantovani, 2000), köpeklerde (Hishinuma, & Sekine, 2003; Pinto, & Kozink, 2008), eşeklerde (Rota, Bastianacci, Magelli, Panzani, & Camillo, 2010), koçlarda (Curry, & Watson, 1994), aygırlarda (Almin, Druart, & Barrier-Battut, 2010; Neild ve ark., 1999), ve hindilerde (Donoghue, Garner, Donoghue, & Johnson, 1996) bildirilmiştir. Buna ek olarak hiperozmotik testler de koçlarda (Curry, & Watson, 1994) ve aygırlarda da (De La Cueva ve ark., 1997) kullanılabilir.

SYBR-14 ve PI içeren NucleoCounter® SP-100™ ve akış sitometri aygıtları için geliştirilmiş hazır kitler bulunmaktadır. (Life Technologies (Invitrogen) Molecular Probes® LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit) Bu kit ile spermanın boyanması ve NucleoCounter® SP-100™ aygıtı ile analizi yaklaşık 2 dakika sürmektedir. EasyKit 1® (Ref. 024708) (IMV, Laigle, France) kiti ile akış sitometri aygıtında analiz spermanın inkübasyonu ile birlikte yaklaşık 11 dakika sürmektedir. Sperma membran bütünlüğü analizi ile aynı zamanda canlılık analizi de yapılmaktadır. Ancak sperma plazma membranı hasarlı olup boyaları almasına karşın hareketli ve motil olabilmektedir. Bu hücrelerin *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda sağlam hücreler kadar uzun süreli yaşayamayacakları düşünülmektedir (Chenoweth, & Lorton, 2014).

### 2.8.6. DNA Bütünlüğü

Spermada çeşitli nedenlere bağlı olarak farklı düzeylerde DNA hasarı oluşabilmekte ve bu hasarların boyutu embriyonik gelişimi etkileyebilmektedir. Bu hasarlar; kromatin paketlenmesi sırasında şekillenen hasarlar, reaktif oksijen türleri varlığına bağlı hasarlar ve apoptozise bağlı DNA hasarları olarak sınıflandırılmaktadır (Silva, & Gadella, 2006). Spermatozoon DNA'sının bütünlüğünü koruması, embriyonun oluşumu ve gelişimi için oldukça önemlidir. Spermatozoonlarda gözlemlenen az miktardaki DNA hasarı, embriyonik gelişimde tolere edilebilirken, ciddi DNA hasarları infertiliteye neden olabilmektedir (Seli, Gardner, Schoolcraft, Moffatt, & Sakkas, 2004). Ciddi DNA hasarı olan (tek/çift zincir kırığı olan) bir spermatozoon oositi fertilize edip ilk bölünme yarıklanması şekillenmiş embriyo açığa çıkarabilmesine karşın, oluşan embriyonun 4-8 blastomerli yapıya ulaşmasının ardından apoptozis mekanizması başlamakta ve embriyo canlılığını sürdürememektedir (Ahmadi, & Ng, 1999; Fatehi ve ark., 2006). Spermatozoon DNA'sı fertilizasyon öncesinde çevresel etkilerden korunması amacı ile protaminasyon adı verilen süreç sonucunda kompakt duruma gelmektedir. Ancak, fertilizasyon sonrasında spermatozoon DNA'sı kompakt yapısını yitirmektedir. Bu süreç sonucunda DNA'da oluşan hasarlar embriyonik gelişimin ilk aşamasında sorun oluşmasını engellemektedir. Ancak ilk bölünme sonrasında kompakt yapı göreceli olarak sürdürdüğü için hafif hasarlar sorun oluşturmazken, ciddi hasarlar fragmentasyona ve oksidasyon sonucunda embriyonik gelişimi engelleyerek embriyonik ölüme neden olmaktadır (Morris, Illott, Dixon, & Brison, 2002). Bu nedenle DNA hasarı, fertilite üzerindeki olumsuz etkisinden çok, embriyonik gelişim üzerine etkili olduğu için oldukça önemlidir (Silva, & Gadella, 2006).

Spermatozoon kromatin yapısının düzgün kompakt olmasının analizi için COMET ASSAY uygulanırken, DNA tek veya çift zincir kırıklarının analizleri için Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) boyama yöntemi kullanılmaktadır. Spermanın kromatin yapısında (DNA) oluşan anormallikler geri dönüşümsüz olarak nitelendirilmekte ve fertilite sonuçlarını ciddi biçimde etkilemektedirler. Evenson ve ark. (1980), fragmente olmuş DNA'nın denatüre edilmesi sonrasında acridine orange boyasıyla boyanmasını içeren SCSA® (Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA Diagnostics, Volga, South Dakota, USA)

analizini geliştirmişlerdir. SCSA/acridin orange analizi, diğer tekli hücrelerde DNA sarmallarının saptanması için geliştirilen COMET, DNA bitimindeki 3'-OH miktarlarının ölçmesi için geliştirilen TUNEL, SCD (Sperm Chromatin Dispersion) analizlerine göre altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu testler pek çok araştırıcı tarafından karşılaştırılmışlardır (Chohan, Griffin, Lafromboise, De Jonge, & Carrell, 2006; Evenson, 1999; Evenson, & Wixon, 2005). Aynı zamanda çeşitli faktör veya zamanlarda sperma analizinde; kriyoprezervasyonun etkisini ölçmek amacıyla tavuklarda (Gliozzi, Zaniboni, & Cerolini, 2011), koçlarda (Nur, Zik, Ustuner, Sagirkaya, & Ozguden, 2010) ve domuzlarda (Fraser, & Strzeżek, 2005); domuz spermasının kısa süreli saklanması (Boe-Hansen, Ersbøll, Greve, & Christensen, 2005; Waberski, Schapmann, Henning, Riesenbeck, & Brandt, 2011); kullanılan sulandırıcıların etkilerinin saptanmasında (Karabinus, Evenson, & Kaproth, 1991); erkek materyalin yaşına bağlı olarak değişimlerin (Karabinus, Evenson, Jost, Baer, & Kaproth, 1990) izlenmesinde kullanılmıştır.

## **2.9. Akış Sitometri**

Motilitenin yanı sıra sperm morfolojisinde fertilité arasında yüksek korelasyon bulunmaktadır (Arangasamy, Kasimanickam, DeJarnette, & Kasimanickam, 2011). Akış sitometri aygıtı dakikalar içinde 50.000 hücre analiz edebilme yeteneği olmasından dolayı, sperm alt popülasyonlarının analizi amacıyla adapte edilmiştir (Graham, 2001). Sistem, kapiller akış sırasında hücelere lazer akımı uygulayarak bireysel olarak analiz etmektedir (Hossain ve ark., 2011). Çeşitli florokrom veya floresan boyaların bulunmasıyla spermanın biyokimyasal ve yapısal fonksiyonları gibi birçok özellik objektif olarak yüksek yinelenebilirlikle ve hızlıca analiz edilebilmektedir (Seneda ve ark., 2016). Bu sistem ile oldukça heterojen hücre popülasyonları içeren sperma örneklerinde canlılık, akrozom bütünlüğü, mitokondriyal fonksiyonlar muayene edilebilmektedir (Graham, 2001; Graham, Kunze, & Hammerstedt, 1990; Graham, & Mocé, 2005; Hossain ve ark., 2011).

Canlılık analizi hücre membran bütünlüğünün belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Bu amaçla sperma propidium iodide (PI) ve 6-carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA) solüsyonlarıyla boyanmaktadır. 6-CFDA tüm spermatozoonlara giriş yapabilecek nitelikte iken, PI ancak membran bütünlüğü hasara uğradığında

hücreye giriş yapabilmekte ve DNA'yı boyayabilmektedir (Cordelli, Eleuteri, Leter, Rescia, & Spanò, 2005; Graham ve ark., 1990). Akrozom bütünlüğü ise lektinlerin (pisum sativum agglutinin; PSA veya arachis hypogaea agglutinin; PNA) floresan boya konjugatları kullanılarak muayene edilmektedir. Bu lektinlerin akrozom matriksinde bulunan mannoz, galaktoz gibi enzimlere afinitesi vardır. Lektinler akrozomal bütünlük bozulduğunda açığa çıkan bu enzimlere konjuge olarak yeşil floresan vermektedirler (Graham ve ark., 1990; Graham, 2001; Hossain ve ark., 2011). Böylelikle akış sırasında farklı ışımaya veren hücre popülasyonları analiz edilebilmektedir.

Spermanın mitokondriyal fonksiyonları ise rhodamine 123 (R123) ve MitoTacker (MITO) floresan boyaları ile muayene edilmektedir. Bu boyalar hücrenin aktif nefes alışı sırasında mitokondriye girip hücrenin orta bölümünün yeşil floresan vermesine neden olmaktadır. Thomas ve ark. (1997)'nin JC-1 florokromunu geliştirmesiyle mitokondriyal fonksiyonu yüksek hücrelerin turuncu, mitokondriyal fonksiyonu düşük hücrelerin yeşil ışımaya vermesi ile sperma içinde farklı popülasyonların oranlarının analiz edilebileceğini bildirmiştir (Graham ve ark., 1990; Gravance, Garner, Miller, & Berger, 2000; Thomas ve ark., 1997).

Akış sitometri aygıtı ile aynı zamanda hücrenin yaşam süresi (apoptozis) hakkında ve kapasitasyon sırasında etkilenen hücrenin kromatin yapısı (DNA) analiz edilebilmektedir (Cordelli ve ark., 2005; Hossain ve ark., 2011). Aynı zamanda kapasitasyon sırasında plazma membranından seminal plazmaya doğru gerçekleşen kolesterol akışı sonrası oluşan artış saptanabilmektedir. Böylelikle kapasitasyon için gerekli hücre içi serbest kalsiyum oranları hakkında da bilgi elde edilebilmektedir (Seneda ve ark., 2016).

Akış sitometri analizleri ile heterojen yapıdaki hücre süspansyonlarında düşük hacimli örnekler kullanılarak yüksek güvenilirlikte hızla sonuçlar alınabilmesi gibi avantajlara sahiptir. Ancak ekipman giderlerinin yüksek oluşu ve deneyim gerektirmesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Seneda ve ark., 2016).

## **2.10. Mikrobiyolojik Analizler**

Damızlıkta kullanım öncesinde ve kullanım sırasında sperma ile bulaşabilecek çeşitli mikrobiyal ve viral ajanlar yönünden hayvanlar rutin testlere tabi tutulmaktadır.

Damızlık koç adaylarında yönetmelik gereği; *Tüberküloz*, *Paratüberküloz*, *Koyun ve Keçi Brusellosisi (B. Melitensis)*, *Koyun Epididimitisi (B. Ovis)*, *Maedi-Visna (MVV)* ve *Caprina Arthritis/Ensaafilitisi (CAEV)*, *Mavidil/EHD*, *Pestivirus (Border hastalığı)*, *Leptospirosis* hastalıkları yönünden belirli aralıklarla test yapılması istenmektedir. Ayrıca alınan sperma, eklenti üreme bezi sıvıları da mikrobiyolojik yönden analiz edilmektedir. Spermada bulunması olası saprofit mikroorganizmalara karşı sperma sulandırıcılarına sulfanilamide, penicillin, streptomycin, dihydrostreptomycin, polymixin B, gentamicin, tylosin, lincomycin ve spectinomycin gibi çeşitli antibiyotikler ayrı ayrı ya da belirli kombinasyonlarla eklenmektedir. Eklenen bu antibiyotiklerin hepsinde olmamakla birlikte, belirli yoğunluklarda sperma üzerinde hasar oluşturma potansiyelleri bulunmaktadır (Chenoweth, & Lorton, 2014). Spermada mikrobiyal yükün saptanması, sperma içinde yabancı partiküllerin artması, reproduktif yollardaki enfeksiyonlardan şüphelenildiği durumlarda kullanılmaları gerekmektedir (Chenoweth, & Lorton, 2014).

Uluslararası boğa, aygır ve köpek sperma ticaretlerinde ülkelerin gereksinimlerine göre mikrobiyolojik kültür istenmektedir. Çeşitli araştırmacılar tarafından spermada bulunabilen ya da sperma aracılığıyla bulaşabilecek hastalıklar irdelenmiş (Cseh, Faigl, & Amiridis, 2012) ve bu hastalıklara yönelik spermaya katılabilecek antibiyotik veya koruyucu olarak uygulanabilecek diğer yöntemler bildirilmiştir (Bielanski, 2007). Boğa, koç ve domuz spermasına donmuş spermanın her mL'sinde gentamicin (250 µg), tylosin (50 µg), lincomycin-spectinomycin (150/300 µg); penicillin (500 IU), streptomycin (500 µg), lincomycin-spectinomycin (150/300 µg), amikacin (75 µg) veya divekacin (25 µg) olacak şekilde çeşitli antibiyotikler kombine veya tek olarak katılabilmektedir. Potassium penicillin ve streptomycin köpek spermalarında daha çok tercih edilirken, aygır spermalarında ticarcillin, amikacin, potassium penicillin ya da gentamicin tercih edilmektedir (Varner ve ark., 1998). Domuz spermasında en çok gantamicin yeğlenmektedir. Aynı zamanda üretilen domuz sperması rutin olarak motilite, tohumlama dozundaki spermatozoon sayısı, mikrobiyolojik kültür ve PRRS (porcine reproductive respiratory syndrome) virüsü yönünden spesifik laboratuvarlarda analiz yapılmaktadır (Chenoweth, & Lorton, 2014).

## 2.11. Spermanın Sulandırılması

Sperma soğutma, donma ve eritme aşamalarında hücre zarlarında (hücre, akrozom, mitokondri ve sitoplazma) ve organellerde dehidrasyon, proteinlerin denatürasyonu ve lipit katının stabilitesi olumsuz etkilenir. Bu olumsuz etkileri minimize etmek için uygun içeriğe sahip sulandırıcılarla sulandırılması gerekir (Hafez, & Hafez, 1993; Holt, 2000a).

Sperma sulandırıcıları ve bu sulandırıcılarda kullanılan kriyoprotektif maddelerin spermanın eritme sonrası yaşamsal aktivitesini sürdürerek fertilizasyon yeteneğini koruması üzerine büyük etkileri vardır. Spermanın dondurulması amacıyla kullanılacak sulandırıcı çeşidi, sulandırma prosedürü, dondurma ve eritme protokolü üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır (Aisen ve ark., 2000; Aisen, Medina, & Venturino, 2002; Ak ve ark., 2010; Nur ve ark., 2010).

Sperma dondurulmadan önce işlem gördüğü sulandırıcının bileşenleri ve paketlenme yöntemi, donma işlemlerinin başarısını belirler (De Leeuw, De Leeuw, Den Daas, Colenbrander, & Verkleij, 1993; Watson, 2000). Kaliteli bir sperma sulandırıcısı spermatozoitler için gerekli olan enerji gereksinimini karşılamalı, bakteriyel üremeyi kontrol etmeli, spermayı soğuk şokuna karşı korumalı ve ortamın pH değerini dengeleyebilmelidir. Bunların yanı sıra sulandırıcılarda uygun bir ozmotik basınç ve elektrolit denge sağlanması, donma sırasında hücreleri koruması için zorunludur. Sperma sulandırıcılarında enerji kaynağı olarak glikoz gibi basit şekerler, spermatozoonu soğuk şokuna karşı korumak için yumurta sarısı, süt ve bakteriyel üremeyi engellemek için ise penisilin, streptomisin gibi çeşitli antibiyotikler önerilmektedir (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000).

Sperma alma yöntemi, üreme sezonu, sulandırıcı içeriği, sulandırma miktarı, soğutma ve dondurma hızı (Ak ve ark., 2010; Nur ve ark., 2011; Woelders, 1997), kullanılan kriyoprotektif madenin türü ve yoğunluğu (Alcay, Üstüner, & Nur, 2016; Nur ve ark., 2010), kriyoprotektanın katıldığı ısı ve zamanı (Ak ve ark., 2010; Bacinoğlu, Cirit, Nur, & Ak, 2007), ekilibasyon süresi (Câmara ve ark., 2011), çözündürme ıslığı (Peña, & Linde-Forsberg, 2000) çözüm sonrası koç spermasının kalitesini etkiler.

Sperma sulandırıcıları, spermanın işlenmesi ve saklanması sırasında spermatozoonu korumak ve yaşamsal aktivitesini sürdürmek için tasarlanmıştır

(Paulenz, Söderquist, Pérez-Pé, & Berg, 2002). Günümüzde laboratuvar koşullarında hazırlanan veya ticari içerikli sulandırıcılar sıklıkla kullanılmaktadır (Hafez, & Hafez, 1993; Seneda ve ark., 2016). Bu sulandırıcılar çözüm sonrası sperm kalitesini artırmak amacıyla farklı kimyasallarla zenginleştirilmiştir. Sperma sulandırıcıları, spermatozoon metabolizmasını destekleyerek, plazma zarını stabilize ederek ve hücre içi ve zar içi iyonik yoğunlukları koruyarak pek çok yönden spermayı soğuk şoku ve ozmotik şokun yarattığı olumsuzluklardan korur. Yağsız süt veya (sitrat, glikoz ve trehaloz vb.) içeren TRIS bazlı sulandırıcılar, çoğu türde sperma sulandırıcısı olarak yaygın kullanılmaktadır (Holt, 2000a; Watson, 1995). TRIS bazlı sulandırıcıların başarısı, pH ve tonisitedeki değişikliklere karşı tamponlama kapasitesi ile ilişkilendirilmiştir (Salamon, & Ritar, 1982). Sulandırıcılarda bulunan früktoz, sitrik asit ve yumurta sarısı gibi maddeler soğutma sırasında hücre zarını korurlar. Ayrıca spermatozoon için fazladan enerji kaynaklarını oluştururlar (Salamon, & Ritar, 1982). İleri ve ark. (2000), sulandırıcılara katılan yumurta sarısında bulunan fosfolipit, lesitin, B-lipovitellin, lipoprotein ve glikoproteinlerin kriyoprotektif özellikte olduğunu, süt lipitleri ve proteinlerinin yanı sıra kazein iyonlarının da kriyoprotektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir (İleri ve ark., 2000).

5 °C ısıda saklama ve dondurma yöntemlerinde spermanın yaşamsal işlevlerini saklama ıslısı, soğutma hızı, sulandırıcının kimyasal bileşenleri ve kullanılan kriyoprotektif maddeler belirler (Nur, 2019).

## **2.12. Kriyoprotektanlar**

Soğuk şoku, donma hızı, sulandırıcı bileşenleri, ozmotik basınç gibi çok sayıda faktör spermada yaşam yeteneğinin yitirilmesine neden olurken, membran yapısı, oksidatif zararlar, membran reseptörlerinin yapısının bozulmasına yol açarak spermada fonksiyonel zararlara yol açar. Soğuk ortamın sperma üzerinde oluşturduğu bu zararları azaltmak amacıyla sperma sulandırıcılarına katılan maddelere kriyoprotektif maddeler adı verilir (Chian, & Quinn, 2010).

Dondurma amacıyla kullanılan sperma sulandırıcıları ve bu sulandırıcılara katılan kriyoprotektif maddelerin, spermanın çözdürme sonrası yaşamsal aktivitesini sürdürerek fertilizasyon yeteneğini koruması konusunda etkileri büyüktür. Spermanın dondurulması amacıyla kullanılacak sulandırıcı çeşidi, sulandırma prosedürü,

dondurma ve eritme protokolü üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır (Faigl ve ark., 2012; Holt, 2000b; Nur ve ark., 2011; Salamon, & Maxwell, 2000)

### **2.12.1. Kriyoprotektanların Keşfi**

Bazı türlere ait somatik ve gamet hücreleri kriyoprotektan kullanılmaksızın dondurulmasından sonra da yeterli düzeyde canlılık göstermektedir. Ortamın kriyoprotektan ile desteklenmesi ile daha yüksek oranda canlılık elde edilebilmektedir (Chian, & Quinn, 2010). İlk olarak gliserolün daha sonraları ise DMSO (Dimetilsülfoksit)'nun keşfi modern kriyobiyoloji biliminin temelini oluşturur. Genel olarak kriyoprotektanların keşfi Polge ve ark. (1949) tarafından horoz spermasının dondurulmasında kullanımlarına atfedilse de literatürde daha erken çalışmalar bulunmaktadır (Keith Jr, 1913; Pabst, 1935).

Günümüzde kriyoprotektan olarak sahada en fazla gliserol, DMSO, etilen glikol ve propilen glikol kullanılmaktadır. Bu kriyoprotektanların dondurma ya da vitrifikasyon sırasında sağladıkları kriyoprotektif etkinin mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır (Chian, & Quinn, 2010). Lovelock, gliserolün dondurma sırasında oluşan yüksek tuz yoğunluğunu düşürerek sıvıların faz diyagramını değiştirdiğini öne sürmüştür (Lovelock, 1953). Faz diyagramı, bir solüsyon içerisinde bir arada bulunan iki ya da daha fazla maddenin denge denklemi olarak tanımlanır. DMSO gibi kimi kriyoprotektif ajanların mekanizmalarını açıklamak amacıyla faz diyagramları yapılmıştır (Cocks, & Brower, 1974). Sıvı solüsyonların soğutulması ile birlikte su kristalize formdan katı forma dönüşmekte ve donmayan bölümlerin yoğunluğu artmaktadır. Buna bağlı olarak donma noktası aşağıya düşmekte sıvı faz ile donmuş faz arasında denge bozulmaktadır. Soğutmanın sürmesi ile sıvıların sıvı formda kalma limitleri aşarak hızla donmuş forma dönüşmektedir (Cocks, & Brower, 1974; Pegg, 2002).

Solüsyonların içine katkı maddeleri eklenerek tek başına olduğu forma göre erime ve çözünme davranışları değiştirilebilmektedir. Bunun sonucunda, katı ve sıvı fazlar arasındaki denge daha kompleks duruma gelmektedir. Özet olarak, kriyoprotektif ajanların eklenmesi ile birlikte sıvıların donma noktaları düşmekte ve sıvıların içindeki donma sırasında kristallerin oluşumu engellenmektedir (Chian, & Quinn, 2010).



Geçtiğimiz yüzyılın ortalarında gliserolün sperma dondurmasında kullanılabileceğinin keşfi (Polge ve ark., 1949) ile birlikte spermanın aylar, yıllar ve on yıllarca saklanabilmesinin önu açılmış, süt sığıru endüstrisi ve insan hekimliğine ait reproduktif teknolojilerde oldukça büyük gelişmeler yaşanmıştır. Spermanın dondurulması konusunda tür bazında; koyunlarda (Salamon, & Maxwell, 1995a, 1995b), insanlarda (Royere, Barthelemy, Hamamah, & Lansac, 1996), köpeklerde (Peña, Núñez-Martínez, & Morán, 2006), farelerde (Marschall, & de Angelis, 1999) ve genel uygulamalar hakkında geniş çalışmalar yayınlanmıştır (Bailey, Morrier, & Cormier, 2003; Holt, 2000a, 2000b).

### **2.12.2. Kriyobioloji Teorisi**

Dondurma ve çözdüme sırasında düşük sıcaklıklarda yaşanan hücre membranı, solüsyon ve kriyoprotektan arasındaki su geçişini anlamak konu hakkındaki teorileri anlamamızı sağlayacaktır.

#### **2.12.2.1. Dondurma Sırasında Gerçekleşen Fiziksel Değişimler**

Kullanılan örneğın sıcaklığı, ortam ısından donma noktasına ulaşılıncaya kadar azaldığı için sürekli değişmektedir. Örnek, donma noktasına doğru ortamdaki su molekülleri reaksiyona girerek kristaller oluşturur. Bu olay, ekzotermik bir süreç olup örneklerin sıcaklığının artmasına neden olarak ortama ısı yaymaktadır. Bu olgu kullanılan örneğın veya dondurma tekniğine göre değişmekle birlikte belirli süreler zarfında sıcaklık dengelenmekte ve sonra yeniden düşüşe geçmektedir. Spermanın payet içinde sıvı azot buharında dondurulmasında da bu olay kaçınılmaz olarak gerçekleşmektedir. Otomatik aygıtların kullanımı ile birlikte yaşanan bu sıcaklık dalgalanmaları yönetilebilir duruma gelmiştir (Chenoweth, & Lorton, 2014).

Buz kristallerinin oluşmaya başlaması ile birlikte su içinde çözülmüş olan tuz ve diğer organik komponentler serbest kalmakta ve ortamdaki yoğunlukları artmaktadır. Biyolojik hücreler bu yüksek yoğunluktaki ortamda ozmotik basıncın etkisi ile su kaybederek büzölmektedir (Chenoweth, & Lorton, 2014).

Dondurma ve çözdüme sırasında hücre membranlarında bulunan yağlarda geri dönüşümsüz olarak yapı değişimleri (translokasyonlar) oluşarak sıcaklığın düşmesi nedeni ile yarı kristalize yağ damlacıkları oluşmaktadır (Holt, & North, 1984). Soğuk

şoku, yalnızca plazma ve akrozomal membrandaki değişimlerden sorumlu olmayıp hücre içi dengenin bozulması ile birlikte, hücre içi kalsiyum düzeylerinin artıp potasyum düzeylerinin azalmasına yol açar (Chenoweth, & Lorton, 2014). Dondurma hızı ve prosedürüne bağlı olarak dondurma hızı yavaş kalırsa hücrelerin hipertonic ortamda daha uzun süre bulunmaları nedeniyle protein ve lipit yapıları zarar görmekte ve bu da daha çok reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına yol açmaktadır. Dondurmanın hızlı olduğu durumda ise hücre içinden sıvı çıkışı tam olarak şekillenememekte ve hücre içi buz kristalleri oluşumu artmaktadır (Chenoweth, & Lorton, 2014). Pratikte optimal dondurma hızı, dondurma sırasında gerçekleşen bu iki olguyu dengelemek temeline dayandırılır (Chenoweth, & Lorton, 2014).

### **2.12.3. Kriyoprotektanlar**

Kriyoprotektanlar kimyasal yapılarına ve hücre geçirgenliklerine göre çeşitli gruplara ayrılır. Etkilerini su ile etkileşime girerek buz kristali oluşumu için gerekli hidrojen bağlarını azaltarak gösterirler. Kriyoprotektanların çalışma ilkeleri oldukça karmaşıktır. Temel olarak donma noktalarının düşürülmesi ve buz kristallerini modifiye ederek donma hasarını önlemek olarak özetlenebilir (Chenoweth, & Lorton, 2014; Chian, & Quinn, 2010; Zhmakin, 2009).

Spermatozoonların dondurulmasında yaygın olarak kullanılan gliserol ve DMSO gibi kriyoprotektanlar, hücre içine girerek hücre içinde ölümcül etkiler ortaya çıkaran buz kristallerinin azaltılmasını sağlarlar. Yalnızca hücre içi olarak değil aynı zamanda hücre dışı ortamdaki su yoğunluğunu azaltarak hücre dışı olarak da etki etmektedirler. Ancak, hücre içine giremeyen polivinilpirolidon (PVP), hidroksi etil nişasta, dekstran gibi makromoleküller, hücrenin dehidrasyonunu sağlayıp dondurma noktasını düşürmek yoluyla düşük sıcaklıklarda solüsyonun viskozitesini artırarak buz kristali oluşumunu azaltmaktadır (Chenoweth, & Lorton, 2014; Chian, & Quinn, 2010; Zhmakin, 2009).

Denizayısı ve sirke kurdu gibi çok hücreli organizmalar vücut su kapasitelerinin %95'ini yitirip aşırı düşük sıcaklıklarda uzun süre yaşayabilmektedirler (Keilin, 1959). Kriyoprotektanların farklı hücre türlerine göre farklı yararları ve toksik etkileri bulunmaktadır. Örneğin gliserol kanatlı spermasında membran ve sitoplazmik yapılar ile etkileşime girerek sterilitiyi artırırken

(Hammerstedt, & Graham, 1992), domuzlarda %3'ten yüksek yoğunluklarda akrozomal yıkımlara neden olmaktadır (Gutiérrez-Pérez, de Lourdes Juárez-Mosqueda, Carvajal, & Ortega, 2009).

Hücre plazma membranlarının su ve kriyoprotektan geçirgenliği optimum dondurma protokollerinin geliştirilmesinde çok önemlidir. Kimi hücreler mükemmel ozmometre olarak çalışmakta, farklı dansitede solüsyon içinde şişip ya da büzüşmekte ve böylece biyofiziksel durumları önceden kestirilebilmektedir. Hücre dışındaki sıvılar dondukça hiperozmotik ortam oluşmakta ve hücre suyunu yitirerek büzüşmektedir. İdeal soğutma hızı bu hücrelerde kalıcı yıkımlar oluşmayacak kadar uzun, hücre içinde su kalabilecek kadar kısa olmamalıdır (Chenoweth, & Lorton, 2014).

Spermatozoon membran geçirgenliği ve optimal dondurma hızı tahmini için pek çok araştırma bulunmasına karşın (Gao ve ark., 1992, 1993; Noiles, Mazur, Watson, Kleinhans, & Critser, 1993) bu çalışmaların sonuçları arasında oldukça farklılık vardır. Son yıllarda kalorimetrik ölçümler ile çeşitli memeli ve diğer hayvanlar için tahminler yürütülebilmektedir (Alapati ve ark., 2009; Devireddy, Campbell, Buchanan, & Tiersch, 2006; Devireddy, Fahrig, Godke, & Leibo, 2004; Devireddy, Swanlund, Roberts, & Bischof, 1999; Devireddy, Swanlund, Roberts, Pryor, & Bischof, 2000; Hagiwara ve ark., 2009; Thirumala, Campbell, Vicknair, Tiersch, & Devireddy, 2006).

Fourier-transform infrared spektroskopisi (FTIR) yöntemi alternatif olarak spermatozoon membranlarının soğuk şokunda (Drobnis ve ark., 1993) ve dondurma sırasında (Oldenhof, Friedel, Sieme, Glasmacher, & Wolkers, 2010; Ricker ve ark., 2006) faz geçişlerinin saptanmasında kullanılan diğer bir yöntemdir. Aygıt sperma membranında bulunan yağ oluşumlarını oldukça duyarlı saptamaktadır. FTIR kullanılarak aygırlarda yapılan bir çalışmada optimal soğutma hızı ve plazma geçirgenliği bakımından bireyler arasında farklılık olduğu bildirilmiştir (Oldenhof ve ark., 2010; Ricker ve ark., 2006).

### **2.12.3.1. Kriyoprotektif Ajanların Gelişimi**

Gliserolün kriyoprotektif etkisi Polge vd. (1949) tarafından keşfedildikten sonra, memeli spermasını dondurmak amacıyla uygun sulandırıcı geliştirme çalışmaları hız kazanmıştır. Memeli spermasının dondurulması amacıyla içinde çeşitli

pH tamponlayıcı maddeler (TRIS-sitrik asit, Na-Sitrat, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, Test, HEPES vb.), molekül ağırlığı düşük olan ve hücre zarını geçebilen şekerler (früktoz, glikoz vb.), membran koruyucu (gliserol ve diğer polialkoller, DMSO, aminoasitler, vb.), nonpermeabl şekerler (laktoz, sükroz ve dekstran, PEG, PVP), antifriz proteinleri ve membran stabilizatörleri (yumurta sarısı, süt, lipitler ve aminoasitler) bulunan sulandırıcılar kullanılmıştır (Aisen ve ark., 2000). Çalışmalarda kullanılan bu maddelerin dondurma sırasındaki çalışma ilkelerinin aydınlatılması konusu güncelliğini korumaktadır (Chian, & Quinn, 2010; Chenoweth, & Lorton, 2014; Zhmakın, 2009).

Yumurta sarısı içinde bulunan lipoproteinlerin ilk olarak 1970'lerde sperma sulandırıcılarında kullanılabileceği bildirilmiştir. Sonraki yıllarda yumurta sarısı içinde bulunan lipoproteinlerin dışarıdan eklenmesinin aditif etkisi olduğu gösterilmiştir (Bencharif ve ark., 2010; Dong, Rodenburg, Hill, & VandeVoort, 2011; Hu ve ark., 2010, 2011; Vera-Munoz ve ark., 2011). Ancak bu katkı maddesinin sperma membranında oluşturduğu değişimler henüz tam olarak açıklanamamıştır. Eksojen lipitlerin (lesitin, fosfatidilkolin) soğutma ve dondurma sırasında spermayı koruduğu, ancak hazır ticari sulandırıcılar içine katılmasına karşın, membran faz değişimlerine katkı sağlayıp sağlanmadığı ve etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (Kubovičová, Ríha, Makarevich, Apolen, & Pivko, 2010).

Ricker et al. (2006), Fourier Transform İnfrared Spectroscopi (FTIR) tekniği kullanarak yaptıkları bir çalışmada, soya veya yumurta sarısı bazlı lesitinlerin yokluğunda spermatozoonların zarar gördüğü ve lesitinlerin sperm membranıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Ricker ve ark., 2006). Bu araştırmacılar, sığır spermasını dondurmak için, içinde yumurta sarısı lesitinleri bulunmayan hazır ticari sulandırıcıyı geliştirerek yumurta sarısı bulunan sulandırıcılarla karşılaştırıldıkları çalışmalarında, sulandırıcılar arasında çok az fark olduğunu bildirmişlerdir (Kolossa, & Seibert, 1990). Sperma saklanması için kullanılan yumurta sarısı bazlı sulandırıcılara anyonik surfaktan olan Equex (sodium triethanolamine lauryl sulfate – SLTS) katıldığında yumurta sarısı ile emülsifiye olmakta ve yumurta sarısının hücre membranı ile daha iyi etkileşime girmesini sağlamaktadır (Howard ve ark., 1986; Kaplan, & Mead, 1992; Monfort ve ark., 1993; Pontbriand ve ark., 1989).

Sperma sulandırıcılarının içeriği, soğutma ve çözündürme protokolleri sperm membran yapısındaki farklılıklar nedeniyle türler arası değişiklik gösterir. Sığır, koyun ve domuz gibi evcil çiftlik hayvanlara ait spermaların dondurulması amacıyla içinde farklı katkı maddeleri bulunan yumurta sarısı, süt gibi temel sulandırıcılar geliştirilmiştir (Lermen ve ark., 2009; Watson, & Fuller, 2001).

### **2.12.3.2. Kriyoprotektanların Sınıflandırılması**

Kriyoprotektanlar soğutma ve dondurma hızının optimizasyonuna olanak sağladığından, yavaş soğutmaya göre çözündürme sonrası canlılık oranını artırmaktadır (Lovelock, & Bishop, 1959; Scott, Lecak, & Acker, 2005; Shaw, & Jones, 2003). Kriyoprotektif etki, dondurma veya vitrifikasyon sırasında hücrelerin hasardan korunması olarak tanımlanır. Çeşitli hücre tiplerinde kriyoprotektif etkisi olan elliden fazla kriyoprotektan bildirilmiştir. Bu kriyoprotektanlar ortak olarak dondurma çözündürme sırasında hücrelerin zarar görmesini, ortamda bulunan su molekülleri üzerinden buz kristallerinin modifikasyonu yolu ile etkilerini gösterirler. Bu etkiler hücre içi ve dışı sularla etkileşime girerek oluşmaktadır (Chian, & Quinn, 2010).

Kriyoprotektif etki, hidrojen bağları, suyun iyonlar ve makromoleküller ile etkileşimleri, dielektrik yapılar, termodinamik eşitlik ve ozmoz gibi biyofiziksel ve biyokimyasal yollar üzerinden oluşturulur (Chian, & Quinn, 2010; Chenoweth, & Lorton, 2014; Zhmakin, 2009). Kriyoprezervasyon çok disiplinli ve karmaşık bir süreç olup dondurulan hücrelerin büyüklüğü, membran geçirgenliği, lipit içeriği ve diğer faktörlerden etkilenmektedir. Bu nedenle, dondurma protokolleri oturtulurken bu değişkenler göz önünde bulundurulmalıdır (Chenoweth, & Lorton, 2014). Kriyoprotektanlar, moleküler ağırlığına ve hücre zarını geçebilme yeteneğine (penetrasyon), göre sınıflandırılırlar. Moleküler ağırlığına göre sınıflandırmada düşük [metanol, etanol, etilen glikol (EG), propilen glikol (PG), dimetilsülfoksit (DMSO)] veya yüksek (polimerler, proteinler, polisakkaritler, PEO, PEG-6000, dekstran, HES ve PVP) moleküler ağırlıklı olarak sınıflandırılmaktadır (Hubalek, 2003; Nash, 1966).

Hücre zarına penetrasyon yeteneklerine göre, hücre zarını geçebilen (permeabl) ve geçemeyenler (nonpermeabl) kriyoprotektanlar olarak sınıflandırılmaktadır (Hubalek, 2003; Meryman, 1971; Bucak, & Tekin, 2007). Ayrıca hücre zarını geçebilen kriyoprotektanlar, hücre içine giriş hızlarına göre 30 dk gibi kısa

zaman içinde hücre membranını hızla geçen [metanol, etanol, etilen glikol (EG), propilen glikol (PG), Dimetilsülfoksit (DMSO)] kriyoprotektanlar ve hücre membranını daha yavaş geçen (gliserol) kriyoprotektanlar olarak ta sınıflandırılmaktadır (Meryman, 1971).

Gliserol gibi kriyoprotektanların zar permeabilitesi, ortam ısısı ve hücre tipine bağlı olarak değişir. Kimi koşullarda penetre olan kriyoprotektanlar düşük geçirgen olarak sınıflandırılmaktadır (Meryman, 1971). Kimi kriyoprotektanlar yalnızca hücre duvarını geçerken kimileri sitoplazmik membranı da geçer. Penetrasyon yeteneğine bağlı olarak kriyoprotektanlar; (i) hücre zarını ve sitoplazmik membranı geçenler ( $Me_2SO$ , gliserol), (ii) yalnız hücre duvarını geçenler (mono- ve disakkaritler, aminoasitler, molekül ağırlığı düşük olanlar örneğin PEG-1000 polimerleri) ve (iii) hücre duvarını geçemeyenler (moleküler ağırlığı yüksek olan polimerler, proteinler, polisakkaritler, PEO, PEG-6000, dekstran, HES ve PVP) olmak üzere üçe ayrılırlar (Hubalek, 2003, Tao, & Li, 1986).

Çeşitli canlı hücreleri ve mikroorganizmaların dondurulması amacıyla kullanılan kriyoprotektanlar kimyasal yapılarına göre sülfoksitler (dimetilsülfoksit), mono hidrik alkoller ve türevleri (metanol, etanol ve polivinil alkol), dioller (etilen glikol, propilen glikol, trimetilen glikol, dietilen glikol, polietilen glikol, polipropilen glikol, polietilen oksit), trioller (gliserol), polialkoller (mannitol, sorbitol, düsitol), monosakkaritler (glukoz ve ksiloz), disakkaritler (sükroz, laktoz, maltoz, trehaloz), trisakkaritler (rafinoz), polisakkaritler (dekstran, mannan, dekstrin, hidroksietil nişasta, ficoll Arap zamkı), amidler, N-alkilamidler ve imidler (asetamid, metilasetamid, dimetilformamid, dimetilasetamid süksinamid), heterosiklik bileşikler (metilpirolidon, polivinilpirolidon), amino ve karbonik asitler (prolin, glisin, glutamik asit, aminobütirik asit, glutarik asit, amonyum asetat, EDTA), proteinler, peptitler, polipeptitler, glikoproteinler serum, albüminler, jelatin ve peptonlar olarak ayrılırlar (Chian, & Quinn, 2010; Hubalek, 2003).

Dondurma protokolü spermatozoonların yapısı, hacmi, organel büyüklüğü ve bileşenlerindeki çeşitliliğe bağlı olarak türler arasında farklılık gösterir (Medeiros, Forell, Oliveira, & Rodrigues, 2002). Kriyoprotektif maddelerin etkisi, soğutma hızına ve türe bağlı olarak değişmektedir (Hafez, & Hafez, 1993). Mono-, oligo-, ve polisakkaritler, mannitol, sorbitol, dekstran, hidroksietil nişasta (HES), metil selüloz,

albümin, jelatin, diğer proteinler, polivinilpirolidon (PV), polietilen glikol (PEG), polietilen oksit (PEO) ekstrasellüler kriyoprotektanlar olup hücre içine giremezler (Hubalek, 2003; Tao, & Li, 1986).

#### **2.12.3.2.1. Hücre İçine Girebilen (Permeabl) Kriyoprotektanlar**

Gliserol, etilen glikol, 1,2 propanediol, DMSO, metanol, asetamid, adenitol, perseitol, metil formamid gibi hücre içine girebilen kriyoprotektanlar genellikle küçük yapılı, düşük sıcaklıklarda suda yüksek çözünürlükte olan noniyonik bileşenlerdir (Gao, & Crister, 2000). Bu bileşenler, hücre membranına penetre olup sitoplazmaya geçebilme özelliklerinden dolayı permeabl kriyoprotektanlar olarak adlandırılır. Koruyucu etkilerini, dehidrasyonu düzenleyip protein yapılarını korumaları ile birlikte, donma sırasında ortamda bulunan elektrolit yoğunluklarının azaltması ve hücrelerde düşük sıcaklıklarda oluşan ozmotik büzüşmeyi azaltmaları ile gerçekleştirmektedirler (De Leeuw ve ark., 1993; Holt, 2000a).

Kriyoprotektanlar aynı zamanda içine katılmış oldukları solüsyonların mekanik özelliklerini de değiştirir. Viskozitesi artan solüsyonlarda kristalizasyonu kontrol altına alırlar (Fernández-Santos, Estes, Montoro, Soler, & Garde, 2006; Gomes, Jacob, Medeiros, Papa, & Alvarenga, 2002). Hücre içine girebilen propilen glikol (propane-1, 2-diol), etilen glikol [ $C_2H_4(OH)_2$ , EG], gliserol ( $C_3H_5(OH)_3$ ), dimetilsülfoksit gibi maddeler elektrolit yoğunluğunu artırıp hipertonic ortam sağlayarak hücrelerin sularını yitirmesine ve büzüşmesine neden olurlar (Chen ve ark., 2001).

Hücrenin düşük ısılarda rehidrasyonu lipit katmanların jel formunda olmasından dolayı yüksek ısılardakine göre daha tehlikelidir (Bryant, Koster, & Wolfe, 2001). Kriyoprotektanlar çözdürme sırasında, hücre zarından hızlıca dışarı çıkamazlarsa hücrenin şişmesine neden olurlar. İleri düzeyde su girişlerinde ozmotik şok ve lipit katmanların düşük elastikiyetinden dolayı patlamasına (turgor) neden olur (Küçük, & Başer, 2007). Spermatozoon ve oosit hücrelerinin membran geçirgenliği türler arasında farklılık gösterir (Pedro ve ark., 2005). Permeabl kriyoprotektanların başarısı hücre içine giriş hızı ile ilgilidir. Bu hız, viskozite gibi pek çok faktörden etkilenmektedir. Aynı zamanda hücrelerin membran yapıları da geçiş hızına etki etmektedir (Chenoweth, & Lorton, 2014; Chian, & Quinn, 2010).

### **2.12.3.2.1.1. Sülfoksitler**

Kriyoprotektan olarak kullanım alanları geniş olan dimetilsülfoksitin yapısı hidrofildir. Dimetilsülfoksit hem sulu hem de organik medyumlarda çözücü olarak kullanılmaktadır (Santos, Figueira-Coelho, Martins-Silva, & Saldanha, 2003). DMSO virüs, bakteri, riketsiya, mikoplazma, klamidy ve siyanobakteriler birçok mikroorganizmanın dondurulmasında kriyoprotektan olarak kullanılmıştır (Hubalek, 2003). Ayrıca farklı türlere ait embriyo ve spermanın dondurulmasında da kullanılmıştır (Chen, 1986; Kim ve ark., 2011; Rasul, Ahmed, & Anzar, 2007; Vicente, & Viudes-de-Castro, 1996; Wegener, & Bienefeld, 2012). Dimetilsülfoksitin ek olarak reaktif oksijen türlerinin azaltılmasında da rolü bulunmaktadır (Santos ve ark., 2003). Reprodüktif dokularda kriyoprotektan olarak kullanılmasında bazı endişeler bulunmaktadır (Gardner, Sheehan, Rienzi, Katz-Jaffe, & Larman, 2007; Johnson, & Pickering, 1987; Karran, & Legge, 1996; Van der Elst, Nerinckx, & Van Steirteghem, 1992; Vincent, Garnier, Heyman, & Renard, 1989; Vincent, Pickering, & Johnson, 1990; Vincent, Pickering, Johnson, & Quick, 1990).

### **2.12.3.2.1.2. Amidler- İmidler**

#### **2.12.3.2.1.2.1. Formamid**

Formamid (methanamide) seyrek olarak kriyoprotektan amacıyla kullanılmaktadır. Düşük moleküler ağırlığı ve düşük viskozitesi nedeni ile geleneksel olarak kullanılan gliserole alternatif olabileceği bildirilmektedir (Alvarenga, Papa, Landim-Alvarenga, & Medeiros, 2005; Chian, & Quinn, 2010). Metilformamid ve dimetil formamidin atlarda gliserole denk ya da daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Alvarenga ve ark., 2005; Medeiros, Gomes, Carmo, Papa, & Alvarenga, 2002; Squires, Keith, & Graham, 2004). Dimetilformamid kaz spermasında da başarılı olarak kullanılmıştır (Lukaszewicz, 2002). Metil formamid köpek spermasında başarılı olarak kullanılırken dimetil fomamidinin CP olarak ekili olmadığı bildirilmiştir (Futino, Mendes, Matos, Mondadori, & Lucci, 2010). Metil formamidin fare spermasında kullanımının başarılı olmadığı bildirilmesine karşın (Sztejn, Noble, Farley, & Mobraaten, 2001), metil formamid ve dimetil formamidin



ile diğerk amidlere göre tavşan spermasında daha iyi sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Hanada, & Nagase, 1980).

#### **2.12.3.2.1.2.2. Asetamid**

Asetamid (asetik asit amid, ethanamid) embriyo vitrifikasyonunda kullanılan kriyoprotektanlardan biridir (Rall, & Fahy, 1985). Fare embriyolarında asetamidin membran geçiş hızı incelenmiş ve 8 hücreli evrede hücre membranı geçiş hızının oldukça arttığı bildirilmiş (Pedro ve ark., 2005) ancak at spermasında kullanılması ile yüksek canlılık yakalanamamıştır (Squires ve ark., 2004). Bunun yanında diğerk kriyoprotektanlar ile birlikte kullanımı ile 2 hücreli fare embriyoları, ovaryum dokuları (Migishima ve ark., 2003), tavşan pronükleer zigotu (Hochi ve ark., 2001), domuz ve kobay blastosistleri (Kono, Suzuki, & Tsunoda, 1988; Yoshino, Kojima, Shimizu, & Tomizuka, 1993) ve fare oositleri başarılı bir şekilde dondurulabilmiştir (Nakagata, 1989). Kriyoprotektan olarak kullanımı sırasında dikkatli olunmalıdır. Asetamidleri %30-40 oranlarında hazırlanan solüsyonlar ile 8 hücreli fare embriyoları dondurulamamış, çözündürme sonrası artan morfolojik bozukluklar ve blastosist aşamasına geçiş gerçekleşmemiştir (Mukaida ve ark., 1998). Ayrıca fare embriyolarının 1,5 mol/L asetamid içeren solüsyon ile kısa süreli muamelesinde toksik etkilerin en az olduğu bildirilmiştir (Pedro ve ark., 2005).

#### **2.12.3.2.1.2.3. Diğerk Amidler**

Propionamid, laktamid, butriamid, maloamid sperma dondurulmasında denenmiş ancak sınırlı başarı elde edilmiştir (Hanada, & Nagase, 1980). Ancak bu tür amidler ile birlikte metil asetamid, demetilasetamid ve süksinimidler mikrobiyolojide başarılı olarak kullanılmasına karşın yardımcı üreme tekniklerinde kullanımları sınırlıdır (Hubalek, 2003).

#### **2.12.3.2.1.3. Alkoller (Monohidrik, diyoller, triyoller, poliyoller)**

##### **2.12.3.2.1.3.1. Metanol**

Metanoller çeşitli mikroorganizmalarda kriyoprotektan olarak yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Hubalek, 2003). Metanollerin sucul türlerde gamet ve embriyo

dondurulmasında kullanımına yönelik çokça literatür bulunmakla birlikte (Guan, Rawson, & Zhang, 2008; Nascimento ve ark., 2005; Tervit ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2005), memelilerde reproduktif dokularda kullanımına yönelik az yayın bulunmaktadır. Atlarda embriyo dondurulmasında kullanımı ile birlikte gliserole yakın sonuçlar elde edilebileceği bildirilmiştir (Bass ve ark., 2004).

#### **2.12.3.2.1.3.2. Propilen Glikol**

Propilen glikol losyon ve kremlerde çözücü, ayrıca gıda takviyesi amacıyla dondurmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle düşük düzeylerde kullanımının toksik olmadığı kabul edilmektedir. Sığır embriyolarının 1,6 mol/L yoğunluğunda solüsyona 30 dakika muamele edilmesinin toksik etkilerinin olmadığı bildirilmiştir (Takagi, Boediono, Saha, & Suzuki, 1993a; Takagi, Otoi, & Suzuki, 1993b). Propilen glikol memeli spermasında (Polge ve ark., 1949) ve insan embriyolarının dondurulmasında ilk kullanılan kriyoprotektanlardan biridir (Testart ve ark., 1986).

#### **2.12.3.2.1.3.3. Etilen glikol**

Etilen glikol çoğunlukla araçlarda antifriz olarak kullanılmaktadır. Fare oositleri ve iskelet kasları morfolojileri üzerinde sınırlı etkileri bulunmaktadır (Hotamisligil, Toner, & Douglas Powers, 1996). Sığır embriyolarının 1,6 mol/L yoğunluğundaki solüsyon ile 30 dakika muamelesinin embriyo gelişimi üzerine olumsuz etkisi olmadığı bildirilmiştir (Takagi ve ark., 1993a, 1993b). Fare epididimal spermasının etilen glikol geçirgenliği çok yüksek olup (Cooper, Barfield, & Yeung, 2008), kriyoprotektan olarak sperma, oosit ve embriyoda kullanımına yönelik pek çok protokol bulunmaktadır (Alvarenga ve ark., 2000; Najafi ve ark., 2017; Shaw, Kuleshova, Macfarlane, & Trounson, 1997).

#### **2.12.3.1.2.3.4. Butilen glikol**

Butilen glikol (1,3-butanediol) reproduktif dokuların dondurulmasında kriyoprotektan olarak genellikle kullanılmamaktadır. Tek başına 1,1 mol/L oranda kullanılmaları ile sığır blastosistlerinde yeterli başarı elde edilememesine karşın (Suzuki ve ark., 1993), sığır ve fare blastosistlerinde diğer kriyoprotektanlar ile

kombine kullanılmasıyla kabul edilebilir düzeyde başarı elde edilebilmiştir (Pugh, Tervit, & Niemann, 2000; Valdez, Mazni, Takahashi, Fujikawa, & Kanagawa, 1992). Diğer kriyoprotektanlara göre butilen glikolün koyun ve fare embriyoları üzerinde en toksik kriyoprotektan olduğu, fare oositleri membranlarında anomalilere neden olduğu bildirilmiştir (Ali, & Shelton, 1993).

#### **2.12.3.2.1.3.5. Gliserol**

Gliserol kriyoprotektan olarak en yaygın kullanılan ve araştırılan şeker alkolüdür. 1930'lu ve 1940'lı yıllarda çeşitli türlerde erkek gametlerin dondurulmasında kullanılan ilk kriyoprotektandır (Hoagland, & Pincus, 1942; Parkes, 1946; Polge ve ark., 1949). Gliserolün hücre membranından geçiş hızı diğer kriyoprotektanlara göre daha yavaştır. Bu nedenle, hücre düzeyinde ozmotik strese neden olmasına karşın kriyoprotektan olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Abdelhakeam, Graham, & Vazquez, 1991; Edashige ve ark., 2007; Fiser ve ark., 1987; Seki ve ark., 2007; Valdez Jr ve ark., 2006). Gliserolün kriyoprotektif etkisini, hücre içinde bulunan suyu uzaklaştırarak ve hücre içi ve hücre dışı ozmolariteyi (tonisiteyi) artırarak oluştursa da özellikle 30 °C ve 5 °C'de motiliteyi ve dolayısıyla fertilizasyon yeteneğini olumsuz etkiler. Ayrıca, akrozom reaksiyonunu hızlandırarak koyunlarda intraservikal tohumlama sonuçlarını olumsuz etkiler (Abdelhakeam ve ark., 1991; Fiser ve ark., 1987).

Taze spermaya gliserol katılmasının toksik etki oluşturduğu, dondurma eritme sırasında dondurma hasarlarına neden olarak sığırlarda çözdürme sonrası motiliteyi ve fertiliteyi düşürdüğü bildirilmiştir (Alvarenga ve ark., 2005; Vishwanath, & Shannon, 2000). Ayrıca kısıraklarda kontraseptif etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Squires ve ark., 2004). Gliserol toksisitesinin doğası tam olarak bilinmemekle birlikte, protein denatürasyonuna neden olup plazma zarını değiştirerek ve aktin etkileşimlerini bozarak zararlı etkilerini oluşturduğu ileri sürülmektedir (Fahy, 2010). Ayrıca hücre zarını geçiş hızı ve düşük ısılarda hücreler üzerinde oluşturduğu ozmotik stres ile gliserolün zararlı etkileri açıklanmaya çalışılmıştır. Gliserolün toksisitesini azaltmak amacıyla, çözdürme sonrası aşamada karşılaştırılabilir veya daha iyi sonuç veren daha az toksik bir CP bulma fikriyle, hücre içine giren (Najafi ve ark., 2017) ve hücre içine giremeyen (Cabrita ve ark., 2001; Rakha ve ark., 2017) CP'lerin araştırılmasına

yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda CP'ler saf (Gloria ve ark., 2019) veya kombine şekilde kullanılmıştır (Rakha ve ark., 2017; Vafaei ve ark., 2019).

#### **2.12.3.2.1.3.6. Adonitol**

Adonitoller poliyol ya da şeker alkolleri olarak bilinmekte, içerdikleri hidroksil grupları yardımıyla plazma membranı ve suyla hidrojen bağları ile etki oluşturmaları nedeni ile kriyoprotektan olarak kullanılmaktadırlar (Utsumi, Hochi, & Iritani, 1992) Bu tip maddelerin kriyoprotektif etkileri hidroksil gruplarının sayısının artması ile artmaktadır (Utsumi ve ark., 1992). Adonitol fare spermasının saklanması için kullanılmış ancak geleneksel kriyoprotektanlar (DMSO) kadar başarı elde edilememiştir (Sztein ve ark., 2001). Ayrıca adonitol ve diğer poliyoller koç (Molinia, Evans, & Maxwell, 1994) ve insan (Alvarez, & Storey, 1993) spermasının saklanması için kullanılmış ancak tek başlarına gliserol kadar başarı gösterememişlerdir. Fare embriyolarının hızlı dondurulmasında 1 mol/L yoğunluğunda diğer poliyollere ve DMSO'ya göre daha yüksek canlılık elde edilmiştir (Utsumi ve ark., 1992).

#### **2.12.3.2.1.3.7. Diğer alkoller**

Etanol, mikroorganizmaların saklanması için yoğun olarak kullanılmasına karşın reproduktif hücre ve dokuların dondurulmasında yaygın olarak kullanılmamaktadır. Diğer alkoller ve deriverleri trimetilen glikol, dietilen glikol, polietilen oksit ve polipropilen glikol çeşitli bilimsel disiplinlerde kullanılmaktadır (Hubalek, 2003). Ayrıca eritritol, sorbitol, ksitiritol gibi poliyoller embriyo saklanması için kullanılmaktadır (Utsumi ve ark., 1992).

#### **2.12.3.2.2. Hücre İçine Giremeyen (Nonpermeabl) Kriyoprotektanlar**

Nonpermeabl kriyoprotektanlar, sıvı ve katyonlara karşı hücre membranlarının geçirgenliğini artırarak ozmotik strese karşı dirençli duruma getirirler. Aynı zamanda, hücrede donma-çözünme olayları sırasında oluşan lipid peroksidasyonunu azaltarak hücreyi korurlar. Nonpermeabl kriyoprotektanlar; makromoleküller ve sakkaritler olarak ikiye ayrılır. Polietilen glikol, ficoll 70, BSA, dekstran, mannitol ve polivinilprolidon gibi maddeler makromoleküller arasında yer almaktadır. Özellikle

hücreleri yağ asitlerinin peroksidasyondan koruyan sığır serum albümini (bovine serum albumin; BSA) çok sayıda çalışmada bildirilmiştir (Ball, & Vo, 2001; Cabrita ve ark., 2001; Kasai, 1996). Hücre içinde oluşan kristaller ölümcül etki oluşturduklarından glikoz, sükroz, trehaloz ve rafinoz gibi sıklıkla kullanılan sakkaritler kristalleşmeyi engellemek için hücrede dehidrasyon oluşturan maddeler arasında sayılabilir (An, Iwakiri, Edashige, Sakurai, & Kasai, 2000; McWilliams, Gibbons, & Leibo, 1995).

Hücre dışı (nonpermabl) kriyoprotektanlar (sükroz, trehaloz, d-mannitol, laktoz) hücrenin sıvı kaybetmesini hızlandırarak hızlı soğutma sırasında yaşama şansını artırmaktadır. Kimi kriyoprotektanlar; gliserol ve sakkaritler, dondurma sırasında proteinlerin denatürasyonunu da engellemekte ve kolay eriyebilen kristallere neden olmaktadır. Dimetilsülfoksit, gliserol, disakkaritler, ve diğerleri gibi düşük molekül ağırlıklı maddelerin yanı sıra yüksek molekül ağırlıklı polimerler ve metalik nanopartiküller kriyoprotektan olarak kullanılabilir (Orief, Schultze-Mosgau, Dafopoulos, & Al-Hasani, 2005; Strambini, & Gabellieri, 1996; Thirumala, Forman, Monroe, & Devireddy, 2007). Sulandırıcı ya da tampon çözeltiler içine zaman zaman fetal buzağı serumu eklenebilmekte ancak enfeksiyon ajanlarınca kontaminasyon riskini artırmaktadır (Campbell, & Brockbank, 2007; Corsini, Hacker, & Bare, 2004).

Hücre kriyoprotektan içeren solüsyonların içine bırakıldığında hipertonic ortam nedeni ile suyunu yitirir ve hacmi azalır (Mullen, Agca, & Critser, 2004). İlk büzülmeden sonra kriyoprotektan ve su yeniden hücre içine giriş sağlayarak denge oluşur ve hücre şişmeye başlar. Kriyoprotektanların hücre içinden dışarı çıkması sırasında da tersi gerçekleşir (Salinas-Flores, Adams, & Lim, 2008). Bu sırada eğer hücre aşırı olarak şişerse membranda geri dönüşümsüz yıkımlar oluşur. Bu yıkımlar yeni membranı onaracak (rejenere) kadar zaman ve materyal bulunamamasından kaynaklanır (Reinhoud, Van Iren, & Kijne, 2000).

Kriyoprotektan ajanların kalite parametrelerinden bir tanesi bağladığı su molekülü miktarıdır. Örneğin propilen glikol 30 su molekülünü bağlama kapasitesindedir (Küçük, & Başer, 2007). Gliserol; daha çok memelilerde, etilen glikol ve DMSO; kanatlılarda, gliserol, metanol ve DMSO; balık türlerinde kullanılmaktadır. Etilen glikol ise düşük molekül ağırlığından dolayı yüksek membran geçiş yeteneği bulunduğu ve düşük toksisitesi nedeniyle daha çok oosit ve embriyo dondurmalarında

kullanılmaktadır (Anchamparuthy, 2007). Kriyoprotektanların etkinliği birbirine yakın türler hatta aynı tür içinde bile çok değişkenlik göstermektedir. İki kanatlı türü olan turna kuşu ve hindi arasında altı kat etkinlik farkı bildirilmiştir (Blanco, Long, Gee, Donoghue, & Wildt, 2008). Memeli türlerinin spermasının oldukça geniş yelpazede ozmotik direnç yetenekleri vardır. Araştırmacılar bu farklılığın hücrelerin ulaşabileceği son hacminden ve membranların hidrolik iletkenlik yeteneklerinden kaynaklandığını bildirmektedir (Ball, & Vo, 2001; Gilmore, Liu, Peter, & Critser, 1998; Rutllant, Pommer, & Meyers, 2003)

Tür spesifik farklılıklarda kriyoprotektanların izotonik medyumlarda toksik etkileri de oldukça önemlidir. Kriyoprotektanlar hücre membranını geçirgenliğini ve protein kinetiklerini değiştirerek etki etmektedirler. Kriyoprotektan ajanlar oda sıcaklığında hücre zarı ile etkileşime geçerek lipid katmanları arasındaki proteinlerde konformasyonu değiştirmektedir (Crowe ve ark., 1988).

En çok kullanılan Gliserol ve DMSO'nun erime noktasını değiştirmesi ve erime noktalarındaki kolay eritme özellikleri Pegg tarafından çalışılmıştır (Pegg, 2022). Küçük sakkaritler su içerisinde çok az miktarda yer kaplamakla birlikte, solüsyonlara katıldıklarında membran ile aralarına 1 nm dolayında bir boşluk kalmaktadır. Bu durum, dondurma sırasında düşük hidrasyona uğramasına neden olmaktadır. Oligosakkaritler ve düşük molekül ağırlıklı bileşikler hücre membranını ile daha yakın uzaklıkta bulunmakta ve bu nedenle daha güçlü hidrasyona neden olarak, membranların sıvı fazdan jel faza geçiş sırasında geçirgenliğini artırmaktadır (Bryant ve ark., 2001).

Yoon ve ark., nükleer manyetik rezonans yardımı ile hücre zarının dondurma sırasında lamellar faz değişimine kriyoprotektanların (sorbitol, DMSO, trehaloz, sakkaroz) etkisini incelemiştir (Yoon, Pope, & Wolfe, 1998). Bu yöntem donmamış fraksiyonların ölçümüne olanak sağlamıştır. Dondurma sırasında hücre yaklaşık %10 dolayında önemli su kaybı yaşamakta ve hücre içinde su ile etkileşime girmeyen bileşenlerin yoğunluğu artmaktadır. Bu bileşenler hücre membranına yakın olduğunda (boşluk 1 nm ve daha az olabilir) itici hidrasyon kuvveti membran deformasyonuna yol açabilecek yüksek değerlere ulaşabilmektedir. Bu koşullarda genellikle lamel fazlarına benzeyen membran yığınları gözlemlenmektedir (Yoon ve ark., 1998).

Kriyoprotektanların rolü su yapısını bozmak ve böylece membranlar arasındaki itici hidrasyon etkileşimini azaltmaktır. Düşünülen tüm kimyasalların lameller fazın hidrasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, düşük yoğunluklu trehaloz ve sakkaroz çözeltilerinde saf ozmotik etkinin egemen olduğu bulunmuştur.

#### **2.12.3.2.2.1. Şekerler**

Hücre dışı kriyoprotektanlar genellikle mono-, oligo- ve polisakkarit yapısında şekerlerdir. Bu şekerlerden kimileri çeşitli bitki ve hayvan türlerinde soğuk iklimlerde korunma amacıyla kullanılmaktadır (Fuller, 2004). Kriyobiyojoloji biliminde kullanımları da aynı mantıklardır. Monosakkaritler disakkaritlere göre daha hızlı çözünmekte ve düşük sıcaklıklarda vitrifiye olmaktadır (Kuleshova, Macfarlane, Trounson, & Shaw, 1999). Ancak hücre tarafından enzimatik olmayan glikoliz amacıyla kullanılabilen ve böylelikle protein interaksiyonuna neden olabilmektedir. Bu nedenle çoğu dondurma protokolleri di- ve poli -sakkaritler ile dizayn edilmektedir (Chian, & Quinn, 2010).

Çeşitli çalışmalar ile birkaç şekerin 10 dakika boyunca 7 mmol/L'ye kadar yoğunluklarda oositler ve embriyolar için toksik olmadığı gösterilse de (Kuleshova ve ark., 1999), daha yüksek yoğunluklarda veya uzun sürelerde diğer şekerler hücre morfolojisini ve işlevselliğini etkileyebilmektedir (Kuleshova ve ark., 1999; Vincent, Turner, Pickering, & Johnson, 1991). Kriyoprezervasyon sırasında farklı şekerlerin farklı koruma düzeyleri sağladığını (Arns, Webb, Kreider, Potter, & Evans, 1987; Fernández-Santos ve ark., 2007; Kuleshova ve ark., 1999; McWilliams ve ark., 1995; Yıldız, Kaya, Aksoy, & Tekeli, 2000) ve bunun ortam kompozisyonuna ve soğutma koşullarına bağlı olarak değişebileceği bildirilmiştir. Bu değişiklikler şekerlerin vitrifikasyon solüsyonlarında farklı cam geçiş sıcaklıklarına sahip olmasından kaynaklanabilir (Kuleshova ve ark., 1999).

#### **2.12.3.2.2.1.1. Monosakkaritler**

##### **2.12.3.2.2.1.1.1. Glikoz**

Glikoz, altı karbon atomlu bir heksoz şekeridir. Bu şekeri, gametler ve embriyolar bir enerji kaynağı olarak kullanır ve bu nedenle milimolar yoğunluklarda

kültür ortamlarında yer alır. Ancak spesifik bir kriyoprotektif ajan olarak kullanımı yaygın değildir. Glikoz, doğadaki organizmaların kendilerini soğuk, sert iklimlerden korumak için kullanıldığı görülen şekerlerden biri olmasına karşın (Fuller, 2004), üreme metodolojisinde yaygın olarak dikkat çekmemiştir.

#### **2.12.3.2.2.1.1.2. Galaktoz**

Galaktoz, nüfuz etmeyen bir kriyoprotektan olarak sınırlı dikkat çeken başka bir heksoz şekeridir. Glikolize olmayan disakkarit şekerlerinin kullanımı ile karşılaştırıldığında, galaktozun sulandırıcıya eklenmesi durumunda aygır spermatozoonlarının motilitesine zararlı etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Arns ve ark., 1987).

#### **2.12.3.2.2.1.1.3. Arabinoz**

Arabinoz, sulandırıcıya eklendiğinde aygır spermatozoonlarının motilitesine zararlı olduğu da bildirilen bir pentoz şekeridir (Arns ve ark., 1987). Früktoz, ksiloz ve mannoz gibi diğer monosakkaritler, geyik sperması için kriyoprotektif ajanlar olarak kullanımına yönelik sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır (Fernández-Santos ve ark., 2007). Mannozun aslında fare embriyolarını 0 °C'de kısa süreli depolama için korumada en az etkili iki şekerden biri olduğu bildirilmiştir (Kasai, 1986).

#### **2.12.3.2.2.1.2. Disakkaritler**

Tür ve hücre hattına bağlı olarak her bir disakkarit farklı düzeyde kriyoprotektif etki gösterir (De Leeuw ve ark., 1993; Holt, & North, 1994).

#### **2.12.3.2.2.1.2.1. Sakkaroz**

Günümüzde permeabl kriyoprotektanlarla birlikte bir katkı maddesi olarak, sakkaroz çok çeşitli türlerde ve çeşitli üreme dokularında farklı donma-çözülme protokollerinde kullanılmaktadır (Luyet, & Hodapp, 1938; Fuller, 2004). Sakkaroz, çeşitli bitkiler ve hayvanların kullandığı, organizmanın donma sırasında zarar görmesini önlemek için kullanılan bir şekerdir (Fuller, 2004). Sakkaroz ilk olarak kurbağa spermatozoonlarını vitrifiye etmek için kullanılmıştır (Luyet, & Hodapp,



1938). İnsan pronükleer evre embriyolarının başarılı şekilde saklanması sakkaroz kullanıldığı bildirilmiştir (Testart ve ark., 1986).

#### **2.12.3.2.2.1.2.2. Trehaloz**

Trehaloz, doğada donmayı tolere edebilen organizmalarda doğal olarak bulunan bir şekerdir. Kriyobiyolojide büyük ilgi görmüş ve benzersiz özellikleri nedeniyle diğer hücre sistemlerinde yaygın olarak kullanılmıştır (Aboagla, & Terada, 2003; Aisen ve ark., 2000, 2022; Bohlool ve ark., 2015; Eroglu, Bailey, Toner, & Toth, 2009; İnanç, Güngör, & Ata, 2019; Öztürk ve ark., 2020). Trehalozun hidrasyon yarıçapı diğer şekerlerinkinden yaklaşık 2,5 kat daha büyüktür (Sola-Penna, & Meyer-Fernandes, 1998) ve proteinlerin hidrasyon kabuklarından dışlanmasına neden olarak protein stabilitesini arttırlar (Lin, & Timasheff, 1996). Trehaloz, çeşitli embriyo vitrifikasyon protokollerinin (Begin, Bhatia, Baldassarre, Dinnyes, & Keefer, 2003; Honadel, & Killian, 1988; Isachenko ve ark., 2003; Saha ve ark., 1996; Valdez ve ark., 1992) bir bileşeni olarak ta kullanılmış, ancak fare pronükleer evre embriyolarının vitrifikasyonu / ısınmasında sakkaroz veya rafinozdan daha kötü sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Bagis, Sagirkaya, Mercan, & Dinnyes, 2004). Ek olarak, trehaloz hücre zarları geçemeyen nonpermeabl bir kriyoprotektan olduğundan, oositlere mikroenjeksiyon yöntemiyle uygulanmış ve insan ve fare embriyolarının dondurularak saklanmasına yarar sağladığı bildirilmiştir (Eroglu ve ark., 2002, 2003, 2009). Aynı zamanda trehalozun fare (Storey ve ark., 1998; Sztein ve ark., 2001), koç (Aisen ve ark., 2000, 2002), boğa (Chen ve ark., 1993) ve aygır (Squires ve ark., 2004; Vafaei ve ark., 2019) spermasının dondurulmasında olumlu etkileri gösterilmiştir.

#### **2.12.3.2.2.1.2.3. Laktoz**

Laktoz, sütte yaygın olarak bulunan ve bir glikoz molekülü ve bir galaktoz molekülünden oluşan disakkarittir. Laktoz, sığır sperması için kriyoprotektif bir ajan olarak kullanılmış ve test edilen monosakkaritlere göre daha iyi sonuç verdiği, sakkaroz veya rabinoz gibi diğer disakkaritlerle karşılaştırıldığında kriyoprotektif etkisinin benzer olduğu bildirilmiştir (Arns ve ark., 1987). Laktozun, çözündürme sonrası fare spermatozoonlarının motilitesini koruyamadığı, ancak sakkaroz ve trehaloza benzer düzeyde fertilite elde edildiği bildirilmiştir (Sztein ve ark., 2001).

#### **2.12.3.2.2.1.2.4. Maltoz**

Maltoz, iki birim glikozdan oluşan malt şekeridir. Di- ve polisakkaritlerin kriyoprotektan olarak üstün olduğu bildirilmesine karşın, maltozun eritme sonrası kızıl geyik spermatozoonlarının korunmasında çeşitli monosakkaritler kadar etkili olmadığı bildirilmiştir (Fernández-Santos ve ark., 2007). Ek olarak, maltozun tavşan spermatozoonlarının korunmasında sakkaroz kadar etkili olmadığı bildirilmiştir (Vicente, & Viudes-de-Castro, 1996). Maltoz kriyoprotektan olarak farklı şeker (Glukoz, galaktoz, fruktoz, sükroz, laktoz ve mannoz) çeşitlerine göre fare embriyolarının 0 °C'de kısa süreli depolamasında en az etkili iki şekerden biri (Mannoz, maltoz) olduğu bildirilmiştir (Kasai, 1986).

#### **2.12.3.2.2.1.3. Polisakkaritler**

##### **2.12.3.2.2.1.3.1. Rafinoz**

Rafinoz; galaktoz, fruktoz ve glikoz birimlerinden oluşan bir trisakkarittir ve yaygın olarak çeşitli sebzelerde bulunur. Bu şeker öncelikle %18 yoğunlukta fare sperması için kriyoprotektan olarak kullanılmış ve hem tek başına hem de gliserol ile birlikte fare spermatozoonlarının korunmasında etkili olduğunu bildirilmiştir (Tada ve ark., 1990). Daha sonra benzer şekilde rafinoz ve gliserol kombinasyonu epididimal fare spermasının dondurularak saklanması için kullanılmış (Ostermeier, Wiles, Farley, & Taft, 2008) ve işlevselliği IVF ve canlı yavruların doğumu (Songsasen, Betteridge, & Leibo, 1997) ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Rafinoz, farklı türlerin spermasının saklanması amacıyla da kullanılmıştır (Arns ve ark., 1987; Garde ve ark., 2008). Disakkaritlerle karşılaştırıldığında, rafinozun fare spermasının korunmasında sakkaroz ve trehaloz ile benzer sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Sztein ve ark., 2001). Rafinoz ile aygır spermasında (Squires ve ark., 2004) glikoz ve früktoza benzer sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Rafinozun etilen glikol içeren çözeltilerle birlikte kullanıldığında vitrifikasyon özelliklerini değiştirdiği (Kuleshova ve ark., 1999) ve cam geçiş sıcaklığını sakkaroz veya trehalozdan daha fazla yükselttiği gösterilmiştir (Nagano ve ark., 2007). Etilen glikol / rafinoz vitrifikasyon çözeltilinde, vitrifikasyondan önce fare oositlerinin rafinozla işlem görmesinin toksik etkisinin olmadığı ve çözündürme sonrası canlılığı arttırdığı bildirilmiştir (Dela Pena, Takahashi,

Atabay, Katagiri, & Nagano, 2001). Bu şeker aynı zamanda fare preantral folikülleri için vitrifikasyon çözeltilerinde de kullanılmış ve bunun da canlı doğumla sonuçlandığı bildirilmiştir (Dela Pena ve ark., 2001). Bir başka çalışmada, rafinozun fare folikülleri için bir kriyoprotektan olarak eklenmesinin, granüloza hücrelerinin vakuolizasyonunu arttırdığını, ancak bunun aşırı etkilenme sonucunda hücresel dehidrasyondan kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir (Nagano ve ark., 2007).

#### **2.12.3.2.2.1.3.2. Dekstran**

Dekstran, yineleyen glikoz moleküllerinden sentezlenmiş karmaşık dallı bir polisakkarittir. Dekstran, temelde 1-3 yan zincirleri olan bir  $\alpha$ -D-1,6-glukoz bağlantılı bir polimer olup donma sırasında oluşan buz kristallerini modifiye ederek kriyoprotektif etki oluşturmaktadır (Kundu ve ark., 2002). Kullanılan dekstranın moleküler ağırlığına bağlı olarak kriyoprotektif etkisi değişiklik gösterir (Kundu ve ark., 2002). Bir çalışmada, yoğunluğu %10 olan dekstran kedi (Gómez, Pope, Harris, Mikota, & Dresser, 2003) ve fare (Kuleshova, Shaw, & Trounson, 2001) embriolarının dondurularak saklanması için diğer permeabl ve nonpermeabl kriyoprotektanlarla birlikte kullanılmıştır. Dekstranın medyata katılmasının, kriyoprezervasyon sonrasında fare zona pellusidasının çatlamasını hafiflettiği bildirilmiştir (Dumoulin ve ark., 1994). DMSO içeren sulandırıcılara farklı moleküler ağırlığında (10-2000 kDa) dekstranın farklı yoğunlukta katılarak dondurulan epididimal teke spermasında düşük moleküler ağırlığındaki dekstran derivelerinin gliserol veya DMSO ile kombinasyonlarından olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir (Kundu ve ark., 2002). Dimetilsülfoksit (DMSO) içeren tavşan sperma sulandırıcılarına dekstran eklenmesinin fertilitte ve akrozom bütünlüğünü korumada sinerjik etki gösterdiği, bu etkinin motilitede gözlemlenmediği bildirilmiştir (Viudes-de-Castro, Talaván, & Vicente, 2021).

#### **2.12.3.2.2.2. Makromoleküller/polimerler**

Makromoleküller veya polimerler genellikle gerekli olmasa da sulandırıcılara ek koruyucu katkı maddeleri olarak katılmaktadır. Bu bileşikler bir çözeltinin vitrifikasyonunu destekleyerek potansiyel olarak zararlı ajanların yoğunluklarında eşzamanlı azalmaya yol açarlar. Makromoleküller, kriyoprotektan çözeltisinin

viskozitesini arttırma eğilimindedir (Mackenzie, 1977). Ayrıca su ile hidrojen bağı yoluyla etkileşimler oluşturarak buz kristali oluşumu eğilimini azaltırlar (Fuller, 2004). Proteinler (serum albümini), sulandırıcıya eklenen yaygın makromoleküllerdendir. Kriyoprotektan olarak rol oynayabilse de hücrelerin payetlere veya diğer kriyo kaplara yapışmasını önlemek için yüzey aktif madde görevi görürler.

#### **2.12.3.2.2.1. Ficoll**

Ficoll, sakkarozun iyonik olmayan sentetik bir polimeridir ve polisakkarit olarak da gruplandırılabilir. Kriyoprezervasyon ortamına eklenmesi, donma aşamasından sonra hem insan hem de farede zona pellusida çatlamasını azaltmıştır (Dumoulin ve ark., 1994). Ficoll, fare (Endoh ve ark., 2007; Kuleshova ve ark., 2001), kedi (Merlo et al., 2008), domuz (Checura, & Seidel Jr, 2007; Huang ve ark., 2008; Hurtt, Landim-Alvarenga, Scidel Jr, & Squires, 2000), maymun (Yeoman ve ark., 2001) gibi çeşitli türlere ait oositlerin vitrifikasyon protokollerindkriyoprotektan olarak kullanılmıştır (Shaw ve ark., 1997).

#### **2.12.3.2.2.2. Polietilen glikol (PEG)**

Nonpermeabl bir kriyoprotektan olan PEG bir alkol türevidir. PEG'nin farklı hücre ve dokuların dondurulmasında kriyoprotektif etkisinin olduğu gösterilmiştir (Kandelousi, Arshami, Naserian, & Abavisani, 2013; Lee ve ark., 2013). Fare oositlerini (Nakagata, 1989) vitrifiye etmek için kullanılmış ve tek başına DMSO'dan daha başarılı olduğu bildirilmiştir (O'Neil, Paynter, Fuller, & Shaw, 1997). Ayrıca, insan oositlerinin dondurması amacıyla diğer kriyoprotektanlarla birlikte kullanılmıştır (Liebermann, Tucker, & Sills, 2003). Fare, sığır (Ohboshi ve ark., 1997) ve sıçan (Kono ve ark., 1988) blastosistlerinin hepsinde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Hidrofilik özellikteki PEG, ortamın ozmotik basıncını artırmak için boğa sperması sulandırıcılarında tek başına kullanıldığında, çözündürme sonrası TM, PM ve canlı spermatozoa oranı düşürdüğü bildirilmiştir (Abavisani, Arshami, Naserian, Kandelousi, & Azizzadeh, 2013; Kandelousi ve ark., 2013). Koç spermasının dondurulması amacıyla kullanımına yönelik çalışmalara rastlanamamıştır. Fare spermatogonyal kök hücrelerinin dondurulmasında medyuma %2,5 oranında eklenmesinin canlı hücre sayısını artırdığı bildirilmiştir (Lee ve ark., 2013).

### **2.12.3.2.2.2.3. Polivinilpirolidon (PVP)**

Polimerik bir eksternal kriyoprotektan olan polivinilpirolidon (PVP), toksik etkilerini minimize etmek amacıyla hücre içine girebilen kriyoprotektanlarla ikame edilerek sperma ve embriyo gibi çeşitli hücre ve dokuların dondurulmasında kullanılabilmesi gösterilmiştir (Khan, Akhter, Aslam, & Ejaz, 2021; Rakha ve ark., 2017). ICSI amacıyla spermanın immobilizasyonunda, sperma seçiminde, oosit kültüründe ve dondurmada gibi yardımcı üreme tekniklerinde farklı amaçlarla kullanılmaktadır (Kato, & Nagao, 2012). PVP'nin, Ca'un hücre içine girişini artırarak, sperm membranında önemli hasara neden olduğu ve kromozomal hasarlara yol açtığı ileri sürülmüştür (Kato, & Nagao, 2009, 2012). Polivinilpirolidon, 8 hücreli fare embriyolarını 30 dakika boyunca -79 ° C'de başarılı bir şekilde saklaması için kullanılan ilk non-permeabl kriyoprotektandır (Whittingham, 1971). PVP ilavesinin manda boğası spermasının çözündürme sonrası plazma membran fonksiyonel bütünlüğünü desteklediği bildirilmiştir (Khan ve ark., 2021). Polivinilpirolidon, diğer kriyoprotektanlarla birlikte, sığır oositlerini dondurmak için çeşitli konsantrasyonlarda kullanılmıştır (Checura, & Seidel Jr, 2007). Polivinilpirolidonun bir etilen glikol vitrifikasyon çözeltisinin cam geçiş sıcaklığını yükselttiği bildirilmiştir (Shaw ve ark., 1997). Sulandırıcıda 6% PVP (w/v) ilavesinin, çözündürme sonrası horoz sperması plazma membran bütünlüğünü kontrol grubuna göre daha iyi koruduğu bildirilmiştir (Rakha ve ark., 2017).

### **2.12.3.2.2.2.4. Hiyaluronan**

Hiyaluronan (hiyaluronik asit, hiyaluronat), hücre dışı matrisin önemli bileşenlerindedir. Genişlemiş kumulus hücre kütlelerinde de bulunur. Bu maddenin, murin ve sığır embriyoları (Franco, & Hansen, 2006; Palasz, Alkemade, & Mapletoft, 1993; Palasz ve ark., 2008; Palasz, Thundathil, De La Fuente, & Mapletoft, 2000) ve küçükbaş hayvan blastosistleri (Joly, Nibart, & Thibier, 1992) için yeni doğan buzağı serumuna uygun bir alternatif olabileceği bildirilmiştir. Hiyaluronan takviyesinin domuz spermasında çözündürme sonrası motiliteyi ve membran stabilitesini de arttırdığı bildirilmiştir (Pena, Johannisson, Wallgren, & Rodriguez-Martinez, 2004).

### 2.12.3.3. Kriyoprotektanların Toksisitesi

Kriyoprotektanların toksik etkisi, kriyoprezervasyon öncesinde, dondurma sırasında ve çözündürme sırasında oluşan ozmotik denge değişiminden ileri gelir. Bu toksik etki kriyoprotektan maddenin ortamdan uzaklaştırılmasına kadar ısı artışı ile paralel artarak devam eder. CP'lerin toksik etkilerinin değerlendirilebilmesi için, bu kimyasalların ortamda bulunan diğer maddelerle olan kollektif etkileri, hücre zarından geçebilme durumları ve dondurma ve çözündürme sırasında oluşturdukları ozmotik stres düzeyinin bilinmesi gerekir. Kriyoprotektanların hücre zarını geçiş hızı direkt olarak ortam sıcaklığından etkilenmektedir. Bu nedenle, kriyoprotektanların toksik etkileri yoğunluğa, eklenme sıcaklıklarına ve zamanlarına bağlı olarak değişiklik gösterir. Kriyoprotektanların bir arada kullanılması ile birlikte olası etkileşimler açığa çıkmaktadır (Takagi ve ark., 1993b). CP'lerin bir arada kullanılmasının tek başına kullanımlarına göre daha iyi sonuç verdiği bildirmiştir (Takagi ve ark., 1993a).

Kriyoprotektanlar dondurma çözündürme sırasında oluşabilecek hasarların önlenmesine yönelik kullanılmasına karşın, özellikle kendileri hücreler üzerinde yıkıma neden olabilmektedir. Bununla birlikte, kriyoprotektandan ileri gelen bir yıkıma neden olup olmadığını doğrulamak ve olası toksisite mekanizmalarını belirlemek için belirli ölçütler karşılanmalıdır (Fahy, Lilley, Linsdell, Douglas, & Meryman, 1990). Bu ölçütler, kriyoprotektanların gerçekte kullanılacakları koşullar altında (yoğunluk, maruz kalma süresi, sıcaklık vb.) etkilerini incelemeyi ve herhangi bir değişikliğin işlev üzerinde etkisinin olup olmadığını, oluşan etkinin geri dönüşümsüz olup olmadığı ve oluşan etkinin ilgili teknik ve soğutma protokollerinden çok kriyoprotektan ajanının kendisinden kaynaklandığını göstermeyi içerir. Örneğin, buz kristali oluşumu veya ozmotik stresin neden olduğu yıkıma sıklıkla atıfta bulunulur, ancak bu durum kriyoprotektif maddenin gerçek toksik etkilerinden çok donma-çözülme sürecinin kendisinden kaynaklanabilmektedir. Genel olarak, toksisite endişelerinin çoğu, hücre içine giremeyen kriyoprotektanlardan çok hücre içine girebilen kriyoprotektanlar ile ilgilidir.

Üreme biyolojisi ve kriyoprotektif bir ajanın sperma üzerindeki toksisitesi; hareketlilik, kapasitasyon ve fertilizasyon yeteneği gibi testlerle değerlendirilmektedir. CP'lerin oositler üzerindeki toksisitesi, kromozomal düzenleme ve fertilizasyon yeteneğine bakılarak değerlendirilir. CP'lerin embriyolardaki toksisiteleri, embriyonik

gelişimi sürdürme (viabilite) yeteneği veya çeşitli moleküler ve biyokimyasal sinyal yolları üzerindeki etkilerine bakarak değerlendirilir (Chian, & Quinn, 2010). CP'lerin neden olduğu sitotoksitenin mekanizması net olarak bilinmemektedir. Hücrelerin çeşitli kriyoprotektanlara maruz kalması sonucu hücre membran yıkımları ve enzimatik aktivite, organel ve protein yapısındaki farklılaşmalara bağlı fonksiyonel değişimler şekillenir (Anchordoguy, Rudolph, Carpenter, & Crowe, 1987; Fahy ve ark., 1990). Polar gruplarının su hidrojen bağlarını inceleyerek kriyoprotektan toksisitesini ölçen yeni yaklaşımlar bulunmaktadır (Fahy, Wowk, Wu, & Paynter, 2004).

#### **2.12.3.3.1. Kriyoprotektanlara maruz kalma süresi, yoğunluk ve ısının toksisite üzerindeki etkileri**

Üreme hücrelerinin kriyoprotektanlar ile karşı karşıya kalmanın oluşturduğu koşullar toksisite durumunu etkileyebilmektedir. Karşı karşıya kalma süresi, kriyoprotektan yoğunluğu ve maruz kalma sıcaklığı gibi faktörlerin tümü, kriyoprotektan maddenin etkisini etkilemektedir (Chian, & Quinn, 2010). Kriyoprotektanlar kısa süreliğine hücrelerle karşı karşıya kaldıklarında genellikle toksik değildirler, ancak yüksek yoğunluklarda uzun süreli karşı karşıya kalma durumunda kriyoprotektan ajanlarının metabolize edilmesine neden olabilir ve bu da daha sonra hücresel fonksiyonu ve canlılığı bozabilir. Örnek olarak, DMSO, PROH (1,2 propanediol, propilen diol) ve gliserol yoğunluklarındaki yükselmenin formaldehitin enzimatik olmayan oluşumunun artmasına neden olduğu gösterilmiştir (Karran, & Legge, 1996).

Sığır blastosistlerinin 10 dakika boyunca 5,4 mol/L'den daha yüksek etilen glikol yoğunluklarıyla karşı karşıya kalmasının embriyonun gelişimine zararlı olduğu bildirilmiştir (Sommerfeld, & Niemann, 1999). Kriyoprotektanlar ayrıca oositlere de zarar verebilmektedir. DMSO ve PROH gibi bileşikler, oosit tubullerinin depolimerizasyonuna ve mayotik için malformasyonuna neden olabilmektedir (George, Pickering, Braude, & Johnson, 1996; Van Der Elst, Van Den Abbeel, Nerinckx, & Van Steirteghem, 1992b; Van der Elst ve ark., 1992a; Vincent ve ark., 1989). Kriyoprotektan ile karşı karşıya kalma sıcaklığının düşürülmesinin toksik ajanların alınımı ve metabolizmasını azalttığı düşünülmektedir. Ortam sıcaklığının

düşürülmesi PROH'ların oosit üzerindeki yan etkilerini azalttığı bildirilmiştir (Van Der Elst ve ark., 1992b). Bazı durumlarda CP'lerin yüksek sıcaklıklarda kullanılması hücre zarı geçirgenliğini artıracığından avantaj olabilmektedir. Örnek olarak, bufalo spermatozoonlarının 37 °C'de gliserole maruz kalması sonucunda 4 °C'de maruz kalma ile görüldenden daha iyi çözülme sonrası canlılık ve hareketlilik elde edildiği bildirilmiştir (Rasul ve ark., 2007). Genel olarak, kriyoprotektan ile karşı karşıya kalmanın sıcaklığını düşürmek, ajanın toksisitesi ile ilgili kimi kaygıları hafifletebilirken, aynı zamanda tübülün ve oosit mayotik milinin depolimerizasyonunu da indükler (Pickering ve ark., 1990; Pickering, & Johnson, 1987).

#### **2.12.3.3.2. Kriyoprotektan hasarı ve toksisitesinden korunma**

Ortam ısısı arttıkça gamet hücrelerinin CP'lere maruz kalma süresi kısaltılmalıdır. Hücre içine giren ve giremeyen CP'lerin birlikte kullanılması ile toksisitenin azaltılması güncel yaklaşımlardandır. Buna dayalı ilk başarılı çalışmalar, fare embriyolarını dondurduktan sonra yavru alınması (Wilmot, 1972) ve sığır embriyolarının kriyoprezervasyonunu izleyen ilk canlı doğumun gerçekleşmesi ile sonuçlanmıştır (Wilmot, 1973). Bu çalışmaların her ikisi de DMSO, sakkaroz ve polivinilpirolidonu birleştiren bir protokolün uygulanarak gerçekleşmiştir.

Birden fazla kriyoprotektan kullanılması ile bir kriyoprotektan diğerinin olumsuz etkilerine karşı koyarak toksisiteyi hafifletebilmekte veya en azından azaltabilmektedir. Örneğin, formamidinin DMSO'nun toksik etkilerini hafiflettiği bildirilmiştir (Fahy ve ark., 1990). Günümüzde birçok başarılı kriyoprezervasyon protokolü; makromolekül katkısı ile birlikte permeabl ve nonpermeabl kriyoprotektanların kombinasyonundan oluşmaktadır ve bu yaklaşım sonucu verimlilikte büyük bir artış olmuştur. Kriyoprotektanların eklenme ve çıkarılma yöntemleri, toksisiteyi veya sonuçta ortaya çıkacak olan yıkımı azaltmak için başka bir yaklaşımdır. Ek olarak, ısınma - çözülme sırasında bu bileşiklerin aşamalı olarak uzaklaştırılması, ozmotik stresi en aza indirmeye yardımcı olmaktadır. Ayrıca, kriyoprotektanın çözündüğü taşıyıcı çözeltinin iyonik bileşimini değiştirmek, yıkımı azaltmanın başka bir yöntemidir. Spesifik olarak, sodyumun kolin ile değiştirilmesi, çözünme etkisinden kaynaklanan yıkımı azaltabilmekte ve ayrıca çözelti



viskozitesinin artmasından dolayı da yarar sağlayabilmektedir (Stachecki, Cohen, & Willadsen, 1998).

#### **2.12.3.4. Ekilibrasyon**

Hücre süspansiyonları ile hücre içine girebilen kriyoprotektan içeren solüsyonların eklenmesinden sonra hücre içi sıvılar ile ortamın dengelenmesi için bir süre beklenmesi yaygın uygulamadır. Pek çok hücre, özellikle ökaryotik hücreler, ozmotik strese duyarlıdırlar. Bu nedenle hücre içine girebilen kriyoprotektanlar, hücrenin ozmotik şoka alışması için zamana gerek duyulmasından dolayı ozmotik stresi azaltmak amacıyla yavaş yavaş eklenmektedir. Kullanılan kriyoprotektanların hücre içine giriş hızları, kullanılan kriyoprotektan maddeye veya hedef hücre tipine göre değişmektedir. Bu nedenle, her uygulama için farklı süre gereksinimleri bulunmaktadır. Genellikle düşük sıcaklıklarda daha uzun süreye gerek duyulmaktadır.

Hem yavaş dondurmada hem de hızlı dondurmada vitrifikasyon gerçekleşebilmekte ve dondurma işleminin başarısı donma sırasında hücre içinde oluşan kristalizasyon formuna bağlı olarak değişmektedir.

#### **2.13. Spermmanın Dondurulması**

Değişik türlerden alınan farklı hücre, doku ve spermatozoonların dondurulması amacıyla yapılan bilimsel çalışmalarda, her biyolojik sistemin kendine özgü optimal bir soğutma hızı olduğu görülmüştür (Hafez, & Hafez, 1993; Woelders, 1997). Türler arası soğuk şokuna karşı duyarlılığın farklı oluşunun plazma membranında bulunan lipit bileşenlerinden ve lipitlerin dağılımlarındaki düzensizlikten ileri geldiğini bildirilmiştir (De Leeuw ve ark., 1993; Mazur, 1963; Whittingham, 1971). Eritme sonrası hücrenin canlılığını soğutma hızı yavaş (slow cooling) veya hızlı soğutma (fast cooling) sırasında şekillenen zararlı etkiler belirler (Hafez, & Hafez, 1993; Woelders, 1997). Birçok türde spermatozoa zarının su geçirgenliği diğer hücrelere göre daha yüksektir (Hafez, & Hafez, 1993; Holt, 2000a; Woelders, 1997).

Her hücrenin su içeriğinin, boyutu ve şekli, su geçirgenlik katsayısına ( $L_p$ ) bağlı olarak soğutma hızı açısından kritik bir değeri vardır (Woelders, 1997). Bu nedenle dondurma amacıyla kullanılan materyalin bu özellikleri göz önünde bulundurularak soğutulmalıdır. Aksi halde gereğinden daha yavaş soğutulduğunda

hücre, aşırı derecede su kaybına uğrar. Gereğinden hızlı soğutulması durumunda ise hücre içinde bulunan suyun dışarıya çıkması için yeterli zaman olmadığından hücre içi buz kristallerinin oluşumuna neden olacaktır. Ayrıca, hızlı soğutma sırasında ozmotik dengeyi sağlayabilmesi için hücreler, boyut ve biçim bakımından çok hızlı değişim göstermek zorunda kalırlar (Mazur, 1963; Whittingham, 1971).

Donma sırasında su ozmoz yoluyla hücreden dışarı çıkar (dehidrasyon). Oluşan dehidrasyon sonucu, hücre orijinal volümüne göre yaklaşık %50 dolayında hacim kaybeder ve hücre organelleri donmaya bağlı olarak şekillenen buz kristalleri arasında donmamış bölüm içinde sıkışır. Bu durum hücreler üzerinde mekanik bir stres oluşturur (Woelders, 1997). Donma sırasında, hücre içi ve hücreler arası ortamda oluşan donmayan fraksiyonlarda aşırı yüksek tuz yoğunlukları oluşarak hücrenin aşırı dehidrasyonuna yol açar. Aşırı tuz yoğunluğuna bağlı olarak hücreler arası tuzlar hücrelerin içine sızarak hücre içindeki iyon kompozisyonunu değiştirir. Donma sırasında gerçekleşen tüm bu fiziksel ve fizikokimyasal değişiklikler hücreler için zararlıdır. Son yıllarda memeli spermatozoonlarının dondurulması amacıyla yapılan çalışmalara göre boğa sperması için optimal soğutma hızı dakikada 100 °C iken (Robbins, Saacke, & Chandler, 1976), erkek domuzlarda 30-50 °C/dk. (Fiser, & Fairfull, 1990), koçlarda 50-60 °C/dk. (Fiser ve ark., 1987) ve insanlarda 1-10 °C/dk. (Henry, Noiles, Gao, Mazur, & Critser, 1993) dondurma hızlarının uygun olduğu bildirilmiştir (Woelders, 1997). Soğutma hızı ile sulandırıcıda kullanılan kriyoprotektif maddenin yoğunluğu arasında sıkı bir ilişki vardır. Gliserol gibi bazı kriyoprotektan maddelerin ana etkisi yavaş soğutma hasarlarını önlemektir. Eğer yüksek soğutma hızı uygulanabilirse daha az yoğunlukta kriyoprotektan miktarının kullanarak spermanın dondurulması mümkün olabilir (Woelders, 1997). Farklı soğutma hızlarının etkilerini araştıran Woelders (1997), kontrollü soğuma olanağı olması durumunda, daha düşük yoğunlukta kriyoprotektan madde kullanılabileceğini ve az da olsa kriyoprotektan maddelerin zararlı etkilerinin önüne geçilebileceğini bildirmiştir (Woelders, 1997). Son zamanlarda yürütülen çalışmaların çoğunda koç sperması kontrollü soğutmaya olanak tanıyan bilgisayarlara entegre dondurma makinaları kullanılmıştır (Cirit ve ark., 2013; Taşdemir ve ark., 2013).

## 2.14. Spermanın Dondurulmasında Genetik Etki

Sperma kriyoprezervasyonu ticari sığır, koyun ve domuz sürülerinde rutin olarak uygulanmasından dolayı elde edilmiş bireysel olarak çok varyasyon içeren ve açıklanamayan veri bulunmaktadır. Bu durum sektör açısından sıkıntı olsa da bu farklılıkların ortaya koyulup bu konudaki bilgilerin artırılması ile türler ve bireyler arasındaki varyasyon durumu azaltılabilecektir (Chenoweth, & Lorton, 2014).

Moleküler tekniklerin gelişmesi ile birlikte, stres altında kalan spermatozoonların durumu sonucunda ortaya çıkan varyasyon, moleküler markörlerle incelenmektedir. Bu konu türler arasında spermatozoonların membranı ve yağ içeriği üzerinden incelense de (Parks, & Lynch, 1992) tür içerisinde bireysel olarak değerlendirme için yeterli değildir. Bir bireyin spermasının normal çiftleşme ile dişiye gebe bırakabilme yeteneği varsa canlılığı ve hareketi sağlayacak kadar yağ miktarı ve membran yapısı var demektir. Bu nedenle bireysel varyasyonlar daha kompleks mekanizmalar nedeni ile gerçekleşmektedir (Chenoweth, & Lorton, 2014).

Erkekler arasındaki bireysel varyasyon bilinmekte ve bireyler dondurulabilirlik açısından iyi ve kötü olarak sınıflandırılmaktadır. Bireyler arasındaki bu fark farelerde (Songsasen, & Leibo, 1997), köpeklerde (Yu, Songsasen, Godke, & Leibo, 2002), maymunlarda (Leibo, Michael Kubisch, Dee Schramm, Harrison, & VandeVoort, 2007), domuzlarda (Thurston, Siggins, Mileham, Watson, & Holt, 2002) ve atlarda (Ortega-Ferrusola ve ark., 2009b) bildirilmiştir. Farelerdeki varyasyonun çok daha fazla olduğu dondurma çözündürme sonrasında yapılan IVF çalışmalarında genetik hatlar arasında önemli farkların olduğu bildirilmektedir (Kawai, Hata, Suzuki, & Matsuda, 2006).

Farelerde yaşanan durum diğer türlerde yapılan çalışmalardan elde edilen veriler desteklemektedir. Thurston ve ark. (2002) 100 domuzu genotiplerine göre iyi kötü ve orta olarak sınıflandırmışlar ve çözündürme sonrasında elde edilen parametreler ile ilişkilendirmeye çalışmışlardır. Çalışma sonucunda, dondurma başarısı ile ilişkili 16 bölgede polimorfik yapı (SNP) saptamışlar, aynı zamanda dondurma öncesinde spermatozoonun baş morfolojisi ile çözündürme sonrası parametreler ile ilişki bulunduğunu bildirmişlerdir (Thurston ve ark., 2002).

Genotip ile dondurma-çözündürme arasındaki ilişki başka araştırmacılar tarafından da çalışılmıştır (Safranski, Ford, Rohrer, & Guthrie, 2011). Bu çalışmalarda genotip

verilerinin seleksiyon ölçütü olarak kullanılabilceği vurgulanmıştır. Ancak domuzlarda rutin olarak taze ve kısa süreli saklanmış sperma ile tohumlama yapılmasından dolayı elde edilen bu veriler gen bankaları tarafından kullanılabilir. Biyomarkırların süt sığırı endüstrisinde kullanımını açısından, sığırların erken yaşlarda test edilip yeterli donma başarısı olmayan bireylerin uzaklaştırılmasından dolayı önemi daha azdır.

### **2.15. Spermanın Eritilmesi**

Donmuş sperma ile yapılan suni tohumlama sonrası yüksek oranda gebelik elde edilmesinde, spermanın kurallara ve tekniğine uygun olarak saklanması, taşınması, eritilmesi ve tohumlama tekniğinin doğru uygulanması önemlidir (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Nur, 2019). Azot konteynerinde bulunan payetlerin saha konteynerine aktarılması, kanisterin kaldırıldığı yükseklik, payet alınırken geçen süre, konteyner içindeki azot miktarı gibi birçok aşamada payet iç ısısında dalgalanmalar oluşur. Payetlerin hacim/yüzey alanı oranının yüksek olması nedeniyle içindeki spermatozoonlar ısı değişikliğine karşı oldukça duyarlıdır (Senger, 1980). Sıvı azot içinde -196 °C'de payetler içinde saklanan spermanın herhangi bir nedenle -100 °C'ye ısınması, buz kristallerinin yapısını etkilediği ve ısı yeniden -196°C'ye indirildiğinde kristalleşme olayının yeniden oluştuğu (mikrotorik rekristalizasyon) hatta bu termodinamik olayların -130 °C'de bile oluşabileceği bildirilmiştir (İleri ve ark., 2000). Bu nedenle çözdürmek amacıyla konteynerden payet alırken dikkatli olunması gerekmektedir.

Sperma çözdürülürken payetin hacim/yüzey alanı oranının yüksek olması nedeniyle ısı alışverişi çok hızlı gerçekleşir. Çözdürme sırasında spermanın ısısı -60 °C ve -15 °C gibi iki kritik sıcaklık bölgesinden geçerken gerçekleşen biyokimyasal ve fonksiyonel olaylara bağlı motilite ve morfolojiyi etkileyen yıkımlar ortaya çıkar. (Salamon, & Maxwell, 1995a). Bu hasarlardan kaçınmak için eritme hızının yüksek olması istenir (Hafez, & Hafez, 1993; Holt, & North, 1994; İleri ve ark., 2000).

Eritme suyu ısısının yükseltilmesiyle eritme hızının arttığı ve dolayısıyla canlı hücre sayısının olumlu yönde etkilendiğini saptanmıştır. Yüksek ısılarda çözdürme tekniğinin canlılık oranını artırsa da sürenin aşılması durumunda ölümlere yol açma

riski olduğundan 37 °C’de 30 sn sürede çözdürülmesi önerilmektedir (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Nur, 2019).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Koyunculuk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu 25/05/2018 tarih 78255852-050.01.04/0149/1332742 sayılı kararı gereğince Koyunculuk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu yönergesine uygun olarak yürütüldü.

Sunulan tez çalışması Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (Proje No: TAGEM/13/07/01/01) tarafından desteklenmiştir.

#### 3.1. Hayvan Materyali

Çalışmada, Bandırma Koyunculuk Araştırma Enstitüsü'nde yetiştiriciliği yapılan 2-3 yaşlı 5 baş Karacabey Merinosu ırkı koçlar kullanıldı. Kullanılan koçlar, deney süresince hayvan başı günlük 1 kg konsantre yemden (Arpa, ATK, Tuz, Mermer tozu) oluşan rasyon ile beslendiler ve koçlara fiğ kuru otu, yalama taşı ve su *ad libitum* olarak verildi. Bunlara ek olarak koçlara çalışma süresince günlük 1 adet yumurta ve 100 gr. kuru üzüm verildi.

##### 3.1.1. Kimyasal

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich'ten sağlandı.

#### 3.2. Koçların sperma vermeye alıştırılması

Aşım sezonu içinde sürüde saptanan kızgın koyunlar kullanılarak koçların suni vajene alışması sağlandı. Bu amaçla sperması alınacak koçlar fantoma (kızgın koyuna) atlamaya alıştırıldı. Bunun için deneyimli bir veteriner hekimi, sağ eline önceden hazırlanmış ve 46 °C ısıda olan suni vajen ile koçların fantoma atlamasını bekledi. Koç fantoma atlayıp kavramasıyla, spermayı alacak kişi yavaşça koça yaklaştı ve koçun penisini suni vajene yönlendirdi. Penisin suni vajen ile temas etmesi ile birlikte koçun yüklenerek ejakülasyon yapması beklendi.

#### 3.3. Spermanın Alınması

Suni vajene alıştırılan koçlardan aşım sezonu içinde, haftada iki kez olmak üzere sperma alındı. Normospermik özellikte olan ejakülat örnekleri çalışmada

kullanıldı. Sperma alınır alınmaz 30 °C'ye ayarlanmış su banyosu içine aktarıldı. Bu işlemi takiben spermatolojik muayeneler yapıldı.

### **3.4. Spermatolojik Muayeneler**

#### **3.4.1. Sperma Miktarı (Hacim)**

Ejakülasyon sonrasında suni vajen uzaklaştırıldı ve spermanın tüpe akması için vajenin havası boşaltılarak dik tutuldu (İleri ve ark., 2000). Daha sonra toplama kadehi çıkarıldı ve tüpün üzerinde bulunan skaladan hacim bilgisi not edildi. Çalışmamızda 0,8 ml'den daha yüksek özellikteki ejakülat örnekleri kullanıldı.

#### **3.4.2. Mass Aktivite (Kitle Hareketi):**

Sperma alındıktan hemen sonra zaman yitirmeksizin, taze spermadan bir damla alındı ve ısıtılmış lamın üzerine yayıldı. Üzerine lamel kapatılmadan 10x büyütmede değerlendirildi (İleri ve ark., 2000). Değerlendirmede, spermanın yapmış olduğu kaynama-dalgalanma hareketinin hızı 1-5 skalası kullanılarak değerlendirildi. Çalışmamızda 4 ve üzeri mass aktivitede olan ejakülat örnekleri kullanıldı.

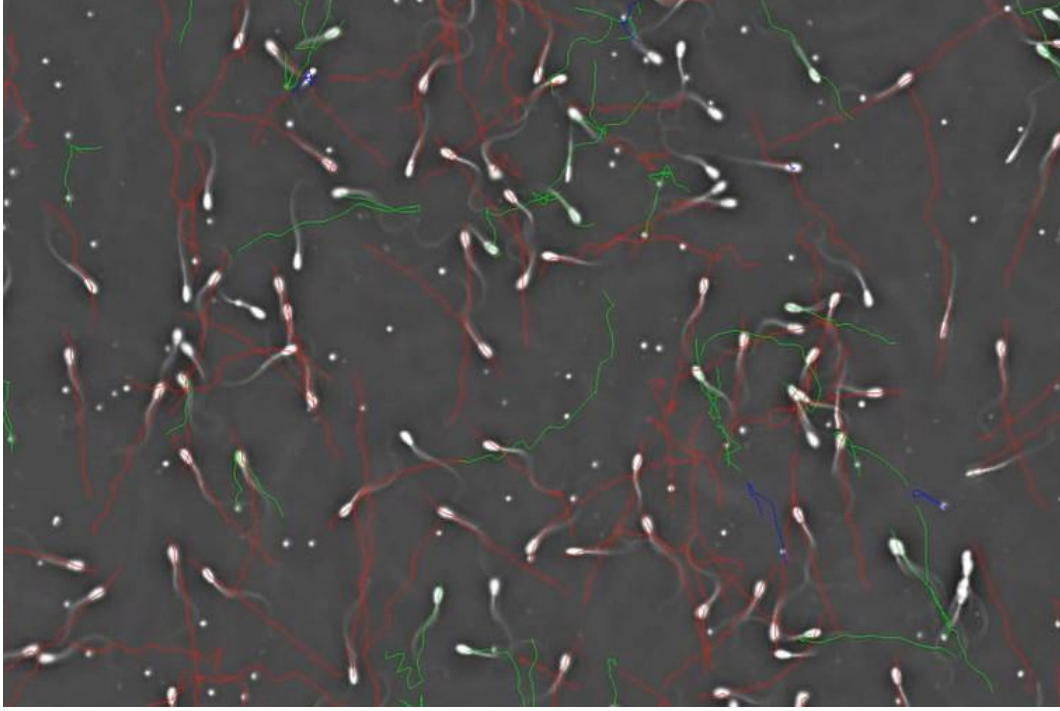
#### **3.4.3. Spermatozoon Yoğunluğu:**

Spermanın yoğunluğu sperma yoğunluk aygıtı (Accucell®, IMV, France) ile belirlendi. Çalışmamızda yoğunluğu en az  $1.960 \times 10^6$  spermatozoon/ml olan ejakülat örnekleri kullanıldı. Sperma yoğunluğu ölçüldükten sonra her payette  $100 \times 10^6$  spermatozoon olacak biçimde doz ayarlaması yapıldı.

#### **3.4.4. Spermatozoon Motilitesi:**

Spermanın motilite muayenesinde CASA aygıtı (SCA®, Microoptics, Spain) kullanıldı. Alınan sperma 1/200 olacak biçimde TRIS bazlı sulandırıcı ile sulandırıldı. İçinden 3 µl alınarak CASA için üretici firmanın önerdiği spesifik lama (Leja®, Ref. 025107, IMV Technologies, France) örnek damlatılarak CASA sistem ile progressif motilite ve toplam motilite değeri belirlendi. En az %57,50 progressif ve %72,22 toplam motilite gösteren ejakülat örnekleri dondurma amacıyla kullanıldı. Motilite incelemeleri taze, sulandırma sonrası, soğutma, ekilibrasyon sonrası ve çözündürme

sonrası aşamalarda tekrarlandı. Spermatozoon hareket özellikleri değerlendirilirken, alan ayarları; en az-en çok 15-70  $\mu\text{m}^2$ , hız ayarları; statik<10  $\mu\text{m/s}$ , yavaş - orta > 45  $\mu\text{m/s}$ , hızlı > 75  $\mu\text{m/s}$ , progressif (STR>80) olarak ayarlandı. En az 7 saha ya da en az 500 spermatozoon analiz edilinceye kadar analiz sürdürüldü.



**Şekil 2.** Bilgisayar destekli sperma analiz cihazında sperm hareketleri (Kırmızı “Rapid/Hızlı”, Yeşil “Medium/Orta”, Mavi Slow/Yavaş”, Sarı “İmmotil/Statik”)

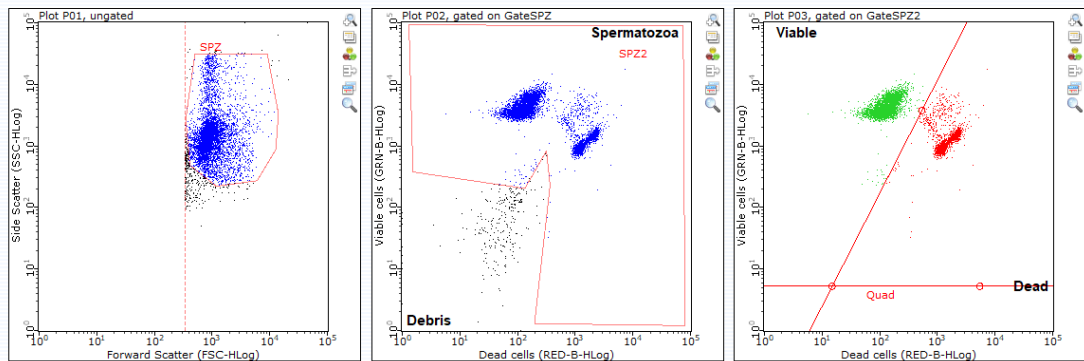
### 3.4.5. Floresan Temelli Morfolojik Muayeneler

Bütün testler CytoSoft programı içeren Guava easyCyte mikrokapiller akış sitometri cihazında gerçekleştirildi (Guava Technologies Inc., Hayward, CA, USA; distributed by IMV Technologies). Aygıtın tek mavi lazeri (488 nm), iki fotodiyotu (forward scatter, side scatter), üç fotomultiplikatörü (yeşil: 525/30 nm, sarı: 583/26 nm, ve kırmızı: 655/50 nm) ve uygun optik filtre ve ayraçları vardır. Her analiz; scatter ve floresan özellikli 5.000 adet spermatozoon sayılıncaya kadar sürdürüldü. Aygıtın performansı günlük olarak Guava Check kit (Guava Technologies, Inc., Millipore, Billerica, MA, USA) ile kontrol edildi. Plazma membran bütünlüğü, mitokondriyal potansiyel durumu ve akrozomal membran bütünlüğü liyofilize florokrom içeren akış sitometri kitleri ile ölçüldü. (EasyKit; IMV Technologies) (Barrier Battut ve ark., 2016).



### 3.4.5.1. Ölü/Canlı Muayenesi

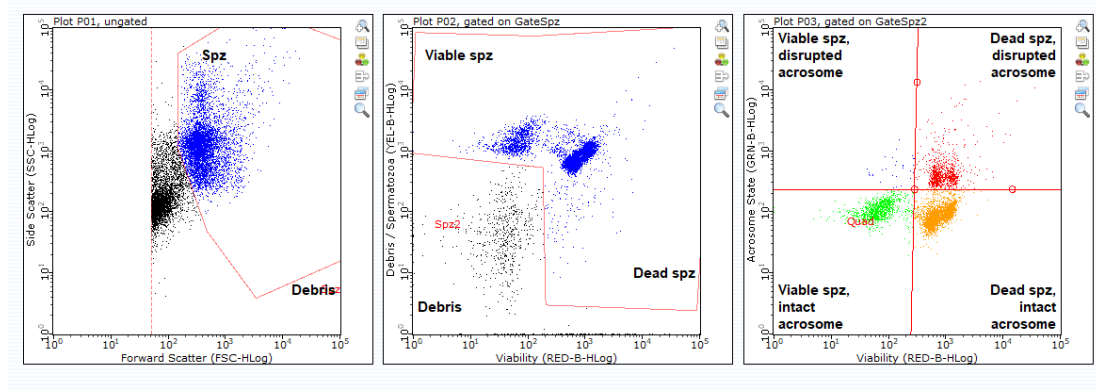
Sperm canlılık oranı, Easykit 1 (ref. 024708; IMV Technologies) ile taze, sulandırma sonrası, soğutma sonrası, ekilibrasyon sonrası ve çözündürme sonrası aşamalarda gerçekleştirildi. Muayene, üretici firmanın yönergesi doğrultusunda gerçekleştirildi. Bu amaçla kullanıma hazır 96 kuyucuktan oluşan pleytlere 200 µL EasyBuffer B (ref. 023826; IMV Technologies) dolduruldu ve kuyucukta 57.000 spermatozoon olacak biçimde sperma eklendi. Analiz gerçekleştirilinceye kadar karanlık ortamda 37 °C’de 10 dakika saklandı. Analiz 5.000 spermamatozoon oluncaya kadar sürdürüldü ve program (EasySoft, ref. 024842; IMV Technologies) yardımı ile canlı spermatozoon oranı hesaplandı (Barrier Battut ve ark., 2016). Spermada canlılık ve yoğunluk sayımına yönelik kullanılan çift boya kombinasyonu bazlı kullanıma hazır bu ticari kit, sağlam ve hasarlı hücre membranlarını geçebilen farklı floresan boya içerir. İçerdiği yeşil floresan (SYBR-14) hücre membranı geçerek nükleik asidi boyar. Böylece tüm sperm başlarını yeşil olarak görünmesini sağlar. Böylelikle sperma dışı parçacıklar analize katılmamaktadır. Diğer kırmızı floresan Propidium Iodid (PI) ise yalnızca membranı hasarlı olan spermatozoonlara nüfuz edebilmektedir. Böylelikle canlı (plazma membranı sağlam) spermatozoonlar yeşil, ölü (membranı hasarlı) spermatozoonlar kırmızı renk almaktadır. Bunlardan ayrı olarak her iki rengi de yansıtan (ölmekte olan) agoni durumundaki spermatozoonlar da bulunmaktadır. Çalışmamızda tüm sitoplazması PI ile kırmızı renk alan hücre popülasyonu ile agoni durumundaki yani sitoplazmasının bir bölümü kırmızı renk alan spermatozoonlar ölü olarak değerlendirildi (Şekil 3).



**Şekil 3.** Akış sitometri cihazında canlı oranı muayenesinde elde edilen dot-plot (En sağ dot-plot; yeşil popülasyon (Canlı), kırmızı popülasyon (Ölü) spermatozoon)

### 3.4.5.2. Plazma ve Akrozom Membran Bütünlüğünün Muayenesi

Yalnızca çözdürme sonrası aşamada gerçekleştirilen plazma ve akrozom membran bütünlüğü, Easykit 5 (ref. 025293; IMV Technologies) kiti ile analiz edildi. Analizler üretici firmanın kullanım talimatnamesine göre gerçekleştirildi. Bu amaçla kullanıma hazır 96 kuyucuğa 200 µL embryonic holding solution (ref. 019449; IMV technologies) ve 40.000 spermatozoon eklendi. Sperma 37 °C'de 45 dakika inkübe edildi. Analiz gerçekleştirilinceye kadar karanlık ortamda saklandı. Analiz 5.000 spermatozoon oluncaya kadar sürdürüldü ve program (EasySoft, ref. 024842; IMV Technologies) aracılığı ile plazma membranı ve akrozomu sağlam veya hasarlı sperma oranları hesaplandı (Şekil 4) (Barrier Battut ve ark., 2016).

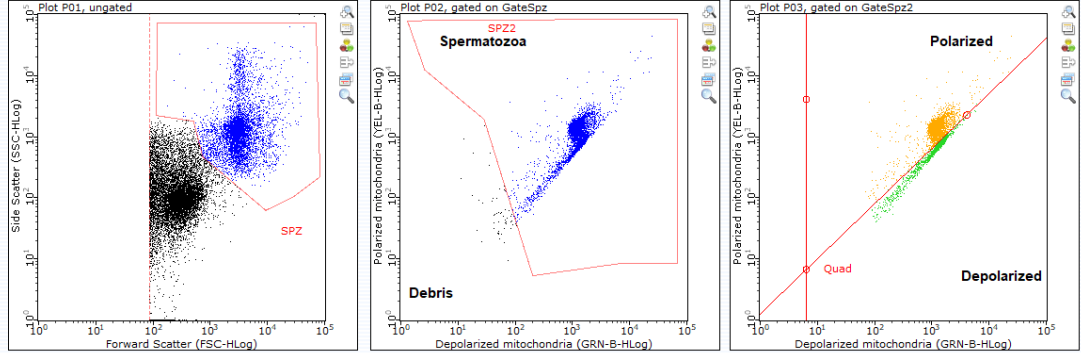


**Şekil 4.** Akış sitometri cihazında plazma ve akrozom bütünlüğü muayenesinde elde edilen dot-plot (En sağ dot-plot; yeşil popülasyon (Plazma ve akrozom membranı sağlam), turuncu popülasyon (Plazma membranı bozuk, akrozomu sağlam), kırmızı popülasyon (Plazma ve akrozom membranı bozuk) spermatozoon)

### 3.4.5.3. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Muayenesi

Spermatozoonların mitokondriyal potansiyeli, EasyKit 2 (ref. 024864; IMV Technologies) ile çözdürme sonrası aşamada değerlendirildi. Bu amaçla kullanıma hazır 96 kuyucuğa florokromun çözdürülmesi amacıyla 10 µL saf etanol eklendi. Sonra 190 µL Easybuffer B ve totalde 50.000 spermatozoon olacak biçimde sperma eklendi. Sperma at 37 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi ve analiz gerçekleştirilinceye kadar karanlıkta saklandı. Analiz 5.000 sperma oluncaya kadar sürdürüldü ve program (EasySoft, ref. 024842; IMV Technologies) aracılığı ile mitokondriyal potansiyel yoğunluğu/oranı hesaplandı (Barrier Battut ve ark., 2016).

Analizde yüksek yoğunlukta florokrom içeren spermatozoonlar polarize mitokondri (Yüksek  $\Delta\psi_m$ ) olarak kabul edilirken, düşük yoğunlukta florokrom içeren spermatozoonlar depolarize mitokondri (Düşük  $\Delta\psi_m$ ) olarak hesaplandı (Şekil 5).



**Şekil 5.** Akış sitometri cihazında mitokondriyal membran bütünlüğü muayenesinde elde edilen dot-plot (En sağ dot-plot; yeşil popülasyon (Depolarize / Düşük mitokondriyal membran potansiyeli), turuncu popülasyon (Polarize / Yüksek mitokondriyal membran potansiyeli) spermatozoon)

### 3.4.6. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Fluorescein-(TUNEL):

Donmuş spermada apoptoza uğrayan spermatozoon oranı TUNEL yöntemi kullanılarak belirlendi. Bunun için; In Situ Cell Death Detection Kit with fluorescein (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kiti, üretici protokolünde ufak modifikasyonlar yapılarak kullanıldı. Bu amaçla bir damla sulandırılmış sperma mikroskop lamı üzerine frotiler yapılarak oda sıcaklığında %10'luk formaldehit solüsyonu ile 20 dakika süreyle fikse edildi. Daha sonra frotiler PBS ile yıkanarak 4 °C'ye kaldırıldı. Soğuk ortamda saklanan frotiler yeniden çıkarılacağı sırada her biri üç kez beşer dakika PBS solüsyonu ile yıkandı. Sonra oda sıcaklığında içinde proteinaz K bulunan nemlendirilmiş şalelerde 10 dakika süre ile muamele edildi. Daha sonra PBS solüsyonu ile yeniden yıkandı ve oda sıcaklığında distile su ile hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit( $H_2O_2$ ) ile 10 dakika muamele edilerek yeniden PBS solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra frotiler geçirgenliği sağlaması amacı ile buz kalıbı üzerinde %0,1'lik Triton X-100 ile 5 dakika boyunca muamele edildi.

Geçirgenliği sağlanmış frotiler 37 °C'de karanlık ortamda 1 saat süre ile içinde terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) plus dUTP etiketi içeren TUNEL reaksiyon karışımında inkübe edildi. Etiketlemeden sonra örnekler PBS ile yıkandı.

Sonra zaman kaybetmeksizin floresan mikroskop altında muayene edildi. Her denemeye negatif (TdT'nin reaksiyon karışımından çıkarılarak) ve pozitif (DNase I, 1 mg/mL, oda sıcaklığında 10 dakika süre ile) kontroller eklendi. En az 100 sperm hücresi sayılarak TUNEL-pozitif sperm yüzdesi hesaplandı. İlk olarak her mikroskop sahası öncelikle floresan mikroskop altında 40x büyütmede reaktif sperm sayısını belirlemek amacıyla sayıldı, daha sonra faz kontrast mikroskop altında total spermatozoon sayıldı (Nur ve ark., 2011).

### 3.5. Spermmanın Sulandırılması ve Soğutulması

Eklenecek olan sulandırıcı miktarı taze spermadaki yoğunluk ve hacim değerleri göz önünde bulundurularak her payette  $100 \times 10^6$  (yüz milyon) spermatozoon olacak biçimde ayarlandıktan sonra Aisen ve ark. (2002) araştırmalarında kullandıkları temel sulandırıcı kontrol grubu olarak kullanıldı (Tablo 1) (Aisen ve ark., 2002).

**Tablo 1.** Sulandırıcı Formülü

TRIS- früktoz sulandırıcısı: Sulandırıcı A (100 ml)	Miktar	Kimyasal Kodu
THAM (TRIS (hydroxymethyl) aminometane)	27,1 gr	T6791
D- früktoz	10,0 gr	F3510
Sitrik asit	14,0 gr	C2404
Penisilin G	0,3 gr	SV30010
Dihidrostreptomisin	0,4 gr/l	SV30010
Trehaloz	1,8917 gr	T0167
Yumurta sarısı	%20 v/v	
Gliserollü Sulandırıcı: Sulandırıcı B		
THAM (TRIS (hydroxymethyl) aminometane)	27,1 gr	T6791
D- früktoz	10,0 gr	F3510
Sitrik asit	14,0 gr	C2404
Penisilin G	0,3 gr	SV30010
Dihidrostreptomisin	0,4 gr	SV30010
Trehaloz	1,8917 gr	T0167
Yumurta sarısı	%20 v/v	

Saf kriyoprotektan içeren gruplar için sulandırıcı B'ye finalde toplam %6 olacak biçimde gliserol (G7893) (kontrol grubu), DEX (D4626), PVP (PVP360) veya PEG (P2139) eklendi (Tablo 2).

Gliserol ve eksternal kriyoprotektanların karışımını içeren çalışma grupları oluşturulurken finalde toplam kriyoprotektan oranı %6 olacak biçimde, sulandırıcı B’de bulunan gliserol %2 veya %4 oranında azaltılarak yerine sırasıyla %4 veya %2 DEX, PVP veya PEG eklendi (Tablo 2).

**Tablo 2.** İçinde farklı oranlarda gliserol/eksternal kriyoprotektan içeren çalışma grupları

<b>Grup</b>	<b>Gliserol (%)</b>	<b>Eksternal Kriyoprotektan</b>
<b>Kontrol</b>	6	0
<b>Dekstran</b>	<b>Gliserol (%)</b>	<b>DEKSTRAN (%) (w/v)</b>
DEX2	4	2
DEX4	2	4
DEX6	0	6
<b>Polivinil Pirlidon</b>	<b>Gliserol (%)</b>	<b>PVP (%) (w/v)</b>
PVP2	4	2
PVP4	2	4
PVP6	0	6
<b>Polietilen Glikol</b>	<b>Gliserol (%)</b>	<b>PEG (%) (w/v)</b>
PEG2	4	2
PEG4	2	4
PEG6	0	6

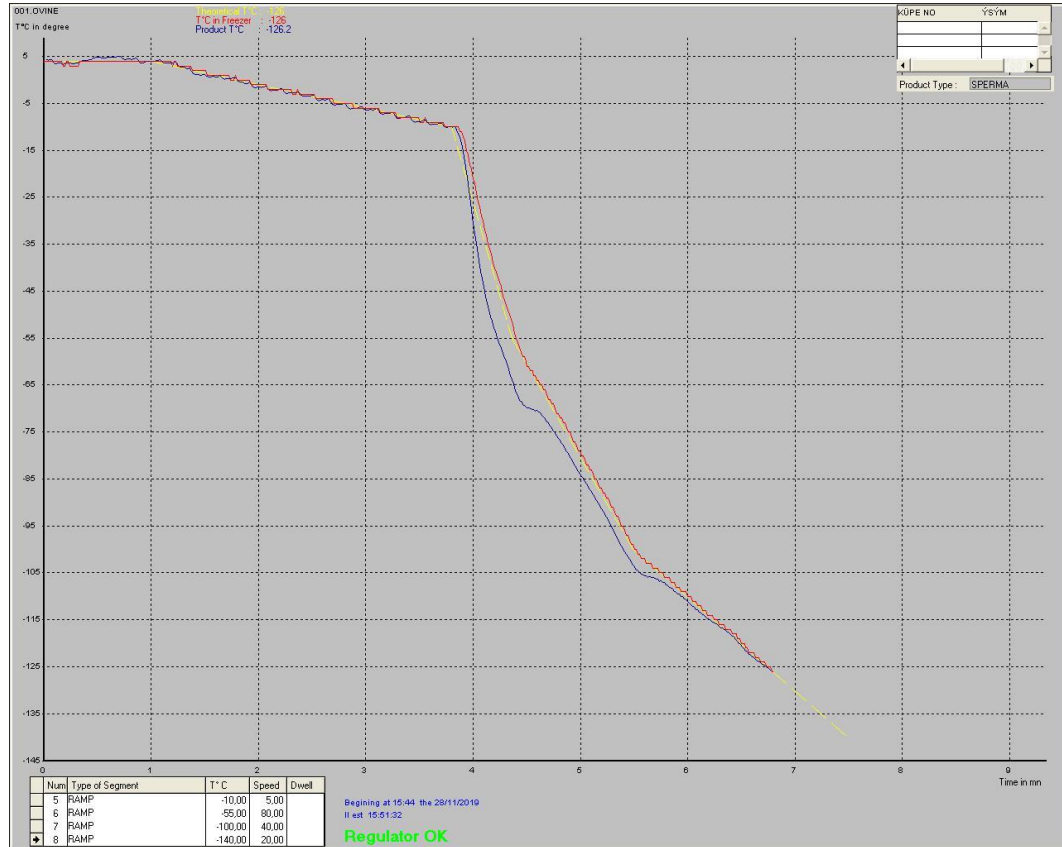
Sperma alındıktan sonra içinde 30 °C su bulunan bir kaba aktarıldı. Normospermik olan örnekler pooling yapıldı. Daha sonra elde edilen miks ejakülat örnekleri 1:1 oranında kriyoprotektan madde içermeyen sulandırıcı A ile sulandırıldı. En az 5 dakika sonra sulandırıcı A’nın geri kalan bölümü eklenerek içinde 30 °C su bulunan kapla birlikte 5 °C’ye ayarlanmış soğuk kabine yerleştirildi. Spermanın ısısı 2 saat içinde (-0,30 °C/dak) suya buz kalıpları atarak 5 °C’ye indirildi.

Soğutulan sperma 10 eşit gruba bölündü ve gruplarda belirtilen kriyoprotektan içeren sulandırıcı B ile 50 dakika inde (5 eşit hacimde) aşamalı olarak sulandırıldı. Sulandırma işlemi tamamlandıktan sonra sperma 5 °C’de 2 saat süreyle ekilibrasyona bırakıldı.

### 3.6. Spermanın Dondurulması

Ekilibrasyon sürenin sonunda sperma otomatik payet doldurma cihazında (MRS-1 Dual® IMV, France) 0,25 mL payetlere çekildi. Dondurma işlemi amacıyla programlanabilir dondurma cihazı (Mini-Digitcool® IMV, France) kullanıldı. Dondurma işlemi; 4 °C'den -10°C'ye 5 °C/dk, -10 °C'den -55 °C'ye 80 °C/dk, -55 °C'den -100 °C'ye 40 °C/dk, -100 °C'den -140 °C'ye 20 °C/dk hızında yaklaşık 6,5 dakika içinde donduruldu (Şekil 6). Dondurulan payetler sıvı azot (-196 °C) içine aktarılarak muayene zamanına kadar saklandı. Bu çalışma beş tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

Dondurma işlemlerinden en az bir hafta sonra dondurulan sperma çözündürüldü ve çözündürme sonrası rutin spermatolojik muayeneleri yapıldı.



Şekil 6. Dondurma İşlemi Diagramı (Sarı (Teorik sıcaklık), Kırmızı (Dondurucu iç sıcaklığı), Mavi (Payet iç sıcaklığı))

### 3.7. İstatistik Analiz

Dondurma çözdürme sonrası elde edilen genel spermatolojik parametreler tanımlayıcı istatistik olarak değerlendirildi ve Ort±St. Hata olarak verildi. Karşılaştırma gerektiren analizlerde *tek yönlü varyans (ANOVA)* ve *Tukey* çoklu karşılaştırma yöntemi uygulandı. Analizlerde SPSS (IBM® SPSS Statistics for Windows, Version 23) paket veri programı kullanıldı. Yapılan değerlendirmelerde  $P<0,05$  anlamlılık düzeyinin istatistiki farkı yansıttığı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Beş tekrar olarak gerçekleştirilen çalışmada kullanılan poolingler ortalama 5,65 mL hacim,  $4.390 \times 10^6$  spermatozoon/mL, %86,17 TM ve %72,42 PM özellikleri sahipti. Sulandırma sonrası aşamada TM, PM ve canlı spermatozoon oranları sırasıyla %91,05, %81,40 ve %76,22, soğutma sonrası aşamada ise yine sırasıyla %88,37, %76,51 ve %75,71 olarak belirlendi (Tablo 3).

**Tablo 3.** Miks edilen spermalarda sulandırma ve soğutma sonrası elde edilen spermatolojik veriler

	n	TM (%)	PM (%)	Canlı (%)
Sulandırma Sonrası	5	91,05	81,40	76,22
Soğutma Sonrası	5	88,37	76,51	75,71

Ekilibrasyon sonrası aşamada saf %6 kriyoprotektan içeren kontrol, DEX6, PVP6 ve PEG6 gruplar karşılaştırıldığında en yüksek ekilibrasyon sonrası TM oranı; DEX6 grubunda elde edildi. DEX6, PVP6 ve kontrol gruplarının ekilibrasyon sonrası TM oranlarının PEG6 içeren gruptan daha yüksek olduğu gözlemlendi ( $P < 0,05$ ). Saf %6 kriyoprotektan içeren gruplara ait PM oranları karşılaştırıldığında, DEX6 grubuna ait PM oranının PEG6 ve PVP6 gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlendi ( $P < 0,05$ ). Canlı spermatozoon oranı bakımından PVP6, DEX6 ve kontrol gruplarına ait canlı spermatozoon oranının PEG6 grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü (Tablo 4). Çalışmada kullanılan kriyoprotektanların miktar ve çeşidinin ekilibrasyon aşamasında incelen spermatolojik özellikleri etkilediği görüldü (Tablo 4). Ekilibrasyon sonrası aşamada karışım gruplarında sulandırıcıdaki gliserol oranı arttıkça TM ve PM oranında artış olduğu gözlemlendi ( $P > 0,05$ ). DEX ve PVP içeren grupların tümünde ve PEG2 grubunda canlı spermatozoon oranının kontrole göre daha yüksek olduğu görüldü ( $P > 0,05$ ).



**Tablo 4.** Gruplarda ekilibasyon sonrasında elde edilen spermatolojik veriler

Grup açıklama	n	Total Motilite (%)	Progressif Motilite (%)	Canlı Spermatozoon Oranı (%)
		Ort ± St. Hata	Ort ± St. Hata	Ort ± St. Hata
Kontrol	5	89,69 ± 1,400 a	83,71 ± 1,760 a	64,94 ± 3,090 abc
DEX2	5	88,44 ± 2,090 ab	77,11 ± 1,450 abc	70,78 ± 2,400 abc
DEX4	5	86,33 ± 1,770 ab	76,47 ± 2,150 abc	70,58 ± 2,240 abc
DEX 6	5	89,83 ± 1,760 a	80,12 ± 1,700 a	71,40 ± 1,840 ab
PVP2	5	92,13 ± 1,300 a	79,24 ± 1,980 ab	74,40 ± 2,730 a
PVP4	5	91,50 ± 0,996 a	73,89 ± 3,460 abc	75,95 ± 2,270 a
PVP6	5	89,71 ± 0,786 a	66,77 ± 1,320 c	72,79 ± 2,930 a
PEG2	5	90,65 ± 1,290 a	74,32 ± 3,420 abc	71,25 ± 1,960 abc
PEG4	5	88,89 ± 0,488 a	73,19 ± 3,250 abc	60,58 ± 2,670 bc
PEG6	5	81,77 ± 1,590 b	68,43 ± 1,690 bc	59,53 ± 2,470 c
<b>P değeri</b>		<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>

a,c Aynı sütündeki farklı harfler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

Çözdürme sonrasında elde edilen TM ( $P<0,001$ ), PM ( $P<0,001$ ), canlı spermatozoon oranı ( $P<0,001$ ), polarize mitokondri (Yüksek Mitokondriyal Potansiyel) ( $P<0,001$ ) ve apoptotik indeks (TUNEL) ( $P>0,05$ ) bakımından gruplar arasında fark olduğu gözlemlendi (Tablo 5). Saf %6 kriyoprotektan içeren kontrol (%6Gliserol), DEX6, PVP6 ve PEG6 içeren gruplar karşılaştırıldığında, çözdürme sonrası TM, PM, canlı spermatozoon ve polarize mitokondri oranları bakımından kontrol grubunun diğer gruplara göre daha üstün olduğu gözlemlendi ( $P<0,001$ ). DEX, PVP ve PEG içeren gruplarda ortamdaki gliserol oranı arttıkça TM, PM, canlı spermatozoon oranı ve polarize mitokondri oranının arttığı belirlendi (Şekil 7). DEX2 ve PEG2 içeren gruplara ait TM, PM, canlı spermatozoon oranı ve polarize mitokondri oranının DEX6 ve PEG6 gruplarına göre daha iyi olduğu saptandı ( $P<0,05$ ). TUNEL indeks oranı bakımından gruplardan elde edilen bulguların benzer olduğu gözlemlendi ( $P>0,05$ ).

**Tablo 5.** Çözdürme sonrası elde edilen ortalama spermatolojik parametreler

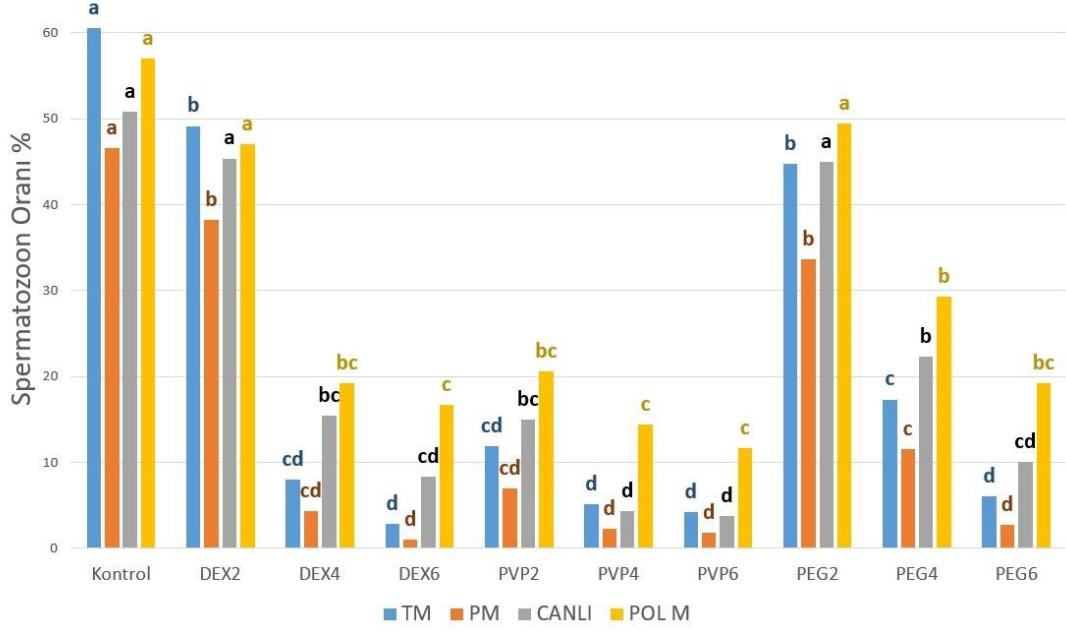
Grup	n	Total Motilite (%)	Progressif Motilite (%)	Canlı spermatozoon oranı (%)	Polarize Mitokondri (%)	TUNEL İndeks (%)
------	---	--------------------	-------------------------	------------------------------	-------------------------	------------------

		Ort. ± St. Hata	Ort. ± St. Hata	Ort. ± St. Hata	Ort. ± St. Hata	Ort. ± St. Hata
Kontrol	15	60,53 ± 3,880 a	46,59 ± 3,690 a	50,86 ± 2,010 a	57,05 ± 2,100 a	3,69 ± 0,598
DEX2	15	49,17 ± 2,580 b	38,22 ± 2,100 b	45,38 ± 2,030 a	47,00 ± 1,770 a	3,69 ± 0,613
DEX4	15	7,98 ± 1,070 cd	4,37 ± 0,731 cd	15,4 ± 2,510 bc	19,24 ± 2,690 bc	3,11 ± 0,507
DEX 6	15	2,83 ± 0,354 d	1,06 ± 0,158 d	8,38 ± 3,550 cd	16,68 ± 2,690 c	3,05 ± 0,526
PVP2	15	11,94 ± 2,100 cd	6,99 ± 1,340 cd	14,96 ± 1,940 bc	20,56 ± 2,100 bc	2,89 ± 0,438
PVP4	15	5,13 ± 0,575 d	2,29 ± 0,408 d	4,38 ± 0,229 d	14,37 ± 1,780 c	3,48 ± 0,695
PVP6	15	4,20 ± 0,569 d	1,84 ± 0,317 d	3,73 ± 0,621 d	11,66 ± 1,190 c	3,28 ± 0,421
PEG2	15	44,73 ± 3,190 b	33,63 ± 3,020 b	45,02 ± 2,780 a	49,47 ± 3,100 a	3,07 ± 0,424
PEG4	15	17,34 ± 2,350 c	11,53 ± 1,740 c	22,28 ± 1,360 b	29,31 ± 2,150 b	2,84 ± 0,390
PEG6	15	6,07 ± 0,657 d	2,74 ± 0,493 d	10,11 ± 0,950 cd	19,23 ± 1,960 bc	2,78 ± 0,658
<b>P değeri</b>		<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	0,956

a,d Aynı sütundaki farklı harfler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

Çözüm sonrası aşamada spermatozon plazma ve akrozom membran bütünlüğünün farklı spermatozon popülasyonlarındaki durumunu belirlemek için Easykit 5 (ref. 025293; IMV Technologies) kiti kullanıldı. Çözdürme sonrası toplam plazma bütünlüğüne sahip spermatozon oranı ( $P>0,001$ ), toplam sağlam akrozom bütünlüğüne sahip spermatozon oranı ( $P>0,001$ ), plazma membranı ve akrozomu sağlam spermatozoa oranı ( $P>0,001$ ), plazma membranı sağlam fakat bozuk akrozoma sahip spermatozon oranı ( $P>0,001$ ), plazma membranı bozuk fakat sağlam akrozoma sahip spermatozon oranı ( $P>0,001$ ), plazma membranı ve akrozomu bozuk spermatozon oranı ( $P>0,001$ ) bakımından gruplar arasında istatistiksel fark olduğu gözlemlendi (Tablo 6).

## Çözdürme Sonrası TM/ PM/ Canlı/ Pol M



**Şekil 7.** Gruplara göre çözdürme sonrası elde edilen TM (Total motilite), PM (Progressif motilite), Canlı oranı (EasyKit 1) ve Pol M (Polarize mitokondri (Yüksek mitokondriyal aktivite) oranı) (a,d Aynı renkte sütunlarda aynı renkli farklı harfler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ( $P < 0,05$ ))

Çözdürme sonrası aşamada saf %6 kriyoprotektan içeren kontrol (%6 Gliserol), DEX6, PVP6 ve PEG6 içeren gruplar karşılaştırıldığında en yüksek toplam plazma membran bütünlüğüne sahip spermatozoon oranı kontrol grubunda elde edildi ( $P > 0,05$ ). En düşük plazma membran bütünlüğüne sahip spermatozoon oranı PVP6 grubunda ( $P > 0,05$ ) elde edilirken; DEX6, PVP6 ve PEG6'nın plazma membran bütünlüğünü korumada yetersiz olduğu gözlemlendi. Genel olarak DEX, PVP ve PEG içeren gruplarda sulandırıcıdaki gliserol oranı arttıkça toplam plazma membran bütünlüğüne sahip spermatozoon oranının arttığı görüldü.

Toplam sağlam akrozom bütünlüğüne sahip spermatozoon oranı bakımından, DEX6 ve PVP6 içeren grupların kontrol grubu ile benzer olduğu görüldü ( $P > 0,05$ ). PEG6 grubunun kontrol ve DEX6 gruplarına göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu belirlendi ( $P < 0,05$ ). DEX ve PVP içeren gruplarda gliserol oranının düşürülmesi toplam akrozom bütünlüğüne sahip spermatozoon oranını etkilemedi. PEG gruplarında ise sulandırıcıdaki gliserol oranı azaldıkça toplam akrozom bütünlüğüne sahip spermatozoon oranının azaldığı, gliserol içermeyen PEG6 içeren gruba ait toplam akrozom bütünlüğüne sahip spermatozoon oranının PEG2 grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu görüldü ( $P < 0,05$ ).

Plazma membranı ve akrozomu sağlam spermatozoon oranı bakımından %6 kriyoprotektan içeren gruplar karşılaştırıldığında, kontrol (%6 gliserol) grubunun diğer gruplara (DEX6, PVP6 ve PEG6) göre daha iyi koruma sağladığı belirlendi ( $P<0,001$ ). DEX, PVP ve PEG içeren gruplarda ortamdaki gliserol oranı azaldıkça plazma membranı ve akrozomu sağlam spermatozoon oranının da azaldığı görüldü.

Plazma membranı sağlam fakat akrozom bütünlüğü bozuk spermatozoon oranı bakımından DEX6 ve PEG6 gruplarının kontrol grubu ile benzer olduğu görülürken en düşük oran PVP6 grubunda elde edildi. Sulandırıcısızdaki gliserol oranının plazma membranı sağlam fakat akrozomu bozuk spermatozoon oranını etkilemediği belirlendi ( $P>0,05$ ).

Plazma membranı bozuk fakat akrozomu sağlam spermatozoon oranı bakımından saf kriyoprotektan içeren gruplar değerlendirildiğinde, gliserol içeren kontrol grubunun, DEX6 ve PVP6 gruplarına göre daha düşük oranda sağlam akrozom oranına sahip olduğu gözlendi ( $P<0,05$ ). Genel olarak ortamdaki gliserol oranı azaldıkça plazma ve akrozomal membranı bozuk spermatozoon oranının arttığı görüldü. Plazma membranı hasara uğramış sperm popülasyonu değerlendirildiğinde, eksternal kriyoprotektan içeren grupların tümünde %6 gliserol içeren kontrol grubuna göre DEX2 ve PEG2 grupları hariç ( $P>0,05$ ) daha yüksek oranda sağlam akrozom oranı elde edildi ( $P<0,05$ ). Plazma ve akrozomal membranı bozuk spermatozoon oranı bakımından kontrol grubuna göre en yüksek oran, PEG6 grubunda elde edildi ( $P>0,05$ ).

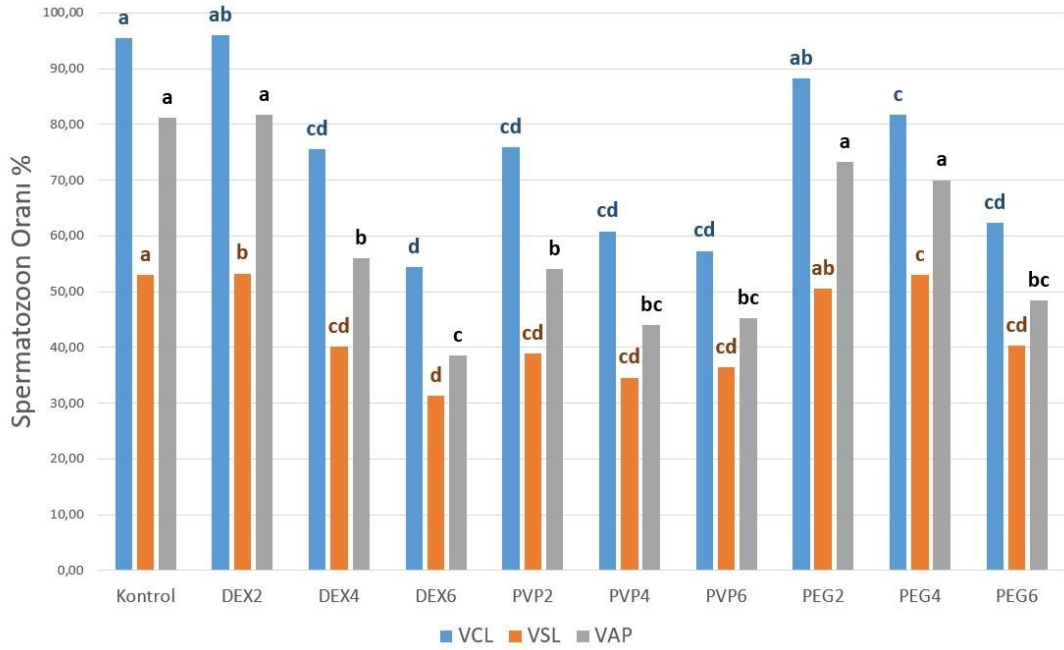
**Tablo 6.** Çözdürme sonrası plazma ve akrozom membran bütünlüğü verileri

Grup	n	Toplam		Plazma Membranı Sağlam		Plazma Membranı Bozuk	
		Plazma Membran Bütünlüğü (%)	Sağlam Akrozom Oranı (%)	Sağlam Akrozom Oranı (%)	Bozuk Akrozom Oranı (%)	Sağlam Akrozom Oranı (%)	Bozuk Akrozom Oranı (%)
		Ort. ± St. Hata	Ort. ± St. Hata	Ort. ± St. Hata	Ort. ± St. Hata	Ort. ± St. Hata	Ort. ± St. Hata
Kontrol	15	48,56 ± 2,890 <sup>a</sup>	79,73 ± 2,310 <sup>ab</sup>	47,86 ± 2,880 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,099 <sup>abcd</sup>	31,88 ± 1,880 <sup>e</sup>	19,56 ± 2,290 <sup>bc</sup>
DEX2	15	43,89 ± 1,760 <sup>a</sup>	80,99 ± 1,820 <sup>a</sup>	43,06 ± 1,720 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,126 <sup>abcd</sup>	37,93 ± 1,700 <sup>de</sup>	18,18 ± 1,830 <sup>c</sup>
DEX4	15	14,96 ± 2,870 <sup>bc</sup>	77,96 ± 1,450 <sup>ab</sup>	14,19 ± 2,870 <sup>bc</sup>	0,77 ± 0,095 <sup>abcd</sup>	63,77 ± 3,150 <sup>ab</sup>	21,27 ± 1,450 <sup>bc</sup>
DEX 6	15	7,86 ± 3,300 <sup>cd</sup>	77,12 ± 1,600 <sup>ab</sup>	7,37 ± 3,290 <sup>cd</sup>	0,49 ± 0,047 <sup>bcd</sup>	69,75 ± 3,270 <sup>a</sup>	22,39 ± 1,600 <sup>bc</sup>
PVP2	15	13,58 ± 1,810 <sup>cd</sup>	72,66 ± 2,240 <sup>abc</sup>	13,01 ± 1,830 <sup>cd</sup>	0,57 ± 0,075 <sup>abcd</sup>	59,65 ± 2,610 <sup>ab</sup>	26,77 ± 2,210 <sup>abc</sup>
PVP4	15	4,93 ± 0,325 <sup>d</sup>	72,31 ± 1,450 <sup>abc</sup>	4,50 ± 0,293 <sup>d</sup>	0,43 ± 0,073 <sup>d</sup>	67,80 ± 1,320 <sup>a</sup>	27,26 ± 1,440 <sup>ab</sup>
PVP6	15	5,21 ± 1,390 <sup>d</sup>	71,23 ± 1,460 <sup>bc</sup>	4,73 ± 1,320 <sup>cd</sup>	0,48 ± 0,092 <sup>cd</sup>	66,50 ± 1,610 <sup>a</sup>	28,29 ± 1,470 <sup>ab</sup>
PEG2	15	42,71 ± 2,320 <sup>a</sup>	78,23 ± 1,660 <sup>ab</sup>	41,73 ± 2,320 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,144 <sup>a</sup>	36,50 ± 1,900 <sup>c</sup>	20,80 ± 1,620 <sup>bc</sup>
PEG4	15	24,58 ± 1,780 <sup>b</sup>	71,70 ± 2,000 <sup>bc</sup>	23,69 ± 1,780 <sup>b</sup>	0,89 ± 0,074 <sup>abc</sup>	48,02 ± 1,920 <sup>cd</sup>	27,41 ± 1,950 <sup>ab</sup>
PEG6	15	9,54 ± 0,964 <sup>cd</sup>	63,63 ± 3,300 <sup>c</sup>	8,61 ± 0,985 <sup>cd</sup>	0,93 ± 0,123 <sup>ab</sup>	55,02 ± 2,870 <sup>bc</sup>	35,44 ± 3,280 <sup>a</sup>
<b>P değeri</b>		<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>

a,d Aynı sütundaki farklı harfler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

Çözdürme sonrası CASA analizleri sonucunda elde edilen TM popülasyonuna ait kinematik parametreler Tablo 7’de verilmiştir. Genel olarak sulandırıcıda bulunan kriyoprotektan çeşidi ve miktarının çalışma gruplarına ait hızlı (rapid) ( $P<0,001$ ), orta (medium) ( $P<0,001$ ) ve yavaş (slow) ( $P<0,001$ ) motil spermatozoon oranı, VCL ( $P<0,001$ ), VSL ( $P<0,001$ ), VAP ( $P<0,001$ ), LIN ( $P>0,05$ ), STR ( $P>0,05$ ) ve WOB ( $P<0,001$ ) değerlerini etkilediği gözlemlendi. Çözüm sonrası saf %6 kriyoprotektan içeren kontrol (%6 Gliserol), DEX6, PVP6 ve PEG6 içeren gruplar karşılaştırıldığında en yüksek rapid ( $P<0,05$ ), medium ( $P<0,05$ ) ve slow ( $P<0,05$ ) motil spermatozoon oranı, VCL ( $P<0,05$ ), VSL ( $P<0,05$ ), ve WOB ( $P<0,05$ ) değeri kontrol grubunda elde edildi. Ortamdaki gliserol oranı azaldıkça diğer bir değişle eksternal kriyoprotektan miktarı arttıkça rapid, medium ve slow motil spermatozoon oranının da düştüğü gözlemlendi (Şekil 9). Aynı durum içinde PEG bulunan gruba ait VAP değeri hariç sperm hızı (velocity) ile ilgili parametreler (VCL, VSL ve VAP) için de söz konusu olduğu görüldü (Şekil 8). Sulandırıcıdaki kriyoprotektan çeşidi ve miktarı LIN ve STR değerlerini önemli düzeyde etkilemediği saptandı ( $P>0,05$ ).

### Çözdürme Sonrası VCL/ VSL/ VAP



**Şekil 8.** Çözdürme sonrası elde edilen kinematik özellikler (VCL (Eğriçizgisel hız), VSL (doğrusal hız) ve VAP (VCL/VSL) (a,d Aynı renkte sütunlarda aynı renkli farklı harfler arasındaki fark istatistik açıdan önemlidir (P<0,05))

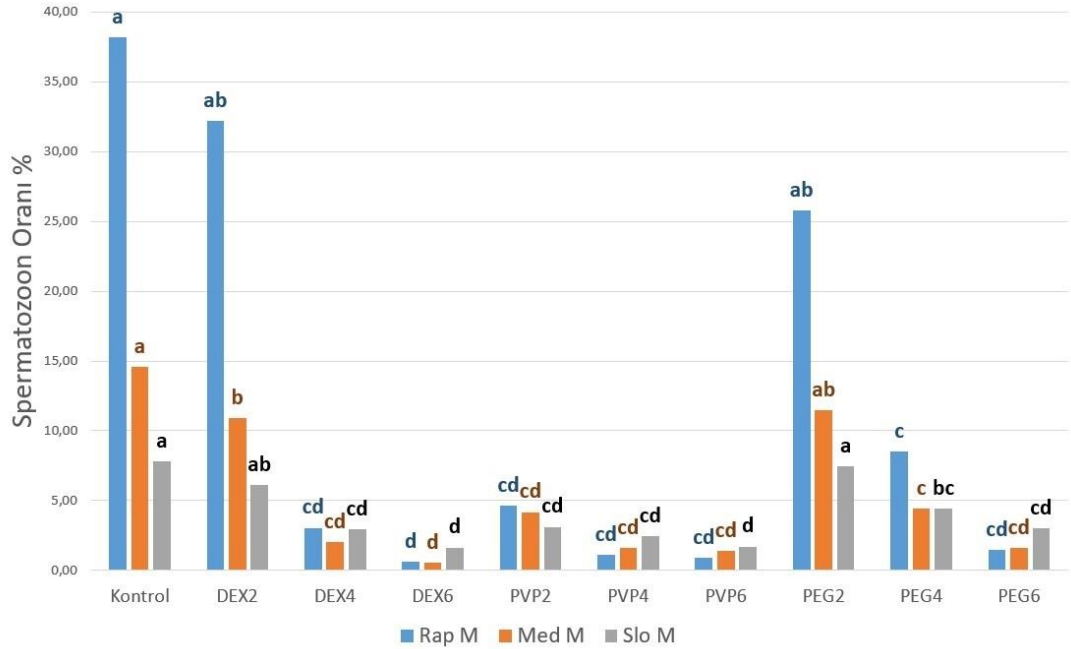
Spermatozoonların yapmış olduğu yalpalama hareketinin (%WOB) sulandırıcıdaki kriyoprotektan madde çeşidi ve miktarından etkilendiği gözlemlendi (P<0,001). İçinde saf kriyoprotektan bulunan gruplar karşılaştırıldığında, DEX6 içeren grubuna ait %WOB oranının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu belirlendi (P<0,05).

**Tablo 7.** Çözdürme sonrası elde edilen kinematik veriler

GRUP	n	Rapid Motil	Medium Motil	Slow Motil	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB
		(%)	(%)	(%)	( $\mu\text{m/s}$ )	( $\mu\text{m/s}$ )	( $\mu\text{m/s}$ )	(%)	(%)	(%)
Kontrol	15	38,18 <sup>a</sup>	14,55 <sup>a</sup>	7,80 <sup>a</sup>	95,49 <sup>a</sup>	53,01 <sup>a</sup>	81,21 <sup>a</sup>	57,35	67,13	84,17 <sup>a</sup>
DEX2	15	32,17 <sup>ab</sup>	10,88 <sup>b</sup>	6,12 <sup>ab</sup>	96,05 <sup>a</sup>	53,26 <sup>a</sup>	81,74 <sup>a</sup>	57,12	66,89	84,01 <sup>a</sup>
DEX4	15	3,05 <sup>cd</sup>	2,01 <sup>cd</sup>	2,97 <sup>cd</sup>	75,59 <sup>bc</sup>	40,13 <sup>bc</sup>	56,06 <sup>b</sup>	55,37	72,93	72,59 <sup>ab</sup>
DEX 6	15	0,62 <sup>d</sup>	0,57 <sup>d</sup>	1,64 <sup>d</sup>	54,37 <sup>d</sup>	31,35 <sup>c</sup>	38,55 <sup>c</sup>	50,31	70,06	62,29 <sup>b</sup>
PVP2	15	4,64 <sup>cd</sup>	4,18 <sup>cd</sup>	3,12 <sup>cd</sup>	75,83 <sup>bc</sup>	38,85 <sup>c</sup>	54,04 <sup>b</sup>	55,59	72,92	72,54 <sup>ab</sup>
PVP4	15	1,10 <sup>cd</sup>	1,60 <sup>cd</sup>	2,43 <sup>cd</sup>	60,84 <sup>cd</sup>	34,60 <sup>c</sup>	44,01 <sup>bc</sup>	58,07	77,48	72,16 <sup>ab</sup>
PVP6	15	0,88 <sup>cd</sup>	1,39 <sup>cd</sup>	1,71 <sup>d</sup>	57,32 <sup>d</sup>	36,46 <sup>c</sup>	45,29 <sup>bc</sup>	62,27	77,15	74,03 <sup>ab</sup>
PEG2	15	25,80 <sup>b</sup>	11,47 <sup>ab</sup>	7,46 <sup>a</sup>	88,27 <sup>ab</sup>	50,60 <sup>ab</sup>	73,19 <sup>a</sup>	58,45	70,10	81,66 <sup>a</sup>
PEG4	15	8,49 <sup>c</sup>	4,45 <sup>c</sup>	4,41 <sup>bc</sup>	81,79 <sup>ab</sup>	53,01 <sup>a</sup>	69,99 <sup>a</sup>	64,85	75,27	83,27 <sup>a</sup>
PEG6	15	1,45 <sup>cd</sup>	1,62 <sup>cd</sup>	3,00 <sup>cd</sup>	62,28 <sup>cd</sup>	40,34 <sup>bc</sup>	48,48 <sup>bc</sup>	59,49	76,22	72,46 <sup>ab</sup>
<b>P değeri</b>		<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	0,138	0,198	<b>0,001</b>

a,d Aynı sütundaki farklı harfler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

### Çözdürme Sonrası Rap M/ Med M/ Slo M



**Şekil 9.** Çözdürme sonrası elde edilen Rap M (Rapid / Hızlı Motil), Medium (Medium / Orta Hızlı Motil) ve Slow (Slow / Yavaş Motil) spermatozoon Oranı (a,d Aynı renkte sütunlarda aynı renkli farklı harfler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir (P<0,05))

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kriyoprotektan maddelerin çeşidi ve miktarı, sulandırma, soğutma, dondurma ve çözme sonrası aşamada membran bütünlüğünü belirleyen temel etkenlerdir. Bu etkenlerin modifikasyonu yapılarak türler arası protokoller geliştirilmiştir (Fernández-Santos ve ark., 2006; Gilmore, Liu, Woods, Peter, & Critser, 2000; Kim ve ark., 2011; Mullen ve ark., 2004; Wegener, & Bienefeld, 2012). Yaptığımız çalışmada, çözüm sonrası aşamada spermatozoon plazma membran ve akrozom membran bütünlüğünün farklı spermatozoon popülasyonlarındaki durumunu “plazma bütünlüğüne sahip spermatozoon oranı, sağlam akrozom bütünlüğüne sahip spermatozoon oranı, plazma membranı ve akrozomu sağlam spermatozoon oranı, plazma membranı sağlam fakat bozuk akrozoma sahip spermatozoon oranı, plazma membranı bozuk fakat sağlam akrozoma sahip spermatozoon oranı, plazma membranı ve akrozomu bozuk spermatozoon oranı” verilerini değerlendirebilmeye olanak tanıyan Easykit 5 (ref. 025293; IMV Technologies) akış sitometri (flow cytometer) kiti kullanıldı (Barrier Battut ve ark., 2016). Suni tohumlama, embriyo elde edilmesi ve transferi, klonlama, *in vitro* fertilizasyon, genomik analiz ve gen transferi gibi biyoteknolojiler hayvancılık sektöründe vazgeçilmez öneme sahiptir. Bu teknikler arasında en etkin ve yaygın olanı, değerli erkek gamet hücrelerinin dondurulması ve dişi hayvanlara transferi esasına dayanan suni tohumlama biyoteknolojisidir (Faigl ve ark., 2012). Bu biyoteknolojik yöntemler etkin bir şekilde kullanılmasıyla ayıklama ve seleksiyondaki isabet derecesi artırılarak genetik ilerleme hız kazanmaktadır (Gordon, 2004b). Ülkemizde koyunculuk alanında genetik özelliklerini yavrularına aktarma yeteneğine sahip üstün damızlıkların seçimi, bu damızlıklardan elde edilen spermanın dondurulması ve suni tohumlama uygulamaları istenilen düzeye ulaşamamıştır. Küçükbaş hayvanlarda suni tohumlamanın yaygınlaştırılması; çözme sonrası sperma kalitesinin artırılarak tohumlama sonrası başarının iyileştirilmesi, uygulama maliyetlerinin düşürülmesi ve veteriner hekimlerine küçükbaş hayvanların suni tohumlaması konusunda eğitimlerin verilmesi ile koyunculuk alanındaki genetik ilerlemeye hız kazandırılabilir (Faigl ve ark., 2012; Kukovics, Gyoker, Nemeth, & Gergatz, 2011; Salamon, & Maxwell, 2000).

Çalışmamız gliserolün çözme sonrası spermatolojik parametreler üzerine olan olumsuz etkisini minimize etmek için, hücre içine giremeyen DEX (dekstran),



PVP (polivinilpirolidon), ve PEG (Polietilen glikol)'nin farklı oranlarda eklenerek gliserolün final yoğunluğunun düşürülmesi amacıyla gerçekleştirildi. Çalışmamızda spermatolojik özellikleri ortaya koymak için yoğunluk, TM, PM, sperm motilitesi ile ilişkili bazı kinematik parametreler, canlı spermatozoon oranı, plazma membran ve akrozom bütünlüğü, mitokondri membran potansiyeli ve apoptoza uğrayan spermatozoon oranı değerlendirildi.

Koç spermasının *in vitro* saklanmasına yönelik taze (Menchaca, Pinczak, & Queirolo, 2006), soğutulmuş (Arando ve ark., 2019; Benmoula ve ark., 2018; Dai ve ark., 2019; Dayanikli ve ark., 2022; Falchi ve ark., 2018; Gungor, Ata, & Inanc, 2018; Gündoğan, 2009; İnanç ve ark., 2019; Kulaksız, Çebi, & Akçay, 2012; O'Hara ve ark., 2010) ve dondurulmuş sperma (Alçay, Soylu, & Üstüner, 2013; Alçay, Üstüner, Çakmak, Çakmak, & Nur, 2015; Soylu, Nur, Ustuner, & Dogan, 2007; Ustuner ve ark., 2016; Üstüner, Alçay, Nur, Sağirkaya, & Soylu, 2014) ile yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Sperma alma yöntemi, üreme mevsimi donörün ırkı, yaşı ve sağlık durumu, kullanılan alet ve malzemenin ısı ve temizliği, sperma sulandırıcısı ve analiz yöntemi spermatolojik özellikleri etkiler. Aşım sezonu içinde Karacabey Merinosu koçlardan suni vajen yöntemi ile haftada iki kez alınan normospermik ejakülat örnekleri pooling yapılarak çalışmada kullanıldı. Çalışmada kullanılan pooling yapılmış taze sperma örnekleri, ortalama 5,65 ml hacim,  $4.390 \times 10^6$  spermatozoon/ml, %86,17 TM ve %72,42 PM özelliklerine sahipti. Bilgisayar destekli sperma analiz sistemi kullanılarak değerlendirilen taze koç spermasında TM %26-%95 ve PM %14-%74 arasında ölçüldüğü bildirilmiştir (Santolaria ve ark., 2015). Normospermik özellikteki ejakülat örnekleri kullanılarak yapılan çalışmalarda pooling sonrası TM: %77-%89 (Ak ve ark., 2010; Alçay ve ark., 2015; Ustuner ve ark., 2016, 2022) arasında sonuçlar elde edilmiştir.

Spermanın çözündürme sonrası fertilitite yeteneğini sürdürebilmesi için dondurulmadan önce sulandırılması zorunludur. Bu amaçla kullanılan sulandırıcılar; uygun bir ozmotik basınç ve elektrolit denge sağlamalı, spermatozoonlar için enerji gereksinimini karşılamalı, bakteriyel üremeyi kontrol etmeli, spermayı soğuk şokuna karşı korumalı ve ortamın pH değerini dengeleyebilmelidir (Silva, Cardoso, Uchoa, & Silva, 2003). Seminal plazma, protein, enzim ve antioksidanlar gibi spermatozoonun fizyolojisinde önemli rolleri olan çok sayıda aktif molekül içerir. Bu aktif moleküller

spermanın dişi genital kanaldaki yaşam süresi, kolonizasyon ve göçünü organize eder (Gündoğan, 2009). Spermanın sulandırılması, seminal plazmada bulunan ve spermatozoonun membran bütünlüğünün ve fonksiyonunun sürdürülmesi için gerekli olan proteinleri, doğal antioksidanları ve diğer faydalı bileşenleri seyrekleştirir (Hafez, & Hafez, 1993). Spermanın sulandırıcılarla işlem görmesi sonucu sulandırmanın etkisi olarak adlandırılan birtakım değişiklikler oluşur. Uygun sulandırma oranı, dengeli tuz, enerji ve tamponlama kapasitesi olan sulandırıcılar kullanılarak sulandırmanın spermatozoonların üzerindeki olumsuz etkisi en aza indirilebilir (Hafez, & Hafez, 1993). Sulandırma sonrası aşamada TM, PM ve canlı spermatozoon oranı sırasıyla %91,05, %81,40 ve %76,22 olarak belirlendi. TRIS bazlı sulandırıcı ile sulandırılan koç spermasında %79 (Nur ve ark., 2010), %72 (Bacınoğlu ve ark., 2007), %74 (Alcay ve ark., 2016) sulandırma sonrası motilite bildirilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız temel sulandırıcı içeriğinin spermatozoonların TM, PM ve canlılığını korumada etkili olduğu gözlemlendi. Bu etkinin sulandırıcının tamponlama kapasitesi ve içeriğindeki enerji kaynaklarından ileri geldiği düşünölmektedir. Farklı ozmotik basınçta trehaloz içeren TRIS bazlı sulandırıcı ile sulandırılan koç spermasında, soğutma aşamada %95 ile %47 motilite, %100 ile 94 sağlam akrozom oranını ve %92 ile %38 fonksiyonel plazma membran bütünlüğu bildirilmiştir (Aisen ve ark., 2002).

Dondurma ve çözdürme sırasında oluşan olumsuz etkileri minimize etmek için çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Temel olarak spermanın saklanma teorisi, ortamın ısının düşürölerek spermatozoonun metabolik ve biyokimyasal fonksiyonunu yavaşlatma temeline dayanır (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000). Geleneksel olarak, sperma vücut sıcaklığına yakın bir sıcaklıkta (30 ila 39 °C) birinci aşama sulandırıcısı ile sulandırılır daha sonra 5 °C'ye soğutulularak bu ısıda içinde bir kriyoprotektan (gliserol vb.) bulunan sulandırıcı ile ikinci aşama sulandırıcı eklenir (Polge ve ark., 1949). Koç spermasının birinci aşama sulandırıcısı ile sulandırıldıktan sonra 1-3 saat için 5 °C'ye soğutulması gerekmektedir. Özellikle soğutmaya bağlı yıkımların oluştuğu 18 °C ile -5 °C ısılar arasında hızlı soğutmadan kaçınılmalıdır (Fiser ve ark., 1987; Salamon, & Maxwell, 1995a). Sıvı veya dondurma yöntemlerinde, kullanılan sulandırıcı içeriğinin spermatozoonun metabolizmasının sürdürölmesi üzerine önemli etkileri vardır (De Leeuw ve ark., 1993; Li, Cai, Kovacs, & Ji, 2005; Maksimović ve ark., 1970; Salamon, & Maxwell, 1995a,2000; Soylu ve

ark., 2007; Taşdemir ve ark., 2013). Sunulan çalışmada birinci aşama sulandırıcısı ile sulandırılan spermanın ısısı 2 saat içinde (-0,30 °C/dak) buz kalıpları da kullanılarak aşamalı olarak 5 °C'ye indirildi. Ortam ısınının 5 °C'ye düşürülmesi, spermatozoon metabolizmasını yavaşlatarak TM (%9'den %88'e) ve PM'yi (%8'den %77'ye) sulandırma sonrası aşamaya göre düşürdüğü gözlemlendi. Taze koç spermasında canlı spermatozoon oranı %20-81 arasında değişmektedir (Santolaria ve ark., 2015). Spermatozoon motilitesi ve canlı spermatozoon oranı sulandırma ve soğutma işleminden olumsuz etkilenir (Benmoula ve ark., 2018). Sperma ısınının vücut sıcaklığından donma noktasına kadar soğutulması, zar bileşenlerini dengesizleştirerek yeniden düzenlenmesine ve kalsiyum akışına neden olarak spermatozoon plazma zarında stres oluşturur (Collin, Sirard, Dufour, & Bailey, 2000; De Leeuw ve ark., 1993).

Sperma ısınının 37 °C'den 5 °C'ye soğutma sırasında oluşan, mekanik ve ozmotik değişiklikler membran lipid yapısının farklılaşması ve faz geçişleriyle ilgilidir. Soğutmanın neden olduğu değişiklikler dondurma ve çözündürmenin neden olduğundan çok farklıdır (Ollero, Perez-Pe, Muiño-Blanco, & Cebrian-Perez, 1998). Spermatozoon, soğutma sırasında çevresinde oluşan birtakım fiziksel ve kimyasal değişikliklerle karşılaşır. Düşük ısılarda spermatozoon membranında bulunan lipid yapılarında translokasyonlar gerçekleşir. Bu değişiklikler sıfırın altındaki ısılarda oluşan faz değişimine bağlı olarak daha belirgin duruma gelir (Holt, 2000a).

Sperm membran yapısının bir göstergesi olan canlı spermatozoon oranının, sulandırma sonrası aşamayla benzer olduğu (%76,22 ve 75,71) gözlemlendi. Farklı sulandırıcılarla sulandırılıp soğutulan farklı ırklara ait koç spermasında soğutma sonrası canlı spermatozoon oranının ırk ve sulandırıcı içeriğinden etkilendiği bildirmiştir (Benmoula ve ark., 2018).

Bilgisayar destekli sperm analiz programları, herhangi bir şekilde hareket eden spermatozoon sayısının popülasyondaki oranını TM olarak değerlendirir (Chenoweth, & Lorton, 2014; Seneda ve ark., 2016). İçinde kriyoprotektan bulunan ikinci sulandırıcı (Sulandırıcı B) ile sulandırılan sperma, 2 saat ekilibrasyona bırakıldı. Ekilibrasyon sonrası aşamaya ait TM oranı, soğutma sonrası ile karşılaştırıldığında; PEG6 grubu dışındaki tüm gruplarda ekilibrasyon aşamasında kriyoprotektan ilavesinin TM oranı etkilemediği gözlemlendi. PM oranı bakımından PVP6 ve PEG6

gruplarında düşüş şekillendi. Canlı spermatozoon bakımından da en yüksek düşüş kontrol, PEG6 ve PEG4 gruplarında görüldü. Gliserol özellikle 30 °C ve 5 °C'de spermaya eklendiğinde motiliteyi olumsuz etkiler. Ayrıca akrozom reaksiyonunu hızlandırır. Dolayısı ile spermatozoanın membran yapısını ve canlı spermatozoa oranı da olumsuz etkiler (Abdelhakeam ve ark., 1991; Fiser ve ark., 1987). Gliserol içeren kontrol grubuna ait canlı spermatozoa oranının düşmesi gliserolün mebran yapısı üzerindeki olumsuz etkisi ile açıklanabilir. Soğuk (+5°C ısıda) ortamda 48 saat boyunca saklanan boğa sperması kullanılarak yapılan çalışmada, %5 oranında PEG ilave edilen gruba ait TM ve canlı spermatozoon oranlarının istatistiksel kontrol grubuna benzer olduğu bildirilmiştir (Abavisani ve ark., 2013). Sunulan çalışma da da ekilibrasyon aşamasında PEG içeren gruplara ait canlı spermatozoa oranının kontrol grubuna benzer olduğu belirlendi.

Spermatozoon motilitesi, erkek ve dişi genital kanaldan köken alan birçok faktörün yanında sulandırıcı içeriği, sulandırma miktarı, soğutma, dondurma çözdürme gibi birçok etken tarafından etkilenir (Chenoweth, & Lorton, 2014; Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000). Ekilibrasyon sonrası kullanılan kriyoprotektanların çeşidinin spermanın TM oranını etkilediği gözlemlendi ( $P<0,001$ ). Saf %6 kriyoprotektan içeren kontrol, DEX6, PVP6 ve PEG6 grupları karşılaştırıldığında en yüksek ekilibrasyon sonrası TM oranı; DEX6 grubunda elde edildi. DEX6, PVP6, Kontrol gruplarının ekilibrasyon sonrası TM oranları PEG6 içeren gruba göre daha yüksek olduğu gözlemlendi ( $P<0,05$ ). Soğuk (+5°C ısıda) ortamda 48 saat boyunca saklanan boğa sperması kullanılarak yapılan çalışmada, %5 oranında PEG ilave edilen gruba ait TM oranının zamanla düştüğü ilk 24 saat sonunda kontrol grubuna benzer olduğu bildirilmiştir (Abavisani ve ark., 2013).

PM, başı yönünde ileri doğru ve özellikle düzgün doğrusal hareket gösteren spermatozoon sayısının TM popülasyonundaki oranıdır (Chenoweth, & Lorton, 2014; Seneda ve ark., 2016). Çalışmada kullanılan kriyoprotektanların çeşidi PM oranını önemli düzeyde etkilediği belirlendi ( $P<0,001$ ). PM oranları karşılaştırıldığında, DEX6 gruba ait PM oranının PEG6 ve PVP6 gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlendi ( $P<0,05$ ).

Boğa sperma sulandırıcılarına PEG katılmasının, taze permaya ait TM, PM ve canlı spermatozoon oranını etkilemediği, 24 saat buzdolabında saklama sonrası ise

istatistiksel olarak düşürdüğü bildirilmiştir (Kandelousi ve ark., 2013). Hindi sperma sulandırıcısına %6, %8 ve %20 PVP eklenerek yapılan bir çalışmada; gliserol içeren grupla karşılaştırıldığında, sulandırma sonrası aşamada PVP katılmasının motilite oranını etkilemediği, %6 ve %8 gruplarında canlı spermatozoon oranını artırdığı bildirilmiştir (Rakha ve ark., 2017). Aynı araştırmanın soğutma sonrası aşamasında, %6 ve %8, PVP gruplarına ait motilite oranlarının ve PVP6 içeren grubun canlı spermatozoon oranının kontrol grubuna göre daha iyi olduğu, ekilibasyon sonrası aşamada ise %6 ve %10 PVP içeren gruplara ait motilite oranı ve canlı spermatozoon oranı bakımından %4, %6 ve %10 PVP içeren grupların kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Rakha ve ark., 2017).

Spermatozoon, aktif çekirdeği ve organelleri olan bir hücredir. Biyosentez, kendini onarma, büyüme, bölünme ve yenilenme gibi etkinlikleri olmaksızın, fertilizasyon aşamasına kadar fizyolojik aktivitesini korumalıdır (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000). Son yıllarda hücrenin farklı fonksiyonel bölgelerine yönelik özellikli floresan boyalar kullanılarak kısa zaman diliminde binlerce hücreyi değerlendirebilen akış sitometri (flow cytometer) tekniği, spermanın kalite muayenesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Cordelli ve ark., 2005; Gillan, Evans, & Maxwell, 2005; Graham, 2001; Hossain ve ark., 2011). Çalışmamızda da canlı spermatozoon oranı akış sitometri aracılığıyla Easykit 1 (ref. 024708; IMV Technologies) kullanılarak belirlendi. Bu yöntemde PI (kırmızı floresan) boya almayan, nükleik asidi yeşil olan spermatozoon sayısının tüm popülasyona göre oranı canlı olarak değerlendirildi (Barrier Battut ve ark., 2016). Çalışmada kullanılan kriyoprotektan çeşidi canlı spermatozoon oranını istatistiksel olarak etkilediği belirlendi ( $P<0,001$ ). Canlı spermatozoon oranı bakımından PVP6 ( $P<0,05$ ), DEX6 ( $P<0,05$ ) ve Kontrol ( $P>0,05$ ) gruplarına ait canlı spermatozoon oranının PEG6 grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü. Boğa sperma sulandırıcılarına PEG ilavesinin benzer şekilde canlı spermatozoon oranını olumsuz etkilediğini, saklama süresinin artması ile bu etkinin daha belirgin hale geldiğini bildirmiştir (Abavisani ve ark., 2013).

Bir madde diğer bir maddenin etkinliğini baskılayabilir ya da aditif veya sinerjik bir etki oluşturabilir. Kullanılan kriyoprotektanların birbirleri ile aditif etkisi söz konusu ise birlikte kullanımıyla daha yüksek koruyucu etki elde edilebilir

(Hubalek, 2003). Genellikle intrasellüler kriyoprotektanların ekstrasellüler veya hücre içine yavaş girenlerle birlikte kullanılması önerilmektedir (Hubalek, 2003).

Ekilibrasyon aşamasında kriyoprotektanların karışımını içeren gruplarda kullanılan kriyoprotektan çeşidi ve miktarının ekilibrasyon sonrası spermatolojik özellikleri etkilediği görüldü. PEG6 grubuna ait TM oranının, 2. (DEX2) ve 3. (DEX4) gruplarına göre daha düşük olduğu gözlemlendi ( $P < 0,05$ ). Dekstran, PEG ve PVP polimerik yapıda ekstrasellüler kriyoprotektanlardandır. Ökaryotik hücreler üzerindeki etkinlikleri değişkenlik göstermektedir (Elliott, Wang, & Fuller, 2017; Hubalek, 2003). Genellikle embriyo, sperma ve doku dondurma veya vitrifikasyonu amacıyla diğer kriyoprotektanlarla birlikte kullanılması önerilmektedir (Elliott ve ark., 2017). Yapılan çalışmada ekilibrasyon sonrası aşamada karışım gruplarında sulandırıcıdaki gliserol oranı arttıkça TM ve PM oranında artış olduğu ( $P > 0,05$ ) görüldü. Sulandırıcıdaki tüm maddeler birbirleri ile etkileşim içindedirler. Kriyoprotektanlar da kombine olarak kullanıldığında, birbiri ile etkileşerek belirli hücre organellerini etkiler ve bireysel etkilerinden farklı bir kriyoprotektif etki oluştururlar (Hubalek, 2003). Dekstran ve PVP içeren grupların tümünde ve PEG2 grubunda canlı spermatozoon oranının kontrole göre daha yüksek olduğu görüldü ( $P > 0,05$ ). Ekilibrasyon sonrası aşamada DEX6 içeren grubun, DEX2 ve DEX4 gruplarına göre daha yüksek TM, PM ve canlı spermatozoon oranına sahip olduğu görüldü. PVP içeren gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde saf PVP6 içeren gruba ait TM, PM ve canlı spermatozoon oranı PVP2 ve PVP4 içeren karışım gruplarına göre daha düşük olduğu gözlemlendi. PEG içeren grupların da PVP gruplarına benzerlik gösterdiği, gliserol ile PVP'nin kombine olarak kullanıldığı gruplara ait TM, PM ve canlı spermatozoon oranlarının saf PEG6 içeren gruba göre daha düşük olduğu gözlemlendi. PVP'nin farklı yoğunluklarının çözümü sonrası kanatlı sperması üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, PVP6 katılmasının ekilibrasyon sonrası motilite, sağlam plazma membranı, canlı spermatozoon ve sağlam akrozom oranlarını artırdığı bildirilmiştir (Rakha ve ark., 2017). Sunulan çalışmada da benzer şekilde ekilibrasyon aşamasında, PVP içeren gruplara ait canlı spermatozoon oranı diğer gruplara göre daha yüksek bulundu.

Soğutma, donma ve eritme aşamalarında şekillenen tüm fiziksel ve fizikokimyasal değişiklikler hücre için zararlıdır. Bu nedenle, dondurmanın zararlı

etkilerinden korunması için, sperma sulandırıcılarına kriyoprotektan maddelerin eklenmesi zorunludur (Ak ve ark., 2010; Soylu ve ark., 2007). Soğutma ve dondurma sırasında suyun ozmoz yoluyla hücreden dışarı çıkması sonucu hücre zarı hasar görür. Donma sırasında şekillenen yüksek tuz basıncı, buz kristallerinden kaynaklanan mekanik stres, membranlarda ve hücre organellerinde dehidrasyon oluşturarak proteinlerin denatürasyonuna ve lipid katmanının stabilitesinin kaybolması sonucu spermatozoonun ultrastrüktürel yapısı ve fizyolojisini etkiler (Watson, 2000). Çözdürme sonrasında elde edilen TM ( $P<0,001$ ), PM ( $P<0,001$ ), canlı spermatozoon oranı ( $P<0,001$ ), polarize mitokondri (yüksek mitokondriyal potansiyel) ( $P<0,001$ ) ve apoptotik indeks (TUNEL) ( $P>0,05$ ) bakımından gruplar arasında fark olduğu gözlemlendi (Tablo 5). Gruplar arası farklılığın sulandırıcı içerğindeki kriyoprotektan madde çeşidi ve sulandırıcıdaki oranlarının farklılığından ileri geldiği düşünülmektedir.

Kullanılan kriyoprotektanın çeşidi ve miktarı, soğutma, dondurma ve çözdürme sonrası elde edilen spermatozojik özellikleri etkilemektedir (Alcay ve ark., 2016; Nur ve ark., 2010). İçinde %5 ve %7 oranında gliserol içeren TRIS bazlı sulandırıcı kullanılarak dondurulan koç spermasında çözdürme sonrası total motilite oranı sırasıyla %42 ve %52 olarak bildirilmiştir (Jha ve ark., 2019). Farklı kriyoprotektanlar (%6 DMSO, %6 etilen glikol, %6 1,2 propanediol ve %6 gliserol) kullanılarak dondurulan koç spermasında, kullanılan kriyoprotektan çeşidinin çözdürme sonrası spermatozoon motilitesini etkilediği en yüksek motilite oranının gliserol içeren kontrol grubundan (%53) elde edildiği bildirilmiştir (Alcay ve ark., 2016). TRIS bazlı sulandırıcılara antioksidan katılmasının motiliteyi iyileştirdiği saptanan bir çalışmada, çözdürme sonrası içinde %5 gliserol bulunan kontrol grubunda %47 motilite bildirilmiştir (Bucak ve ark., 2008). İçinde %7 oranında gliserol bulunan lesitin bazlı sulandırıcı ile dondurulan koç spermasında çözdürme sonrası TM ve PM oranı sırasıyla %42 ve %25 bildirilmiştir (Asadzadeh, Abdollahi, Esmailkhanian, & Masoudi, 2021). TM ile ilgili sonuçlar arasındaki farklılık kullanılan analiz yönteminin farklılığından ileri geldiği düşünülmektedir.

Dondurulmuş spermanın yaşam süresi taze ve soğutulmuş spermaya göre daha uzundur. Taze koç spermasının oda ısısında saklanma süresi yaklaşık olarak bir iki gün iken (Morrell, 2006; Paulenz ve ark., 2005a; Paulenz, Soltun, Ådnøy, Berg, & Söderquist, 2005b), soğutulmuş formu fertilizasyon yeteneğini saklama koşullarına

bağlı olarak 72 saat kadar sürdürebilir (Dayanikli ve ark., 2022; Falchi ve ark., 2018; Gündoğan, 2009). Donmuş sperma ise uygun koşullar sağlandığı sürece fertilizasyon yeteneğini yıllarca korumaktadır (Hafez, & Hafez, 1993; Salamon, Maxwell, & Evans, 1985). Gliserolün kriyoprotektif etkisinin Polge vd. (1949) tarafından gösterilmesinden sonraki yıllarda, farklı tür ve değişik hücre tiplerinin dondurulması amacıyla birçok hücre içine girebilen internal ve giremeyen eksternal kriyoprotektanların kullanılabileceği gösterilmiştir (Lovelock, & Bishop, 1959).

Çözdürme işleminin motilite oranı, canlı spermatozoon oranı ve spermatozoon morfolojisi ve fonksiyonel büyüklüğü üzerine önemli etkileri vardır. Bu nedenlerden dolayı dondurulmuş spermanın en ideal çözdürme tekniği konusunda çalışmalar yapılmıştır (Brito ve ark., 2017; Paulenz, Ådnøy, & Söderquist, 2007; Peña, & Linde-Forsberg, 2000; Salamon, & Maxwell, 1995a). Sunulan çalışmada, dondurulan sperma 37 °C ısıda çözdürüldü. Çözdürme sonrası bulgular değerlendirildiğinde, gliserol dışında kullanılan diğer kriyoprotektanların (DEX6, PVP6 ve PEG6) hiçbiri tek başına kullanıldığında TM, PM, canlı spermatozoon ve polarize mitokondri oranını dondurmanın zararlı etkilerine karşı koruyamadığı gözlemlendi. eksternal kriyoprotektan içeren farklı sulandırıcı ve türlerde yapılan çalışmalarda, Dextran (Kundu ve ark., 2002; María P. Viudes-de-Castro ve ark., 2021) dışında diğer PVP (Schmehl, Vazquez & Graham, 1986) ve PEG (Abavisani ve ark., 2013, Schmehl ve ark., 1986) ilavelerinin çözüm sonrası spermatolojik özellikleri korumada yetersiz olduğu bildirilmiştir. Bu durum çalışmada kullanılan eksternal kriyoprotektanların tek başına koç sperması üzerinde yeterince dehidrasyon sağlamadığı ile açıklanabilir.

TRIS, sükröz, trehaloz, sitrik asit gibi birçok farklı kimyasallarla birlikte kullanılarak koç spermasının dondurulması amacıyla birçok çalışmada başarıyla kullanılmıştır (Aisen ve ark., 2000, 2002; Alçay ve ark., 2015; Alçay ve ark., 2016; Nur ve ark., 2010). Kontrol grubumuzla benzer sulandırıcı içeriğine sahip sulandırıcı ile yapılan çalışmalarda %44 ila %54 motilite (Alçay ve ark., 2015; Alçay ve ark., 2016; Demir ve ark., 2015; Nur ve ark., 2010) ve %25 PM (Cirit ve ark., 2013) bildirilmiştir. Çözdürme sonrası aşamada kontrol grubuna ait TM oranı %61 ve PM oranı %47 olarak bulundu. Koç sperması çözdürme sonrası aşamada %40-50 oranında motilite yeteneğini korusa da fonksiyonel özelliğini ancak %20-30 oranında korur (Salamon, & Maxwell, 1995a). Sulandırıcımızda da bulunan eksternal bir



kriyoprotektan olan trehaloz, spermatozoonun zarında bulunan fosfolipitlerle etkileşiminin sonucu spesifik bir membran koruyucusu olarak hareket eder, böylece dehidrasyona karşı ek koruma sağlar. Fakat tek başına katıldığında, çözüm sonrası spermatolojik özellikleri yeterince korumadığı, gliserol ile birlikte kullanıldığında ise daha yüksek koruma sağladığı bildirilmiştir (Aisen ve ark., 2000). Aisen ve ark. (2000), TRIS sulandırıcısı ile sulandırıp dondurdukları koç spermasında, çözündürme sonrası motilite ve sağlam akrozom oranını sırasıyla %64 ve %68 bulmuşlardır. Gliserol içeren grubun diğerlerine göre çok üstün oluşu, trehalozun koruyucu aditif etkisinden ileri gelmiş olabileceği düşünülmektedir (Aisen ve ark., 2000).

İntrasellüler ve ekstrasellüler CP'ler, dondurmanın temel gereksinimi olan dehidrasyona yol açmalarından dolayı, sıklıkla dondurma medyumlarına katılır. Hücrenin su içeriği CP'lere karşı davranışını etkiler (Sztein ve ark., 2001). Trehaloz, DMSO, etilen glikol (EG), PEG ve gliserolün, farklı hücre ve dokuların ondurulmasında kriyoprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Abavisani ve ark., 2013; Cabrita ve ark., 2001; Jung, Kim, & Yoon, 2016; Kandelousi ve ark., 2013; Lee ve ark., 2013; Taşdemir ve ark., 2013). Yapılan çalışmalar, her bir tür ve hücre tipinin farklı bir sulandırma, soğutma, dondurma ve eritme gerektirdiğini; standart dondurma yönteminin kullanılamayacağını göstermiştir (Davidson, Benson, & Higgins, 2014; Mazur, 1963). Hatta aynı tür ve ırk içinde genetik varyasyonlara bağlı olarak bireyler arasında donmaya karşı duyarlılığın farklı olduğu bildirilmiştir (Thurston, Watson, Mileham, & Holt, 2001). Hindi spermasının gliserol katmaksızın dekstranın %10 oranında sulandırıcılara katılması ile başarılı bir şekilde dondurulabileceği bildirilmiştir (Gloria ve ark., 2019). Spermatozoonun fonksiyonları bikarbonat ( $\text{HCO}_3$ ) tarafından aktive edilmektedir (De Jonge, & Barratt, 2017). Spermatozoon motilitesi, biyokimyasal olarak  $\text{HCO}_3$ , intrasellüler pH değerini yükseltmesi ile  $\text{Ca}^{2+}$  ve cAMP'yi artıran olaylar zincirini başlatarak uyarılır (De Jonge, & Barratt, 2017; Ho, & Suarez, 2001). Sperma sulandırıcılarında bulunan  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  gibi iyonlar birçok türün sperm motilitesini etkiler (Pegg, 2002). Soğutma, dondurma ve çözdürmeye bağlı şekillenen kriyojenik hasarlar, eritme sonrası aşamada kısmi veya tam olarak sperm motilite ve membranın fonksiyonel bütünlüğünün yitirilmesi ile tanımlanır (Meryman, 2007). Dekstran, temelde 1-3 yan zincirleri olan bir  $\alpha$ -D-1,6-glikoz bağlantılı bir polimer olup donma sırasında oluşan buz kristallerini modifiye ederek

kriyoprotektif etki oluşturur (Kundu ve ark., 2002). Kullanılan dekstranın moleküler ağırlığına bağlı olarak kriyoprotektif etkisi değişiklik göstermektedir. Kundu ve ark. (2002) gliserol veya DMSO içeren sulandırıcılara farklı moleküler ağırlığa sahip (10-2000 kDa) dekstranın farklı yoğunlukta eklenerek dondurdukları epididimal teke spermasında; düşük moleküler ağırlıkta dekstran içeren gliserol ve DMSO kombinasyonların olumlu sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmamızda 15.000-30.000 kDa moleküler ağırlıkta dekstran kullanılmıştır. Sonuçlar arasındaki farklılığın tür, kullanılan dekstranın moleküler ağırlığı, sulandırıcı çeşidi ve yoğunluk farklılığından ileri geldiği düşünülmektedir. Dekstran, PVP ve PEG içeren gruplarda ortamdaki gliserol oranı arttıkça TM, PM, canlı spermatozoon oranı ve polarize mitokondri oranının artışı gözlemlendi. Dimetilsülfoksit (DMSO) içeren tavşan sperma sulandırıcılarına dekstran katkısının fertilité ve akrozom bütünlüğünü korumada sinerjik etki gösterdiği, bu etkinin motilite üzerinde de gözlemlenmediği bildirilmiştir (Viudes-de-Castro ve ark., 2021). Horoz sperması sulandırıcılarına 0% (kontrol), 4% (w/v), 6% (w/v), 8% (w/v) ve 10% (w/v) PVP eklenerek yapılan bir çalışmada çözündürme sonrası aşamada en yüksek motilite 6% (w/v) PVP içeren grupta elde edildiği bildirilmiştir (Rakha ve ark., 2017). TRIS - sitrik asit sulandırıcısı kullanılarak dondurulan manda spermasında, sulandırıcılara 0,05 ve 0,1 mM PVP katkılarının eritme sonrası motilite oranını artırdığı, yüksek yoğunluklarda bu etkinin görülmediği bildirilmiştir (Khan ve ark., 2021). Bu durum, kullanılan hayvan türü ve sperm sulandırıcısındaki farklılıkla açıklanabilir.

Hidrofilik özellikteki PEG, ortamın ozmotik basıncını artırmak için kullanılan PEG'nin koç spermasının dondurulması amacıyla kullanımına yönelik çalışmalar sınırlıdır (Schmehl ve ark., 1986). Tek başına kullanıldığında boğa sperması üzerine öldürücü etkisi olan PEG'nin (Kandelousi ve ark., 2013), fare spermatogonyal kök hücrelerinin dondurulmasında medyuma %2,5 oranında eklenmesinin canlı hücre sayısını artırdığı bildirilmiştir (Lee ve ark., 2013). Boğa spermasının dondurulması amacıyla yapılan bir çalışmada, sperma sulandırıcılarına PEG katılmasının, çözündürme sonrası TM, PM ve canlı spermatozoon oranı düşürdüğü bildirilmiştir (Abavisani ve ark., 2013; Kandelousi ve ark., 2013). Sunulan çalışmada, sulandırıcılara özellikle yüksek dozlarda PEG ilavesinin çözündürme sonrası TM ve PM oranı düşürdüğü görülmüştür. Bu olumsuz etkinin %2 düzeyinde PEG içeren grupta düşük olduğu

bulunmuştur. PEG içeren sulandırıcı ile dondurulan sığır spermasında, kontrol grubuna ait çözündürme sonrası canlı spermatozoon, TM ve PM oranlarının %5PEG içeren gruba göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Abavisani ve ark., 2013). TEST-yumurta sarısı-gliserol sulandırıcılarına farklı oranlarda dekstran PVP ve PEG ilave edilerek pellet metoduna göre dondurulan koç spermasında, dekstran ilavesinin çözüm sonrası motilityi artırırken, PVP ve PEG ilavelerinin motilityi düşürdüğü bildirilmiştir (Schmehl ve ark 1986).

Trombosit dondurma medyumlarına kriyoprotektan olarak katılan PVP'nin -196 °C'de dondurularak saklanan trombositlere yüksek düzeyde koruma sağladığı bildirilmiştir (Kato, & Nagao, 2012). PVP'nin koç sperması sulandırıcılarına eklenmesi ile ilgili çalışmalara rastlanamamıştır. Hindi sperm sulandırıcısına %6, %8, ve %20 PVP katılarak yapılan bir çalışmada, çözündürme sonrası aşamada %4 ve %6 PVP içeren gruplara ait motilite ve PVP6 gruba ait canlı spermatozoon oranlarının gliserol içeren gruba göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Rakha ve ark., 2017). Sunulan çalışmamızda koç sperması sulandırıcılarına PVP katılmasının TM, PM ve canlı spermatozoon oranlarını düşürdüğü gözlemlendi. Bu durum, kullanılan sulandırıcı ve hayvan türünün farklılığı ile açıklanabilir.

Spermatozoon canlılığı, plazma membranı hasarlı ölü hücrelerin PI boya alması ilkesine dayanır (Nur, 2019). Farklı ırk, sulandırıcı, dondurma ve analiz yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda çözündürme sonrası aşamada %38 ile %67 çözüm sonrası canlı spermatozoon oranı bildirilmiştir (Asadzadeh ve ark., 2021; Jha ve ark., 2019). Sunulan çalışmada dondurma öncesi aşamalar (soğutma ve ekilibasyon) ile karşılaştırıldığında, çözündürme sonrası aşamada daha düşük oranda canlı spermatozoon elde edildi. Dondurulmamış spermaya göre dondurulmuş çözdürülmüş spermada daha az canlı ve daha fazla agoni halinde spermatozoon bulunur (Bailey ve ark., 2003). Sunulan çalışmamızda çözüm sonrası aşamada en yüksek canlı spermatozoon oranı kontrol grubunda (%51) elde edilirken, en düşük canlı spermatozoon oranı PVP4 ve PVP6 gruplarında elde edildi. İçinde %5 ve %7 oranında gliserol içeren TRIS bazlı sulandırıcı kullanılarak dondurulan koç spermasında eritme sonrası total canlı spermatozoon oranı sırasıyla %54 ve %67 bildirilmiştir (Jha ve ark., 2019). Horoz sperması sulandırıcılarına (%6 w/v) PVP katılması çözündürme sonrası canlı spermatozoon oranı artırmaktadır (Rakha ve ark.,

2017). Sunulan çalışmada, PVP katkısının canlı spermatozoon oranını olumsuz etkilediği görüldü ( $P < 0,05$ ). Çözdürme sonrası aşamada saf %6 kriyoprotektan içeren kontrol (%6 gliserol), DEX6, PVP6 ve PEG6 içeren gruplar arasında en yüksek canlı spermatozoon oranı kontrol grubundan elde edildi. Özellikle çalışmada kullanılan eksternal kriyoprotektanların (DEX2 ve PEG2) düşük dozlarında çözdürme sonrası canlı spermatozoon oranının kontrole benzer olduğu belirlendi. TRIS - sitrik asit sulandırıcısı kullanılarak dondurulan manda spermasında, sulandırıcılara 0,01 ve 0,05 mM PVP katkılarının eritme sonrası canlı spermatozoon oranını artırdığı, yüksek yoğunluklarda (0,1mM) bu etkinin görülmediği bildirilmiştir (Khan ve ark., 2021). Spermatozoonun hücre membran yapısı türler arasında değişiklik gösterir. Bu nedenle, sulandırıcı içeriği, soğutmaya ve dondurma sırasında oluşan dehidrasyon ve rehidrasyon sırasındaki faz değişimlerine karşı hücre membranının davranışı da değişir (Cabrita ve ark., 2001; Gilmore ve ark., 1998; Hafez, & Hafez, 1993). Sunulan çalışmada kullanılan eksternal kriyoprotektan çeşidi ve sulandırıcıdaki oranının, canlı spermatozoon oranını etkilediği belirlendi. Özellikle miks gruplara ait çözdürme sonrası canlı spermatozoon oranının kontrol grubuna göre düşük olduğu görüldü. Sulandırıcı ozmolaritesi ve kullanılan kriyoprotektan çeşidi, çözdürme sonrası koç sperması membran bütünlüğünü önemli düzeyde etkilediği bildirilmiştir (Soylu ve ark., 2007). Canlı spermatozoa oranı bakımından gruplar arası bulunan farklılık sulandırıcılara ait ozmotik basınç ve kullanılan kriyoprotektanın kriyoprotektif etkisinin farklılıklarıyla açıklanabilir.

Plazma zarı ve mitokondriyal işlev bozuklukları, programlanmış hücre ölümünün erken dönem göstergelerindedir (Barroso ve ark., 2006). Birçok hücre tipinde apoptozis mekanizmasını koordine eden mitokondri, reaktif oksijen türleri (ROS) motilite için gerek duyduğu ATP'nin büyük bir bölümünü üretir. Kalsiyum sinyali, hiperaktivasyon, membran fonksiyonu spermatozoon metabolizması ve fertilizasyon aşamalarında önemli görevler üstlenir (Aitken, & Baker, 2004; Ott ve ark., 2007; Peña ve ark., 2009; Silva, & Gadella, 2006). Spermatozoon motilitesi ve fertilizasyonda önemli rollerinden dolayı mitokondri membran potansiyelinin spermatolojik muayenede önemli yeri bulunmaktadır.

Çözdürme sonrası sperm fonksiyonel bütünlüğü ve fertilite gücü dondurma hızı ve sulandırıcı bileşenlerinden etkilenmektedir (Asadzadeh ve ark., 2021; Hammadeh,

Askari, Georg, Rosenbaum, & Schmidt, 1999; Hammadeh ve ark., 2001). Sulandırma, soğutma, dondurma ve çözme aşamalarında şekillenen plazma ve mitokondri zarı değişikliklerine yol açan mekanizmaların belirsiz olması nedeniyle ileri düzeyde çalışmalara gerek duyulmaktadır (Barroso ve ark., 2006). Çalışmamızda kullanılan eksternal kriyoprotektanların tümünün çözme sonrası aşamada mitokondride polarizasyona neden olduğu gözlemlendi. Bu durum kullanılan kriyoprotektanların hücre membranı gibi mitokondrial membranı da korumada yetersiz olduğunu düşündürmektedir.

İntraservikal ve intrauterin tohumlamalarda karşılaşılan fertilité düşüklüğü, büyük oranda mitokondriyal yıkımlarla ilişkilendirilmektedir (Faigl ve ark., 2012). Sunulan çalışmada, çözme sonrası aşamada saf %6 kriyoprotektan içeren kontrol (%6 gliserol), DEX6, PVP6 ve PEG6 içeren gruplar karşılaştırıldığında en yüksek polarize mitokondri oranı kontrol grubunda (%57) elde edildi. Düşük oranda eksternal kriyoprotektan içeren DEX2 ve PEG2 gruplara ait polarize mitokondri oranının kontrol grubu ile benzer olduğu gözlemlendi ( $P>0,05$ ). İçinde %7 oranında gliserol içeren lesitin bazlı sulandırıcı kullanılarak dondurulan koç spermasında çözme sonrası aşamada çalışmamızın kontrol grubuna benzer (%57) oranda polarize mitokondri oranı (%51) bildirmiştir (Asadzadeh ve ark., 2021).

Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanabilen apoptozis, fizyolojik bir süreçtir. İstenmeyen veya yararsız hücreler, gelişim ve diğer normal biyolojik süreçler sırasında ortadan kaldırılır. Apoptoza uğrayan hücreler; kromatin agregasyonu, nükleer ve sitoplazmik yoğunlaşma, ribozom içeren ve sitoplazma ve çekirdek zarına bağlanmış veziküller (apoptotik yapılar), morfolojik olarak bozulmuş mitokondri ve nükleer materyal gibi morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler gösterir (Choudhury, Kumar, Mayank, Mehta, & Bardalai, 2012; Hans-Jürgen, 2005).

Apoptozis, ölüm reseptörleri, hücre membranı değişiklikleri, proteaz yolağı, mitokondri düzeyindeki değişiklikler ve DNA yapısının kırılması gibi birçok yolla başlatılabilmektedir. Apoptoza uğrayan hücre popülasyonunu, TUNEL metodu yanında, comet assay (CA), sperm chromatin structure assay (SCA) ve Caspaz aktivitesi gibi çok farklı yöntemle belirlenebilmektedir (Choudhury ve ark., 2012; Fernández ve ark., 2003; Hans-Jürgen, 2005). TUNEL metoduyla, apoptozun geç aşamalarında oluşan DNA zincirindeki kırılmalar belirlenir. Bu nedenle apoptozun

erken belirteci olan diğer değişiklikler hakkında yeterli bilgi verememektedir (Hans-Jürgen, 2005). Sunulan çalışmada kontrol ve çalışma gruplarında %2,8 ila %3,7 TUNEL pozitif spermatozoon oranı bulundu. TUNEL indeks oranı bakımından gruplar arası istatistiksel bir fark bulunmadığı saptandı ( $P>0,05$ ). Çalışmamızda gruplar arası farkın görülmemesi TUNEL metodunun apoptozun erken belirteçlerini belirlemesindeki yetersizlikle açıklanabilir. Nur ve ark. (2010), farklı kriyoprotektan kullanarak yaptıkları çalışmada %1,2 ila %6,9 oranında TUNEL pozitif spermatozoon oranı bildirilmişlerdir. Çözdürme sonrası aşamada en yüksek TUNEL pozitif spermatozoon oranının gliserol içeren gruptan elde edildiği, kullanılan diğer kriyoprotektan çeşitlerinin TUNEL pozitif spermatozoon oranlarının benzer olduğu bildirilmiştir (Nur ve ark., 2010). Sunulan çalışmada da kullanılan kriyoprotektan çeşidinin apoptoza uğrayan spermatozoon oranını etkilememesi anılan çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Fertilizasyon sırasında gerçekleşen fizyolojik süreçler spermatozoonun plazma ve akrozom membran bütünlüğü ile ilgilidir (Jeyendran, Van der Ven, Perez-Pelaez, Crabo, & Zaneveld, 1984). Spermatozoonun apikal ucunda bulunan ve fertilizasyonda önemli fonksiyonları olan akrozomal yapı, korona penetrating enzim, hiyaluronidaz, nöraminidaz, proakrozin, proteinaz, esteraz, fosfataz, fosfolipaz A2, asit fosfataz, aril sülfataz,  $\beta$ -N-asetil glikozaminidaz, aril aminidaz ve kollajenaz gibi proteolitik enzimleri içerir. Bu enzim ve mediatörlerin çeşidi ve miktarı türler arasında farklılık gösterir (Hafez, & Hafez, 1993). Sperm sulandırıcılarına katılan

Koç spermatozoonu, boğa, tavşan ve insan gibi diğer türlere göre daha yüksek çoklu doymamış/doymuş yağ asitleri oranına ve daha düşük kolesterol/fosfolipit oranına sahip olduğundan, soğuk şokuna karşı daha duyarlıdır (Faigl ve ark., 2012; Salamon, & Maxwell, 2000). Koç spermasının çözdürme sonrası yüksek oranda membran düzensizliği ve hasarı bu farklılıklarla ilişkilidir (Ollero ve ark., 1998). Sunulan çalışmada kullanılan kriyoprotektan çeşidi ve miktarının, çözdürme sonrası plazma bütünlüğüne sahip spermatozoon oranı ( $P>0,001$ ), sağlam akrozom bütünlüğüne sahip spermatozoon oranı ( $P>0,001$ ), plazma membranı ve akrozomu sağlam spermatozoon oranı ( $P>0,001$ ), plazma membranı sağlam fakat bozuk akrozoma sahip spermatozoon oranı ( $P>0,001$ ), plazma membranı bozuk fakat sağlam

akrozoma sahip spermatozoon oranı ( $P>0,001$ ), plazma membranı ve akrozomu bozuk spermatozoon oranını ( $P>0,001$ ) istatistiksel düzeyde etkilediği gözlemlendi (Tablo 6).

Spermatozoon membranı, hücre içi ve dışı ortamların dengesinin sağlanması, motilite ve dişi genital kanal veya oosit-kumulus kompleksinin aşılması dahil dolaylı veya dolaysız olarak fertilizasyonla ilişkilidir (Chen ve ark., 2003). Çalışmamızda çözündürme sonrası aşamada en yüksek TM ve PM kontrol grubundan elde edildi. Buna paralel olarak çözündürme sonrası en yüksek toplam plazma membran bütünlüğüne sahip spermatozoon oranı kontrol grubunda (%49) saptandı ( $P>0,05$ ). İçinde %5 ve %7 oranında gliserol içeren TRIS bazlı sulandırıcı kullanılarak dondurulan koç spermasında çözündürme sonrası plazma membran bütünlüğü oranı %47 ve %60 bildirilmiştir (Jha ve ark., 2019). Kontrol grubumuzla benzer sulandırıcı içeriğine sahip sulandırıcı ile yapılan çalışmalarda hipoozmotik şişme testi (HOST) ile değerlendirilen koç spermasında, fonksiyonel plazma membran oranı %65 (Alçay ve ark., 2015), %68 (Alçay ve ark., 2016), lesitin bazlı sulandırıcı kullanılarak dondurulan koç spermasında çözündürme sonrası plazma membran ve akrozom bütünlüğü oranı %60 bildirilmiştir (Asadzadeh ve ark., 2021).

Kriyoprezervasyon, plazma membranı üzerine geri dönüşümü olmayan farklılaşmalara yol açarak hücre ölümlerine yol açar (Faigl ve ark., 2012; Holt, 2000b; Kukovics ve ark., 2011; Peris-Frau ve ark., 2020; Salamon, & Maxwell, 1995b). Sulandırıcıda bulunan dekstran ve polietilen glikol (PEG) gibi polimerlerin farklı düzeyde hidrofobik etkileri vardır (Ollero ve ark., 1998). Çalışmamızda plazma membran bütünlüğü en düşük spermatozoon oranı PVP6 ( $P>0,005$ ) ile elde edilirken; DEX6, PVP6 ve PEG6'nin de plazma membran bütünlüğünü korumada yetersiz olduğu gözlemlendi. Polimerik bir eksternal kriyoprotektan olan PVP'nin toksik etkilerini minimize etmek amacıyla, yerine hücre içine girebilen kriyoprotektanlar kullanılarak spermatozoon ve embriyo gibi çeşitli hücre ve dokuların dondurulmasında kullanılabilmesi gösterilmiştir (Barak, Menezo, Veiga, & Elder, 2001; Kato, & Nagao, 2012; Rakha ve ark., 2017; Shaw ve ark., 1997). Ayrıca, PVP uzun zamandır ICSI amacıyla spermanın immobilizasyonu, sperma seçimi, oosit kültürü ve dondurma gibi yardımcı üreme tekniklerinde farklı amaçlarla kullanılmaktadır (Kato, & Nagao, 2012). PVP eklenmesinin manda boğası spermasının çözündürme sonrası plazma membran fonksiyonel bütünlüğünü desteklediği bildirilmiştir (Khan ve ark., 2021).

Yapılan çalışmalarda PVP'nin, sperm membranı ve kromozomal yapıda yıkımlara neden olduğu bildirilmiştir (Kato, & Nagao, 2012). Çalışmamızda da sulandırıcıdaki PVP oranı artıkça plazma membran hasarının da artığı gözlemlendi. Sulandırıcıdaki PVP oranı çözündürme sonrası horoz spermatozoonunun plazma membran bütünlüğünü etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada, %0 (kontrol), %4 (w/v), 6% (w/v), %8 (w/v) ve %10 (w/v) PVP eklenerek dondurulan horoz spermasında en yüksek plazma membran bütünlüğü %6 (w/v) içeren grupta elde edilmiştir (Rakha ve ark., 2017). Dekstran, PVP ve PEG içeren gruplarda sulandırıcıdaki eksternal kriyoprotektan oranı artıkça toplam plazma membran bütünlüğüne sahip spermatozoon oranının azaldığı görüldü. Bu durum hayvan türü ve sulandırıcı içeriğinin farklılığı ile açıklanabilir.

Hücreyi bir bütün olarak saran spermatozoon membranı; (i) akrozomun etrafını saran, (ii) akrozomdan sonra başın geri kalanını saran ve (iii) baştan kuyruğa kadar olan bölümü saran olmak üzere farklı özelliklerde üç bölümden oluşmaktadır (Hafez, & Hafez, 1993; İleri ve ark., 2000; Nur, 2019). Akrozoma ait dış membran ile hücre membranı bütünlüğü, sulandırıcı içeriği, sulandırma, soğutma, dondurma ve çözdüürmenin zararlı etkilerine bağlı olarak yıkıma uğrar (Bailey, Bilodeau, & Cormier, 2000; Kadirvel, Periasamy, & Kumar, 2012). Sunulan çalışmada, akrozom bütünlüğü sağlam olan toplam spermatozoon oranı bakımından, DEX6 ve PVP6 içeren grupların kontrol grubu ile benzer olduğu görüldü ( $P>0,05$ ).

Horoz sperm sulandırıcısına %6, %8 ve %20 PVP eklenerek yapılan bir çalışmada, PVP eklenmesinin plazma ve akrozom membran bütünlüğünü korumada gliserole göre daha üstün olduğu bildirilmiştir (Rakha ve ark., 2017). Spermatozoonun akrozomal yapısı, sulandırma, soğutma ve dondurma-çözdürme işlemlerinden etkilenir (Hafez, & Hafez, 1993; Salamon, & Maxwell, 1995b; Watson, 2000). TRIS bazlı sulandırıcılar kullanılarak yapılan çalışmalarda, %64 (Alçay ve ark., 2015), %45 (Alçay ve ark., 2016) ve %40 (Nur ve ark., 2010) sağlam akrozom oranı bildirilmiştir. İçinde %5 ve %7 oranında gliserol bulunan TRIS bazlı sulandırıcı kullanılarak dondurulan koç spermasında çözündürme sonrası %58 ve %70 akrozom bütünlüğü bildirmiştir (Jha ve ark., 2019). Akış sitometri yöntemi kullanılarak değerlendirilen koç spermasında ise %45 akrozom bütünlüğü oranı bildirilmiştir (Asadzadeh ve ark., 2021). Çalışmamızda en yüksek toplam sağlam akrozom oranı kontrol grubunda (%80), en düşük PEG6 grubunda (%64) elde edildi. Farklı yoğunluklarda PVP içeren



horoz sperması sulandırıcılarında en yüksek sağlam akrozom oranının PVP6 eklenen grupta elde edildiği bildirilmiştir (Rakha ve ark., 2017). Özellikle PEG6 grubuna ait sağlam akrozoma sahip toplam spermatozoon oranı, kontrol ve DEX6 gruplarına göre istatistiksel olarak daha düşük bulundu ( $P<0,05$ ). Manda sperması kullanarak yapılan bir çalışmada, düşük yoğunlukta PVP (0,1 mM) eklemenin çözündürme sonrası akrozom bütünlüğünü, kontrol grubu ve 0,01mM oranda PVP içeren gruplara göre daha iyi koruduğu bildirilmiştir (Khan ve ark., 2021).

Kullanılan kriyoprotektan çeşidi ve miktarının, akrozom yapısını ve plazma membranı sağlam ve bozuk spermatozoon popülasyonunu farklı düzeylerde etkilediği görüldü. Tüm gruplara ait plazma membranı sağlam spermatozoonların akrozomlarının düşük oranda yıkıma uğradığı belirlendi. Plazma membranı ve akrozomu sağlam spermatozoon oranı bakımından saf kriyoprotektan madde içeren kontrol (%6 gliserol) grubunun, DEX6, PVP6 ve PEG6 gruplarına göre daha iyi koruma sağladığı belirlendi ( $P<0,001$ ). Dekstran, PVP ve PEG içeren gruplarda ortamdaki gliserol oranı azaldıkça plazma membranı ve akrozomu sağlam spermatozoon oranının da azaldığı görüldü. PVP'ye maruz bırakılan boğa spermasında yapılan bir çalışmada, PVP'nin kalsiyumun hücre içine girişini etkileyerek akrozom reaksiyonunu uyardığı bildirilmektedir (Kato, & Nagao, 2012). Sunulan çalışmada membran yapısı sağlam olan spermatozoon popülasyonunda PVP içeren gruplara ait sağlam akrozom oranının yalnızca gliserol içeren kontrol grubundan daha düşük olduğu gözlemlendi.

Plazma membranı sağlam fakat akrozom bütünlüğü bozuk spermatozoon oranı bakımından DEX6 ve PEG6 gruplarının kontrol grubu ile benzer olduğu görülürken en düşük oran PVP6 grubunda elde edildi. Sulandırıcıdaki gliserol oranının plazma membranı sağlam fakat akrozomu bozuk spermatozoon oranını etkilemediği belirlendi ( $P>0,05$ ). Plazma membranı bozuk, fakat akrozomu sağlam spermatozoon oranı bakımından saf kriyoprotektan içeren gruplar karşılaştırıldığında, gliserol içeren kontrol grubunun DEX6 ve PVP6 gruplarına göre daha düşük oranda sağlam akrozomal bütünlüğe sahip spermatozoon oranı saptandı ( $P<0,05$ ).

Tüm gruplara ait plazma membranı yıkıma uğramış spermatozoon popülasyonun, sulandırıcıda kullanılan kriyoprotektan madde çeşidinin farklı düzeyde akrozomal bütünlüğü koruduğu belirlendi. Özellikle %4 ve %6 oranında eksternal

kriyoprotektan içeren grupların tümünün %6 gliserol içeren kontrol grubuna göre sağlam akrozom oranının daha yüksek olduğu saptandı ( $P<0,05$ ).

Sulandırıcı ozmolaritesi ve kullanılan kriyoprotektan çeşidi, çözündürme sonrası koç sperması motilite, plazma membran ve akrozom bütünlüğünü önemli düzeyde etkiler (Soylu ve ark., 2007). Plazma ve akrozom membranı bozuk spermatozoon oranı bakımından kontrol grubuna göre en yüksek oran PEG6 grubunda elde edildi ( $P>0,05$ ). Ortamdaki gliserol oranı azaldıkça plazma ve akrozomal membranı bozuk spermatozoon oranının arttığı gözlemlendi.

Bilgisayar destekli sperm analizi sistemleri yardımıyla spermatozoon motilitesi ile ilişkili farklı hareket biçimlerinin de değerlendirilmesi olasıdır. Spermatozoon motilitesi ile fertilité arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır. Sperm motilitesi ve motilite ile ilişkili diğer hareket biçimleri birlikte değerlendirildiğinde, bu korelasyon daha da yükselmektedir (Baskaran, Finelli, Agarwal, & Henkel, 2021; Farrell ve ark., 1998; Larsen ve ark., 2000; Tardif, Farrell, Trouern-Trend, Simkin, & Foote, 1998). Her bir spermatozoon, sulandırma, soğutma, dondurma ve çözündürmeden farklı düzeyde etkilenecek motilite yeteneğini kısmen veya tamamen yitirebilir. Genel olarak çalışma gruplarına ait çözündürme sonrası hızlı (rapid) ( $P<0,001$ ), orta derecede (medium) ( $P<0,001$ ) ve yavaş (slow) ( $P<0,001$ ) motil spermatozoon oranı, VCL ( $P<0,001$ ), VSL ( $P<0,001$ ), VAP ( $P<0,001$ ), LIN ( $P>0,05$ ), STR ( $P>0,05$ ) ve WOB ( $P<0,001$ ) değerleri arasında farklar olduğu gözlemlendi.

Ejakülatı oluşturan her bir spermatozoonun kendine özgü hareket yeteneği vardır. Kimileri progresif şekilde hızlı hareket ederken, kimileri farklı hız ve ilerleyiş gösterir. Farklı motilite yeteneğinde olan bu spermatozoonlar, düşük düzeyde de olsa fertilizasyonun başarısına katkıda bulunurlar (Watson, 2000). Çözüm sonrası saf %6 kriyoprotektan içeren kontrol (%6 gliserol), DEX6, PVP6 ve PEG6 içeren gruplar karşılaştırıldığında, en yüksek rapid ( $P<0,05$ ), medium ( $P<0,05$ ) ve slow ( $P<0,05$ ) motil spermatozoon oranı, VCL ( $P<0,05$ ), VSL ( $P<0,05$ ), ve WOB ( $P<0,05$ ) değeri kontrol grubunda elde edildi. Farklı sulandırıcılarla sulandırılıp dondurulan koç spermasında, çözündürme sonrası en iyi spermatolojik bulguların %6 gliserol ve %20 yumurta sarısı içeren TRIS bazlı sulandırıcılar ile elde edildiği bildirmiştir (Fiser ve ark., 1987; Ollero ve ark., 1998).

Spermatozoon kinematik parametreleri bakımından türler arasında farklılık bulunmaktadır (Castellini ve ark., 2011). Dondurma-çözdürme işlemi, spermatozoonun ultrastrüktürel (fiziksel), biyokimyasal veya fonksiyonel yapısında yıkıma yol açar (Salamon, & Maxwell, 1995a). Sperm hızı (velocity) ile ilgili parametreler, spermatozoonun mitokondriyal fonksiyonunun dolaylı bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (Graham, & Mocé, 2005; Larsen ve ark., 2000). Bu parametreler spermanın fertilitésinin bir göstergesidir (Budworth ve ark., 1987). Ortamın viskozitesi spermatozoonun yüzme gücünü etkiler (Hyakutake, Suzuki, & Yamamoto, 2015). Ortamdaki eksternal kriyoprotektan oranı arttıkça spermatozoonun hızı ile ilgili rapid, medium ve slow motil spermatozoon oranının düştüğü gözlemlendi. Bu durumun, içinde PEG bulunan gruba ait VAP değeri dışında spermatozoonun hızı (velocity) ile ilgili parametreleri (VCL, VSL, ve VAP) için de söz konusu olduğu görülmektedir. Ortamın viskozitesi artıkça VSL'de artış görülür (Hyakutake ve ark., 2015). VSL bakımından kontrol grubu, DEX2, PEG2 ve PEG6 gruplarının benzer olduğu görüldü. Spermatozoonun yapmış olduğu yalpalama hareketinin (%WOB) sulandırıcıdaki kriyoprotektan madde çeşidi ve miktarından etkilendiği saptandı. İçinde saf kriyoprotektan bulunan gruplar karşılaştırıldığında DEX6 içeren grubun WOB değerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu belirlendi ( $P < 0,05$ ). Bu bulgu, eksternal kriyoprotektanların ortamdaki suyu bağlayarak viskoziteyi değiştirmeleri ile açıklanabilir. Sulandırıcıdaki kriyoprotektan çeşidi ve miktarının LIN ve STR değerlerini önemli düzeyde etkilemediği bulundu. Ortamın viskozitesi artıkça spermanın yüzme kuvveti de artar (Hyakutake ve ark., 2015). Çalışmamızda elde edilen LIN ve STR oranlarındaki değişiklikler ortamın viskozitesindeki farklılıktan ileri geldiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak sunulan çalışmada:

- Saf kriyoprotektan içeren gruplara ait bulgular değerlendirildiğinde;
  - En yüksek TM, PM, canlı spermatozoon, polarize mitokondri, plazma ve akrozom membran bütünlüğünün %6 gliserol ve %20 yumurta sarısı içeren sulandırıcı ile sulandırılan kontrol grubundan elde edildiği,
  - Çalışmada kullanılan sulandırıcı içeriğine katılan eksternal kriyoprotektanların (DEX, PVP ve PEG) hiçbirinin tek başına koç spermasını, dondurmanın zararlı etkilerine karşı koruyamadığı,

- Kullanılan kriyoprotektan çeşidinin apoptotik indeksi etkilemediği
  - Eksternal kriyoprotektanların zararlı etkilerini;
    - Motilite ile ilgili spermatozoon parametrelerini
    - Canlı spermatozoon oranını
    - Akrozom membran bütünlüğünü
    - Plazma membran bütünlüğünüetkileyerek gösterdiği,
  - Eksternal kriyoprotektan ile gliserol içeren gruplara ait bulgular değerlendirildiğinde,
    - %4 gliserol ve DEX2 veya PEG2 içeren karışım gruplarında çözündürme sonrası aşamada elde edilen bulguların kabul edilebilir düzeyde TM, PM, canlı spermatozoon ve polarize mitokondri oranları elde edilebildiği,
    - DEX ve PEG'nin düşük yoğunluklarda (%2) gliserolün yerine kullanılabileceği,
    - Çalışmada kullanılan PVP oranlarının koç sperması üzerine toksik etkilerinin olduğu,
    - DEX ve PEG'nin %2'den daha düşük yoğunluklarının araştırma konusu olabileceği,
  - %4 gliserol + DEX2 ve %4 gliserol + PEG2 içeren gruplara ait çözüm sonrası bulguların fertilite sonuçları ile doğrulanması amacıyla çalışmaların yapılması gerektiği
- sonuçlarına varılmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- Abaigar, T., Holt, W.V., Harrison, R.A., & del Barrio, G. (1999). Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biology of reproduction*, 60(1), 32-41. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD60.1.32>
- Abavisani, A., Arshami, J., Naserian, A.A., Kandelousi, M.A.S., & Azizzadeh, M. (2013). Quality of bovine chilled or frozen-thawed semen after addition of omega-3 fatty acids supplementation to extender. *International journal of fertility & sterility*, 7(3), 161.
- Abdelhakeam, A.A., Graham, E.F., & 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. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(91\)90005-9](https://doi.org/10.1016/0011-2240(91)90005-9)
- Aboagla, E.M.E., & Terada, T. (2003). Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction*, 69(4), 1245-1250. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017889>
- Aboua, Y.G., Du Plessis, S.S., & Brooks, N. (2007). In vitro red palm oil (RPO) administration to human spermatozoa: Finding a suitable solvent. *Medical Technology SA*, 21(1), 8-12.
- Agarwal, A., Sharma, R.K., & Nelson, D.R. (2003). New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. *Journal of Andrology*, 24(3), 343-352. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02681.x>
- Ahmadi, A., & Ng, S.C. (1999). Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology*, 284(6), 696-704. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x\(19991101\)284:6%3C696::aid-jez11%3E3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(19991101)284:6%3C696::aid-jez11%3E3.0.co;2-e)
- Aisen, E.G., Alvarez, H.L., Venturino, A., & Garde, J.J. (2000a). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*, 53(5), 1053-1061. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00251-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00251-x)
- Aisen, E.G., Medina, V.H., & Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57(7), 1801-1808. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00653-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00653-2)
- Aitken, R.J., & Baker, M.A. (2004). Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(5), 581-588. <https://doi.org/10.1071/RD03089>
- Ak, K., Cirit, Ü., Nur, Z., Bacinoğlu, S., Pabuççuoğlu, S., Özdaş, Ö., & Birler, S. (2010). Effects of Extender Osmolarity, Cooling Rate, Dilution Rate and Glycerol Addition Time on Post-thaw Ram Semen Characteristics and Fertilization. *Journal of Istanbul Veterinary Sciences*, 36(2), 33-46. <https://doi.org/10.16988/IUVFD.19525>
- Alaçam, E. (Ed.) (2010). *Evcil Hayvanlarda Doğum ve Infertilite (7. Baskı)*. Ankara: Medisan Yayınevi.

- Alapati, R., Stout, M., Saenz, J., Gentry Jr, G.T., Godke, R.A., & Devireddy, R.V. (2009). Comparison of the permeability properties and post-thaw motility of ejaculated and epididymal bovine spermatozoa. *Cryobiology*, 59(2), 164-170. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.06.009>
- Alçay, S., Soylu, M.K., & Üstüner, B. (2013). Boğa ve Alabalık Seminal Plazmasının Koç Spermasının Dondurulması Üzerine Etkisi. *Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University*, 10(1), 7-14.
- Alçay, S., Üstüner, B., Çakmak, İ., Çakmak, S., & Nur, Z. (2015). Effects of various cryoprotective agents on post-thaw drone. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21(1), 31-35. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2014.11515>
- Alçay, S., Üstüner, B., & Nur, Z. (2016). Effects of low molecular weight cryoprotectants on the post-thaw ram sperm quality and fertilizing ability. *Small Ruminant Research*, 136, 59-64. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.01.009>.
- Ali, J., & Shelton, J.N. (1993). Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *Reproduction*, 99(2), 471-477. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0990471>
- Almin, M.R., Druart, X., & Barrier-Battut, I. (2010). Osmotic resistance of frozen stallion spermatozoa in relation to fertility. *International Symposium on Equine Reproduction (ISER 2010)*, 121(1-2).
- Altinel, A., Evrim, M., Özcan, M., Başpınar, H., & Deligözoğlu, F. (1998). Sakız, Kıvrıkcık ve Alman Siyah Başlı Koyun Irkları Arasındaki Melezlemeler ile Kaliteli Kesim Kuzuları Elde Etme Olanaklarının Araştırılması. *Turkish Journal Veterinary and Animal Sciences*, 22, 257-265.
- Alvarenga, M.A., Landim-Alvarenga, F.C., Moreira, R.M., & Cesarino, M.M. (2000). Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Veterinary Journal*, 32(6), 541-545. <https://doi.org/10.2746/042516400777584749>
- Alvarenga, M.A., Papa, F.O., Landim-Alvarenga, F.C., & Medeiros, A.S.L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4), 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.001>
- Alvarez, J.G., & Storey, B.T. (1993). Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *Journal of Andrology*, 14(3), 199-209. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1993.tb00383.x>
- Amann, R.P., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5-17. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>
- An, T.Z., Iwakiri, M., Edashige, K., Sakurai, T., & Kasai, M. (2000). Factors affecting the survival of frozen-thawed mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 40(3), 237-249. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2245>
- Anchamparuthy, V. (2007). *Vitrification of bovine oocytes*. [Doctoral dissertation, Virginia Tech University]. Erişim:

[https://vtechworks.lib.vt.edu/bitstream/handle/10919/25986/Vahida\\_Anchamprathy\\_Dissertation.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://vtechworks.lib.vt.edu/bitstream/handle/10919/25986/Vahida_Anchamprathy_Dissertation.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Anchordoguy, T.J., Rudolph, A.S., Carpenter, J.F., & Crowe, J.H. (1987). Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, 24(4), 324-331. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(87\)90036-8](https://doi.org/10.1016/0011-2240(87)90036-8)
- Arando, A., Delgado, J.V., León, J.M., Nogales, S., Navas-González, F.J., Pizarro, M.G., & Pérez-Marín, C.C. (2019). Effect of three commercial extenders on sperm motility and fertility in liquid ram semen stored at 15 °C or 5 °C. *Acta Veterinaria Hungarica*, 67(3), 430-444. <https://doi.org/10.1556/004.2019.043>
- Arangasamy, A., Kasimanickam, V.R., DeJarnette, J.M., & Kasimanickam, R.K. (2011). Association of CRISP2, CCT8, PEBP1 mRNA abundance in sperm and sire conception rate in Holstein bulls. *Theriogenology*, 76(3), 570-577. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.03.009>
- Arav, A., Shehu, D., & Mattioli, M. (1992). Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99(2), 353-358. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0990353>
- Arı, U., Arı, E., & Arı, A. (2016). Spermatozoa Hızının Belirlenmesi İçin Yeni Bir Bilgisayar Destekli Sperma Analiz Sistemi (ESAS). 8. *Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi (Poster)*
- Arns, M.J., Webb, G.W., Kreider, J.L., Potter, G.D., & Evans, J.W. (1987). Use of different nonglycolysable sugars to maintain stallion sperm viability when frozen or stored at 37 degrees C and 5 degrees C in a bovine serum albumin medium. *Journal of Reproduction and Fertility*. 35, 135-141.
- Arruda, R.P., Celeghini, E.C., Alonso, M.A., Carvalho, H.F., Oliveira, L.Z., Nascimento, J., Silva, D.F., Affonso, F.J., Lemes, K.M., & Jaimes, J.D. (2011). Methods of the assessment of morphology and function of sperm: actual moment and future challenges. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35(2), 145-151.
- Asadzadeh, N., Abdollahi, Z., Esmailkhanian, S., & Masoudi, R. (2021). Fertility and flow cytometry evaluations of ram frozen semen in plant-based extender supplemented with Mito-TEMPO. *Animal Reproduction Science*. 233, 106836. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106836>
- Aytuğ, C.N., Yalçın, C., Alaçam, E., Türker, H., & Gökçen, H. (1990). *Koyun ve Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği*. İstanbul: Tümvet Hayvancılık Hizmetleri Yayını No: 2.
- Bacinoglu, S., Taş, M., Cirit, Ü., Özdaş, Ö.B., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.01.014>
- Bacınoğlu, S., Cirit, Ü., Nur, Z., & Ak, K. (2007). Effect of Different Glycerol Addition Techniques and Cooling Rates on Spermatological Characteristics in Thawed Ram Semen. *Journal of Istanbul Veterinary Sciences*, 33(1), 11-21. <https://doi.org/10.16988/IUVFD.84406>
- Bag, S., Joshi, A., Rawat, P.S., & Mittal, J.P. (2002). Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in

- a semi-arid tropical environment. *Small Ruminant Research*, 43(1), 23-29. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(01\)00247-4](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(01)00247-4)
- Bagis, H., Sagirkaya, H., Mercan, H.O., & Dinnyes, A. (2004). Vitrification of pronuclear-stage mouse embryos on solid surface (SSV) versus in cryotube: Comparison of the effect of equilibration time and different sugars in the vitrification solution. *Molecular Reproduction and Development*, 67(2), 186-192. <https://doi.org/10.1002/mrd.10388>
- Bailey, J. L., Bilodeau, J.F., & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21(1), 1-7. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x>
- Bailey, J., Morrier, A., & Cormier, N. (2003). Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Canadian Journal of Animal Science*, 83(3), 393-401. <https://doi.org/10.4141/A03-024>
- Ball, B.A., & 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(6), 1061-1069. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb03446.x>
- Barak, Y., Menezo, Y., Veiga, A., & Elder, K. (2001). A physiological replacement for polyvinylpyrrolidone (PVP) in assisted reproductive technology. *Human Fertility*, 4(2), 99-103. <https://doi.org/10.1080/1464727012000199371>
- Barrier Battut, I., Kempfer, A., Becker, J., Lebailly, L., Camugli, S., & Chevrier, L. (2016). Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. *Theriogenology*, 86(4), 1111-1131. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.001>
- Barroso, G., Taylor, S., Morshedi, M., Manzur, F., Gaviño, F., & Oehninger, S. (2006). Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertility and Sterility*, 85(1), 149-154. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.06.046>
- Bartels, P., & Kotze, A. (2006). Wildlife biomaterial banking in Africa for now and the future. *Journal of Environmental Monitoring*, 8(8), 779-781. <https://doi.org/10.1039/b602809h>
- Baskaran, S., Finelli, R., Agarwal, A., & Henkel, R. (2021). Diagnostic value of routine semen analysis in clinical andrology. *Andrologia*, 53(2), e13614. <https://doi.org/10.1111/and.13614>
- Bass, L.D., Denniston, D.J., Maclellan, L.J., McCue, P.M., Seidel Jr, G.E., & Squires, E.L. (2004). Methanol as a cryoprotectant for equine embryos. *Theriogenology*, 62(6), 1153-1159. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.026>
- Begin, I., Bhatia, B., Baldassarre, H., Dinnyes, A., & Keefer, C.L. (2003). Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2-to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology*, 59(8), 1839-1850. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01257-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01257-8)
- Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., & Guérin, J.F. (2003). Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted



- reproductive technique. *Human Reproduction*, 18(5), 1023-1028. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg228>
- Bencharif, D., Amirat, L., Pascal, O., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M., Barrière, P., & Larrat, M. (2010). The advantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(2), 189-200. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01198.x>
- Benmoula, A., Badi, A., Hilali, A., El Khalil, K., Allai, L., El Fadili, M., & El Amiri, B. (2018). Evaluation of camel milk as an extender for short-term storage of ram semen at 15°C. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 6(1), 57-64. <https://doi.org/10.22103/jlst.2017.10987.1212>
- Benson, J.D., Woods, E.J., Walters, E.M., & Critser, J.K. (2012). The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, 78(8), 1682-1699. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.007>
- Bielanski, A. (2007). Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology*, 68(1), 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.025>
- Blanco, J.M., Long, J.A., Gee, G., Donoghue, A.M., & Wildt, D.E. (2008). Osmotic tolerance of avian spermatozoa: Influence of time, temperature, cryoprotectant and membrane ion pump function on sperm viability. *Cryobiology*, 56(1), 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.09.004>
- Boe-Hansen, G.B., Ersbøll, A.K., Greve, T., & Christensen, P. (2005). Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology*, 63(7), 2006-2019. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.006>
- Boersma, A.A., Braun, J., & Stolla, R. (1999). Influence of random factors and two different staining procedures on computer-assisted sperm head morphometry in bulls. *Reproduction in Domestic Animals*, 34(2), 77-82. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1999.tb01387.x>
- Boersma, A., Rasshofer, R., & Stolla, R. (2001). Influence of sample preparation, staining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the morphology analyser integrated visual optical system. *Reproduction in Domestic Animals*, 36(5), 222-229. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00291.x>
- Bohloul, Z., Mohammadi, M., Mehr, M.R.A., & Hossein-Zadeh, N.G. (2015). Effect of different concentrations of trehalose and glycerol on the freezability of ram semen using soybean lecithin-based diluents. *Animal Production Science*, 55(5), 666-671. <https://doi.org/10.1071/AN13431>
- Bredderman, P.J., & Foote, R.H. (1969). Volume of stressed bull spermatozoa and protoplasmic droplets, and the relationship of cell size to motility and fertility. *Journal of Animal Science*, 28(4), 496-501. <https://doi.org/10.2527/jas1969.284496x>
- Brito, M.M., Lúcio, C.F., Angrimani, D.S.R., Losano, J.D. A., Dalmazzo, A., Nichi, M., & Vannucchi, C.I. (2017). Comparison of Cryopreservation Protocols

- (Single and Two-steps) and Thawing (Fast and Slow) for Canine Sperm. *Animal biotechnology*, 28(1), 67-73. <https://doi.org/10.1080/10495398.2016.1203797>
- Bryant, G., Koster, K.L., & Wolfe, J. (2001). Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. *Seed Science Research*, 11(1), 17-25. <https://doi.org/10.1079/SSR200056>
- Bucak, M.N., & Tekin, N. (2007). Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54(54), 67-72. <http://hdl.handle.net/20.500.12575/66092>
- Bucak, M.N., Ateşşahin, A., & Yüce, A. (2008a). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*, 75(2-3), 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.09.002>
- Budworth, P.R., Amann, R.P., & Hammerstedt, R.H. (1987). A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity of bull sperm. *Journal of Dairy Science*, 70(9), 1927-1936. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(87\)80233-3](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(87)80233-3)
- Buffoni, A., Vozzi, A., Gonzalez, D.M., Viegas, H., LaTorraca, A., Hozbor, F., Ledesma, A., & Abecia, J.A. (2015). Melatonin modifies scrotal circumference but not plasma testosterone concentrations and semen quality of rams during the seasonal anestrus at 43°S. *Biological Rhythm Research*, 46(6), 785-795. <https://doi.org/10.1080/09291016.2015.1052649>
- Cabrita, E., Anel, L., & Herraéz, M.P. (2001). Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 56(4), 623-635. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00594-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00594-5)
- Câmara, 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. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.013>
- Campbell, L.H., & Brockbank, K.G.M. (2007). Serum-free solutions for cryopreservation of cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 43(8), 269-275. <https://doi.org/10.1007/s11626-007-9039-z>
- Cardoso, R.D.C.S., Silva, A.R., Uchoa, D.C., & Da Silva, L.D.M. (2003). Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, 59(3-4), 743-751. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01151-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01151-2)
- Casarett, G.W. (1953). A one-solution stain for spermatozoa. *Stain Technology*, 28(3), 125-127.
- Castellini, C., Dal Bosco, A., Ruggeri, S., & Collodel, G. (2011). What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertility and Sterility*, 96(1), 24-27. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.096>
- Celeghini, E.C.C., De Arruda, R.P., De Andrade, A.F.C., Nascimento, J., & Raphael, C.F. (2007). Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction*

- in *Domestic Animals*, 42(5), 479-488. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00810.x>
- Checura, C.M., & Seidel Jr, G.E. (2007). Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. *Theriogenology*, 67(5), 919-930. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.044>
- Chen, C. (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *The Lancet*, 327(8486), 884-886. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(86\)90989-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(86)90989-x)
- Chen, H., Chow, P.H., Cheng, S.K., Cheung, A.L.M., Cheng, L.Y.L., & W., O. (2003). Male genital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. *Journal of Andrology*, 24(5), 704-711. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02730.x>
- Chen, T., Acker, J.P., Eroglu, A., Cheley, S., Bayley, H., Fowler, A., & Toner, M. (2001). Beneficial effect of intracellular trehalose on the membrane integrity of dried mammalian cells. *Cryobiology*, 43(2), 168-181. <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2360>
- Chen, Y., Foote, R.H., & Brockett, C.C. (1993). Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 30(4), 423-431. <https://doi.org/10.1006/cryo.1993.1042>
- Cheng, F., Fazeli, A., Voorhout, W.F., Marks, A., Bevers, M.M., & Colenbrander, B. (1996). Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *Journal of Andrology*, 17(6), 674-682. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1996.tb01852.x>
- Chenoweth, P.J., Hopkins, F.M., Spitzer, J.C., & Larsen, R.E. (1993). Guidelines for using the bull breeding soundness evaluation form. *Theriogenology Handbook*, 10, 1-5.
- Chenoweth, P.J., & Lorton, S.P. (Ed.). (2014). *Animal andrology: theories and applications*. London: Cabi.
- Chian, R.C., & Quinn, P. (2010). *Fertility cryopreservation*. New York: Cambridge University Press.
- Chohan, K.R., Griffin, J.T., Lafromboise, M., De Jonge, C.J., & Carrell, D.T. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology*, 27(1), 53-59. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05068>
- Choudhury, J.D., Kumar, S., Mayank, V., Mehta, J., & Bardalai, D. (2012). A review on apoptosis and its different pathway. *International Journal of Biological and Pharmaceutical Research*, 3(7), 848-861.
- Christensen, P., Whitfield, C.H., & Parkinson, T.J. (1994). The use of bright-field microscopy in evaluating bovine acrosome reaction. *Theriogenology*, 42(4), 655-662. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(94\)90382-s](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90382-s)
- Cirit, Ü., Bağış, H., Demir, K., Agca, C., Pabuccuoğlu, S., Varişli, Ö., Clifford-Rathert, C., & Agca, Y. (2013). Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose and cysteamine on ram semen. *Animal Reproduction Science*, 139(1-4), 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.010>
- Cocks, F.H., & Brower, W.E. (1974). Phase diagram relationships in cryobiology. *Cryobiology*, 11(4), 340-358. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(74\)90011-x](https://doi.org/10.1016/0011-2240(74)90011-x)

- Collin, S., Sirard, M., Dufour, M., & Bailey, J.L. (2000). Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen. *Journal of Andrology*, 21(6), 938-943. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03425.x>
- Coloma, M.A., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Velázquez, R., Gómez-Brunet, A., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2011). Seasonal variation in reproductive physiological status in the Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) and its relationship with sperm freezability. *Theriogenology*, 76(9), 1695-1705. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.001>
- Cooper, T.G., Barfield, J.P., & Yeung, C.H. (2008). The tonicity of murine epididymal spermatozoa and their permeability towards common cryoprotectants and epididymal osmolytes. *Reproduction*, 135(5), 625-634. <https://doi.org/10.1530/rep-07-0573>
- Cordelli, E., Eleuteri, P., Leter, G., Rescia, M., & Spanò, M. (2005). Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception*, 72(4), 273-279. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2005.03.004>
- Corsini, J., Hacker, C., & Bare, C. (2004). Serum-free cryopreservation of five mammalian cell lines in either a pelleted or suspended state. *Biological Procedures Online*, 6(1), 61-66. <https://doi.org/10.1251/bpo73>
- Çoyan, K., Ataman, M.B., Kaya, A., & Karaca, F. (2002). *Evcil hayvanlarda dölerme ve sun'ı tohumlama*. Konya: Selçuk Üni, Vet Fak Yayın Ünitesi.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., Rudolph, A.S., Wistrom, C.A., Spargo, B.J., & Anchoroguy, T.J. (1988). Interactions of sugars with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 947(2), 367-384. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(88\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0304-4157(88)90015-9)
- Cseh, S., Faigl, V., & Amiridis, G.S. (2012). Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130(3-4), 187-192. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.014>
- Curry, M.R. (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*, 5, 46-52. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_10)
- Curry, M.R., & Watson, P.F. (1994). Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*, 31(1), 39-46. <https://doi.org/10.1006/cryo.1994.1005>
- Dai, G.C., Meng, Y., Zhang, L., Du, Y., Wen, F., Feng, T., & Hu, J. (2019). Effect of addition of melatonin on liquid storage of ram semen at 4°C. *Andrologia*, 51(5), 1-8. <https://doi.org/10.1111/and.13236>
- David, I., Bonnot, A., Raoul, J., & Lagriffoul, G. (2012). Sheep insemination: current situation in France and work on data of semen production. In *63. Annual Meeting of the European Association of Animal Production (EAAP)* (Vol. 18, No. 1ère Ed., pp. 476-p). Wageningen Academic Publishers.
- David, I., Kohnke, P., Lagriffoul, G., Praud, O., Plouarboué, F., Degond, P., & Druart, X. (2015). Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*, 161, 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.006>

- Davidson, A.F., Benson, J.D., & Higgins, A.Z. (2014). Mathematically optimized cryoprotectant equilibration procedures for cryopreservation of human oocytes. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 11(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-11-13>
- Davis, R.O., & Katz, D.F. (1992). Standardization and comparability of CASA instruments. *Journal of Andrology*, 13(1), 81-86. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1992.tb01632.x>
- Dayanikli, C., Sengul, E., Bulbul, B., Ustuner, B., & Nur, Z. (2022). The Effect of Concentration and Storage Time on Short-Term Storage of Ram Sperm. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 28(6), 681-690. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2022.27636>
- De La Cueva, F.I.C., Pujol, M.R., Rigau, T., Bonet, S., Miro, J., Briz, M., & Rodriguez-Gill, J.E. (1997). Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: the role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. *Theriogenology*, 48(6), 947-968. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00322-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00322-1).
- De Leeuw, F.E., De Leeuw, A.M., Den Daas, J.H.G., Colenbrander, B., & 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/cryo.1993.1005>
- De Jonge C.J., & Barratt C.L.R. (Ed.). (2017). *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. New York: Cambridge University Press.
- Dela Pena, E.C., Takahashi, Y., Atabay, E.C., Katagiri, S., & Nagano, M. (2001). Vitrification of mouse oocytes in ethylene glycol-raffinose solution: effects of preexposure to ethylene glycol or raffinose on oocyte viability. *Cryobiology*, 42(2), 103-111. <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2310>
- Demir, K., Bakirer Öztürk, G., Cirit, Ü., Bozkurt, H.H., Aktaş, A., Birler, S., Ak, K., Pabuççuoğlu, S. (2015). Effects of Cooling Rate on Membrane Integrity and Motility Parameters of Cryopreserved Ram Spermatozoa. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21(1): 61-67. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2014.11726>
- Devireddy, R.V., Campbell, W.T., Buchanan, J.T., & Tiersch, T.R. (2006). Freezing response of white bass (*Morone chrysops*) sperm cells. *Cryobiology*, 52(3), 440-445. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.01.008>
- Devireddy, R.V., Fahrig, B., Godke, R.A., & Leibo, S.P. (2004). Subzero water transport characteristics of boar spermatozoa confirm observed optimal cooling rates. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 67(4), 446-457. <https://doi.org/10.1002/mrd.20041>
- Devireddy, R.V., Swanlund, D.J., Roberts, K.P., & Bischof, J.C. (1999). Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents. *Biology of Reproduction*, 61(3), 764-775. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.3.764>



- Devireddy, R.V., Swanlund, D.J., Roberts, K.P., Pryor, J.L., & Bischof, J.C. (2000). The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing. *Human Reproduction*, 15(5), 1125-1135. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.5.1125>
- Dogan, I., Nur, Z., Gunay, U., & Soylu, M. K. (2005). Semen characteristics during the transition period in Saanen bucks. *Indian Veterinary Journal*, 82(10), 1080-1082.
- Dong, Q.X., Rodenburg, S.E., Hill, D., & VandeVoort, C.A. (2011). The role of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. *Asian Journal of Andrology*, 13(3), 459. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.145>
- Donoghue, A.M., Garner, D.L., Donoghue, D.J., & Johnson, L.A. (1996). Assessment of the membrane integrity of fresh and stored turkey spermatozoa using a combination of hypo-osmotic stress fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, 46(1), 153-163. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00150-1](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00150-1)
- Douglas-Hamilton, D.H., Smith, N.G., Kuster, C.E., Vermeiden, J.P.W., & Althouse, G.C. (2005a). Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *Journal of Andrology*, 26(1), 115-122. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2005.tb02880.x>
- Douglas-Hamilton, D.H., Smith, N.G., Kuster, C.E., Vermeiden, J.P.W., & Althouse, G.C. (2005b). Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. *Journal of Andrology*, 26(1), 107-114. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2005.tb02879.x>
- Drobnis, E.Z., Crowe, L.M., Berger, T., Anchoroguy, T.J., Overstreet, J.W., & Crowe, J.H. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*, 265(4), 432-437. <https://doi.org/10.1002/jez.1402650413>
- Dumoulin, J.C.M., Bergers-Janssen, J.M., Pieters, M.H.E.C., Enginsu, M.E., Geraedts, J.P.M., & Evers, J.L.H. (1994). The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. *Fertility and Sterility*, 62(4), 793-798. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)57006-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)57006-X)
- Dupuy, J., Jal, J.F., Ferradou, C., Chieux, P., Wright, A.F., Calemczuk, R., & Angell, C.A. (1982). Controlled nucleation and quasi-ordered growth of ice crystals from low temperature electrolyte solutions. *Nature*, 296(5853), 138-140. <https://doi.org/10.1038/296138a0>
- Edashige, K., Ohta, S., Tanaka, M., Kuwano, T., Valdez Jr, D.M., Hara, T., Jin, B., Takahashi, S., Seki, S., Koshimoto, C., & Kasai, M. (2007). The role of aquaporin 3 in the movement of water and cryoprotectants in mouse morulae. *Biology of Reproduction*, 77(2), 365-375. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059261>
- Elliott, F.I., Sherman, J.K., Elliott, E.J., & Sullivan, J.J. (1973). A photographic method of measuring percentage of progressively motile sperm cells using dark-field microscopy. *VIII International Symposium on Zootechny*, Milan, Italy.

- Elliott, G.D., Wang, S., & Fuller, B.J. (2017). Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, 76, 74-91. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.004>
- Endoh, K., Mochida, K., Ogonuki, N., Ohkawa, M., Shinmen, A., Ito, M., Kashiwazaki, N., & Ogura, A. (2007). The developmental ability of vitrified oocytes from different mouse strains assessed by parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Reproduction and Development*, 708310062. <https://doi.org/10.1262/jrd.19058>
- Eppleston, J., Salamon, S., Moore, N.W., & Evans, G. (1994). The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, 36(3-4), 211-225. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)90069-8)
- Eroglu, A., Bailey, S.E., Toner, M., & Toth, T.L. (2009). Successful cryopreservation of mouse oocytes by using low concentrations of trehalose and dimethylsulfoxide. *Biology of Reproduction*, 80(1), 70-78. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.070383>
- Eroglu, A., Lawitts, J.A., Toner, M., & Toth, T.L. (2003). Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. *Cryobiology*, 46(2), 121-134. [https://doi.org/10.1016/s0011-2240\(03\)00018-x](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(03)00018-x)
- Eroglu, A., Toner, M., & Toth, T.L. (2002). Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertility and Sterility*, 77(1), 152-158. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(01\)02959-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(01)02959-4)
- Evans, G., & Maxwell, W.M.C. (1987). *Salamons' artificial insemination of sheep and goats*. Sydney: Butterworths
- Evenson, D.P. (1999). Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reproduction, Fertility and Development*, 11(1), 1-16. <https://doi.org/10.1071/rd98023>
- Evenson, D.P., Thompson, L., & Jost, L. (1994). Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*, 41(3), 637-651. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(94\)90174-h](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90174-h)
- Evenson, D.P., Parks, J.E., Kaproth, M.T., & Jost, L.K. (1993). Rapid determination on sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. *Journal of Dairy Science*, 76(1), 86-94. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(93\)77326-9](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(93)77326-9)
- Evenson, D.P., & Wixon, R. (2005). Comparison of the Halosperm® test kit with the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) infertility test in relation to patient diagnosis and prognosis. *Fertility and Sterility*, 84(4), 846-849. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.08.009>
- Fahy, G.M. (2010). Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology*, 60(3), S45-S53. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.05.005>
- Fahy, G.M., Lilley, T.H., Linsdell, H., Douglas, M.S.J., & Meryman, H.T. (1990). Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of

- molecular mechanisms. *Cryobiology*, 27(3), 247-268. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(90\)90025-y](https://doi.org/10.1016/0011-2240(90)90025-y)
- Fahy, G.M., Wowk, B., Wu, J., & Paynter, S. (2004). Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology*, 48(1), 22-35. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.11.004>
- Faigl, V., Vass, N., Jávora, A., Kulcsár, M., Solti, L., Amiridis, G., & Cseh, S. (2012a). Artificial insemination of small ruminants-A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 60(1), 115-129. <https://doi.org/10.1556/AVet.2012.010>
- Falchi, L., Galleri, G., Zedda, M.T., Pau, S., Bogliolo, L., Ariu, F., & Ledda, S. (2018). Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. *Livestock Science*, 207, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.11.001>
- Farrell, P.B., Presicce, G.A., Brockett, C.C., & Foote, R.H. (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, 49(4), 871-879. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00036-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00036-3)
- Fatehi, A.N., Bevers, M.M., Schoevers, E., Roelen, B.A.J., Colenbrander, B., & Gadella, B.M. (2006). DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *Journal of Andrology*, 27(2), 176-188. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04152>
- Fernández-Santos, M.R., Martínez-Pastor, F., García-Macías, V., Estesó, M.C., Soler, A.J., De Paz, P., Anel, L., & Garde, J.J. (2007). Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 67(4), 738-753. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.005>
- Fernández-Santos, M.R., Estesó, M.C., Montoro, V., Soler, A.J., & Garde, J.J. (2006). Influence of various permeating cryoprotectants on freezability of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of concentration and temperature of addition. *Journal of Andrology*, 27(6), 734-745. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000505>
- Fernández, J.L., Muriel, L., Rivero, M.T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J.G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology*, 24(1), 59-66. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02641.x>
- Fiser, P.S., Ainsworth, L., & Fairfull, R.W. (1987). Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 28(5), 599-607. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(87\)90276-7](https://doi.org/10.1016/0093-691x(87)90276-7)
- Fiser, P.S., & Fairfull, R.W. (1990). Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. *Molecular Reproduction and Development*, 25(2), 123-129. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080250204>
- Flesch, F.M., Voorhout, W.F., Colenbrander, B., van Golde, L.M.G., & Gadella, B.M. (1998). Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity.



- Biology of Reproduction*, 59(6), 1530-1539.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod59.6.1530>
- Foote, R.H. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*, 80(1678), 1-10.  
[https://doi.org/10.2527/ANIMALSCI2002.80E-SUPPL\\_21A](https://doi.org/10.2527/ANIMALSCI2002.80E-SUPPL_21A)
- Foote, R.H., Arriola, J., & Wall, R.J. (1978). Principles and procedures for photometric measurement of sperm cell concentration. *Proceedings of the Seventh Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*, Madison, WI, 14-15.
- Foote, R.H. (2003). Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Animal Reproduction Science*, 75(1-2), 119-139.  
[https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(02\)00233-6](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(02)00233-6)
- Franco, M., & Hansen, P.J. (2006). Effects of hyaluronic acid in culture and cytochalasin B treatment before freezing on survival of cryopreserved bovine embryos produced in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 42(1), 40-44. <https://doi.org/10.1007/s11626-006-0010-1>
- Fraser, L., & Strzeżek, J. (2005). Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reproduction in Domestic Animals*, 40(6), 530-536. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00626.x>
- Fuller, B.J. (2004). Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*, 25(6), 375-388.
- Futino, D.O., Mendes, M.C.B., Matos, W.N.L., Mondadori, R.G., & Lucci, C.M. (2010). Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(2), 214-220.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01208.x>
- Gao, D.Y., Ashworth, E., Watson, P.F., Kleinhans, F.W., Mazur, P., & Critser, J.K. (1993). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biology of Reproduction*, 49(1), 112-123. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.1.112>
- Gao, D.Y., Mazur, P., Kleinhans, F.W., Watson, P.F., Noiles, E.E., & Critser, J.K. (1992). Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. *Cryobiology*, 29(6), 657-667. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90068-d](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90068-d)
- Gao, D., & Critser, J.K. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR journal*, 41(4), 187-196. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187>
- García-Macias, V., Martínez-Pastor, F., Alvarez, M., Garde, J.J., Anel, E., Anel, L., & de Paz, P. (2006). Assessment of chromatin status (SCSA®) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog. *Theriogenology*, 66(8), 1921-1930. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.05.011>
- García-Vázquez, F.A., Gadea, J., Matás, C., & Holt, W.M. (2016). Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 844-850. <https://doi.org/10.4103/1008-682x.186880>
- Garde, J.J., Del Olmo, A., Soler, A.J., Espeso, G., Gomendio, M., & Roldan, E.R.S. (2008). Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). *Animal*

- Reproduction Science*, 108(3-4), 384-401.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.09.010>
- Gardner, D.K., Sheehan, C.B., Rienzi, L., Katz-Jaffe, M., & Larman, M.G. (2007). Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology*, 67(1), 64-72.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.012>
- George, M.A., Pickering, S.J., Braude, P.R., & Johnson, M.H. (1996). Preimplantation embryology: The distribution of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tubulin in fresh and aged human and mouse oocytes exposed to cryoprotectant. *Molecular Human Reproduction*, 2(6), 445-456. <https://doi.org/10.1093/molehr/2.6.445>
- Gil, J., Lundeheim, N., Söderquist, L., & Rodríguez-Martínez, H. (2003). Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, 59(5-6), 1241-1255.  
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01177-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01177-9)
- Gillan, L, Evans, G., & Maxwell, W.M.C. (1997). Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 9(5), 481-488. <https://doi.org/10.1071/r96046>
- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W.M.C. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2), 445-457. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.024>
- Gilmore, J.A., Liu, J., Peter, A.T., & Critser, J.K. (1998). Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 58(1), 28-36.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod58.1.28>
- Gilmore, J.A., Liu, J., Woods, E.J., Peter, A.T., & Critser, J.K. (2000). Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Human Reproduction*, 15(2), 335-343.  
<https://doi.org/10.1093/humrep/15.2.335>
- Gliozzi, T.M., Zaniboni, L., & Cerolini, S. (2011). DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*, 75(9), 1613-1622.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.001>
- Gloria, A., Toscani, T., Robbe, D., Parrillo, S., De Amicis, I., & Contri, A. (2019). Cryopreservation of turkey spermatozoa without permeant cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, 211, 106218.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106218>
- Gökçen, H. (1980). Sıvı azot buharında dondurma yönteminin çeşitli evrelerinde, koç spermatozoitlerindeki akrozom bozukluklarının saptanması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 27(03.04).  
[https://doi.org/10.1501/Vetfak\\_0000000857](https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000000857)
- Gökçen, H, Aştı, R.N., Çekgöl, E., & Şener, E. (1985). Prostaglandin F2 alfa ve Vit E katılarak dondurulan koç spermalarında akrozom morfolojisi ve dölverimi üzerinde araştırmalar. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 4(1), 1-3. <http://hdl.handle.net/11452/17786>

- Gökçen, H, Soylu, M.K., & Tümen, H., Doğan, I. (1991). Koçlarda ejakülasyon sıklığının kimi spermatojik özelliklere etkisi. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 1(1), 35-37.
- Gomes, G.M., Jacob, J., Medeiros, A., Papa, F.O., & Alvarenga, M.A. (2002). Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, 277-279. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00899-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00899-3)
- Gómez, M.C., Pope, E., Harris, R., Mikota, S., & Dresser, B.L. (2003). Development of in vitro matured, in vitro fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. *Theriogenology*, 60(2), 239-251. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00004-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00004-9)
- Gordon, I. (Ed.). (2004a). *Controlled Reproduction Sheep&Goats (Vol. 2)*. Dublin: CABI Publishing.
- Gordon, I. (Ed.). (2004b). *Reproductive Technologies In Farm Animals*. Dublin: CABI Publishing.
- Graham, J.K. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, 68(3-4), 239-247. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00160-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00160-9)
- Graham, J.K., Kunze, E., & Hammerstedt, R.H. (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 43(1), 55-64. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.1.55>
- Graham, J.K., & Mocé, E. (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, 64(3), 492-504. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.006>
- Gravance, C.G., Garner, D.L., Miller, M.G., & Berger, T. (2000). Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reproductive Toxicology*, 15(1), 5-10. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(00\)00113-1](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(00)00113-1)
- Green, C.E., & Watson, P.F. (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122(6), 889-898. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220889>
- Guan, M., Rawson, D.M., & Zhang, T. (2008). Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. *Cryobiology*, 56(3), 204-208. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.03.001>
- Gündoğan, M. (2009). Short term preservation of ram semen with different extenders. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(3), 429-435. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2009.033-A>
- Gungor, S., Ata, A., & Inanc, M.E. (2018). Effects of trehalose and catalase on the viability and kinetic parameters of cryopreserved ram sperm. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46(1), 1-7. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.83865>
- Gutiérrez-Pérez, O., de Lourdes Juárez-Mosqueda, M., Carvajal, S.U., & Ortega, M.E.T. (2009). Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology*, 58(3), 287-292. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.02.003>

- Hackett, A.J., & Macpherson, J.W. (1965). Some staining procedures for spermatozoa. *The Canadian Veterinary Journal*, 6(3), 55. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14330362>
- Hafez, E. S. E., Hafez, B., (Ed.). (1993). *Reproduction in Farm Animals (Seventh Edition)*. South Carolina: Lea&Febiger.
- Hagiwara, M., Choi, J.H., Devireddy, R.V, Roberts, K.P., Wolkers, W.F., Makhlof, A., & Bischof, J.C. (2009). Cellular biophysics during freezing of rat and mouse sperm predicts post-thaw motility. *Biology of Reproduction*, 81(4), 700-706. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076075>
- Hammadeh, M.E., Askari, A.S., Georg, T., Rosenbaum, P., & Schmidt, W. (1999). Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *International Journal of Andrology*, 22(3), 155-162. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1999.00162.x>
- Hammadeh, M.E., Dehn, C.H., Hippach, M., Zeginiadou, T., Stieber, M., Georg, T., Rosenbaum, P., & Schmidt, W. (2001). Comparison between computerized slow-stage and static liquid nitrogen vapour freezing methods with respect to the deleterious effect on chromatin and morphology of spermatozoa from fertile and subfertile men. *International Journal of Andrology*, 24(2), 66-72. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2001.00270.x>
- Hammerstedt, R.H., & Graham, J.K. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29(1), 26-38. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90004-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90004-1)
- Hanada, A., & Nagase, H. (1980). Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *Reproduction*, 60(1), 247-252. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0600247>
- Hans-Jürgen, R. (Ed.) (2005). *Cell Death- Apoptosis and Necrosis; Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation (3rd Edition)*. Eppstein: Roche Diagnostics GmbH.
- Henry, M.A., Noiles, E.E., Gao, D., Mazur, P., & Critser, J.K. (1993). Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertility and Sterility*, 60(5), 911-918. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)56296-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)56296-7)
- Hishinuma, M., & Sekine, J. (2003). Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypoosmotic swelling test with ultrapure water. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65(7), 817-820. <https://doi.org/10.1292/jvms.65.817>
- Ho, H., & Suarez, S.S. (2001). Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*, 122(4), 519-526. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220519>
- Hoagland, H., & Pincus, G. (1942). Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen. *The Journal of General Physiology*, 25(3), 337-344. <https://doi.org/10.1085/jgp.25.3.337>

- Hochi, S., Hirabayashi, M., Hirao, M., Kato, M., Kobayashi, T., Kimura, K., Hirasawa, K., Leibo, S.P., & Ueda, M. (2001). Effects of cryopreservation of pronuclear-stage rabbit zygotes on the morphological survival, blastocyst formation, and full-term development after DNA microinjection. *Molecular Reproduction and Development*, 60(2), 227-232. <https://doi.org/10.1002/mrd.1082>
- Holt, C., Holt, W.V., Moore, H.D.M., Reed, H.C.B., & Curnock, R.M. (1997). Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *Journal of Andrology*, 18(3), 312-323. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1997.tb01925.x>
- Holt, W.V. (2000a). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 3-22. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)
- Holt, W.V. (2000b). Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47-58. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)
- Holt, W.V., Bennett, P.M., Volobouev, V., & Watwon, P.F. (1996). Genetic resource banks in wildlife conservation. *Journal of Zoology*, 238(3), 531-544. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1996.tb05411.x>
- Holt, W.V., & North, R.D. (1984). Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: Freeze-fracture study. *Journal of Experimental Zoology*, 230(3), 473-483. <https://doi.org/10.1002/jez.1402300316>
- Holt, W.V., & 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. <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.3.414>
- Holt, W.V., & Fazeli, A. (2016). Sperm storage in the female reproductive tract. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4, 291-310. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111350>
- Holt, W.V., O'Brien, J., & Abaigar, T. (2007). Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(6), 709-718. <https://doi.org/10.1071/rd07037>
- Honadel, T.E., & Killian, G.J. (1988). Cryopreservation of murine embryos with trehalose and glycerol. *Cryobiology*, 25(4), 331-337. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(88\)90041-7](https://doi.org/10.1016/0011-2240(88)90041-7)
- Hossain, M.E., Khatun, M.M., Islam, M.M., & Miazi, O.F. (2012). Semen characteristics of breeding bulls at the Central Cattle Breeding and Dairy Farm of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Animal Science*, 41(1), 1-5. <https://doi.org/10.3329/bjas.v41i1.11968>
- Hossain, M.S., Johannisson, A., Wallgren, M., Nagy, S., Siqueira, A.P., & Rodriguez-Martinez, H. (2011). Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian Journal of Andrology*, 13(3), 406. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.15>
- Hotamisligil, S., Toner, M., & Douglas Powers, R. (1996). Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes



- after vitrification in ethylene glycol. *Biology of Reproduction*, 55(1), 161-168. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.1.161>
- Howard, J.G., Bush, M., De Vos, V., Schiewe, M.C., Pursel, V.G., & Wildt, D.E. (1986). Influence of cryoprotective diluent on post-thaw viability and acrosomal integrity of spermatozoa of the African elephant (*Loxodonta africana*). *Reproduction*, 78(1), 295-306. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0780295>
- Hu, J., Jiang, Z., Lv, R., Li, Q., Zhang, S., Zan, L., Li, Y., & Li, X. (2011). The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*, 62(1), 83-87. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.12.007>
- Hu, J., Li, Q., Zan, L., Jiang, Z., An, J., Wang, L., & Jia, Y. (2010). The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science*, 117(1-2), 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.04.001>
- Huang, J., Li, Q., Zhao, R., Li, W., Han, Z., Chen, X., Xiao, B., Wu, S., Jiang, Z., Hu, J. & Liu, L. (2008). Effect of sugars on maturation rate of vitrified-thawed immature porcine oocytes. *Animal Reproduction Science*, 106(1-2), 25-35. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.03.023>
- Hubalek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205-229. [https://doi.org/10.1016/s0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(03)00046-4)
- Hurtt, A.E., Landim-Alvarenga, F., Scidel Jr, G.E., & Squires, E.L. (2000). Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology*, 54(1), 119-128. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00330-7](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00330-7)
- Hyakutake, T., Suzuki, H., & Yamamoto, S. (2015). Effect of viscosity on motion characteristics of bovine sperm. *Journal of Aero Aqua Bio-Mechanisms*, 4(1), 63-70. <https://doi.org/10.5226/JABMECH.4.63>
- Iaffaldano, N., Di Iorio, M., Miranda, M., Zaniboni, L., Manchisi, A., & Cerolini, S. (2016). Cryopreserving turkey semen in straws and nitrogen vapour using DMSO or DMA: effects of cryoprotectant concentration, freezing rate and thawing rate on post-thaw semen quality. *British Poultry Science*, 57(2), 264-270. <https://doi.org/10.1080/00071668.2016.1148261>
- İleri, İ., Ak, K., Pabuçuoğlu, S., & Birlir, S. (2000). *Reproduksiyon ve Sun'i Tohumlama*. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Yayını. Ders Notu No: 23.
- İnanç, M.E., Güngör, Ş., & Ata, A. (2019). Effect of 7-Dehydrocholesterol on Ram Semen Spermatological Parameters on Short Term Preservation. *Kocatepe Veterinary Journal*, 12, 1-1. <https://doi.org/10.30607/kvj.492556>
- Inanc, M.E., Gungor, S., Ozturk, C., Korkmaz, F., Bastan, I., & Cil, B. (2019). Cholesterol-loaded cyclodextrin plus trehalose improves quality of frozen-thawed ram sperm. *Veterinarni Medicina*, 64(3), 118-124. <https://doi.org/10.17221/146/2018-VETMED>
- Isachenko, V., Alabart, J.L., Dattena, M., Nawroth, F., Cappai, P., Isachenko, E., Cocero, M.J., Olivera, J., Roche, A., Accardo, C., Krivokharchenko, A., & Folch, J. (2003). New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology*, 59(5-6), 1209-1218. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01165-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01165-2)

- Jeyendran, R.S., & Graham, E.F. (1980). An evaluation of cryoprotective compounds on bovine spermatozoa. *Cryobiology*, 17(5), 458-464. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(80\)90055-3](https://doi.org/10.1016/0011-2240(80)90055-3)
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., & Zaneveld, L.J.D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*, 70(1), 219-228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>
- Jha, P.K., Shahi Alam, M.G., Mansur, A.A., Naher, N., Islam, T., Uddin Bhuiyan, M., & Bari, F.Y. (2019). Cryopreservation of Bangladeshi ram semen using different diluents and manual freezing techniques. *Cryobiology*, 89(June), 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.06.001>
- Jiménez-Rabadána, P., Soler, A., Ramóna, M., García-Álvarez, O., Maroto Morales, A., Iniesta-Cuerdab, M., Fernández-Santos, M.R., Montoro, V., Pérez Guzmán, M.D., & Gardeb, J.J. (2016). Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 167, 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.013>
- Johnson, M.H., & Pickering, S.J. (1987). The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development*, 100(2), 313-324. <https://doi.org/10.1242/dev.100.2.313>
- Joly, T.H., Nibart, M., & Thibier, M. (1992). Hyaluronic acid as a substitute for proteins in the deep-freezing of embryos from mice and sheep: an in vitro investigation. *Theriogenology*, 37(2), 473-480. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90204-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90204-5)
- Jung, H., Kim, N., & Yoon, M. (2016). Reproductive stage-dependent effects of additional cryoprotectant agents for the cryopreservation of stallion germ cells. *Animal Reproduction Science*, 173, 24-28. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.08.005>
- Kadirvel, G., Periasamy, S., & Kumar, S. (2012). Effect of cryopreservation on apoptotic-like events and its relationship with cryocapacitation of buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(1), 143-150. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01818.x>
- Kandelousi, M.A.S., Arshami, J., Naserian, A.A., & Abavisani, A. (2013). The effects of addition of omega-3, 6, 9 fatty acids on the quality of bovine chilled and frozen-thawed sperm. *Open Veterinary Journal*, 3(1), 47-52. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26623311>
- Kandelousi, M.A.S., Arshami, J., Naserian, A.A., & Abavisani, A. (2013). The effects of addition of omega-3, 6, 9 fatty acids on the quality of bovine chilled and frozen-thawed sperm. *Open Veterinary Journal*, 5(2), 47. <https://doi.org/10.5455/ovj.2013.v3.i1.p47>
- Kaplan, J.B., & Mead, R.A. (1992). Evaluation of extenders and cryopreservatives for cooling and cryopreservation of spermatozoa from the western spotted skunk (*Spilogale gracilis*). *Zoo Biology*, 11(6), 397-404. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430110606>
- Karabinus, D.S., Evenson, D.P., Jost, L.K., Baer, R.K., & Kaproth, M.T. (1990). Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by

- light microscopy and flow cytometry. *Journal of Dairy Science*, 73(9), 2364-2371. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(90\)78919-9](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(90)78919-9)
- Karabinus, D.S., Evenson, D.P., & Kaproth, M.T. (1991). Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. *Journal of Dairy Science*, 74(11), 3836-3848. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(91\)78576-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(91)78576-7)
- Karran, G., & Legge, M. (1996). Fertilization and early embryology: non-enzymatic formation of formaldehyde in mouse oocyte freezing mixtures. *Human Reproduction*, 11(12), 2681-2686. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019191>
- Kasai, M. (1986). Nonfreezing technique for short-term storage of mouse embryos. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 3(1), 10-14. <https://doi.org/10.1007/bf01131374>
- Kasai, M. (1996). Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), 67-75. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01536-9](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01536-9)
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K., & Kadirvel, G. (2011). Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system-a review. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), 165-172. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x>
- Kato, Y., & Nagao, Y. (2009). Effect of PVP on sperm capacitation status and embryonic development in cattle. *Theriogenology*, 72(5), 624-635. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.04.018>
- Kato, Y., & Nagao, Y. (2012). Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction. *Reproductive Medicine and Biology*, 11(4), 165-176. <https://doi.org/10.1007/s12522-012-0126-9>
- Katz, D.F., Davis, R.O., Delandmeter, B.A., & Overstreet, J.W. (1985). Real-time analysis of sperm motion using automatic video image digitization. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 21(3), 173-182. [https://doi.org/10.1016/0169-2607\(85\)90002-1](https://doi.org/10.1016/0169-2607(85)90002-1)
- Kawai, Y., Hata, T., Suzuki, O., & Matsuda, J. (2006). The relationship between sperm morphology and in vitro fertilization ability in mice. *Journal of Reproduction and Development*, 606050027. <https://doi.org/10.1262/jrd.18023>
- Kaymakçı, M. (2002). *Koyun Yetiştiriciliği El Notları*. İzmir: İzmir İli Damızlık Koyun Keçi Yetiştiricileri Birliği Yayınları.
- Keilin, D. (1959). The Leeuwenhoek Lecture-The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 150(939), 149-191. <https://doi.org/10.1098/rspb.1959.0013>
- Keith Jr, S.C. (1913). Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water. *Science*, 37(962), 877-879. <https://doi.org/10.1126/science.37.962.877>
- Khan, B.I., Akhter, S., Aslam, S., & Ejaz, R. (2021). Effect of supplementation of polyvinylpyrrolidone in extender on buffalo semen parameters. *Pakistan*



- Journal of Zoology*, 53(1), 9-15.  
<https://doi.org/10.17582/JOURNAL.PJZ/20181230161216>
- Kim, S., Lee, Y.J., Ji, D.B., & Kim, Y.J. (2011). Evaluation of different cryoprotectants (CPAs) in boar semen cryopreservation. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(7), 961-963. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0345>
- Kirk, E.S., Squires, E.L., & Graham, J.K. (2005). Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 64(6), 1422-1439. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.03.006>
- Kolossa, M., & Seibert, H. (1990). A chemically 'defined' diluent for cryopreservation of bovine spermatozoa. *Andrologia*, 22(5), 445-454. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1990.tb02026.x>
- Kono, T., Suzuki, O., & Tsunoda, Y. (1988). Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. *Cryobiology*, 25(2), 170-173. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(88\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0011-2240(88)90011-9)
- Kubovičová, E., Ríha, L., Makarevich, A. V, Apolen, D., & Pivko, J. (2010). Effect of different semen extenders and additives to insemination doses on ewe's pregnancy rate. *Slovak Journal of Animal Science*, 43(3), 118-122.
- Kukovics, S., Gyoker, E., Nemeth, T., & Gergatz, E. (2011). Artificial Insemination of Sheep - Possibilities, Realities and Techniques at the Farm Level. *Artificial Insemination in Farm Animals* içinde (s28-50) Intechopen. <https://doi.org/10.5772/16642>
- Kulaksız, R., Çebi, Ç., & Akçay, E. (2012). The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4 °C. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 36(2), 177-182. <https://doi.org/10.3906/vet-1103-11>
- Kulaksız, R., Çebi, Ç., Akçay, E., & 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. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2009.11.014>
- Kuleshova, L.L., Macfarlane, D.R., Trounson, A.O., & Shaw, J.M. (1999). Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*, 38(2), 119-130. <https://doi.org/10.1006/cryo.1999.2153>
- Kuleshova, L.L., Shaw, J.M., & Trounson, A.O. (2001). Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*, 43(1), 21-31. <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2335>
- Kundu, C.N., Chakrabarty, J., Dutta, P., Bhattacharyya, D., Ghosh, A., & Majumder, G.C. (2002). Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reproduction*, 123, 907-913. <https://doi.org/10.1530/REP.0.1230907>
- Kuster, C.E., Singer, R.S., & Althouse, G.C. (2004). Determining sample size for the morphological assessment of sperm. *Theriogenology*, 61(4), 691-703. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00240-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00240-1)

- Kútvölgyi, G., Stefler, J., & Kovács, A. (2006). Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa. *Biotechnic & Histochemistry*, 81(4-6), 109-117. <https://doi.org/10.1080/10520290600931007>
- Küçük, T., & Başer, İ. (2007). Cryopreservation of female fertility: a review on the basics of cryobiology for obstetrics and gynecology residents. *European Clinics in Obstetrics and Gynaecology*, 3(2), 97-102. <https://doi.org/10.1007/s11296-007-0072-y>
- Larsen, L., Scheike, T., Jensen, T.K., Bonde, J.P., Ernst, E., Hjollund, N.H.I., Zhou, Y., Skakkebaek, N.E., & Giwercman, A. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reproduction*, 15(7), 1562-1567. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.7.1562>
- Lee, Y.A., Kim, Y.H., Kim, B.J., Jung, M.S., Auh, J.H., Seo, J.T., Park, Y.S., Lee, S.H., & Ryu, B.Y. (2013). Cryopreservation of Mouse Spermatogonial Stem Cells in Dimethylsulfoxide and Polyethylene Glycol. *Biology of Reproduction*, 89(5), 1-9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.111195>
- Leibo S.P., & Brandley L. (1999): Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. *The Male Gamet* içinde (s502-515). St Louis: Cache River Press.
- Leibo, S.P., Michael Kubisch, H., Dee Schramm, R., Harrison, R.M., & VandeVoort, C.A. (2007). Male-to-male differences in post-thaw motility of rhesus spermatozoa after cryopreservation of replicate ejaculates. *Journal of Medical Primatology*, 36(3), 151-163. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2006.00194.x>
- Lermen, D., Blömeke, B., Browne, R., Clarke, A., Dyce, P.W., Fixemer, T., Fuhr, G.R., Holt, W.V., Jewgenow, K., Lloyd, R.E., Lötters, S., Paulus, M., Reid, G.M., Rapoport, D.H., Rawson, D., Ringleb, J., Ryder, O.A., Spörl, G., Schmitt, T., Veith, M., & Müller, P. (2009). Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes. *Molecular Ecology*, 18(6), 1030-1033. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2008.04062.x>
- Li, Y.H., Cai, K.J., Kovacs, A., & Ji, W.Z. (2005). Effects of various extenders and permeating cryoprotectants on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Journal of Andrology*, 26(3), 387-395. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04147>
- Liebermann, J., Tucker, M.J., & Sills, E.S. (2003). Cryoloop vitrification in assisted reproduction: analysis of survival rates in > 1000 human oocytes after ultra-rapid cooling with polymer augmented cryoprotectants. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 30(2-3), 125-129.
- Lin, T., & Timasheff, S.N. (1996). On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. *Protein Science*, 5(2), 372-381. <https://doi.org/10.1002/pro.5560050222>
- Love, C.C. (2011). Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*, 76(3), 547-557. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.03.007>
- Lovelock, J.E. (1953). The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 10, 414-426. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(53\)90273-x](https://doi.org/10.1016/0006-3002(53)90273-x)

- Lovelock, J.E. (1954). The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochemical Journal*, 56(2), 265. <https://doi.org/10.1042/bj0560265>
- Lovelock, J.E., & Bishop, M.W.H. (1959). Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*, 183(4672), 1394-1395. <https://doi.org/10.1038/1831394a0>
- Lukaszewicz, E. (2002). An effective method for freezing White Italian gander semen. *Theriogenology*, 58(1), 19-27. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00690-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00690-2)
- Luyet, B.J., & Hodapp, E.L. (1938). Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 39(3), 433-434. <https://doi.org/10.3181/00379727-39-10229P>
- Lybaert, P., Danguy, A., Leleux, F., Meuris, S., & Lebrun, P. (2009). Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Histology and Histopathology*, 24, 999-100. <https://doi.org/10.14670/hh-24.999>
- Mackenzie, A.P. (1977). Non-equilibrium freezing behaviour of aqueous systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 278(959), 167-189. <https://doi.org/10.1098/rstb.1977.0036>
- Magargee, S.F., Kunze, E., & Hammerstedt, R.H. (1988). Changes in lectin-binding features of ram sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation. *Biology of Reproduction*, 38(3), 667-685. <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.3.667>
- Makler, A. (1978). A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoal motility determination. *Fertility and Sterility*, 30(2), 192-199. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)43459-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)43459-x)
- Maksimović, N., Milovanović, A., Barna, T., Caro Petrović, V., Pantelić, V., Lazarević, M., & Stojanov, I. (1970). Short-term liquid storage of ram semen in various extenders. *South African Journal of Animal Science*, 48(4), 717-723. <https://doi.org/10.4314/sajas.v48i4.13>
- Malmgren, L. (1997). Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology*, 48(4), 523-530. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00268-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00268-9)
- Malo, A.F., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A.J., & Roldan, E.R.S. (2006). Sperm design and sperm function. *Biology Letters*, 2(2), 246-249. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0449>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.006>
- Marschall, S., & de Angelis, M.H. (1999). Cryopreservation of mouse spermatozoa: double your mouse space. *Trends in Genetics*, 15(4), 128-131. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(99\)01715-1](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(99)01715-1)
- Martínez, I.N., Morán, J.M., & Peña, F.J. (2006). Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *Journal of Andrology*, 27(4), 596-603. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05153>

- Massip, A. (2001). Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. *Reproduction in Domestic Animals*, 36(2), 49-55. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00248.x>
- Mattner, P.E., & 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. <https://doi.org/10.1071/EA9620078>
- Maxwell, W.M.C., & Johnson, L.A. (1997). Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 48, 209-219. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)84068-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)84068-x)
- Maxwell, W.M.C., & Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(6), 613-638. <https://doi.org/10.1071/rd9930613>
- Mazur, P. (1963). Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *The Journal of General Physiology*, 47(2), 347-369. <https://doi.org/10.1085/jgp.47.2.347>
- Mazur, P., Leibo, S.P., & Seidel Jr, G.E. (2008). Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biology of Reproduction*, 78(1), 2-12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064113>
- McDonald, L.E., & Pineda, M.H. (1989). Reproductive Patterns of Sheep. *Veterinary Endocrinology and Reproduction* içinde (s428-445). Lea&Febiger.
- McKinnon, A.O., Squires, E.L., Vaala, W.E., & Varner, D.D. (Ed.). (2011). *Equine reproduction (Second Edition)*. Wiley-Blackwell
- McWilliams, R.B., Gibbons, W.E., & Leibo, S.P. (1995). Fertilization and early embryology: Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono-and disaccharides. *Human Reproduction*, 10(5), 1163-1171. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136112>
- Medeiros, A.S.L., Gomes, G.M., Carmo, M.T., Papa, F.O., & Alvarenga, M.A. (2002). Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, 273-276. <https://doi.org/10.1016/S0093-691X%2802%2900898-1>
- Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D., & Rodrigues, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327-344. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00674-4](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00674-4)
- Menchaca, A., Pinczak, A., & Queirolo, D. (2006). Storage of ram semen at 5 °C: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. *Animal Reproduction*, 2(3), 195-198. <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/AR035.pdf>
- Merlo, B., Iacono, E., Regazzini, M., & Zambelli, D. (2008). Cat blastocysts produced in vitro from oocytes vitrified using the cryoloop technique and cryopreserved electroejaculated semen. *Theriogenology*, 70(1), 126-130. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.03.009>
- Meryman, H.T. (1971). Cryoprotective agents. *Cryobiology*, 8(2), 173-183. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(71\)90024-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(71)90024-1)

- Meryman, H.T. (2007). Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion*, 47(5), 935-945. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01212.x>
- Migishima, F., Suzuki-Migishima, R., Song, S., Kuramochi, T., Azuma, S., Nishijima, M., & Yokoyama, M. (2003). Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biology of Reproduction*, 68(3), 881-887. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007948>
- Molinia, F.C., Evans, G., & Maxwell, W.M.C. (1994). Effect of polyols on the post-thawing motility of pellet-frozen ram spermatozoa. *Theriogenology*, 42(1), 15-23. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(94\)90658-6](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90658-6)
- Monfort, S.L., Asher, G.W., Wildt, D.E., Wood, T.C., Schiewe, M.C., Williamson, L.R., Bush, M., & Rall, W.F. (1993). Successful intrauterine insemination of Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) with frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction*, 99(2), 459-465. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0990459>
- Morrell, J.M. (2006). Update on semen technologies for animal breeding. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(1), 63-67. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00621.x>
- Morrell, J.M., & Hodges, J.K. (1998). Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research. *Animal Reproduction Science*, 53(1), 43-63. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(98\)00126-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(98)00126-2)
- Morris, I.D., Ilott, S., Dixon, L., & Brison, D.R. (2002). The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction*, 17(4), 990-998. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.4.990>
- Mortimer, S.T. (2000). CASA-practical aspects. *Journal of Andrology*, 21(4), 515-524. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x>
- Moustacas, V.S., Zaffalon, F.G., Lagares, M.A., Loaiza-Eccheverri, A.M., Varago, F. C., Neves, M.M., Heneine, L.G.D., Arruda, R.P., & Henry, M. (2011). Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 75(2), 300-307. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.016>
- Mukaida, T., Wada, S., Takahashi, K., Pedro, P.B., An, T.Z., & Kasai, M. (1998). Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Human Reproduction*, 13(10), 2874-2879. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.10.2874>
- Mullen, S.F., Agca, Y., & Critser, J.K. (2004b). Modeling the Probability of MII Spindle Disruption in Bovine Oocytes as a Function of Total Osmolality Using Logistic Regression and Its Application toward Improved CPA Addition and Removal Procedures. *Cell Preservation Technology*, 2(2), 145-155. <https://doi.org/10.1089/153834404774101981>
- Murphy, E.M., Kelly, A.K., O'Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P., & Fair, S. (2018). Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility parameters in Holstein Friesian bulls in a commercial artificial insemination centre. *Journal of Animal Science*, 96(6), 2408-2418. <https://doi.org/10.1093/jas/sky130>



- Nagano, M., Atabay, E.P., Atabay, E.C., Hishinuma, M., Katagiri, S., & Takahashi, Y. (2007). Effects of isolation method and pre-treatment with ethylene glycol or raffinose before vitrification on in vitro viability of mouse preantral follicles. *Biomedical Research*, 28(3), 153-160. <https://doi.org/10.2220/biomedres.28.153>
- Najafi, A., Daghigh-Kia, H., Vaseghi Dodaran, H., Mehdipour, M. & 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. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.12.004>
- Nakagata, N. (1989). High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *Reproduction*, 87(2), 479-483. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0870479>
- Nascimento, I.A., Leite, M.B.N.L., de Araújo, M.M.S., Sansone, G., Pereira, S.A., & do Espírito Santo, E.M. (2005). Selection of cryoprotectants based on their toxic effects on oyster gametes and embryos. *Cryobiology*, 51(1), 113-117. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.04.006>
- Nash, T. (1966). Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. *Cryobiology*, 46, 179-211. <https://doi.org/10.1085%2Fjgp.46.1.167>
- Neild, D., Chaves, G., Flores, M., Mora, N., Beconi, M., & Agüero, A. (1999). Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 51(4), 721-727. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00021-7](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00021-7)
- Noiles, E.E., Mazur, P., Watson, P.F., Kleinhans, F.W., & Critser, J.K. (1993). Determination of water permeability coefficient for human spermatozoa and its activation energy. *Biology of Reproduction*, 48(1), 99-109. <https://doi.org/10.1095/biolreprod48.1.99>
- Núñez-Martínez, I., Moran, J.M., & Peña, F.J. (2006). A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(5), 408-415. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00685.x>
- Nur, Z., Seven-Çakmak, S., Ustuner, B., Çakmak, I., Erturk, M., Abramson, C.I., Sagirkaya, H., & Soylu, M.K. (2011). The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. *Apidologie*, 43, 31-38. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0073-1>
- Nur, Z., Zik, B., Ustuner, B., Sagirkaya, H., & Ozguden, C.G. (2010). Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*, 73(9), 1267-1275. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.12.007>
- Nur, Z. (2019). Spermanın Alınması ve Muayenesi, Spermanın Saklanması ve Eritilmesi ve Seksüel Siklus ve Suni Tohumlama içinde *Doğum Bilgisi ve Suni Tohumlama*, (s18-78). Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Yayınları No:3141
- Nur, Z., Zik, B., Ustuner, B., Tutuncu, S., Sagirkaya, H., Ozguden, C.G., Günay, Ü., & Doğan, I. (2011). Effect of freezing rate on acrosome and chromatin integrity in ram semen. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 58, 267-272. [https://doi.org/10.1501/VETFAK\\_0000002486](https://doi.org/10.1501/VETFAK_0000002486)

- O'Hara, L., Hanrahan, J. P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A. C. O., & Lonergan, P. (2010). Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, 73(4), 541-549. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.009>
- O'Meara, C.M., Hanrahan, J.P., Donovan, A., Fair, S., Rizos, D., Wade, M., Boland, M.P., Evans, A.C.O., & Lonergan, P. (2005). Relationship between in vitro fertilisation of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, 64(8), 1797-1808. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.009>
- O'Neil, L., Paynter, S.J., Fuller, B.J., & Shaw, R.W. (1997). Vitrification of mature mouse oocytes: improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. *Cryobiology*, 34(3), 295-301. <https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2007>
- Odhiambo, J. F., Sutovsky, M., DeJarnette, J. M., Marshall, C., & Sutovsky, P. (2011). Adaptation of ubiquitin-PNA based sperm quality assay for semen evaluation by a conventional flow cytometer and a dedicated platform for flow cytometric semen analysis. *Theriogenology*, 76(6), 1168-1176. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.009>
- Ohboshi, S., Etoh, T., Sakamoto, K., Fujihara, N., Yoshida, T., & Tomogane, H. (1997). Effects of bovine serum proteins in culture medium on post-warming survival of bovine blastocysts developed in vitro. *Theriogenology*, 47(6), 1237-1243. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00103-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00103-9)
- Oldenhof, H., Friedel, K., Sieme, H., Glasmacher, B., & Wolkers, W.F. (2010). Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*, 61(1), 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.06.002>
- Ollero, M., Perez-Pe, R., Muiño-Blanco, T., & Cebrian-Perez, J.A. (1998). Improvement of Ram Sperm Cryopreservation Protocols Assessed by Sperm Quality Parameters and Heterogeneity Analysis. *Cryobiology*, 37(1), 1-12. <https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2092>
- Orief, Y., Schultze-Mosgau, A., Dafopoulos, K., & Al-Hasani, S. (2005). Vitrification: Will it replace the conventional gamete cryopreservation techniques? *Middle East Fertility Society Journal*, 10(3), 171-184. <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/7490/1/mf05029.pdf>
- Ortega-Ferrusola, C., García, B.M., Gallardo-Bolanos, J.M., Gonzalez-Fernandez, L., Rodríguez-Martinez, H., Tapia, J.A., & Peña, F.J. (2009a). Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 114(4), 393-403. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.10.005>
- Ortega-Ferrusola, C., Garcia, B.M., Rama, V.S., Gallardo-Bolaños, J. M., González-Fernández, L., Tapia, J.A., Rodríguez-Martinez, H., & Pena, F.J. (2009b). Identification of sperm subpopulations in stallion ejaculates: changes after cryopreservation and comparison with traditional statistics. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(3), 419-423. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01097.x>

- Ostermeier, G.C., Wiles, M.V., Farley, J.S., & Taft, R.A. (2008). Conserving, distributing and managing genetically modified mouse lines by sperm cryopreservation. *PloS One*, 3(7), e2792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002792>
- Ott, M., Norberg, E., Walter, K.M., Schreiner, P., Kemper, C., Rapaport, D., Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2007). The mitochondrial TOM complex is required for tBid/Bax-induced cytochrome c release. *Journal of Biological Chemistry*, 282(38), 27633-27639. <https://doi.org/10.1074/jbc.m703155200>
- Özgür, M.E., Okumuş, F., & Kocamaz, A.F. (2019). A novel computer assisted sperm analyzer for assessment of spermatozoa motility in fish; BASA-Sperm Aqua. *El-Cezeri*, 6(1), 208-219. <https://doi.org/10.31202/ECJSE.486342>
- Özkoca, A. (1984). *Çiftlik hayvanlarında reproduksiyon ve suni tohumlama*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları,
- Öztürk, A.E., Bodu, M., Bucak, M.N., Ağır, V., Özcan, A., Keskin, N., İli, P., Topraggaleh, T.R., Sidal, H., Başpınar, N., & Dursun, Ş. (2020). The synergistic effect of trehalose and low concentrations of cryoprotectants can improve post-thaw ram sperm parameters. *Cryobiology*, 95(March), 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.03.008>
- Pabst, A. M. (1935). Use of below-freezing temperatures for maintenance of meningococcus cultures (*Neisseria intracellularis* Weichselbaum). *Public Health Reports*, 732-737. <https://doi.org/10.2307/4581553>
- Palasz, A., Alkemade, S., & Mapletoft, R.J. (1993). The use of sodium hyaluronate in freezing media for bovine and murine embryos. *Cryobiology*, 30(2), 172-178. <https://doi.org/10.1006/cryo.1993.1016>
- Palasz, A.T., Brena, P.B., Martinez, M.F., Perez-Garnelo, S.S., Ramirez, M.A., Gutiérrez-Adán, A., & De la Fuente, J. (2008). Development, molecular composition and freeze tolerance of bovine embryos cultured in TCM-199 supplemented with hyaluronan. *Zygote*, 16(1), 39-47. <https://doi.org/10.1017/s0967199407004467>
- Palasz, A.T., Thundathil, J., De La Fuente, J., & Mapletoft, R.J. (2000). Effect of reduced concentrations of glycerol and various macromolecules on the cryopreservation of mouse and cattle embryos. *Cryobiology*, 41(1), 35-42. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2262>
- Palasz, A.T., & Mapletoft, R.J. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnology Advances*, 14(2), 127-149. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(96\)00005-5](https://doi.org/10.1016/0734-9750(96)00005-5)
- Palmer, C.W., & Barth, A.D. (2003). Comparison of the BullMate™ sperm quality analyzer with conventional means of assessing the semen quality and breeding soundness of beef bulls. *Animal Reproduction Science*, 77(3-4), 173-185. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(03\)00037-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00037-x)
- Parkes, A.S. (1946). Preservation of Human Spermatozoa at Low Temperatures. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 1(1), 155-156. <https://doi.org/10.3181/00379727-82-20219>



- Parks, J.E., & Lynch, D.V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29(2), 255-266. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90024-v](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90024-v)
- Paulenz, H., Ådnøy, T., & Söderquist, L. (2007). Comparison of fertility results after vaginal insemination using different thawing procedures and packages for frozen ram semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-26>
- Paulenz, H., Söderquist, L., Ådnøy, T., Soltun, K., Sæther, P.A., Fjellsøy, K.R., & Berg, K.A. (2005a). Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. *Animal Reproduction Science*, 86(1-2), 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.06.007>
- Paulenz, H., Soltun, K., Ådnøy, T., Berg, K.A., & Söderquist, L. (2005b). Effect of different extenders on sperm viability of buck semen stored at room temperature. *Small Ruminant Research*, 59(1), 89-94. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2004.11.010>
- Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé, R., & Berg, K.A. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, 57(2), 823-836. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00683-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00683-5)
- Pedro, P.B., Yokoyama, E., Zhu, S.E., Yoshida, N., Valdez Jr, D.M., Tanaka, M., Edashige, K., & Kasai, M. (2005). Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. *Journal of Reproduction and Development*, 51(2), 235-246. <https://doi.org/10.1262/jrd.16079>
- Pegg, D.E. (2002). The history and principles of cryopreservation. *Seminars in Reproductive Medicine*, 20(01), 5-14. <https://doi.org/10.1055/s-2002-23515>
- Peña, A., & Linde-Forsberg, C. (2000). Effects of equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54(6), 859-875. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00397-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00397-6)
- Pena, F.J., Johannisson, A., Wallgren, M., & Rodríguez-Martínez, H. (2004). Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation. *Theriogenology*, 61(1), 63-70. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00181-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00181-x)
- Peña, F.J., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J.A., Ortega Ferrusola, C., Gonzalez Fernandez, L., & Macias Garcia, B. (2009). Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), 345-349. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01211.x>
- Peña, F.J., Núñez-Martínez, I., & Morán, J.M. (2006). Semen technologies in dog breeding: an update. *Reproduction in Domestic Animals*, 41, 21-29. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00766.x>
- Peña, F.J., Saravia, F., García-Herreros, M., Núñezmartínez, I., Tapia, J.A., Johannisson, A., Wallgren, M., & Rodríguez-Martínez, H. (2005). Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *Journal of Andrology*, 26(6), 716-723. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05030>

- Peris-Frau, P., Soler, A.J., Iniesta-Cuerda, M., Martín-Maestro, A., Sánchez-Ajofrín, I., Medina-Chávez, D.A., Fernández-Santos, M.R., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., & Montoro, V. (2020). 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. <https://doi.org/10.3390/ijms21082781>
- Petrunkina, A.M., & Harrison, R.A.P. (2011). Cytometric solutions in veterinary andrology: Developments, advantages, and limitations. *Cytometry*, 79A(5), 338-348. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21044>
- Pickering, S.J., Braude, P.R., Johnson, M.H., Cant, A., & Currie, J. (1990). Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertility and Sterility*, 54(1), 102-108. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)53644-9](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)53644-9)
- Pickering, S.J., & Johnson, M.H. (1987). The influence of cooling on the organization of meiotic spindle of the mouse oocyte. *Human Reproduction*, 2(3), 207-216. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136516>
- Pinto, C.R.F., & Kozink, D.M. (2008). Simplified hypoosmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 104(2-4), 450-455. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.07.005>
- Polge, C., Smith, A.U., & Parkes, A.S. (1949). Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*, 164, 666. <http://dx.doi.org/10.1038/164666a0>
- Pontbriand, D., Howard, J.G., Schiewe, M.C., Stuart, L.D., & Wildt, D.E. (1989). Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26(4), 341-354. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(89\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0011-2240(89)90058-8)
- Pradice, J., Estes, M.C., Lopez-Sebastián, A., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Carrizosa, J.A., Urrutia, B., & Santiago-Moreno, J. (2015). Successful ultrarapid cryopreservation of wild Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa. *Theriogenology*, 84(9), 1513-1522. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.036>
- Pugh, P.A., Tervit, H.R., & Niemann, H. (2000). Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. *Animal Reproduction Science*, 58(1-2), 9-22. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(99\)00087-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(99)00087-1)
- Quinn, P.J., Salamon, S., & White, I.G. (1968). The effect of cold shock and deep-freezing on ram spermatozoa collected by electrical ejaculation and by an artificial vagina. *Australian Journal of Agricultural Research*, 19(1), 119-128. <https://doi.org/10.1071/AR9680119>
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., & Rodríguez-Gil, J.E. (2004). Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*, 61(4), 673-690. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00248-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00248-6)
- Rakha, B.A., Ansari, M.S., Akhter, S., Zafar, Z., Hussain, I., Santiago-Moreno, J., & Blesbois, E. (2017). Cryopreservation of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus*

- murghi) semen with polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology*, 78, 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.07.006>
- Rall, W.F., & Fahy, G.M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 C by vitrification. *Nature*, 313(6003), 573-575. <https://doi.org/10.1038/313573a0>
- Kershaw, C.M., Khalid, M., McGowan, M.R., Ingram, K., Leethongdee, S., Wax, G., & Scaramuzzi, R. (2005). The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, 64, 5, 1225-35. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.02.017>
- Rasul, Z., Ahmed, N., & Anzar, M. (2007). Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glycerol during cryopreservation of buffalo sperm. *Theriogenology*, 68(5), 813-819. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.014>
- Rathi, R., Colenbrander, B., Bevers, M.M., & Gadella, B.M. (2001). Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 65(2), 462-470. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.2.462>
- Reinhoud, P.J., Van Iren, F., & Kijne, J.W. (2000). Cryopreservation of undifferentiated plant cells. *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application* içinde (s91-102). Japan International Research Center for Agricultural Sciences
- Revell, S.G., & Wood, P.D.P. (1978). A photographic method for the measurement of motility of bull spermatozoa. *Reproduction*, 54(1), 123-126. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0540123>
- Ricker, J.V, Linfor, J.J., Delfino, W.J., Kysar, P., Scholtz, E.L., Tablin, F., Crowe, J. H., Ball, B.A., & Meyers, S.A. (2006). Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biology of Reproduction*, 74(2), 359-365. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.046185>
- Ritar, A.J., & Salam, S. (1983). Fertility of fresh and frozen -thawed semen of the angora goat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 36(1), 49-60. <https://doi.org/10.1071/BI9830049>
- Robbins, R.K., Saacke, R., & Chandler, P.T. (1976). Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws. *Journal of Animal Science*, 42(1), 145-154. <https://doi.org/10.2527/jas1976.421145x>
- Rota, A, Penzo, N., Vincenti, L., & Mantovani, R. (2000). Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 53(7), 1415-1420. <https://doi.org/10.1016/S0093-691X%2800%2900284-3>
- Rota, A., Bastianacci, V., Magelli, C., Panzani, D., & Camillo, F. (2010). Evaluation of plasma membrane integrity of donkey spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(2), 228-232. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01241.x>
- Rota, A., Linde Forsberg, C., Vannozzi, I., Romagnoli, S., & Rodriguez Martinez, H. (1998). Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations

- and freezing/thawing rates. *Reproduction in Domestic Animals*, 33, 355-361. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.1998.TB01370.X>
- Royere, D., Barthelemy, C., Hamamah, S., & Lansac, J. (1996). Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Human Reproduction Update*, 2(6), 553-559. <https://doi.org/10.1093/humupd/2.6.553>
- Ruiz-Sánchez, A.L., O'donoghue, R., Novak, S., Dyck, M.K., Cosgrove, J.R., Dixon, W.T., & Foxcroft, G.R. (2006). The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. *Theriogenology*, 66(4), 736-748. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.12.012>
- Rutllant, J., Pommer, A.C., & Meyers, S.A. (2003). Osmotic tolerance limits and properties of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa. *Journal of Andrology*, 24(4), 534-541. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02705.x>
- Saacke, R.G. (2008). Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology*, 70(3), 473-478. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.012>
- Safranski, T.J., Ford, J.J., Rohrer, G.A., & Guthrie, H.D. (2011). Genetic selection for freezability and its controversy with selection for performance. *Reproduction Domestic Animals*, 46, 31-34. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01853.x>
- Saha, S., Otoi, T., Takagi, M., Boediono, A., Sumantri, C., & Suzuki, T. (1996). Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology*, 33(3), 291-299. <https://doi.org/10.1006/cryo.1996.0029>
- Salamon, S., & Maxwell, W.M.C. (1995a). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3-4), 185-249. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01327-I](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01327-I)
- Salamon, S., & Maxwell, W.M.C. (1995b). Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, 38(1-2), 1-36. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01328-J](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01328-J)
- Salamon, S., & Maxwell, W.M.C. (2000a). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 77-111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
- Salamon, S., & Ritar, A.J. (1982). Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences*, 35(3), 295-304. <https://doi.org/10.1071/BI9820295>
- Salinas-Flores, L., Adams, S.L., & Lim, M.H. (2008). Determination of the membrane permeability characteristics of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, oocytes and development of optimized methods to add and remove ethylene glycol. *Cryobiology*, 56(1), 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.10.175>
- Salmon, V.M., Castonguay, F., Demers-Caron, V., Leclerc, P., & Bailey, J.L. (2017). Cholesterol-loaded cyclodextrin improves ram sperm cryoresistance in skim milk-extender. *Animal Reproduction Science*, 177, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.11.011>

- Santolaria, P., Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Fantova, E., Blasco, M.E., Silvestre, M.A., & Yániz, J.L. (2015). Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction Science*, 163, 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.10.001>
- Santos, N.C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., & Saldanha, C. (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*, 65(7), 1035-1041. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(03\)00002-9](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00002-9)
- Schmehl, M.K., Vazquez, I.A., & Graham, E.F. (1986). The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to TEST-yolk-glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 23 6, 512-7. <https://doi.org/10.1016/0011-2240%2886%2990060-X>
- Scott, K.L., Lecak, J., & Acker, J.P. (2005). Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. *Transfusion Medicine Reviews*, 19(2), 127-142. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2004.11.004>
- Seki, S., Kouya, T., Hara, T., Valdez Jr, D. M., Jin, B., Kasai, M., & Edashige, K. (2007). Exogenous expression of rat aquaporin-3 enhances permeability to water and cryoprotectants of immature oocytes in the zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of reproduction and development*, 53 3, 597-604. <https://doi.org/10.1262/jrd.18164>
- Seli, E., Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., Moffatt, O., & Sakkas, D. (2004). Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 82(2), 378-383. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2003.12.039>
- Seneda, M.M., Silva-Santos, K.C., & Marinho, L.S.R. (Ed.) (2016). *Biotechnology of animal reproduction*. Brasil: Nova Science Publisher.
- Senger, P.L. (1980). Handling frozen bovine semen - factors which influence viability and fertility. *Theriogenology*, 13(1), 51-62. <https://doi.org/10.1016/0093-691X%2880%2990014-X>
- Setchell, B.P. (1991). Male reproductive organs and semen. *Reproduction in Domestic Animals (Fourth Edition)* içinde (s221-249). Academic Press
- Sevinç, A. (1977). *Dölerme ve Sun'i Tohumlama Ders Kitabı*. Elazığ: Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını,
- Shaw, J.M., & Jones, G.M. (2003). Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 9(6), 583-605. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD%2FDMG041>
- Shaw, J.M., Kuleshova, L.L., Macfarlane, D.R., & Trounson, A.O. (1997). Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology*, 35(3), 219-229. <https://doi.org/10.1006/CRYO.1997.2043>
- Shaw, J.M., & Nakagata, N. (2002). Cryopreservation of transgenic mouse lines. *Transgenesis Techniques*, 207-228. <https://doi.org/10.1385/1-59259-178-7%3A207>



- Sherman, J. K., & Lin, T. P. (1958). Effect of glycerol and low temperature on survival of unfertilized mouse eggs. *Nature*, 181(4611), 785-786. <https://doi.org/10.1038/181785A0>
- Shiple, C.F.B., Buckrell, B.C., Mylne, M.J.A., Pollard, J., & Hunton, J.R. (2007). CHAPTER 86 - Artificial Insemination and Embryo Transfer in Sheep içinde *Current Therapy in Large Animal Theriogenology (Second Edition)* (s629-641). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-072169323-1.50089-1>
- Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Uchoa, D. C., & Silva, L.D.M. (2003). Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, 59(3-4), 821-829. <https://doi.org/10.1016/S0093-691X%2802%2901130-5>
- Silva, P.F.N., & Gadella, B.M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958-978. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.09.010>
- Sola-Penna, M., & Meyer-Fernandes, J.R. (1998). Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 360(1), 10-14. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1998.0906>
- Solar, I.I. (2009). Use and exchange of salmonid genetic resources relevant for food and aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 1(3-4), 174-196. <https://doi.org/10.1111/J.1753-5131.2009.01013.X>
- Sommerfeld, V., & Niemann, H. (1999). Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, 38(2), 95-105. <https://doi.org/10.1006/CRYO.1999.2159>
- Songsasen, N., Betteridge, K.J., & Leibo, S.P. (1997). Birth of live mice resulting from oocytes fertilized in vitro with cryopreserved spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 56(1), 143-152. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD56.1.143>
- Songsasen, N., & Leibo, S.P. (1997). Cryopreservation of Mouse Spermatozoa. *Cryobiology*, 35(3), 255-269. <https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2047>
- Sönmez, M. (2013). Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. Elazığ: Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını.
- Soylu, M. K., Nur, Z., Ustuner, B., Dogan, I., Sagirkaya, H., Gunay, U., & Ak, K. (2007). Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 51(2), 241-246. <http://www.piwet.pulawy.pl/jvetres/images/stories/pdf/20072/20072241246.pdf>
- Squires, E.L., Keith, S.L., & Graham, J.K. (2004). Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6), 1056-1065. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2003.12.024>
- Stachecki, J.J., Cohen, J., & Willadsen, S.M. (1998). Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. *Cryobiology*, 37(4), 346-354. <https://doi.org/10.1006/CRYO.1998.2130>

- Storey, B.T., Noiles, E.E., & Thompson, K.A. (1998). Comparison of Glycerol, Other Polyols, Trehalose, and Raffinose to Provide a Defined Cryoprotectant Medium for Mouse Sperm Cryopreservation. *Cryobiology*, 37(1), 46-58. <https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2097>
- Strambini, G.B., & Gabellieri, E. (1996). Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding. *Biophysical Journal*, 70(2), 971-976. <https://doi.org/10.1016/S0006-3495%2896%2979640-6>
- Su, T., Xue, L., & Ozcan, A. (2012). High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40), 16018-16022. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212506109>
- Suzuki, T., Takagi, M., Yamamoto, M., Boediono, A., Saha, S., Sakakibara, H., & Oe, M. (1993). Pregnancy rate and survival in culture of in vitro fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. *Theriogenology*, 40(3), 651-659. <https://doi.org/10.1016/0093-691X%2893%2990417-4>
- Sz ell, A., Bierbaum, R.C., Hazelrigg, W.B., & Chetkowski, R.J. (2013). Live births from frozen human semen stored for 40 years. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30, 743-744. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-9998-9>
- Sztejn, J.M., Noble, K., Farley, J.S., & Mobraaten, L.E. (2001). Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 42(1), 28-39. <https://doi.org/10.1006/CRYO.2001.2300>
- Tada, N., Sato, M., Yamanoi, J., Mizorogi, T., Kasai, K., & Ogawa, S. (1990). Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *Reproduction*, 89(2), 511-516. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0890511>
- Takagi, M., Boediono, A., Saha, S., & Suzuki, T. (1993a). Survival rate of frozen-thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. *Cryobiology*, 30(3), 306-312. <https://doi.org/10.1006/CRYO.1993.1029>
- Takagi, M., Otoi, T., & Suzuki, T. (1993b). Survival rate of frozen-thawed bovine IVM/IVF embryos in relation to post-thaw exposure time in two cryoprotectants. *Cryobiology*, 30(5), 466-469. <https://doi.org/10.1006/CRYO.1993.1047>
- Tao, D., & Li, P.H. (1986). Classification of plant cell cryoprotectants. *Journal of Theoretical Biology*, 123(3), 305-310. <https://doi.org/10.1016/S0022-5193%2886%2980245-4>
- Tardif, A.L., Farrell, P.B., Trouern-Trend, V., Simkin, M.E., & Foote, R.H. (1998). Use of Hoechst 33342 stain to evaluate live fresh and frozen bull sperm by computer-assisted analysis. *Journal of Andrology*, 19(2), 201-206. <https://doi.org/10.1002/J.1939-4640.1998.TB01989.X>
- Ta demir, U., B y kleblebici, S., Tuncer, P.B., Co kun, E.,  zg rta , T., Aydin, F. N., B y kleblebici, O., & G rcan, I.S. (2013). Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology*, 66(1), 38-42. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.10.006>

- Tekin, N. (1994). Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama, Doğum ve İnfertilite*. İçinde s(69-79) Konya.
- Tervit, H.R., Adams, S.L., Roberts, R.D., McGowan, L.T., Pugh, P.A., Smith, J.F., & Janke, A.R. (2005). Successful cryopreservation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Cryobiology*, 51(2), 142-151. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2005.06.001>
- Testart, J., Lassalle, B., Belaisch-Allart, J., Hazout, A., Forman, R., Rainhorn, J.D., & Frydman, R. (1986). High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertility and Sterility*, 46(2), 268-272. <https://doi.org/10.1016/S0015-0282%2816%2949524-5>
- Thirumala, S., Campbell, W.T., Vicknair, M.R., Tiersch, T.R., & Devireddy, R.V. (2006). Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. *Theriogenology*, 66(4), 964-973. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2006.02.035>
- Thirumala, S., Forman, J.M., Monroe, W.T., & Devireddy, R.V. (2007). Freezing and post-thaw apoptotic behaviour of cells in the presence of palmitoyl nanogold particles. *Nanotechnology*, 18(19), 195104. <https://doi.org/10.1088/0957-4484%2F18%2F19%2F195104>
- Thomas, C.A., Garner, D.L., Mel DeJarnette, J., & Marshall, C.E. (1997). Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 56(4), 991-998. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD56.4.991>
- Thurston, L.M., Watson, P.F., Mileham, A.J., & Holt, W.V. (2001). Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *Journal of Andrology*, 22(3), 382-394. <https://doi.org/10.1002/J.1939-4640.2001.TB02194.X>
- Thurston, L.M., Siggins, K., Mileham, A.J., Watson, P.F., & Holt, W.V. (2002). Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 66(3), 545-554. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.3.545>
- TÜİK. (2022). (Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK], 2022). <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Çiğ-Süt-Üretim-İstatistikleri-2020-2021-45861&dil=1>
- Ustuner, B., Alçay, S., Gokce, E., Yilmaz, M.M., Aktar, A., Huraydin, O., Duman, M., Onder, N.T., Akal, E., & Nur, Z. (2022). Lyophilized extender supplemented with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plasma improves cryopreservation of ram sperm. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 28 (2): 255-260. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2021.26855>
- Üstüner, B., Alçay, S., Nur, Z., Sağırkaya H, & Soylu, M.K. (2014). Effect of egg yolk and soybean lecithin on tris-based extender in post-thaw ram semen quality and in vitro fertility. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(3), 393-398. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2013.10248>



- Ustuner, B., Alçay, S., Toker, M. B., Nur, Z., Gökçe, E., Sonat, F. A., Gül, Z., Duman, M., Ceniz, C., & Uslu, A. (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. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.017>
- Utsumi, K., Hochi, S., & Iritani, A. (1992). Cryoprotective effect of polyols on rat embryos during two-step freezing. *Cryobiology*, 29(3), 332-341. <https://doi.org/10.1016/0011-2240%2892%2990034-Y>
- Uysal, O., & Bucak, M.N. (2007). Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Veterinaria Brno*, 76(3), 383-390. <https://doi.org/10.2754/AVB200776030383>
- Vafaei, F., Kohram, H., Zareh-Shahne, A., Ahmad, E., & Seifi-Jamadi, A. (2019). Influence of Different Combinations of Permeable and Nonpermeable Cryoprotectants on the Freezing Capacity of Equine Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 75, 69-73. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.01.014>
- Valdez, C.A., Mazni, O.A., Takahashi, Y., Fujikawa, S., & Kanagawa, H. (1992). Successful cryopreservation of mouse blastocysts using a new vitrification solution. *Reproduction*, 96(2), 793-802. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0960793>
- Valdez Jr, D.M., Hara, T., Miyamoto, A., Seki, S., Jin, B., Kasai, M., & Edashige, K. (2006). Expression of aquaporin-3 improves the permeability to water and cryoprotectants of immature oocytes in the medaka (*Oryzias latipes*). *Cryobiology*, 53(2), 160-168. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2006.05.003>
- Van der Elst, J., Nerinckx, S., & Van Steirteghem, A.C. (1992a). In vitro maturation of mouse germinal vesicle-stage oocytes following cooling, exposure to cryoprotectants and ultrarapid freezing: limited effect on the morphology of the second meiotic spindle. *Human Reproduction*, 7(10), 1440-1446. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137591>
- Van Der Elst, J., Van Den Abbeel, E., Nerinckx, S., & Van Steirteghem, A. (1992b). Parthenogenetic activation pattern and microtubular organization of the mouse oocyte after exposure to 1, 2-propanediol. *Cryobiology*, 29(5), 549-562. <https://doi.org/10.1016/0011-2240%2892%2990060-F>
- Van der Horst, G., & Maree, L. (2010). SpermBlue®: a new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis. *Biotechnic & Histochemistry*, 84(6), 299-308. <https://doi.org/10.3109/10520290902984274>
- Varner, D.D., Scanlan, C.M., Thompson, J.A., Brumbaugh, G.W., Blanchard, T.L., Carlton, C.M., & Johnson, L. (1998). Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*, 50(4), 559-573. <https://doi.org/10.1016/S0093-691X%2898%2900161-7>
- Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Anton, M., Desherces, S., Shmitt, E., Thorin, C., & Tainturier, D. (2011). Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4 C. *Asian Journal of Andrology*, 13(2), 281. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.84>

- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1), 149-179. <https://doi.org/10.1016/S0093-691X%2801%2900664-1>
- Vicente, J.S., & Viudes-de-Castro, M.P. (1996a). A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen. *Reproduction Nutrition Development*, 36(5), 485-492. <https://doi.org/10.1051/rnd:19960504>
- Vincent, C., Garnier, V., Heyman, Y., & Renard, J.P. (1989). Solvent effects on cytoskeletal organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *Reproduction*, 87(2), 809-820. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0870809>
- Vincent, C., Pickering, S.J., & Johnson, M.H. (1990). The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. *Reproduction*, 89(1), 253-259. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0890253>
- Vincent, C., Pickering, S.J., Johnson, M.H., & Quick, S.J. (1990). Dimethylsulphoxide affects the organisation of microfilaments in the mouse oocyte. *Molecular Reproduction and Development*, 26(3), 227-235. <https://doi.org/10.1002/MRD.1080260306>
- Vincent, C., Turner, K., Pickering, S.J., & Johnson, M.H. (1991). Zona pellucida modifications in the mouse in the absence of oocyte activation. *Molecular Reproduction and Development*, 28(4), 394-404. <https://doi.org/10.1002/MRD.1080280412>
- Vincent, P., Underwood, S.L., Dolbec, C., Bouchard, N., Kroetsch, T., & Blondin, P. (2014). Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Bovine Reproduction*, 685-695. <https://doi.org/10.1002/9781119602484.CH81>
- Vishwanath, R., & Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 23-53. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00153-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00153-6)
- Viudes-de-Castro, M.P., Talaván, A.G., & Vicente, J.S. (2021). Evaluation of dextran for rabbit sperm cryopreservation: Effect on frozen-thawed rabbit sperm quality variables and reproductive performance. *Animal Reproduction Science*, 226. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106714>
- Waberski, D., Schapmann, E., Henning, H., Riesenbeck, A., & Brandt, H. (2011). Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI. *Theriogenology*, 75(2), 337-345. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.004>
- Watson, P.F. (1975). Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *The Veterinary Record*, 97(1), 12-15. <https://doi.org/10.1136/VR.97.1.12>
- 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. <https://doi.org/10.1071/RD9950871>
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481-492. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)

- Watson, P.F., & Fuller, B.J. (2001). Principles of cryopreservation of gametes and embryos. *Cryobanking the Genetic Resource: Wildlife Conservation for the Future* içinde (s23-46). London: Taylor & Francis.
- Wegener, J., & Bienefeld, K. (2012). Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology*, 77(3), 600-607. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.08.036>
- Wells, M.E., & Awa, O.A. (1970). New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, 53(2), 227-232. <https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302%2870%2986184-7>
- White, I.G. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(6), 639-658. <https://doi.org/10.1071/RD9930639>
- Whittingham, D.G. (1971). Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, 233(5315), 125-126. <https://doi.org/10.1038/233125A0>
- Wildt, D.E., Rall, W.F., Critser, J.K., Monfort, S.L., & Seal, U.S. (1997). Genome resource banks. *Bioscience*, 47(10), 689-698. <https://doi.org/10.2307/1313209>
- Wilmut, I. (1972). The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sciences*, 11(22), 1071-1079. <https://doi.org/10.1016/0024-3205%2872%2990215-9>
- Wilmut, I. (1973). The successful low-temperature preservation of mouse and cow embryos. *Journal of Reproduction & Infertility*, 45, 409-411. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0330352>
- Woelders, H. (1997). Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Veterinary Quarterly*, 19(3), 135-138. <https://doi.org/10.1080/01652176.1997.9694758>
- Woelders, H., Zuidberg, C. A., & Hiemstra, S.J. (2006). Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective. *Poultry Science*, 85(2), 216-222. <https://doi.org/10.1093/PS%2F85.2.216>
- Yeoman, R.R., Gerami-Naini, B., Mitalipov, S., Nusser, K.D., Widmann-Browning, A.A., & Wolf, D.P. (2001). Cryoloop vitrification yields superior survival of Rhesus monkey blastocysts. *Human Reproduction*, 16(9), 1965-1969. <https://doi.org/10.1093/HUMREP%2F16.9.1965>
- Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M., & 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. <https://doi.org/10.1016/S0093-691X%2800%2900373-3>
- Yoon, Y., Pope, J.M., & Wolfe, J. (1998). The effects of solutes on the freezing properties of and hydration forces in lipid lamellar phases. *Biophysical journal*, 74(4), 1949-65. <https://doi.org/10.1016/S0006-3495%2898%2977903-2>
- Yoshino, J., Kojima, T., Shimizu, M., & Tomizuka, T. (1993). Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification. *Cryobiology*, 30(4), 413-422. <https://doi.org/10.1006/CRYO.1993.1041>

- Youngquist, R.S., & Threlfall, W.R. (Ed.). (2007). *Current therapy in large animal theriogenology (Second Edition)*. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7216-9323-1.X5001-6>
- Yu, I., Songsasen, N., Godke, R.A., & Leibo, S.P. (2002). Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology*, 44(1), 62-78. <https://doi.org/10.1016/S0011-2240%2802%2900005-6>
- Zhang, Y.Z., Zhang, S.C., Liu, X.Z., Xu, Y.J., Hu, J.H., Xu, Y.Y., Li, J., & Chen, S.L. (2005). Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Theriogenology*, 63(3), 763-773. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.04.011>
- Zhmakin, A.I. (Ed.). (2009). *Fundamentals of cryobiology: physical phenomena and mathematical models (2009 Edition)*. Springer.
- Zhou, R., Shi, B., Chou, K.C.K., Oswald, M.D., & Haug, A. (1990). Changes in intracellular calcium of porcine sperm during in vitro incubation with seminal plasma and a capacitating medium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 172(1), 47-53. <https://doi.org/10.1016/S0006-291X%2805%2980171-8>

## 7. SİMGELER VE KISALTMALAR

100x	: 100'lük büyütme
10x	: 10'luk büyütme
40x	: 40'lık büyütme
ALH	: Spermatozoon başının lateral deplasman amplitüdü (µm)
ATP	: Adenozin trifosfat
BCF	: Çaprazlama sıklığı (beat-cross frequency) (Hz)
BSA	: Bovine serum albümin
C/OH	: Hidroksil molekülü
Ca	: Kalsiyum
CAEV	: Caprina Arthritis/Ensafilitisi
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CASA	: Bilgisayar Destekli Sperma Analiz Cihazı
CFDI / CFDA	: Carboxyfluorescein diacetate
Cl	: Klor
Cm	: Santimetre
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
COMET	: Tek hücre jel elektroforezi
CP	: Kriyoprotektan
CTC	: Chlortetracycline
Dak	: Dakika
DEX	: Dekstran
DEX2	: %4 gliserol + %2 dekstran içeren sulandırıcı
DEX4	: %2 gliserol + %4 dekstran içeren sulandırıcı
DEX6	: %6 dekstran içeren sulandırıcı
DHLA	: Dihidrolipoik Asit
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
FITC	: Fluorescein-5-isothiocyanate
FITO	: Fluorescein isothiocyanate
FTIR	: Fourier-transform infrared spektroskopisi
Fura-2	: Cell-permeable acetoxymethyl (AM) ester form of Fura-2
Gr	: Gram
H-Bağları	: Hidrojen bağları
HCO <sub>3</sub>	: Bikarbonat
HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
HES	: Hidroksietil Nişasta
HOST	: Hipoosmotik Şişme Testi
Hz	: Hertz / Frekans
IVF	: In vitro fertilizasyon
KCl	: Potasyum klorür
l	: Litre
LIN	: Doğrusallık (linearity)
MAD	: Ortalama açılma yer değiştirme (mean angular displacement) (derece)
MITO	: MitoTacker
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar

mm	: Milimetre
mOsm	: Miliosmol
Na	: Sodyum
NaHCO <sub>3</sub>	: Sodyum bikarbonat
°C	: Derece santigrat
OH	: Hidroksit
P	: Fosfor
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PEG	: Polietilen glikol
PEG2	: %4 gliserol + %2 polietilen glikol içeren grup
PEG4	: %2 gliserol + %4 polietilen glikol içeren grup
PEG6	: %6 polietilen glikol içeren grup
PEO	: Polietilen oksit
PI	: Propidium Iodide
PNA	: Peanut agglutinin
PROH	: 1,2 propanediol, propilen diol
PSA	: Pisum sativum agglutinin
PVP	: Polivinilpirolidon
PVP2	: %4 gliserol + %2 polivinilpirolidon içeren grup
PVP4	: %2 gliserol + %4 polivinilpirolidon içeren grup
PVP6	: %6 polivinilpirolidon içeren grup
RNA	: Ribo Nükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SCD	: Sperm Chromatin Dispersion
SCSA	: Sperm Chromatin Structure Assay
SMI	: Sperm Movement Index
SNP	: Single Nükleotid Polimorfizm
Spt	: Spermatozoon
STR	: Doğrusallık (straightness)
SVI	: Sperm Velocity Index
TRIS	: Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TRITC	: Thiol-reactive teenethyirhodamine-5-(-6)- isothiocyanate
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) plus dUTP
V	: Volt
VAP	: Ortalama yol hızı (average path velocity) (µm/s)
VCL	: Eğri çizgisel hız (curvilinear velocity) (µm/s)
VSL	: Doğrusal hız (rectilinear velocity) (µm/s)
WOB	: Salınım hareketi (wobble)
µl	: Mikrolitre
mm	: Mikrometre

## 8.EKLER

**EK1**

T.C.  
GIDA TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI  
Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü  
Balıkesir Bandırma Koyunculuk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : 78255852-050.01.04[050.01.04]- 014,9

25.05.2018

Konu : HADYEK Kararı

Syn. Prof. Dr. Zekeriya NUR

İlgi :11.04.2018 tarihli yazınız;

İlgi dilekçenize istinaden; Kurumumuz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından başvurunuz incelenmiş olup, inceleme sonucunda düzenlenen "Başvuru Değerlendirme Formu" yazımız ekinde sunulmuştur.

Bilgi ve gereğini rica ederim.

Ek : Başvuru Değerlendirme Formu (1 sayfa)



T.C.  
GIDA TARIM ve HAYVANCILIK BAKANLIĞI  
KOYUNCULUK ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
BAŞVURU DEĞERLENDİRME FORMU

Sayı : 1332742	
Geliş Tarihi : 11.04.2018	
Araştırma Yürütücüsü: Prof. Dr. Zekeriya NUR	
Araştırmanın Adı: Koç Spermasının Dondurulmasında Kullanılan Gliserolün Hücre İçine Girmeyen Bazı Kriyoprotektanlarla İkame Edilmesinin, Eritme Sonrası Spermatolojik Özelliklere Etkilerinin Araştırılması	
Hayvan türleri ve sayıları: Karacabey Merinosu 10 baş 2-5 yaşlı koç	
Araştırma daha önce yapılmış mı?	Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input checked="" type="checkbox"/>
Araştırma için seçilen hayvan türü uygun mu?	Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/>
Araştırma için öngörülen hayvan sayıları yeterli mi?	Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/>
Mümkün olan en az sayıda hayvan kullanımı amaçlanmış mıdır?	Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/>
Hayvanlar için optimum şartlar sağlanmış mıdır?	Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/>
Araştırmacı / ların deney hayvanı sertifikası / yetkisi var mı?	Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/>
Araştırma protokolünde hayvanlara en az ağrı ve acı verecek önlemler alınmış ve bu konudaki standartlar gözetilmiş mi?	Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/>
Araştırmada çevre ve/veya iş sağlığını tehdit edecek kimyasal, biyolojik radyoaktif maddelerin bulaşması riski var mıdır?	Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input checked="" type="checkbox"/>
Araştırma sonunda hayvanlara yapılacak işlemler konusunda gerçekçi tespitler yapılmış mıdır?	Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/>
Hayvanlara ötenazi yapılacak ise en uygun yöntem seçilmiş midir?	Evet (-) Hayır (-)
Araştırma sonunda hayvanlar ağrısız ve acısız ötenazi yapılacak ise en uygun yöntem seçilmiş midir?	Evet (-) Hayır (-)
Araştırma sonunda hayvanlar ağrısız ve acısız ötenazi edildi ise atıkların imhası için gerekli önlem alınmış mıdır?	Evet (-) Hayır (-)
Açıklamalar:	

- Tarafımızca değerlendirilen bu çalışma Koyunculuk Araştırma Enstitüsü Hayvan Deneyleri Etik Kurul Yönergesi' nde belirtilen ilkelere uygun bulunmuştur.
- Tarafımızca değerlendirilen bu çalışma Koyunculuk Araştırma Enstitüsü Hayvan Deneyleri Etik Kurul Yönergesi' nde belirtilen ilkelere uygun bulunmamıştır.
- Eksik kısımların tamamlanması uygun görülmüştür.
- Düzeltme gerekli görülmüştür.
- Ek literatür bilgisi istenmesi uygun görülmüştür.
- Araştırmacılarla görüşülme yapılmıştır.
- Reddedilmesi uygundur. (Lütfen "Açıklamalar" bölümüne yazınız)



T.C.  
GIDA, TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI  
Koyunculuk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : 78255852-903.07.02/ŞİŞ  
Konu : Proje bazlı izin muvafakati

29.11.2016

Sayın: Prof. Dr. Zekariya NUR

İlgi: 18/10/2016 tarihli ve bila sayılı yazı.

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. Zekariya NUR'dan alınan ilgi kayıtlı yazıda, "Koç spermasının dondurulmasında kullanılan gliserolün hücre içine girmeyen bazı kriyoprotektanlarla ikame edilmesinin eritme sonrası spermatolojik özelliklere etkilerinin araştırılması" adlı çalışmanın kurumumuz bünyesinde yapılması, çalışmada 2-5 yaşlı 10 baş Karacabey Merinosu koç kullanılması ve çalışma esnasında; hayvan refahı, hayvan ve halk sağlığından korunmasından sorumlu bir veteriner hekim görevlendirilmesi istenmektedir.

Bahsi geçen çalışmanın materyalini hali hazırda kurumumuzca yürütülmekte olan projenin materyali olmasından ve çalışmanın 30.11.2015 tarihinde kurumumuz enstitü araştırma komitesinde görüşülüp onay almasından dolayı, çalışmanın belirtilen sayıda hayvanla kurumumuzda yürütülmesinde sakınca bulunmamaktadır. Çalışma esnasında; hayvan refahı, hayvan ve halk sağlığından korunmasından sorumlu veteriner hekim olarak kurumumuz veteriner hekimlerinden İsmail ÇOBAN'ın görevlendirilmesi uygun görülmüştür. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

## 9.TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca hem akademik hem kişisel olarak beni her daim destekleyen ve yönlendiren, tecrübelerini esirgemeyen benim için danışmandan öte olan değerli hocam Prof. Dr. Zekariya NUR'a teşekkürü bir borç bilirim. Doktora eğitimim boyunca üzerimde emeği olan başta Prof. Dr. M. Kemal SOYLU olmak üzere tüm Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. Yürütülen çalışmalarımıza desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Burcu ÜSTÜNER hocama ayrıca teşekkür ederim. Akış sitometri cihazı için destekleri için Arş.Gör.Dr. Selin YAĞCIOĞLU'na teşekkür ederim. Bugünlere gelmemde emeği çok büyük olan annem ve babama, doktora çalışmam boyunca tüm iyi ve kötü anlarıma şahit olan / maruz kalan eşim Nagehan DAYANIKLI'ya, kızım Nazlı Arya DAYANIKLI'ya, oğlum Tuna Arden DAYANIKLI'ya varlıkları ve her şey için çok teşekkür ederim. Tez çalışmamı yürütebilmem için alt yapı ve finansman desteği sağlayan Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne teşekkürü bir borç bilirim. Doktora çalışmamı yürüttüğüm Koyunculuk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü çalışanı olan mesai arkadaşlarım ve amirlerime teşekkür ederim.

## 10.ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimini Niğde'de tamamlamıştır. 2004 yılında başladığı Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2010 yılında mezun olmuştur. 2011 yılında Koyunculuk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünde göreve başlamış olup halen burada görev yapmaktadır. 2011 Eylül ayında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başlamıştır. 2013-2014 yıllarında askerlik görevini tamamlamıştır. 2014 yılında evlenmiş olup, 2 çocuk babasıdır.