



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REPRODÜKSİYON ve SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI

VST-YL-2014-0001

**FRUKTOZ , TREHALOZ VE SÜKROZ İÇEREN TRİS
BAZLI SULANDIRICIYA KOLESTEROL YÜKLÜ
SİKLODEKSTRİN (CLC) İLAVESİNİN KOÇ SPERMASININ
DONDURULABİLİRLİK VE ÇÖZÜM SONU
SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uğur UÇAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
REPRODÜKSİYON ve SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI
VST-YL-2014-0001

FRUKTOZ , TREHALOZ VE SÜKROZ İÇEREN TRİS
BAZLI SULANDIRICIYA KOLESTEROL YÜKLÜ
SİKLODEKSTRİN (CLC) İLAVESİNİN KOÇ SPERMASININ
DONDURULABİLİRLİK VE ÇÖZÜM SONU
SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Uğur UÇAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Uğur UÇAN tarafından hazırlanan “**Fruktoz, Trehaloz ve Sükroz İçeren Tris Bazlı Sulandırıcıya Kolesterol Yüklü Siklodekstrin (CLC) İlavesinin Koç Spermasının Dondurulabilirlik ve Çözüm Sonu Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkilerinin Araştırılması**” başlıklı tez, 05/09/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

<u>Ünvanı, Adı ve Soyadı :</u>	<u>Üniversitesi :</u>	<u>İmzası:</u>
1- Prof. Dr. Melih AKSOY	Adnan Menderes Üniversitesi	
2- Prof. Dr. Hayrettin ÇETİN	Adnan Menderes Üniversitesi	
3- Prof. Dr. Ahmet CEYLAN	Adnan Menderes Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Güzel DİŞÇİGİL

Enstitü Müdürü

Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Santral: (256) 218 20 00

Telefon: (256)2144745

09010-AYDIN
Fax : (256) 2133657

ÖNSÖZ

Dünya nüfusunun hızlı artışı, dengeli bir beslenme için büyük önem taşımakta olan temel besin maddelerinden hayvansal protein ihtiyacını da arttırmaktadır. Kırmızı etin üretilmesi bağlamında ana faktörlerden birisi olan koyunculüğün etkin bir şekilde sürdürülebilmesi de gen kaynaklarının başarılı bir şekilde muhafaza edilebilmesine ve gelecek nesillere aktarılabilmesine bağlıdır. Koç spermasının dondurularak saklanması bu açıdan ayrı bir önem arz etmektedir.

Hızla artan dünya nüfusu, bilim adamlarını yaşam için gerekli kaynaklardan daha verimli yararlanma olanaklarını araştırmaya yöneltmiştir. Hayvancılık sektöründe vazgeçilmez öneme sahip olan üreme biyoteknolojisi; suni tohumlama, in-vitro fertilizasyon, gen transferi ve klonlama gibi birtakım yenilikleri kapsamaktadır. Bu teknikler arasında en eski ve yaygın olanı suni tohumlamadır. Suni tohumlama hayvan türlerinde genetik ilerlemenin sağlanabilmesi amacıyla kullanılan en basit yöntemdir. Bununla birlikte embriyo transferi ile bir dışıdan üretilebilecek yavru sınırlıyken, iyi bir damızlık erkek hayvandan elde edilen sperma ile bir yılda on binlerce dışı tohumlanabilmektedir.

Suni tohumlama çalışmalarının ekonomik olabilmesi spermanın muhafaza edilebilir ve istenilen yere götürülebilir olmasına bağlıdır. Bu da spermanın özellikle uzun süreli muhafazası ile sağlanabilir. Koç spermasının uzun süreli yani dondurularak saklanması ve çözüm sonu tohumlamalarda başarılı sonuçlar alınması henüz tam olarak gerçekleştirilemediği için konu güncelliğini korumakta ve yeni çalışmalar yapılmaya devam etmektedir.

Bu çalışmada koç spermasının uzun süreli saklanması farklı sulandırıcılar kullanılarak daha önce yapılan çalışmalara göre çözüm sonu daha iyi spermatolojik parametrelere ulaşılması amaçlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
1.1. Koç Spermalarının Saklanması	2
1.1.1.Koç Spermalarının Kısa Süreli Saklanması	2
1.1.2.Koç Spermalarının Uzun Süreli (Dondurularak) Saklanması	4
1.2.Spermaların Dondurulmasında Kullanılan Kriyoprotektif Maddeler	6
1.2.1.İnternal Kriyoprotektanlar	6
1.2.1.1.Gliserol	7
1.2.1.2.Etilen Glikol	8
1.2.1.3.Amid Türevi Kriyoprotektanlar	8
1.2.1.4. DMSO(Dimetilsülfoksit)	9
1.2.2.Eksternal Kriyoprotektanlar	9
1.2.2.1.Makromoleküller	9
1.2.2.2.Sakkaritler	10
1.2.2.2.1.Sükroz	10
	iii

1.2.2.2.2.Trehaloz	11
1.2.2.2.3.Laktoz	12
1.2.2.2.4.Rafinoz	12
1.2.2.3.Tris	12
1.2.2.4.Kolesterol	13
1.2.2.5.Süt	14
1.2.2.6.Yumurta Sarısı	14
2.GEREÇ VE YÖNTEM	15
2.1.Araştırmanın Etik Yönü	15
2.2.Hayvan Materyeli	15
2.3.Yöntem	15
2.3.1. Kolesterol'ün Siklodekstrin Molekülüne Yüklenmesi	15
2.3.2.Spermanın Alınması, Sulandırılması ve Dondurulması	16
2.3.3.Spermanın Çözülmesi ve Muayenesi	17
2.3.3.1.Motilite	17
2.3.3.2.Ölü-Canlı Spermatozoon Oranı	18
2.3.3.3.Anormal Spermatozoon Oranı	18
2.3.3.4.Spermatozoon Membran Bütünlüğünün Belirlenmesi	19
2.3.3.5.Prematüre Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatozoon Oranının Belirlenmesi	20
2.4.Bulguların Değerlendirilmesi ve İstatiksel Analiz	21
3.BULGULAR	22
3.1.Motilite Muayenesi	22
3.2.Canlı Spermatozoon Oranı	23

3.3.Anormal Spermatozoon Oranı	24
3.4. Canlı-Sağlam Plazma Membranına Sahip Spermatozoon Oranı	25
3.5. Sağlam Plazma Membranına Sahip Spermatozoon Oranı	26
3.6. Prematüre Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatozoon Oranı	27
4.TARTIŞMA	28
5.SONUÇ	33
6.ÖZET	34
7.SUMMARY	36
8.KAYNAKLAR	38
9.ÖZGEÇMİŞ	47
10.TEŞEKKÜR	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

B	Beta
BSA	Bovine Serum Albümin
CLC	Kolesterol Yüklenmiş Siklodekstrin
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DMA	Dimetilasetamid
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
TCG	Tris-Sitrik Asit-Glukoz
M	Molar

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge2.1. Çalışmada kullanılan TCG nin kompozisyonu (100 ml için)	16
Çizelge2.2. Çalışmada kullanılan sperma sulandırıcılarının kompozisyonu	17

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim2.1. Ölü Spermatozoon (A), Canlı Spermatozoon (B) görüntüleri	18
Resim2.2. Membran bütünlüğüne sahip canlı spermatozoon (A), membran bütünlüğüne sahip ölü spermatozoon (B), membran bütünlüğü bozulmuş canlı spermatozoon (C), membran bütünlüğü bozulmuş ölü spermatozoon (D)	19
Resim2.3. Sayılan tüm spermatozoonlar (A) ve aynı alanda prematüre akrozom reaksiyonuna giren spermatozoonların (B) görüntüsü	20

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Çalışma gruplarında çözüm sonu motilite oranları	22
Şekil 3.2. Çalışma gruplarında çözüm sonu canlı spermatozoon oranları	23
Şekil 3.3 Çalışma gruplarında çözüm sonu anormal spermatozoon oranları	24
Şekil3.4. Çalışma gruplarında çözüm sonu canlı-sağlam plazma membranına sahip spermatazoon oranları	25
Şekil3.5. Çalışma gruplarında çözüm sonu sağlam plazma membranına sahip spermatozoon oranları	26
Şekil 3.6. Çalışma gruplarında çözüm sonu prematüre akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranları	27

1.GİRİŞ

Spermanın saklanması temel yaklaşım spermatozoonların metabolizmasını yavaşlatmak ve hareket enerjilerini azaltarak yaşam sürelerini uzatmaktır. Yapılan araştırmalar sonucunda spermanın saklanması için iki yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan birincisi spermatozoonun ısını düşürerek veya metabolizmasını yavaşlatarak sıvı şekilde kısa süreli saklama, ikincisi ise, 0°C'den daha düşük ısılarda dondurularak uzun süreli saklama yöntemidir.

Çiftlik hayvanlarında spermanın dondurularak saklanması ve gerekli durumlarda çözdürülerek suni tohumlama için kullanılması rutin bir teknik haline gelmiştir. Bu yöntemin sığırlarda başarılı biçimde ve yüksek fertilitite oranlarıyla uygulanabilmesine rağmen koyunlarda henüz arzu edilen sonuçlara ulaşamamıştır. Bunun başlıca nedenleri arasında halen koç spermatozoonlarının dondurma-çözdürme süreci içerisinde yüksek oranda ölmesi, düşük ısıya daha duyarlı olması ve koç spermatozoon membranlarının yüksek oranda doymamış yağ asiti içermeleri sayılabilir.

Spermatozoonlarda plazma membranının bütünlüğü erkek fertilitesi açısından büyük önem taşır. Spermatozoonların kendilerini çevreleyen ortamla madde alışverişlerinin sağlanmasının yanı sıra kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon olgusunda spermatozoonların oosit yüzeyine tutunabilmesi için de yine aktif bir plazma membranına gereksinim vardır (Töpfer-Petersen ve ark 1990).

Spermanın dondurulması sırasında şekillenen membran hasarları başlıca 3 nedene bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bunlar; intra-cellular ve extra-cellular buz oluşumu (Mazur 1977, Watson 1995), ozmotik değişikliklere bağlı zararlar (Mazur 1984, Steponkus ve ark 1983) ve soğuk şokuna (Watson 2000) bağlı zararlardır. Dondurma sırasında çevre ısısının düşmesine bağlı olarak spermatozoonların plazma membranlarında yer alan lipidler fiziksel bir değişikliğe uğrayarak yumuşak ve akışkan durumlarını yitirir, daha sert ve daha az akışkan bir hale gelirler. İşte bu durum değişikliği (faz geçişi) soğuğa maruz kalan spermatozoon membranlarının akışkanlığının azalmasının temel nedenidir (Nolan ve Hammerstedt 1997). Soğutma ya da dondurma sırasında spermatozoon membranlarında ortaya çıkan hasarların bu durum değişikliği sonrasında lipidlerin yeniden başlangıçtaki

biçimde organize olamaması veya normal dağılımlarını kazanamamaları neticesi olduğu ifade edilmektedir (Buhr ve ark 1994, Holt ve North 1986). Bu nedenle, spermatozoon plazma membranında bu durum değişikliği olgusunun azaltılması veya tamamen ortadan kaldırılması dolaylı olarak soğuga bağlı ortaya çıkacak hasarların da azaltılmasına olanak sağlayabilir.

1.1. Koç Spermalarının Saklanması

Spermanın saklanmasında temel yaklaşım spermatozoonların metabolizmasını yavaşlatmak ve hareket enerjilerini azaltarak fertil ömürlerini uzatmaktır. Günümüzde diğer hayvan türlerinde olduğu gibi koçlarda da sperma kısa (likit olarak) ve uzun süreli depolanabilmektedir. Bunlardan birincisi spermatozoonun ısını düşürerek veya metabolizmasını yavaşlatarak sıvı şekilde kısa süreli saklama, diğeri ise, 0°C'den daha düşük ısılarda dondurularak yapılan uzun süreli saklama yöntemidir. Koç spermalarının uygun koşullarda depolanarak korunması yapılacak suni tohumlama çalışmalarının başarısı açısından oldukça önemlidir (Bailey ve ark 2003).

1.1.1. Koç Spermanın Kısa Süreli Saklanması

Düşük derecelerde (0-5 °C ya da 10-15 °C) ve oda sıcaklığında sıvı içerisinde geri dönüşümlü spermanın inaktive edilmesi sperma depolamanın ana metotlarıdır. Spermatozoonlar depolanırken soğuk şokuna maruz bırakılmamasına dikkat edilmelidir. 0°C'ye yakın sıcaklıklara soğutulması spermada geri dönüşümsüz bozukluklara yol açabilir. Soğuk şokunun spermatozoonlar üzerine zararlı etkileri 1931'de bulunmuştur. Spermatozoonun soğuk şokundan korunması amacıyla çeşitli sulandırıcılardan yararlanılmaktadır (Salamon ve Maxwell 2000). Koç spermalarının kısa süreli depolanmasında süt, sodyum sitrat sulandırıcılarına yumurta sarısı eklenerek hazırlanan sulandırıcılar yaygın olarak kullanılmaktadır (Holt 2000). Taze sperma ile karşılaştırıldığında soğutulmuş spermada, motilite ve morfolojik bütünlük zarar görmekte, baş, orta kısım ve kuyruk kısmında bazı hasarlar meydana gelmekte, spermatozoonun dişi üreme organındaki yaşam süresi ve gücü azalmaktadır. Bunlara ek olarak fertilitite düşmekte ve embryonik kayıplarda bir artış olduğu gözlemlenmektedir.

Koç spermasının depolanmasında yağsız süt, sitrat ve tris bazlı sulandırıcılar yaygın olarak kullanılmıştır (Salamon ve Maxwell 1995, Salamon ve Maxwell 2000). Sitrat-glikoz-yumurta sarısı, yumurta sarısı-müsinaz ve sitrat-borik asit-yumurta sarısı gibi diğer sulandırıcılar da geliştirilmiştir (Maxwell ve Salamon 1993).

Spermanın sulandırılması sadece depolanması bakımından değil aynı zamanda spermanın yoğunluğunu azaltarak daha fazla tohumlama dozlarına kolayca bölünmesi bakımından da yararlıdır (Özkoca 1984, Hafez 1987). Koç spermasının depolanmasında kullanılmak üzere birçok sulandırıcı tipi üzerine çalışılmış ve birçok araştırmacı bu sulandırıcıların spermatozoon motilitesi ve fertilitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Ancak yapılan bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar geniş bir varyasyon göstermektedir (Smith ve ark 1993, Lopez-Saez ve ark 2000). Spermanın depolanmasında kullanılacak sulandırıcılarda aranan özellikler arasında; spermatozoanın yaşaması için gerekli olan sentetik kimyasal maddeler arasında bir denge olmalı, enfeksiyon etkenleri taşınamalı, spermatozoanın metabolizma artıklarından meydana gelen toksik etkileri önleyecek kimyasal maddeler içermeli, kullanılan maddeler ucuz ve her zaman bulunabilir olmalı, hayvan türlerindeki kanın osmotik basıncına uygun olmalı, soğuk koşullara karşı spermatozoayı koruyabilmeli ve spermatozoon için bir besi ortamı oluşturması sayılabilir (Yurdaydın 1990).

Spermanın saklanması bakteriyel kontaminasyon özellikle 10-15 °C'lerde ortaya çıkmıştır ve antibiyotik uygulanarak önüne geçilmeye çalışılmıştır. Koç spermasında sadece fruktoz bulunmasına rağmen, sulandırıcılarda bulunan glikoz ve mannozu metabolize edebilir (White ve ark 1954). Diğer şekerler enerji kaynağı olarak kullanılmazlar fakat koç spermasının motilitesini koruma yeteneğine sahiptirler. Önceki çalışmalar da yumurta sarısı-sitrat ya da fosfat sulandırıcılarına glikoz ya da fruktoz katılması tercih edilmiştir (Salamon ve Robinson 1962).

37°C'de tutulan spermaya laktoz eklenmesinin spermatozoon motilitesini arttırdığı (Choong ve Wales 1962, Wales ve Choong 1963, Martin 1966) ve elektrolit solusyonuna fruktoz, glikoz, laktoz ya da sükroz gibi şekerler eklenince spermatozoonların 5 °C'de yaşama oranları daha fazla olmuştur (Martin 1966).

Toplanan spermaların kalitesini düşürmeden, dondurmadan önce 48 saat saklanabilmektedir. Bu teknikle ticari damızlık birimlerine yakın olmayan yörelerdeki çiftliklerde üreticilerin sperma örnekleri saklaması mümkündür (Purdy 2006).

1.1.2. Koç Spermanın Uzun Süreli (Dondurularak) Saklanması

Spermatozoonlar dondurularak uzun yıllar saklanabilir ve istenildiğinde çözülerek tekrar kullanılabilir. Spermanın dondurularak saklanmasına kriyoprezervasyon denir (Trounson 1990). Bu tekniğin dayandığı temel ilke spermanın çeşitli yöntemler kullanılarak -79 °C ile -196 °C'ye kadar sıcaklığının düşürülmesi ve bu sıcaklıklarda spermatozoonların zarar görmesini engelleyecek bir ortamda depolanmasıdır (Holt 2000, Salamon ve Maxwell 1995).

Bilimsel ve modern anlamda hücre dondurma çalışmaları, 1949 yılında Polge ve arkadaşlarının gliserolün kriyoprotektan (soğuk şokuna karşı koruma sağlayıcı) özelliğini bulmasından sonra başlamış, ilk dondurulan hücre spermatozoon olmuştur. Bu anlamda, kriyobiyojji hücre, doku, organ ve organizmaların dondurulmasını inceleyen bilim dalı olarak önemini artırmış ve dondurulan-çözdürülen hücrenin fizyolojik-fonksiyonel özelliklerinin daha iyi anlaşılması, kriyobiyojjiyi yönlendirmiştir (Leibo ve Brandley 1999, Polge ve ark 1949).

Spermatozoanın yapay koşullarda uzun süre depolanması ve fertil ömrünün uzatılması; spermatozoanın metabolizma hızının azaltılarak uygun sulandırıcılar içinde hareketlerinin sınırlandırılması ile mümkündür. Bu nedenle çeşitli araştırmacılar tarafından dondurma oranı, çözme ısısı, sulandırıcı bileşimi ve gliserol konsantrasyonlarının koç sperması üzerine etkileri araştırılmıştır (Abdelhakeam ve ark 1991, Öztürkler ve ark 1999, Pontbriand ve ark 1989). Koç spermatozoonları dondurma sırasında oluşan ekstrem ısı değişikliklerine karşı oldukça duyarlıdır (Salamon ve Maxwell 1995). Çözüm sonrası motilitenin donmuş-çözünmüş spermanın kalitesini belirlemede değerli bir parametre olduğu bildirilmiştir (Watson 1995, Watson 1996). Koç spermasının kalitesi genellikle sulandırıcı çeşidi, kendi morfolojik yapısı ve kriyoprotektif ajanların konsantrasyonlarından etkilenmektedir (Aisen ve ark 2000, El-Alamy ve Foote 2001, Fiser ve ark 1986). Dondurma işleminin koç spermasının erken kapasitesini uyardığı

belirlenmiştir (Aisen ve ark 2000). Dondurma ısısının çözüm sonrasında spermatozoon motilitesi üzerine çok önemli etkisinin olduğu bildirilmiştir (Bag ve ark 2002).

Koç spermasının dondurmaya karşı duyarlı olmasının temel nedeni spermatozoa membranının önemli bir kısmını doymamış yağ asitlerinin (fosfolipitler) oluşturmasıdır. Buna bağlı olarak spermatozoanın dondurulması sırasında yapılan soğutma işlemleri spermatozoa membranının geriye dönüşümü olmayan sıvı fazdan jel fazına geçmesine neden olmakta ve membran içi enzimlerin kinetiğinde değişimlere yol açarak çözüm sonu canlılığın azalmasına sebebiyet verdiği öne sürülmektedir (Watson 1995).

Spermatozoonlarda dondurmaya bağlı olarak meydana gelen hasarlar fiziksel, biyokimyasal veya fonksiyonel olabilmektedir. Fiziksel hasarlar, plazma ve akrozom membranlarında veya mitokondrial kılıfta yani spermatozoonun orta kısmında meydana gelmektedir. Koç spermatozoonlarında daha çok fiziksel hasarlara rastlanılmaktadır (Bailey ve ark 2000, Salamon ve Maxwell 2000). Plazma ve akrozom membranları, nukleus (çekirdek) ve lokomotor bölüm denilen orta kısma göre daha hassastırlar. Akrozomun dış membranı içteki membrana göre daha kolay hasar görmektedir (Salamon ve Maxwell 2000).

Koç spermasının çok düşük sıcaklıklarda dondurulup depolanması ile ilgili yapılan çalışmaların bazılarında başarı elde edilmiş bazılarında ise başarı sağlanamamıştır. Ancak gerçekleşen başarısızlıkları depolama süresi ile ilişkilendirmemek gerekmektedir. Çünkü uzun yıllar boyunca saklanan spermalardan bile yaklaşık %60 düzeyinde gebelik sağlanması mümkün olmuştur (Salamon ve Maxwell 1995, Salamon ve Maxwell 2000).

Koç spermasının dondurulma başarısı üzerine aşım mevsimine geçiş döneminin ve aşım mevsimin önemli etkisinin olduğu bildirilmiştir. Koçlarda mevsimsel değişikliklerin sperma parametreleri üzerine etkili olduğu ve dolayısıyla seminal plazmadaki spesifik proteinlerin yokluğunun ve toplam protein konsantrasyonlarındaki azalmanın donmuş spermadaki düşük motilite ile bağlantılı olabileceği bildirilmiştir (Smith ve ark 1993). Koçlarda çözüm sonrası akrozomal bütünlük ile motilite arasında pozitif bir ilişki olduğu ve hem aşım mevsiminde hem de aşım mevsimine geçiş dönemlerinde motilite ile akrozomal bozukluk oranı arasında negatif korelasyon bulunduğu ifade edilmiştir (Salamon ve Maxwell 1995, Salamon ve Maxwell 2000). Buna ek olarak, yapılan

çalışmalarda sezon içinde alınan koç ejakülatlarının dondurulabilme başarısının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Fiser ve ark 1986, Öztürkler ve ark 1999).

Dondurulmuş-çözdürülmüş koç spermasından elde edilen düşük fertilitite oranları, araştırmacıları bu konuda çalışmaya yönlendirmiş ve farklı sulandırıcı formülasyonları, sulandırıcıya çeşitli hormon, vitamin, şeker, antioksidan maddelerin ilave edilmesine yöneltmiştir (Gökçen ve ark 1985, Chen ve ark 1993). Sulandırıcıya katılan çeşitli kriyoprotektif maddeler ise beklenenin aksine dondurulmuş çözdürülmüş spermanın fertilititesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Gliserol gibi kriyoprotektanların oranının azaltılabilmesinin sulandırıcı içerisine katılacak antioksidanlara bağlı olduğu öne sürülmektedir (Purdy 2006b, Bucak ve ark 2007).

1.2. Spermanın Dondurulmasında Kullanılan Kriyoprotektif Maddeler

Spermanın dondurulmasında kullanılan sulandırıcıda kriyoprotektif özellikli maddelerin bulunması esastır. Biyolojik dokuları ve hücreleri dondurmanın zararlı etkilerinden koruyan maddeler kriyoprotektan olarak adlandırılır. Kriyoprotektanlar hücrenin soğutulması ve dondurulması esnasında gelişen fiziksel, kimyasal ve oksidatif stres hasarlarını azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. İnternal özellikli kriyoprotektanların yanısıra, bazı eksternal kriyoprotektanların (sakkaritler, antioksidanlar, EDTA) hücre dışında kriyoprotektif etki gösterdikleri son zamanlarda anlaşılmış, sperma sulandırıcılarında kullanılmaya başlanmıştır (Bucak ve Tekin 2008).

1.2.1.İnternal Kriyoprotektanlar

Permeabl özelliğe sahip kriyoprotektan olarak gliserol, etilen glikol, formamide, dimetilsülfoksit (DMSO) bu gruba örnek olarak sayılabilir. Bu tür kriyoprotektanlar etkilerini, hücre zarından içeriye girerek ve ‘kolligatif’ olarak göstermektedir. Koruyucu etkileri donma esnasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltmaları, dehidrasyonu düzenleyip protein yapılarını korumaları ve düşük sıcaklıkların yarattığı ozmotik büzüşmeyi azaltmaları ile oluşmaktadır (Leibo ve Brandley 1999, Holt 2000, Leeuw FED ve ark 1993, Mcgann LE 1978).

1.2.1.1. Gliserol

Gliserol yüksek oranda hidrofilik yapı gösteren bir poliol bileşigidir. Kimyasal yapısındaki C/OH oranının eşit olması onun spermatozoon üzerine olan etkisini arttırmaktadır. Gliserol spermatozoon membran lipitleriyle etkileşime girerek, kimyasal ve fiziksel streslere karşı membranları stabilize eder. Gliserolün koruma mekanizması ile ilgili bazı görüşler şöyledir (Katkov ve ark 1998):

- Membranlara önemli ölçüde hidrostatik basınç uygulayarak koruma sağlar,
- Elektroporasyon ile membranlarda oluşan hasara karşı koyar,
- Plazma membranına esneklik sağlayarak ozmotik strese karşı koyma yeteneğini artırır,
- Membranları stabilize eder,
- Membran füzyonunu indükler,
- Sulandırıcıda %6 oranında gliserolün varlığı, membran Lp değerini düşürür ve membranlardaki sıvı ve kriyoprotektan giriş çıkışını dengeye getirerek, plazma membranında strese yol açacak ani hacim değişimlerini önler,
- Sulandırıcıdaki şeker bileşiklerinin membranlardaki polar baş yapılarıyla etkileşime girmesi, kendisinin daha yavaş salınımına yol açarak membran stabilizasyonunu oluşturur.

Sperma kriyoprezervasyonundaki yararlı etkilerine rağmen gliserol, spermatozoonun membran yapısını değiştirmekte, bağlayıcı protein ve glikoproteinleri etkilemektedir. Ayrıca gliserol spermatozoonların enerji ihtiyaçlarını arttırmaktadır (Alvarenga ve ark 2000, Hammerstedt ve ark 1990).

Gliserolün toksisitesi, metabolik dönüşümünden oluşan methlglycosal tarafından oluşturulur. Gliserolün toksik etkisi türe bağımlılık göstermekte; aygır, tavşan, kanatlı ve balık spermaları için fertilizasyonu engelleyici bir etki göstermektedir. Hücrelerde gliserolün toksik etkisi, membran biyoenerji dengesinde değişikliğe ve ozmotik strese yol açmasıyla kendini göstermektedir (Alvarenga ve ark 2000, Katkov ve ark 1998, Woods ve ark 2000).

Gliserol iyonlar için membran geçirgenliğini artırır ve iyon kanallarının ATP tüketimi artar. Spermatozoaya karşı ozmotik hasarı artırır ancak bu etkisi türe bağlıdır. Örneğin teke sperması bu ozmotik basıncı tolere edebilir (Farshad ve Akhondzadeh 2008). Ruminant ve primat spermasının dondurulmasında gliserol kullanılma oranı %4-8, aygırlarda ise %4-5'dir. Domuzda gliserol oranı %3'ü, farede ise %1,75'i geçtiğinde şiddetli akrozomal yıkımın olduğu bildirilmiştir (Katkov ve ark 1998, Holt 2000, Morrell ve Hodge 1998).

Gliserolün sperma üzerine zararlı etkisi en çok ozmotik etki ile ilgilidir. Gliserol ilavesinden sonra, intraselüler suyun dışarı çıkmasına bağlı olarak hücre hızla küçülmektedir, daha sonra da daha yavaş bir şekilde orijinal hacmine dönmekte ve gliserol spermatozoona penetre olmaktadır (Hammerstedt ve ark 1990). Ayrıca gliserolün dişi genital kanalında irritasyona yol açarak fertilitiyi azalttığı da bildirilmektedir (Abdelhakeam ve ark 1991).

1.2.1.2.Etilen Glikol

Birçok türün spermasında donma-çözdürme esnasında oluşan zarara karşı etilen glikol, gliserole eşit oranda etki sağlamaktadır. Etilen glikol at embriyosunun dondurulmasında %6, spermasının dondurulmasında 2 M oranında kullanıldığında gliserole göre daha az toksik etki gösterir. Sığır embriyolarının dondurulmasında ise toksik etkisi oluşmamaktadır (Alvarenga ve ark 2000, Alvarenga ve ark 2005, Ball ve Vo 2001).

1.2.1.3.Amid Türevi Kriyoprotektanlar

Amid türevi kriyoprotektanlar (formamid, dimetilasetamid vb.) özellikle aygır spermasının dondurulmasında gliserole göre daha iyi koruma sağlamakta ve daha az toksik etki göstermektedir. Sulandırıcılara %3,5-5 oranında katılması, donma zararına karşı etkili olmakta, çözüm sonu parametrelerde iyileşme sağlamaktadır. Amidler, gliserole duyarlı türlerin (tavşan, alabalık, kanatlı) spermalarının dondurulmasında alternatif olarak gözükmemektedir (Alvarenga ve ark 2005, Gomes ve ark 2002).

1.2.1.4.DMSO (Dimetilsülfoksit)

DMSO, kimyasal olarak bir polar kök etrafında iki apolar baştan oluşan amfipatik bir bileşiktir. Bu özellik ona hem sıvı hem de organik medyumlarda çözünme imkanı sağlamaktadır. Kanatlı sperması için en toksik kriyoprotektanın DMSO olduğu, en az toksik etkiyi ise gliserol ile DMA'nın (dimetilasetamid) verdiği bildirilmiştir (Chalah ve ark 1999, Donoghue ve Wishart 2000) .

Tavşan ve alabalık spermasında çözüm sonu en yüksek motilite oranı, sulandırıcıya %10-15 oranında katılan DMSO'ten alınmıştır (Tekin ve ark 2003, Vicente ve Viudes-De-Castro 1996).

1.2.2.Eksternal Kriyoprotektanlar

Eksternal kriyoprotektanlar (hücreye penetrasyon özelliğine sahip olmayanlar) ekstrasellüler etkilerinden dolayı, hücre membranındaki esnekliğin kaybını önledikleri, membran proteinlerinde stabilizasyon sağladıkları ve ekstrasellüler ortamda gelişen kristalizasyonu azalttıkları bilinmektedir (McWilliams ve ark 1995, Cabria ve ark 2001).

Eksternal kriyoprotektanlar, membranların sıvı ve katyonlara karşı permeabilitesinde artış yaparak, ozmotik strese karşı hücre membranlarını esnek hale getirir. Ayrıca, hücrede donma-çözünme esnasında gelişen lipit peroksidasyonunu azaltmaya çalışırlar. Sulandırıcıya düşük oranda permeabl eksternal kriyoprotektan ilavesi internal kriyoprotektanların olası toksik etkilerini azaltmaktadır (Arav ve ark 1993, McWilliams ve ark 1995, Cabria ve ark 2001, Purdy 2006). Eksternal kriyoprotektanlar, makromoleküller ve sakkaritler olarak ikiye ayrılır.

1.2.2.1. Makromoleküller

Makromoleküllerinden en çok kullanılanları polietilen glikol, ficoll 70, BSA, dekstran, mannitol ve polivilinilprolidon'dür. BSA (bovine serum albumin)'nin lipit peroksidasyon inhibitörü olduğu düşünülmektedir (Cabria ve ark 2001, Kasai 1996, McGann 1978).

1.2.2.2. Sakkaritler

Monosakkaritler olarak, glukoz ve galaktoz; disakkarit olarak, sükroz, trehaloz; trisakkarit olarak da raffinoz, melezitoz sayılabilir. Sakkaritler, ölümcül etkili hücre içi kristal oluşumunu engellemek için hücrede dehidrasyon oluştururlar. Şekerler donma ve çözüm esnasında oluşan membran zararına karşı, membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girip yüzey artışı oluşturarak koruma sağlamakta ve çözüm işlemi sırasında da hücrelerin ozmotik şoka girmesini önlemektedir (McWilliams ve ark 1995, McGann 1978). Disakkaritler membran yapılarını stabilize etmelerine rağmen, monosakkaritlerin böyle etkisi ya bulunmamakta ya da çok zayıf olarak bulunmaktadır. Fakat monosakkaritlerin hücreye hızla penetre olarak, dehidrasyonu engelledikleri olasıdır. Fare ve insan oositlerinde yapılan bir çalışmada monosakkaritlerin disakkaritlere göre daha etkili ozmotik tamponlayıcı olarak görev yaptığı bildirilmektedir. Disakkaritlerden ise en çok sükroz ve trehaloz bu amaçlar için kullanılmaktadır (An ve ark 2000, McWilliams ve ark 1995, Palasz ve Mapletopt 1996, Woelders ve ark 1997).

Şekerler donma ve çözüm esnasında oluşan hasardan membran yapılarını, membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girip, yüzey artışı sağlayarak, fosfolipitlerde meydana gelen ısı değişimlerini azaltarak ve fosfolipit acyl zincirleri arasındaki Van Der Waal's bağ etkileşimlerini azaltarak korurlar. Ayrıca hücreyle ortam arasında ozmotik tamponlayıcı olarak görev yaparak soğuk şokuna karşı koruma sağlamaktadır. Ortamda Ca^{+2} iyonlarının bulunması şekerlerin koruyucu etkisini attırmaktadır (Bakas ve Disalvo 1991, Leeuw ve ark 1993).

Şekerlerin koruyucu etkilerini molar ya da kitle konsantrasyonlarına göre gösterip göstermedikleri tartışma konusudur. Molar etkinin, ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltarak ya da ortamdaki donmamış kanalların genişlemesini sağlayarak gösterdiği belirtilmektedir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada şekerlerin kitlesel yoğunluğunun molar miktarlarına göre daha da etkinlik gösterdiği saptanmıştır (Koshimoto ve Mazur 2002).

1.2.2.2.1.Sükroz

Bir disakkarit olan sükroz (sakkaroz), bir mol glukoz ve bir mol fruktozun birleşmesi ile oluşur. Bu iki monosakkaritin aldehit ve keton gruplarının birleşmesinden

oluştduğundan, serbest aldehit ve keton grubu ihtiva etmez, indirgeyici özelliği yoktur, ancak hidrolize edilebilir. Sükrozun dondurma sırasında boğa sperması membran bütünlüğünü koruduğunu bildirilmiştir. Sükroz hidrojen bağlarını fosfat grupları ya da membran fosfolipitleri ile düzenleyerek hücre zarını sağlamlaştırmakta ve böylelikle spermatazoonun dondurma ve çözündürme sırasında uğradığı şişme-küçülme gibi değişikliklere karşı ek bir koruma sağlayabilmektedir (Liu ve Foote 1998).

Embriyo dondurma medyumuna sükroz 0,25-0,5 M katılır (Mazur 1990). Boğa sperma sulandırıcısına 0,05 M sükroz ilavesi koruyucu etki yapmaktadır (Chen ve ark 1993). Tavşanlarda ise sperma sulandırıcısına katılan 0,1 M sükroz ve 1,75 M DMSO çözüm sonu motilitesi ve akrozom bütünlüğünde en iyi oranı vermiştir (Vicente ve ark 1996).

Sükroz, spermatozoanın akrozom bütünlüğünü glikoz, fruktoz ve laktozdan daha iyi koruduğu için sentetik sulandırıcılarda temel bileşen olarak kullanılır. Sükroz özellikle doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu önler (Salamon ve Maxwell 2000).

Peroksidasyon anaerobik koşullarda, antioksidan ve şelat yapıcı maddelerin de (örneğin:EDTA) sulandırıcıya eklenmesiyle engellenebilir. Çözdürülen spermada peroksidasyon derecesi, bir peroksidasyon ürünü olan malondialdehit ölçülerek belirlenir ve çözündürme sırasında sıcaklığın artması ile peroksidasyon hızlanır (Salamon ve Maxwell 2000).

Dondurma sırasında anaerobik koşulların sağlanması teknik olarak zordur. Bu nedenle dikkatler antioksidan kullanımına örneğin: doğal ve sentetik tokoferole çevrilmiştir. Tokoferol sakkaroz içeren sulandırıcılara eklendiğinde çok etkili bulunmuştur (Salamon ve Maxwell 2000).

1.2.2.2.2.Trehaloz

Eksternal kriyoprotektan olarak görev yapan sakkaritlerden trehaloz, iki D-glikoz molekülünün bağlanmasıyla oluşmuş bir disakkarit bileşimidir (Richards ve ark 2002). Tam olarak etki mekanizması bilinmemekle birlikte, spermatozoa plazma membranına penetre olduğu, donma ve çözüm esnasında membran fosfolipitlerinin polar baş gruplarıyla hidrojen bağları kurarak yüzey artışı sağladığı ve ozmotik tamponlayıcı göreviyle ozmotik

şoka karşı koruyucu etkinlik gösterdiği, serbest oksijen radikallerinin salınımını azalttığı ileri sürülmektedir (Aboagla ve Terada 2003, Aisen ve ark 2002, McWilliams ve ark 1995, Purdy 2006). Son yıllarda trehaloz memeli spermasının dondurulmasında sulandırıcıya katılmaya başlanmış, çözüm sonrası spermatolojik parametreler (motilite, akrozom ve membran bütünlüğü) ve antioksidan kapasitenin artırılması ve lipit peroksidasyonunun azaltılması üzerinde önemli etkinlik sağladığı bildirilmiştir (Aboagla ve Terada 2003, Aisen ve ark 2000, Aisen ve ark 2002, Bucak ve ark 2007, Purdy 2006).

1.2.2.2.3.Laktoz

Dondurma işlemi süresince kristalizasyon sıcaklığını düşürmede disakkaritler (laktoz, sakkaroz) monosakkaritlerden çok daha etkili olmuşlardır. Bu etkileri sulandırıcıya EDTA-Na² ve dietilamin ilavesiyle artar. Akasya ağaçlarından sentezlenen, yüksek moleküler ağırlıklı, suda çözünebilen bir kompleks polisakkarit olan arap zamkı sulandırıcıya %1.5-15 oranında eklendiğinde spermatozoonlar tarafından tolere edilebilir ve ekstrasellüler kriyoprotektif etki gösterir.

1.2.2.2.4.Rafinoz

Rafinoz gibi yüksek moleküler ağırlıklı şekerler, hızlı dondurma sırasında spermatozoa için düşük molekül ağırlıklı şekerlere göre daha iyi bir koruma sağlarlar. Hücrenin lipid-protein kompleksinin stabilizasyonunu sağlamada şekerler verimliliklerine göre şu şekilde sıralanabilirler: rafinoz, sakkaroz, laktoz, fruktoz, glikoz (Salamon ve Maxwell 2000).

1.2.2.3. Tris

Tris payet dondurma için temel sulandırıcı bileşeni olarak kullanılır. Glikoz tris ile birlikte kullanılan; fruktoz, laktoz ve rafinozdan daha uygun bir şekerdir. Osmolaritesi 375 mOsm/kg olan, %2 yumurta sarısı içeren trisin akrozomal bütünlüğü ve çözündürme sonrası motiliteyi en iyi sağlayan bileşen olduğu belirtilmiştir. 30-290 mM şekerlerin (mono veya

disakkarit) 100-300 mM tris kombinasyonunda çözdürme sonrası motiliteye ve fertiliteye etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Ancak glikozdan ziyade laktoz, sükröz veya süt ile kombine edilmesinin daha iyi sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Salamon ve Maxwell 2000).

1.2.2.4. Kolesterol

Kolesterol gerek spermatozoonlar ve gerekse de somatik hücrelerde plazma membranının temel yapısını oluşturan önemli bir unsurdur. Kolesterolün plazma membranının akıcılığını ya da yumuşaklığını değiştirebildiği çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Landbrooke ve ark 1968, White 1993). Çevresel bazı faktörlere ve ısıya bağlı olarak kolesterol plazma membranının akıcılığını ve kıvamını arttırabilir ya da azaltabilir. Yüksek çevresel ısılarda hücre içerisindeki kolesterol düzeyinin arttırılması membran akışkanlığının azalmasına ve sertleşmeye neden olur (Holt ve North 1986, Rottem ve ark 1973). Bunun tersine, düşük ısılara maruz bırakılan hücrelerde kolesterol düzeyinin yükseltilmesi “faz geçişi” olgusunun şekilleneceği sıcaklık aralığını genişletir. Böylece, spermatozoon kolesterol düzeyinin yükselmesi plazma membranının daha düşük derecelerde bile yumuşak kalmasını ve daha akıcı olmasını sağlayarak soğuk şokunun olumsuz etkilerine karşı daha dirençli olmasına yardımcı olabilir (Landbrooke ve ark 1968, Rottem ve ark 1973).

Methyl- β -cyclodextrin siklik bir oligosakkarit molekülüdür ve 7 β glucopyranose ünitesi içerir. Kolesterol gibi hidrofobik, non-polar moleküllerin suda eriyebilir hale gelmesini sağlar (Pinta ve ark 1988). Methyl- β -cyclodextrin’in çeşitli hücre tiplerinde ve spermatozoonlarda membran kolesterol düzeyini düşürerek hücre dışı bir kolesterol süngeri gibi çalıştığı gösterilmiştir (Ilangumaran ve Hoessli 1998, Christian ve ark 1997).

Son yıllarda, kolesterol yüklenmiş methyl- β -cyclodextrin molekülü (CLC) aygır (Zahn ve ark 2002) ve sığır (Purdy ve Graham 2004a) spermatozoon membranlarına kolesterol taşınmasında bir taşıyıcı molekül olarak kullanılmıştır. CLC molekülü ile muamele edilen sığır spermatozoonlarının kolesterol düzeylerindeki artış ve buna bağlı olarak da daha yüksek oranda çözüm sonu canlılık oranları bildirilmiştir (Purdy ve Garaham 2004a, Purdy ve Garaham 2004b).

1.2.2.5.Süt

Süt sulandırılmış formda arabinoz, fruktoz veya yumurta sarısıyla kombine edilerek sperma dondurulmasında kullanılır. Yapılan çeşitli çalışmalarda sitrat-yumurta sarısı, glikoz-yumurta sarısı, sitrat-glikoz-yumurta sarısı kombinasyonları ile pastörize veya yağsız sütün etkinlik değerinin eşit olduğu görülmüştür. Bazı araştırmacılar çözündürme sonrasında sulandırılmış yağsız sütün sperm hücrelerinin yaşama kabiliyeti üzerine sitrat-yumurta sarısı, fruktoz ve laktoz tabanlı sulandırıcılardan daha olumlu etkisi olduğunu belirtmişlerdir (Salamon ve Maxwell 2000).

1.2.2.6.Yumurta Sarısı

Sperma sulandırıcılarında yaygın olarak kullanılır. Sperm hücrelerini soğuk şokuna karşı dondurma ve çözündürme sırasında korur. Çok geniş aralıklarda konsantrasyonları sperma dondurmak için çalışılmıştır. Koruyucu etkisi aynı zamanda sulandırıcının bileşimine de bağlıdır. Yumurta sarısı özellikle plazma membranı üzerine olan koruyucu etkisi nedeniyle günümüzde hala yaygın olarak kullanılan önemli bir maddedir (Salamon ve Maxwell 2000)

Bu çalışma koç spermasının dondurulması sırasında ortaya çıkan ve tohumlamalardan sonra gebelik oranlarının önemli oranda düşmesine yol açan spermatozoon membran hasarlarının minimize edilmesi amacıyla kolesterol yüklenmiş siklodekstrin ile kombine edilen fruktoz, trehaloz veya sükrozun koruyucu etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Araştırmanın Etik Yönü

Çalışmaya başlamadan önce Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik kurulundan 20/06/2012 tarih ve 2012/025 sayılı etik kurul onayı alınmıştır.

2.2.Hayvan Materyali

Bu çalışmada sperma vericisi olarak fertilitesi bilinen ve genital organ muayenesi sonucunda herhangi bir patolojiye rastlanmayan toplam 5 baş Kıvırcık ırkı koç kullanıldı. Araştırma sırasında kullanılan koçların bakımı, besleme ve barındırılması Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi bünyesinde yer alan küçükbaş hayvan padoklarında standart yetiştirme koşullarında yapıldı. Analizler Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi.

2.3. Yöntem

2.3.1.Kolesterol'ün Siklodekstrin Molekülüne Yüklenmesi

Kolesterol bağlanmış siklodekstrin (CLC)'in hazırlanmasında daha önce Purdy ve Graham (2004) tarafından tanımlanan yöntemlerden yararlandı. Farklı olarak, hazırlanan CLC solüsyonu son olarak sonike edilerek kolesterol'ün tamamen erimesi sağlandı. Kısaca, 1g methyl-β-cyclodextrin 2 ml methanol içerisinde çözülüp, ayrı bir tüpte de 200 mg kolesterol 1 ml chloroform içerisinde çözülerek kolesterol solüsyonu hazırlandı. Bu iki solüsyon (0.45ml kolesterol solüsyonu + 2 ml methyl-β-cyclodextrin solüsyonu) karıştırılıp, azot gazı akımına maruz bırakılarak solventlerin uçması sağlandı ve böylece CLC tozu sentezlendi. Bu toz tris buffer içerisinde eritilerek 50 mg/ml lik stok solüsyon hazırlandı ve son olarak da 3mg/ml bovine serum albumin ilave edildi.

2.3.2. Spermanın Alınması, Sulandırılması ve Dondurulması

Sperma elektro-ejakulatör yöntemiyle alınıp sperma örnekleri motilite ve anormal spermatozoon oranları yönünden muayene edildi. Motilite oranı %70 ve üzerinde, anormal spermatozoon oranları ise %20'nin altında olan ejakülatlar dondurma işleminde kullanılmak üzere sperma toplama kadehinden alınarak önceden 37°C'lik su banyosunda bekletilerek ısıtılmış kuru bir deney tüpüne aktarıldı. Toplanan ejakülatlarda spermatozoon yoğunlukları hemositometrik yöntemle belirlendi, ejakülatlar biri CLC ilave edilmeyen diğeri de CLC ilave edilen grup olmak üzere 2 eşit kısma ayrıldı. Daha sonra CLC grubuna 120×10^6 spermatozoon için 3mg dozunda CLC ilave edildi, ilave edilen CLC hacmine eşit miktarda CLC ilave edilmeyen gruba da TCG solüsyonu ilave edildi (Çizelge2.1). Her iki grupta 35°C de 15 dk süresince su banyosunda inkübe edildi.

Çizelge2.1. Çalışmada kullanılan TCG nin kompozisyonu (100 ml için)

Tris	3.63 g
Sitrik asit	1.99 g
Glukoz	0.5 g

TCG sulandırıcısı spermanın alınmasından bir gün önce hazırlanıp, +4°C de buzdolabında ağzı parafilm ile sıkıca kapatılarak muhafaza edildi (Evans ve Maxwell, 1987).

İnkübasyon sonunda CLC ilave edilen ve edilmeyen grupların her birisi 3 alt gruba ayrıldı. Bu alt gruplar fruktoz, sükroz veya trehaloz solüsyonlarıyla her payette 50×10^6 spermatozoon olmak üzere ayrı ayrı sulandırıldı (Çizelge 2.2).

Çizelge2.2. Çalışmada kullanılan sperma sulandırıcılarının kompozisyonu

Fruktozlu Sulandırıcı	Sükrozlu Sulandırıcı	Trehalozlu Sulandırıcı
Fruktoz (28mM)	Sükroz (28mM)	Trehaloz (28mM)
Tris (300mM)	Tris (300mM)	Tris (300mM)
Sitrik Asit (95mM)	Sitrik Asit (95mM)	Sitrik Asit (95mM)
Yumurta Sarısı (% 14)	Yumurta Sarısı (% 14)	Yumurta Sarısı (% 14)
Gliserol (%5)	Gliserol (%5)	Gliserol (%5)
Penisilin 20000 IU	Penisilin 20000 IU	Penisilin 20000 IU
Streptomisin 20mg	Streptomisin 20mg	Streptomisin 20mg

Grupların sulandırma işlemlerinden sonra, sperma örnekleri 0.25 ml lik payetlere çekildi. Payetler ekulibrasyon işlemi için 4°C de 2 saat boyunca beklemeye bırakıldı. Ekulibrasyon işleminden sonra payetler 7 dakika süre ile sıvı azot buharının üzerine (5 cm üzerinde olacak şekilde) yatay bir şekilde dizildi. Süre bitiminden sonra payetler depolama için sıvı azotun içine daldırıldı. Dondurma çalışmaları her koçtan alınan sperma örnekleri için 2 şer kez olmak üzere 5 koç için toplamda 10 kez tekrarlandı.

2.3.3. Spermanın Çözülmesi ve Muayenesi

Payetler 37 °C lik su banyosunda 30 sn süresince çözülmeye bırakıldıktan sonra çözülen payetlerden toplanan sperma örneklerinde her iki grup spermatozoa motilitesi, ölü-canlı ve anormal spermatozoon oranları, spermatozoon membran bütünlüğünün ve akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranlarının belirlenmesi amacıyla aşağıdaki muayeneler yapıldı.

2.3.3.1. Motilite

Payetlerin çözümünden sonra elde edilen spermadan lam lamel arasına küçük bir damla yerleştirilerek motilite oranı belirlendi. Isıtma tablalı faz-kontrast mikroskopta x200 büyütmede en az 5 değişik mikroskop sahasında örnekler incelendi. Bulunan ortalama değer yüzde (%) olarak ifade edildi.

2.3.3.2. Ölü-Canlı Spermatozoon Oranı

Çözülmüş spermallerdeki ölü-canlı spermatozoa oranı supravital boyama tekniğiyle belirlendi. Eosin-nigrosin boyası kullanılarak hazırlanan frotilerde mikroskop yardımıyla x400 büyütmede en az 200 spermatozoon sayılarak değerlendirilmiş ve ölü spermatozoon oranı yüzde (%) olarak ifade edilmiştir. Preparatların değerlendirilmesinde baş kısmı boya alan spermatozoonlar ölü, baş kısmı boya almamış spermatozoonlar ise canlı olarak değerlendirildi. (Resim2.1) .



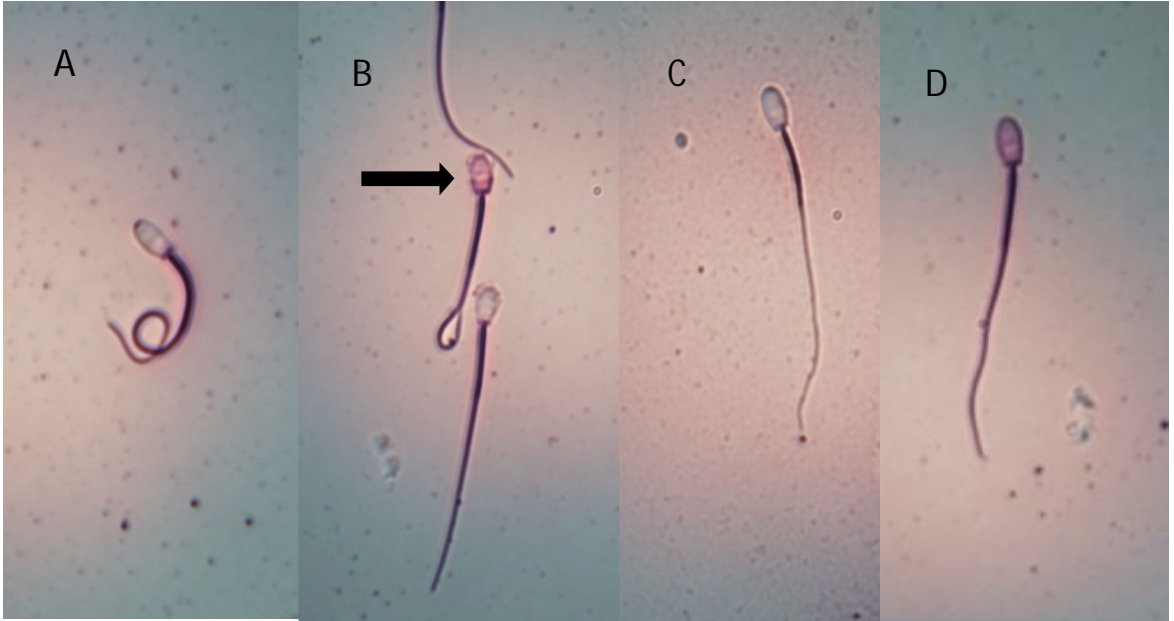
Resim 2.1. Ölü Spermatozoon (A), Canlı Spermatozoon (B) görüntüleri

2.3.3.3. Anormal Spermatozoon Oranı

Sperma numunelerindeki anormal spermatozoon oranı sıvı fikzasyon yöntemiyle belirlendi. Bu yöntemde Hancock solüsyonu (Hancock 1952) kullanılarak fikze edilen hücreler lam-lamel arasında bir faz-kontrast mikroskop altında incelendi. İmmersiyon objektif (x1000 büyütme) altında en az 200 spermatozoonun çeşitli kısımlarının (akrozom, baş, orta kısım ve kuyruk) incelenmesi sonunda anormal yapı gösteren spermatozoa oranı yüzde (%) olarak belirlenmiştir.

2.3.3.4. Spermatozoon Membran Bütünlüğünün Belirlenmesi

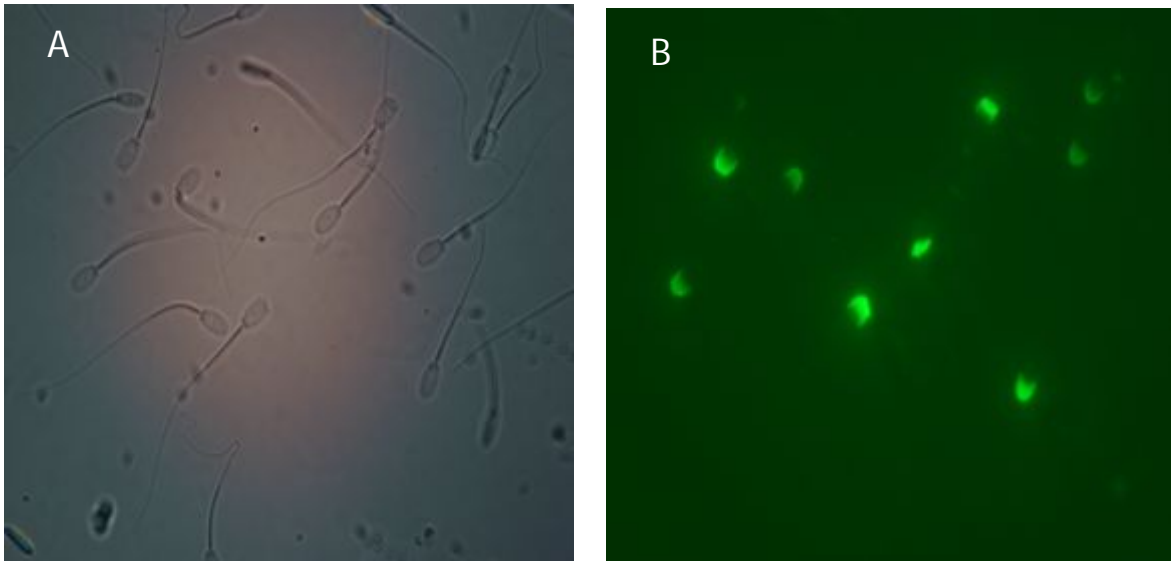
Spermatozoon membran bütünlüğünün belirlenmesi için HOS testi uygulandı. Bu amaçla Jeyendran ve ark (1984) tarafından belirtilen yöntemden yararlandı. Sperma örneklerinin 100 mOsm/l ye ayarlanmış (Aisen ve ark 2005) fruktoz solüsyonu içerisinde inkübe edilmesinden sonra preparatlar hazırlanıp boyandı. Hazırlanan preparatlardan toplam 200 hücre sayıldı, kıvrık kuyruklu spermatozoonlar pozitif olarak kabul edilip, membran bütünlüğüne sahip spermatozoonların (Resim2.2) oranları belirlendi.



Resim 2.2. Membran bütünlüğüne sahip canlı spermatozoon (A), membran bütünlüğüne sahip ölü spermatozoon (B), membran bütünlüğü bozulmuş canlı spermatozoon (C), membran bütünlüğü bozulmuş ölü spermatozoon (D)

2.3.3.5. Prematüre Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatozoon Oranının Belirlenmesi

Prematüre akrozom reaksiyonu geçirmiş hücreleri belirlemek için akrozoma spesifik floresan boya fluorescein isothiocyanate-labeled peanut (*Arachis hypogea*) agglutinin (FITC-PNA) kullanıldı. Spermatozoonlar (1×10^6) $38 \text{ }^\circ \text{C}$ ' de 5 dakika boyunca FITC PNA ($200 \text{ } \mu\text{g} / \text{ml}$) ya maruz bırakıldı ve sonra % 4 (w / v) 1 ml paraformaldehid ilave edilmesi suretiyle tespit edildi. Cam slayt üzerine $5 \mu\text{l}$ sperm süspansiyonu koyuldu ve üzerine lamel yerleştirildi. Numuneler floresan filtreler (U-FBN / U-FUN) ile donatılmış bir floresan mikroskop altında (Olympus BX41; $100\times$ objective) hemen incelendi. Hazırlanan preparatlardan toplam 200 hücre sayılarak, akrozom reaksiyonuna giren hücre oranı belirlendi. FITC-PNA ile boyanan spermatozoonlar akrozom reaksiyonuna giren hücreler olarak sınıflandırıldı ve herhangi bir floresan ışığa vermeyen spermatozoonlar ise akrozom reaksiyonuna girmeyen hücreler olarak kabul edildi (Hernandez ve ark 2012).



Resim2.3. Sayılan tüm spermatozoonlar (A) ve aynı alanda prematüre akrozom reaksiyonuna giren spermatozoonların (B) görüntüsü

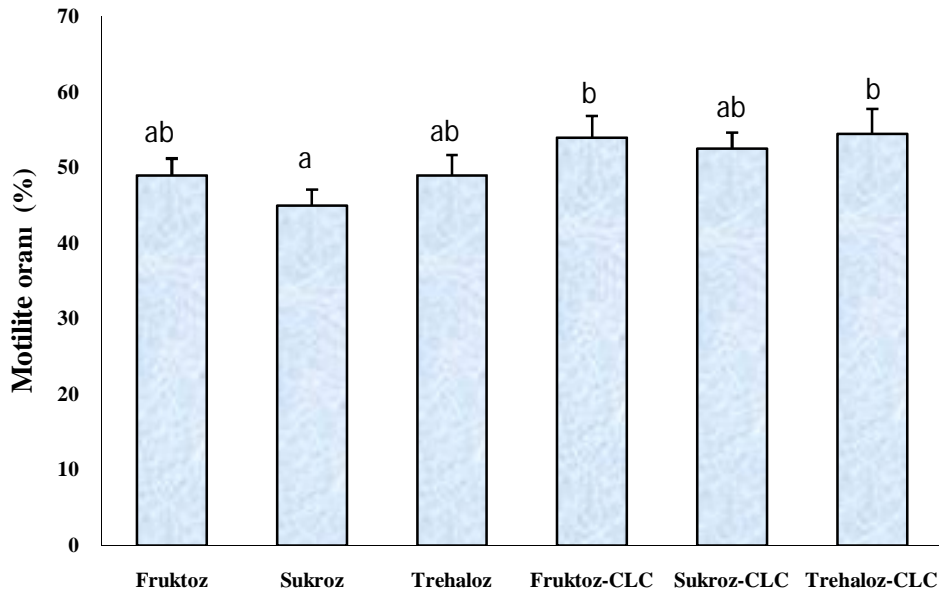
2.4. Bulguların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Araştırmada elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart hataları hesaplandı. Sonuçlar, SPSS (version 17, SPSS Inc.,Chicago IL USA) programı kullanılarak analiz edildi. özüm sonu spermatolojik parametreler One-Way ANOVA ile karşılaştırıldı. Gruplar arası P değerlerinin saptanması için Duncan Post-Hoc testi uygulandı. %5'in altındaki P değerleri önemli olarak yorumlandı.

3.BULGULAR

3.1. Motilite Muayenesi

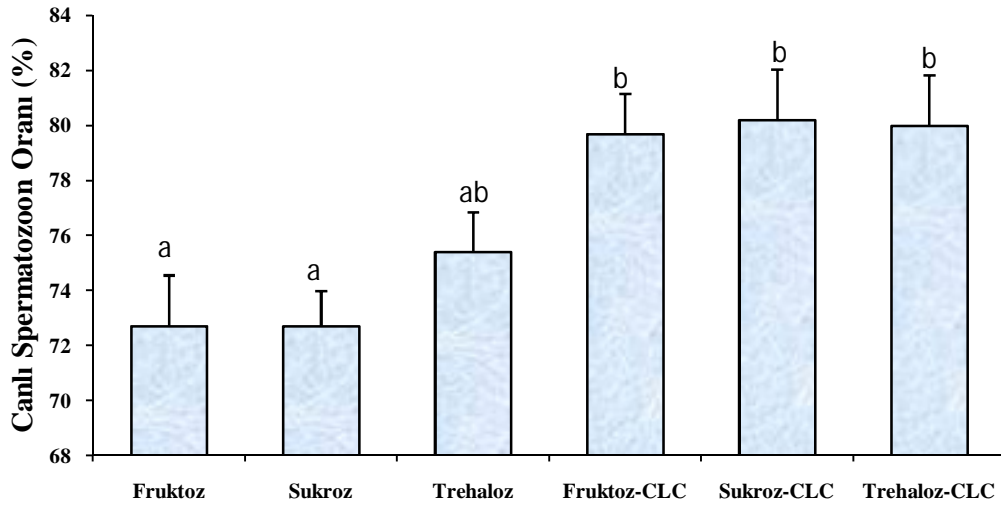
Çözüm sonu motilite sonuçları fruktoz, sükröz, trehaloz grupları için sırasıyla %49±2.21, %45±2.10, %49±2.66 iken CLC-fruktoz, CLC-sükröz, CLC-trehaloz grupları için sırasıyla %54±2.86, %52.5±2.14, %54.5±3.28 şeklindedir. CLC içermeyen gruptaki üç şeker arasından en düşük motilite değeri sükröz grubunda tespit edildi. Üç şeker grubu arasında elde edilen fark istatistiksel bakımdan önemli bulunmadı ($P>0.05$). CLC ilave edilen gruplarda ise değerlerin birbirine oldukça yakın olduğu görüldü. Bununla birlikte sükröz grubunun (%45±2.10), CLC-fruktoz (%54±2.86) ve CLC-trehaloz (%54.5±3.28) ile motilite oranları kendi aralarında değerlendirildiğinde motilite oranında yaklaşık %9' luk fark olduğu belirlenmiştir. Elde edilen fark istatistiksel bakımdan önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Gruplara ait motilite oranları Şekil 3.1'de grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1.Çalışma gruplarında çözüm sonu motilite oranları (Mean±SEM)

3.2. Canlı Spermatozoon Oranı

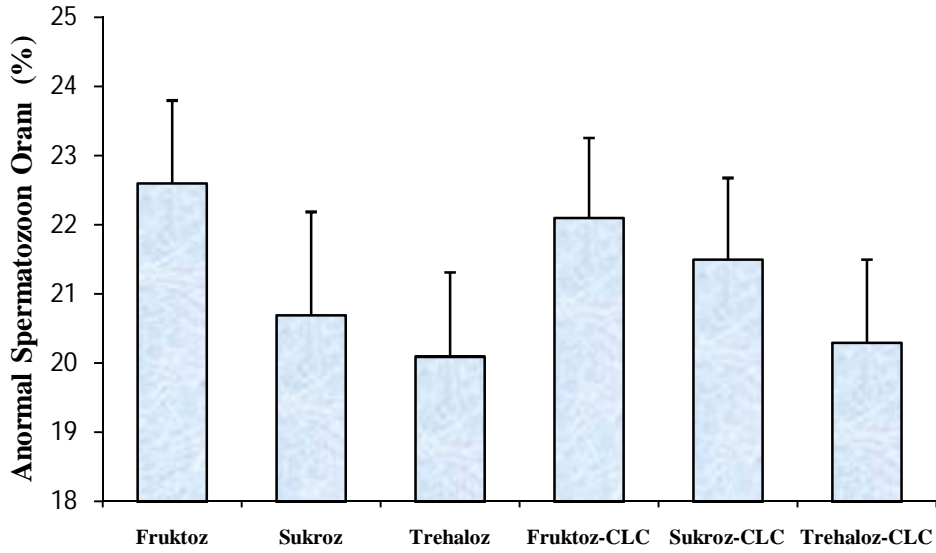
Çözüm sonu değerlendirilen sperma örneklerinde canlı spermatozoon oranları fruktoz, sükroz, trehaloz grupları için sırasıyla 72.7 ± 1.86 , 72.7 ± 1.29 , 75.4 ± 1.46 iken CLC-fruktoz, CLC-sükroz, CLC-trehaloz grupları için sırasıyla 79.7 ± 1.46 , 80.2 ± 1.84 , 80 ± 1.83 şeklindedir. CLC içermeyen şeker gruplarında en yüksek sonuç trehaloz grubunda gözlenirken, CLC içeren her üç şeker grubunda elde edilen değerler oldukça birbirine yakın bulundu. Fruktoz ve sükroz grupları ile CLC-fruktoz, CLC-sükroz ve CLC-trehaloz grupları arasında canlı spermatozoon oranları bakımından yapılan karşılaştırmada (Şekil 3.2) elde edilen farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü ($P < 0.05$).



Şekil 3.2. Çalışma gruplarında çözüm sonu canlı spermatozoon oranları (Mean±SEM)

3.3. Anormal Spermatozoon Oranı

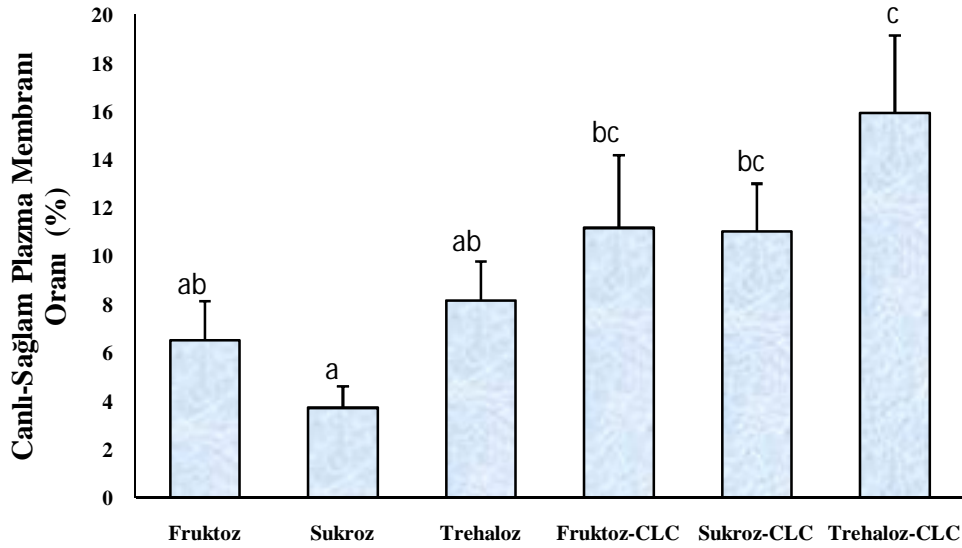
Anormal spermatozoon oranları fruktoz, sükröz, trehaloz gruplarında sırasıyla %22.6±1.20, %20.7±1.49, %20.1±1.22 iken CLC-fruktoz, CLC-sükröz, CLC-trehaloz gruplarında sırasıyla %22.1±1.16, %21.5±1.18, %20.3±1.20 bulunmuştur. Grafikte de görüldüğü üzere anormal spermatozoon oranları bakımından yapılan değerlendirmeler sonucunda hem CLC içermeyen hem de CLC içeren gruplarda istatistiksel bakımdan önemli bir fark görülmemiştir ($P>0.05$) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Çalışma gruplarında çözüm sonu anormal spermatozoon oranları (Mean±SEM)

3.4. Canlı-Sağlam Plazma Membranına Sahip Spermatozoon Oranı

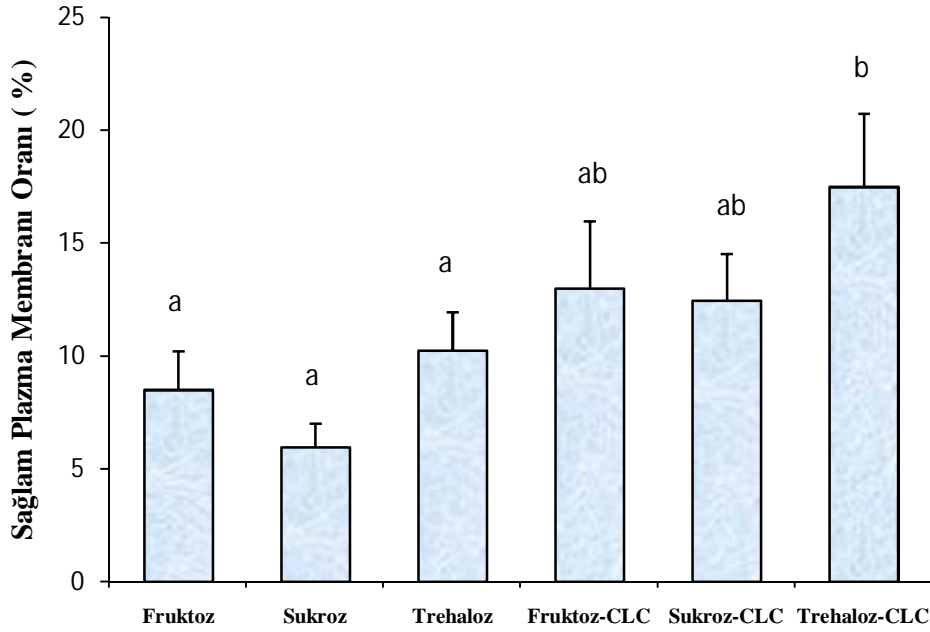
Canlı-sağlam plazma membranına sahip spermatozoon oranları fruktoz, sükroz, trehaloz grupları için sırasıyla %6.55±1.62, %3.75±0.88, %8.2±1.61 iken CLC-fruktoz, CLC-sükroz, CLC-trehaloz gruplarında sırasıyla %11.2±3.01, %11.05±1.98, %15.95±3.21 olarak bulunmuştur. Çözüm sonu örneklerde farklı gruplardan elde edilen sonuçlar aşağıdaki grafikte sunulmuştur (Şekil 3.4). Canlı-sağlam plazma membranı sahip spermatozoon oranları için yapılan değerlendirmeler sonucunda CLC-trehaloz (%15.95±3.21) grubu ile fruktoz (%6.55±1.62), sükroz (%3.75±0.88) ve trehaloz (%8.2±1.61) grupları arasında fark bulunmuştur ($P<0.05$). Aynı zamanda %3.75±0.88 canlı-sağlam plazma membranına sahip sükroz grubu ile CLC-fruktoz (%11.2±3.01), CLC-sükroz (%11.05±1.98) grupları arasında da istatistiksel fark görülmüştür ($P<0.05$).



Şekil 3.4. Çalışma gruplarında çözüm sonu canlı-sağlam plazma membranına sahip spermatozoon oranları (Mean±SEM)

3.5. Sağlam Plazma Membranına Sahip Spermatozoon Oranı

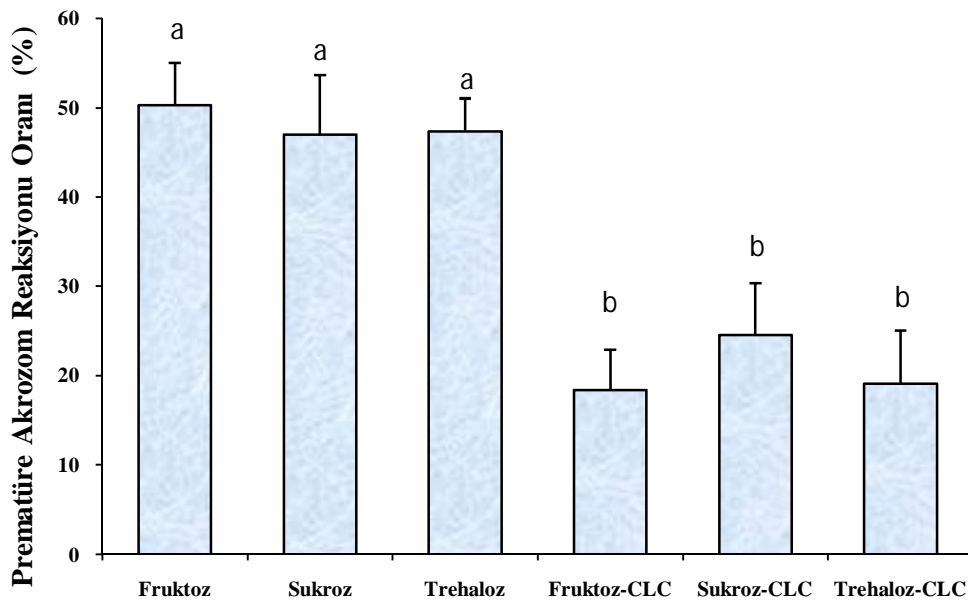
Yapılan çalışmada sağlam plazma membranına sahip spermatozoon oranları fruktoz, sükroz, trehaloz gruplarında sırasıyla 8.5 ± 1.73 , 5.95 ± 1.07 , 10.25 ± 1.70 iken CLC-fruktoz, CLC-sükroz, CLC-trehaloz gruplarında sırasıyla 13 ± 2.99 , 12.45 ± 2.08 , 17.5 ± 3.26 şeklindedir. Çözüm sonu elde edilen bulgular sonucunda (17.5 ± 3.26) sağlam plazma membranına sahip CLC-trehaloz ile fruktoz (8.5 ± 1.73), sükroz (5.95 ± 1.07) ve trehaloz (10.25 ± 1.70) grupları ile arasında istatistiksel bir fark bulunmuştur ($P < 0.05$, Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Çalışma gruplarında çözüm sonu sağlam plazma membranına sahip spermatozoon oranları (Mean \pm SEM)

3.6. Prematüre Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatozoon Oranı

Yapılan değerlendirmeler sonucunda prematüre akrozom reaksiyonu oranları fruktoz, sukroz, trehaloz gruplarında sırasıyla %50.3±4.77, %47.05±6.66 ve %47.4±3.67 iken, CLC-fruktoz, CLC-sukroz, CLC-trehaloz gruplarında sırasıyla %18.45±4.51, %24.6±5.79, %19.15±5.93 olarak bulundu (Şekil3.6). CLC ve CLC'siz şeker grupları arasındaki fark istatistiksel bakımdan önemli bulundu ($P<0.05$).



Şekil 3.6. Çalışma gruplarında çözüm sonu prematüre akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranları (Mean±SEM)

4.TARTIŞMA

Türkiye’de mevcut koyun popülasyonunun önemli bir kısmının verim düzeyinin düşük olması nedeniyle koyunlarımızın ıslah edilmesi ve verimlerinin arttırılması gerekmektedir. Bunun da başlıca yolu, yüksek verimli ve sağlıklı koçların spermalarını kullanarak suni tohumlama yapmaktır. Bu amaçla spermanın saklanması da önemli bir avantaj ve kolaylık sağlayacaktır. Bu alanda en geçerli ve en uygun yöntem koç spermalarının dondurularak saklanmasıdır. Bu yöntemin sığırlarda başarılı biçimde ve yüksek fertilitite oranlarıyla uygulanabilmesine rağmen koyunlarda henüz arzu edilen sonuçlara ulaşılamamıştır. Bunun başlıca nedenleri arasında halen koç spermatozoonlarının dondurma-çözdürme süreci içerisinde yüksek oranda ölmesi, düşük ısılarla daha duyarlı olması ve koç spermatozoon membranlarının yüksek oranda doymamış yağ asiti içermeleri nedeniyle daha kırılgan bir yapı göstermesi sayılabilir.

Koç sperma hücrelerinin dondurma işlemi sırasında soğuk şokuna karşı duyarlılık göstermeleri, hücreler üzerindeki hasarı arttırarak çözüm sonrası spermatolojik özellikleri ve fertilitiyi olumsuz yönde etkilemektedir. Bunun için sperma sulandırıcılarına katılacak koruyucu katkı maddeleriyle dondurma işlemi ve hücrelerde gelişecek soğuk şoku hasarı azaltılabilmektedir. Bu çalışmada da koç spermalarının uzun süreli saklanmasında farklı sulandırıcı kompozisyonları kullanılarak çözüm sonu daha iyi spermatolojik parametrelere ulaşılması amaçlanmıştır.

Birçok araştırmacı koç spermalarının dondurulup saklanmasında çeşitli sulandırıcılar, kriyoprotektan ajanlar, dondurma ve çözme metotları, dondurma kaynaklı hasarlar ve koç spermalarının fertilitesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Sulandırıcılar diğer türlerde olduğu gibi koç spermalarında da koruyucu, yeterli pH’da ve uygun ozmolaritede olmalıdır (Salamon ve Maxwell 2000).

Sperma sulandırıcılarına ilave edilen bazı şekerlerin spermanın depolanması sırasında enerji kaynağı olduğu (glikoz, fruktoz), bazılarının ise (sükroz ve laktoz) sulandırıcının ozmotik basıncını arttırdığı bildirilmiştir (Maxwell ve Salomon 1993). Enerji kaynağı olarak kullanılmayan fakat hücre dışında ozmotik basınç ve membran bütünlüğünü sağlayan şekerler spermatozoonların uzun süreli saklanılmasında önemli katkılar sağlayabilir (Maxwell ve Salomon 1993, Rudoph ve Crowe 1985).

Sperma sulandırıcılarına eklenen trehaloz spermatozoonlar için ozmotik basıncı ayarlar ve kriyoprotektan olarak etki gösterir. Non-permeable bir disakkarit olan trehalozun su kaybı sırasında hücre membranında oluşan olumsuz etkilerin önlenmesinde önemli bir etkiye sahip olduğu (Molinia ve ark 1994) ve bunun da spermadaki endojen glutatyon tüketimini azalttığını ve ortamda oluşan serbest radikalleri temizleyerek olumlu bir etki sağladığı yapılan çalışmalarda ifade edilmiştir (Aisen ve ark 2005).

CLC ilave edilmiş spermatozoonların CLC ilavesi yapılmayanlara göre çözüm sonrası daha uzun süre motil kaldığı bildirilmektedir (Moce ve ark 2010). Kontrol grubuna (CLC ilave edilmemiş) göre dondurma işleminden önce CLC ilavesi yapılan spermatozoonların dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik parametrelerinde iyileşme sağladığı ve spermatozoon motilitesininin ortalama %15-17 arttığı ifade edilmektedir (Purdy ve Graham 2004a).

Bu çalışmada çözüm sonu en yüksek motilite sonuçları CLC içeren çalışma gruplarında elde edildi. CLC ilave edilmiş gruplardaki motilite oranları CLC-fruktoz, CLC-sükroz, CLC-trehaloz gruplarında sırasıyla %54±2.86, %52.5±2.14, %54.5±3.28 olarak bulundu. Buna karşın CLC ilave edilmemiş gruplardaki motilite oranları ise fruktoz, sükroz, trehaloz gruplarında sırasıyla %49±2.21, %45±2.10, %49±2.66 olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede CLC ilave edilmemiş ve CLC ilave edilmiş şekerler arasında önemli bir fark bulunmazken CLC ilave edilmiş fruktoz ve trehaloz grubunun motilitesi ile CLC içermeyen sükroz grubunda elde edilen motilite değerleri arasında istatistiksel bir farklılık bulundu ($P<0.05$). Dondurma öncesi sperma sulandırıcısına CLC ilavesi spermatozoon motilitesini olumlu yönde etkilediği görülmektedir. Bu çalışmadaki bulguları destekler nitelikteki sonuçlar Moce ve ark (2010), Purdy ve Graham (2004a), Aksoy ve ark (2010) ve Awad ve ark (2011) tarafından da bildirilmiştir.

Sunulan çalışmada elde edilen canlı spermatozoon oranları; CLC ilave edilmeyen gruptaki fruktoz, sükroz, trehaloz için sırasıyla %72.7±1.86, %72.7±1.29, %75.4±1.46 iken CLC ilave edilen gruplarda ise CLC-fruktoz, CLC-sükroz, CLC-trehaloz için %79.7±1.46, %80.2±1.84 ve %80.0±1.83 bulundu. CLC ilave edilmeyen şeker grupları arasında en yüksek canlı spermatozoon oranı trehaloz grubunda elde edildi. Bununla birlikte her üç şeker grubu arasında fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı. CLC içeren fruktoz, trehaloz ve sükroz grubunda canlı spermatozoon oranları ise birbirine yakın bulundu. CLC

ilave edilen fruktoz ve sükröz grubu canlı spermatozoon oranları ile CLC ilave edilmeyen gruplara göre fark gösterirken ($P<0.05$) CLC ilave edilen trehaloz CLC ilave edilmeyene göre fark göstermemiştir. Elde edilen sonuçlara göre CLC ilavesinin canlı spermatozoon oranı üzerine olumlu yönde etki gösterdiği gözlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen CLC ilavesinin çözüm sonu canlı spermatozoon oranları üzerine etkilerine benzer sonuçlar Awad ve ark (2011), Combes ve ark (2000), Moore ve ark (2005), Moce ve ark (2010), Purdy ve Graham (2004a) tarafından da bildirilmektedir. Başka bir çalışmada da spermatozoon membranına kolesterölün eklenmesi dondurulduktan sonra önemli ölçüde canlı spermatozoon ve akrozom membran bütünlüğüne katkı sağladığı bildirilmektedir (Farshad ve ark 2011).

Sperma kriyoprezervasyon süreci sırasında zarar görmekte ve bunun sonucu olarak da dondurulmuş-çözdürülmüş spermatozoonun dölleme kapasitesi taze ya da soğutularak saklanan spermatozoonla kıyasla düşük olmaktadır. Soğuk şokuna spermatozoonun hassasiyeti membran fosfolipid kompozisyonu tarafından belirlenmekte (Holt 2000) ve spermalarında yüksek düzeyde kolesteröl: fosfolipid oranına sahip türlerin (örneğin insan ve tavşan), spermatozoon kolesteröl:fosfolipid oranı düşük olan türlere (örneğin, aygır, koç ve boğa) kıyasla daha dirençli oldukları bildirilmektedir (Darin-Bennett ve White 1977, Watson 1981). Düşük sıcaklıklarda membran akışkanlığını arttırmak ve membran fosfolipid yapısını stabil tutmak için kolesteröl, sperma da dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine eklenebilmektedir (Moore ve ark 2005).

Spermatozoonların plazma membranı, dış akrozomal membranı ve mitokondri membranı dondurma-çözünme işlemine karşı son derece duyarlıdır. Membran yapıları akıcı mozaik tarzında düzenlenmiş protein, glikoprotein ve glikolipitlerle bezeli iki sıralı fosfolipit katmanından oluşmuştur. Bu yapıların termodinamik özellikte ve %65-70 oranında doymamış fosfolipitlerden oluşması, membranların soğutulması sırasında geri dönüşümsüz faz değişimine, neden olmaktadır (Watson 2000). Gelişen faz değişimi sonrası bozulan membran stabilizasyonu ile hücrede soğuk şoku hasarı gelişmektedir. Sunulan çalışmada da CLC ilave edilmesinin hangi şekerle olursa olsun canlı-sağlam plazma membranına sahip spermatozoon oranları açısından olumlu bir farklılık ortaya çıkardığı görülmüştür. Sağlam plazma membranına sahip spermatozoon oranı CLC ilave edilen CLC-fruktoz, CLC-sükröz ve CLC-trehaloz gruplarında sırası ile 13 ± 2.99 , 12.45 ± 2.08 ve 17.5 ± 3.26 iken CLC ilave edilmeyen fruktoz, sükröz ve trehaloz gruplarında sağlam

plazma membranına sahip spermatozoon oranları ise sırasıyla %8.5±1.73, %5.95±1.07 ve %10.25±1.70 bulundu. Bu sonuçlar doğrultusunda CLC ilave edilen trehaloz grubu spermatozoonlarda CLC edilmeyene göre fark bulunmuştur (P<0.05). Bununla birlikte canlı-sağlam plazma membranına sahip spermatozoon oranları ise CLC ilave edilen fruktoz grubunda %11.2±3.01, sükroz grubunda %11.05±1.98 ve trehaloz grubunda da %15.95±3.21 bulunurken CLC ilave edilmeyen fruktoz grubunda %6.55±1.62, sükroz grubunda %3.75±0.88 ve trehaloz grubunda ise %8.2±1.61 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar da çalışmada hangi şekere CLC eklenirse eklensin (trehaloz, fruktoz, ve sükroz) kolesterolün dondurma-çözdürme işlemleri sonrasında membran bütünlüğünü CLC içermeyen gruba göre daha iyi koruduğunu ortaya koymuştur. Özellikle CLC'nin olumlu etkisinin trehaloz grubunda daha iyi ortaya çıktığı gözlenmiştir. Aynı şekilde bu çalışmayı destekler şekilde, sulandırıcıya ilave edilen CLC'nin plazma membran yapılarını birleştirdiği ve elastikiyet kazandırdığı bildirilmiştir (Purdy ve Graham 2004a, Moore ve ark 2005, Farshad ve ark 2011). Yine başka bir çalışmada CLC uygulamasının spermatozoon membran bütünlüğünü çok geniş bir ozmatik basınç aralığında (20-1500 mOsm/L) ilerlettiği ifade edilmiştir (Ahmad ve ark 2013).

Ayrıca mevcut çalışmada prematüre akrozom reksiyonu oranları CLC ilave edilmeyen fruktoz, sükroz ve trehaloz gruplarında sırasıyla %50.3±4.77, %47.05±6.66 ve %47.4±3.67 iken, CLC içeren CLC-fruktoz grubunda %18.45±4.51, sükroz grubunda %24.6±5.79, trehaloz grubunda ise %19.15±5.93 olarak tespit edildi. Bu sonuçlar ışığında dondurma işlemi öncesi sperma sulandırıcısına CLC ilavesinin her üç şeker grubunda da CLC eklenmeyenlere göre prematüre akrozom reaksiyonuna giren spermatozoa oranları üzerine istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturduğu gözlenmiştir (P<0.05). Benzer biçimde CLC uygulamasının koç spermatozoonlarında çözüm sonunda lysophosphatidylcholine ile uyarılmış akrzom reaksiyonu olgusunu baskıladığı ve spermatozoonların bu ajana cevap verme yeteneklerinin değiştiği tespit edilmiştir (Ahmad ark 2013). Membran değişikliklerinden sorumlu moleküler olaylar halen tam anlaşılmamış olmasına rağmen, hücreler dondurulduktan sonra sperm plazma membranın kolestrol kaybettiği bildirilmektedir (Bailey ve ark 2000, Bailey ve ark 2008, Chakrabary ve ark 2007, Thomas ve ark 2006, Cormier ve ark 1997). Dondurulmuş spermada görülen erken kapasitasyonun başlıca nedenlerinden birisi soğuk şokudur (Thomas ve ark 2006, Amorim ve ark 2009). Bununla birlikte Gadella ve ark (2001) spermanın erken kapasitasyon oranının plazma membranındaki kolestrol azalması ile bağlantılı olduğu ileri

sürülmektedir. Buna ek olarak spermatozoon membranına kolestrol eklenmesinin dondurulduktan sonra önemli ölçüde canlılık ve akrozom bütünlüğüne katkı sağladığı ve erken kapasitasyonu önlediğini bildirilmektedir (Farshad ve ark 2011, Serin ve ark 2011). Benzer şekilde diğer çalışmalarda da spermaya kolestrol eklenmesinin dondurulma sonrası prematüre akrozom reaksiyonunu azalttığı ileri sürülmektedir (Barrera-Compean ve ark 2005, Ibora ve ark 2000, Motamed ve ark 2000, Shadan ve ark 2004, Serin ve ark 2011).

Sonuç olarak kullanılan şekerlerden özellikle trehalozun bazı spermatolojik parametreler (canlı spermatozoon, canlı-sağlam plazma membranı, sağlam plazma membranı) bakımından diğer şekerlere göre daha olumlu sonuçlar ortaya çıkardığı gözlenmekle birlikte, CLC'nin koruyucu etkisinin çok daha belirgin olduğu saptandı.

5.SONUÇ

Bu çalışmadan alınan sonuçlara göre sperma sulandırıcılarına ilave edilen trehalozun früktoz ve sü kroza göre çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerinde önemli iyileşmeler sağladığı gözlenmiştir. Trehaloz ilavesi özellikle çözüm sonu canlı, membran bütünlüğü sağlam ve anormal spermatozoa oranlarını sü kroz ve fruktoz gruplarına göre daha olumlu etkilemesi, trehalozun birçok araştırmada belirtilen hücre sel dehidrasyonla ozmotik basıncı de ğiştirme ve hücre membranını hasarlardan korudu ğu görü şünü do ğrulamaktadır.

Dondurulmuş-çözdürülmüş koç spermatozoonlarının tohumlama sonrası dişi genital kanalında yaşama süresinin kısılması, çözüm sonu akrozom ve membran hasarlarının çok yüksek olması tohumlamalar sonrası elde edilecek gebelik oranlarının önemli ölçüde düşmesine yol açmaktadır. Kolesterol spermatozoon plazma membranının temel yapısını oluşturan önemli bir unsurdur. Kolesterol'ün plazma membranının akışkanlık ve esnekliğini de ğiştirebildi ği ve spermatozoon membranlarının kolesterol düzeyinin yükseltilmesinin plazma membranının daha düşük derecelerde bile yumuşak kalmasını ve daha akıcı olmasını sağlayarak so ğuk şokunun olumsuz etkilerine karşı daha dirençli olmasına yardımcı olabilece ği bildirilmektedir.

Mevcut çalışmada da kolosterol içeren sulandırıcı gruplarında içermeyenlere göre yüksek çözüm sonu parametreler (motilite, canlı spermatozoon, canlı-sa ğlam plazma membranı, sa ğlam plazma membranı) elde edilmesi yukarıda bildirilen görü şü destekler niteliktedir. Koç spermasına kolesterolün methyl-β-cyclodextrin molekülü yardımıyla bağlanması koç spermatozoonlarının daha başarılı şekilde dondurulabilece ğini ve çözüm sonu iyi parametreler elde edilebilece ğini göstermiştir.

Sunulan çalışma da kısmen de olsa yararlı ve önemli sonuçlara ulaşılmıştır. Ancak daha kesin sonuçların ortaya çıkarılabilmesi için in vitro de ğerlendirmeler yanında dölverimi sonuçlarını içeren çalışmaların da yapılması gereklidir.

Fruktoz , Trehaloz ve Sükroz İçeren Tris Bazlı Sulandırıcıya Kolesterol Yüklü Siklodekstrin (CLC) İlavesinin Koç Spermasının Dondurulabilirlik ve Çözüm Sonu Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkilerinin Araştırılması

ÖZET

Bu çalışmanın amacı koç spermasının dondurulması sırasında ortaya çıkan ve tohumlamalardan sonra gebelik oranlarının önemli ölçüde düşmesine yol açan spermatozoon membran hasarlarının minimize edilmesi amacıyla Fruktoz, Trehaloz ve Sükroz içeren sulandırıcıya kolesterol ilavesinin dondurma sırasındaki koruyucu etkisi ve çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkinliğinin araştırılmasıdır.

Çalışmada toplam 5 baş Kıvırcık ırkı koç ve bu koçlardan elektro-ejakulatör kullanılarak toplanan ejakülatlar kullanıldı. Alınan sperma örnekleri motilite ve anormal spermatozoon oranları yönünden muayene edildi. Toplanan ejakülat spermatozoon yoğunlukları hemositometrik yöntemle belirlendi, ejakülatlar biri CLC içermeyen grup diğeri de CLC (120×10^6 spermatozoon /3mg) içeren grup olmak üzere 2 eşit kısma ayrıldı. 35°C de 15 dk İnkübasyondan sonra CLC içeren ve CLC içermeyen grupları her ikisi de 3 alt gruba ayrıldı. Bu alt gruplar fruktoz, sükroz ve trehaloz solüsyonlarıyla sulandırıldı ve payetlere çekildi. Payetler equilibrasyon işlemi için beklemeye bırakıldı. Equilibrasyon işleminden sonra payetler sıvı azot buharında dondurularak sıvı azotun içinde saklandı. Çözülen payetlerden spermatozoa motilitesi, ölü-canlı ve anormal spermatozoon oranları, spermatozoon membran bütünlüğünü ve prematüre akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranlarının belirlenmesi amacıyla örnekler alındı.

Yapılan çözüm sonu muayeneler sonucunda motilite açısından şeker grupları arasında istatistiksel bir farklılık görülmezken en iyi sonuçlar CLC içeren CLC-trehaloz (% 54.5 ± 3.28) ve CLC-fruktoz (% 54 ± 2.86) gruplarında elde edildi. Canlı spermatozoon oranlarında ise CLC içeren fruktoz ve sükroz grubunun CLC içermeyen fruktoz ve sukroz grubuyla arasında istatistiksel bir farklılık gözlemlendi ($P < 0.05$). Anormal spermatozoon oranlarında ise gruplar arası fark bulunmadı. Sağlam plazma membranına sahip spermatozoon oranı ve canlı-sağlam plazma membranına sahip spermatozoon oranları açısından CLC-trehaloz grubunda bulundu. Prematüre akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranları CLC içeren şeker gruplarında CLC içermeyen gruplara göre önemli

derecede düşük bulundu. CLC içeren ve CLC içermeyen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($P<0.05$).

Sonuç olarak, kullanılan şekerlerin bazı parametreler üzerine etkisi önemli olmakla beraber CLC'nin koruyucu etkisinin çok daha belirgin olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: CLC, dondurma, fruktoz, koç spermatozoon, sükroz, trehaloz

**Effect of Fructose, Trehalose or Sucrose Supplementation of the Tris-Based Extender
Including Cholesterol-Loaded Cyclodextrin on the Freezability and Post-Thaw
Parameters of Ram Spermatozoa**

SUMMARY

The ram sperm undergo different type of damages during cryopreservation process which consequently results in low pregnancy rate in sheep. Among them damages the sperm membrane is the major factor that affects the sperm survival post-cryopreservation. Many studies have been conducted to minimize the adverse effect of cryopreservation on sperm plasma membrane. Therefore, the objective of present study was to protect the sperm membrane during cryopreservation by using different sugars (fructose, sucrose and trehalose) in combination with cholesterol in semen extenders. The information based upon post-thaw parameters would help to choose the best combination for ram sperm cryopreservation.

Five KIVIRCIK rams were used and semen was collected using electro-ejaculator. Initial motility, concentration and abnormal sperm percentage were evaluated. After evaluation, semen was split into two parts: one was treated with CLC (3mg/120x10⁶ sperm) and second remained untreated. After treatment, CLC treated and untreated parts was further divided into three aliquots and diluted with either fructose, sucrose or trehalose supplemented extenders. Then all the diluted aliquots were packed into straws and cooled to 4°C for two hours. After equilibration at 4°C, straws were frozen in liquid nitrogen vapor and stored in liquid nitrogen. Straws were thawed after freezing and sperm characteristics (motility, live/dead, membrane integrity, abnormal sperm and acrosome integrity) were estimated.

The post-thaw results showed that there is no statistical difference in motility amongst the groups, however, CLC-trehalose (54.5±3.28%) and CLC-fructose (54±2.86%) has highest motility compared to other groups. Live sperm percentage was significantly (P<0.05) higher in CLC-fructose and sucrose as compared to untreated fructose and sucrose. There is no significant difference in abnormal sperm percentage between CLC treated and untreated group. CLC-trehalose has highest percentage of total intact membrane and live-intact membrane sperm compared to other groups.

The CLC-treated groups has significantly ($P < 0.05$) low percentage of sperm with reacted acrosome as compared to CLC-untreated sperm.

In conclusion; although the sugars utilized in this study has influenced some of the post-thaw paramaters the protective influence of CLC on freezing ram spermatozoa was more prominent than sugars.

Key words: CLC, cryopreservation, fructose, ram sperm, sucrose, trehalose

KAYNAKLAR

Abdelhakeam AA, Grahama EF, Vazqueza IA, Chaloner KM. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Development of an extender for freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars and the method of dilution. *Cryobiology* 1991;28(1):43-49.

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

Ahmad E, Aksoy M, Serin İ, Küçük N, Ceylan A, Uçan U. Cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment of ram spermatozoa protects structural integrity of plasma membrane during osmotic challenge and reduces their ability to undergo acrosome reaction in vitro. *Small Ruminant Research* 2013;115(1):77-81.

Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H and Venturino A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, 2005;50(3):239-249.

Aisen EG, Alvarez HI, Venturino A, Gadre JJ. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 2000;53(5):1053-1061.

Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post- thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 2002;57(7):1801-1808.

Aksoy M, Akman O, Lehimcioglu NC, Erdem H. Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2010;120(1-4):166-172.

Alvarenga MA, Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM: Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Veterinary Journal* 2000; 32(6):541-545.

Alvarenga MA, Papa FO, Landim-alvarenga FC, Medeiros ASL. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal Reproduction Science* 2005;89(1-4):105-113.

Amorim EA, Graham JK, Spizziri B, Meyers M, Torres CA. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 2009;58(2):210-214.

An TZ, Iwakiri M, Edashige K, Takashi M. Factors affecting the survival of frozen-thawed mouse spermatozoa. *Cryobiology* 2000; 40(3): 237-249.

Arav A, Shehu D, Mattioli M. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *The Journal of the Society for Reproduction and Fertility* 1993;99(2): 353-358.

Awad MM. Effects of sub-optimal glycerol concentration and cholesterol-loaded cyclodextrin in a Tris-based diluent on cryopreserved ram sperm longevity and acrosomal integrity. *Small Ruminant Research* 2011;100(2-3):164-168

Bag S, Joshi A, Naqvi SM, Rawat PS, Mittal JP. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2002b;72(3-4):175-183.

Bailey JL, A Morrie and N Cormier,. Semen cryopreservation: success and persistent in farm species. *Canadian Journal of Animal Science* 2003;83:393-401.

Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals:A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology* 2000;21(1):1-7.

Bailey JL, Lessard C, Jacques J, Brèque C, Dobrinski I, Zeng W, Galantino-Homer HL.. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology* 2008;70(8):1251-1259.

Bakas LS, Disalvo EA. Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology* 1991;28(4):347-353.

Ball BA, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology* 2001;22(6):1061-1069.

Barrera-Compean MH, Purdy PH, Dzakuma JM, Newton GR, Nuti LC. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves post-thaw goat sperm motility. *Journal of Animal Science*. 2005;83:153.

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

Bucak MN, Tekin N. Ankara tekesi spermasının dondurulmasında bazı kriyoprotektanların etkisi. *Lalahan hayvansal araştırma enstitüsü dergisi* 2008;48(2):59-66.

Buhr MM, Curtis EF, Kakuda NS. Composition and behavior of head membrane-lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 1994;31(3):224-238.

Cabria E, Anel L, Herraes MP. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 2001;54(4):623-635.

Chakrabarty J, Banerjee D, Pal D, De J, Ghosh A, Majumder GC. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology* 2007;54(1):27-35.

Chalah T, Seigneurin F, Blesbois E, Brillard JP. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology* 1999;39(2):185-191.

Chen Y, Foote RH, Brockett CC. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 1993;30(4):423-431.

Choong C.H, Wales RG. The effect of cold shock on spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences* 1962;15:543-551.

Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of Lipid Research* 1997;38(11):2264-2272.

Combes, G.B., Varner, D.D., Schroeder, F., Burghardt, R.C., Blanchard, T.L.,. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 2000;56:127–132.

Cormier N, Sirard MA, Bailey JL. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *Journal of Andrology* 1997;18(4):461-468.

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

Donoghue AM, Wishart GJ. Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science* 2000;62:213-232.

El-Alamy MA, Foote RH.. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Animal Reproduction Science*, 2001;65(3-4):245–254.

Evans G, Maxwell WMC. Salamon S. *Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths; 1987.

Farshad A, Akhondzadeh S. Effects of sucrose and glycerol during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Asian-Australasian Journal Animal Science* 2008;21(12):1721-1727.

Farshad A, Amidi F, Koohi Khor A, Rashidi A. Effect of Cholesterol-loaded-cyclodextrin in Presence and Absence of Egg Yolk during Freezing Step on Quality of Markhoz Buck's Spermatozoa. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 2011;24(2):181-189.

- Fiser PS, Fairful RW, Marcus GJ. The effect of thawing velocity on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa frozen at optimal rates in straws. *Cryobiology* 1986;23(2):141-149.
- Gadella BM, Rathi R, Brouwers JF, Stout TA, Colenbrander B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science* 2001;68(3-4):249-265.
- Gökçen H, Aştı RN, Çekgöl E, Şener E. Prostaglandin F₂alfa ve Vit.E katılarak dondurulan koç spermalarında akrozom morfolojisi ve döl verimi üzerinde araştırmalar. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1985;4:1-3.
- Gomes GM, Jacop JCF, Medeiros ASL, Papa FO, Alvarenga MA. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the mangalarga marchador breed. *Theriogenology* 2002;58(2):277-279.
- Hafez ESE. Physiology of reproduction. *Reproduction in Farm Animals*. Philadelphia: Lea & Febiger. 1987.p.85-128.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology* 1990;11(1):73-88.
- Hancock JL. The morphology of bull spermatozoa. *The Journal of Experimental Biology* 1952;9:445-453.
- Hernández PJE, Fernández RF, Rodríguez SJL, Juárez RE, Soto MYG, García RAD. Effect of cryopreservation of sheep semen related to its viability and acrosomal status. *Revista de Salud Animal* 2012;34(2):78-83.
- Holt WT. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 2000;62(1-3):3-22.
- Holt WT. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000;53(1):47-58.
- Holt WV, North RD. Thermotropic phase-transitions in the plasma-membrane of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 1986;78(2):447-457.
- Iborra, A., M. Companyo, P. Martinez, A. Morros. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. *Biology of Reproduction* 2000;62(2):378-383.
- Ilangumaran S, Hoessli DC. Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochemical Journal* 1998;335(2):433-440.

- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal. Reproduction. Fertil* 1984;70(1):219-228.
- Kasai M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Animal Reproduction Science* 1996;42(1-4):67-75.
- Katkov II, Katkova N, Crister JK, Mazur P. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations.. *Cryobiology* 1998;37(4):325-338.
- Koshimoto C, Mazur P. Effects of cooling and warming rate to and from -70 degrees C, and effect of further cooling from -70 to -196 degrees C on the motility of mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction* 2002;66(5):1477-1484.
- Ladbrooke BD, Williams RM, Chapman D. Studies on lecithin-cholesterol-water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1968;150(3):333-340.
- Leeuw FED, Leeuw AMD, Daas JHG, Colenbrander BV, Erkleij AJ. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 1993;30(1):32-44.
- Leibo SP, Brandley L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: C Gagnon (Ed), *The Male Gamet*. Cache River Press:St Louis;1999.p.502-515.
- Liu Z, Foote RH, Brockett CC. Survival of Bull Sperm Frozen at Different Rates in Media Varying in Osmolarity. *Cryobiology*, 1998;37(3):219-230.
- López-Sáez A, Ortiz N, Gallego L, Garde JJ. Liquid storage (5 degrees C) of ram semen in different diluents. *Archives of Andrology* 2000;44(2):155-164.
- Martin ICA. Diluents for the preservation of ram spermatozoa. I. Diluents used at 37°C and 5°C containing casein. *Australian Journal of Biological Science*. 1966;19:645-653.
- Maxwell WMC, Salamon S. Liquid Storage of Ram Semen: a Review. *Reproduction Fertility and Development*, 1993;5(6):613-638
- Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophysics* 1990;17(1):53-92.
- Mazur P. Freezing of living cells - mechanisms and implications. *American Journal of Physiology* 1984;247(3):125-142.
- Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 1977;14(3):251-272.

- McGann LE. Differing action of penetrating and nonpenetrating agents. *Cryobiology* 1978;15(4):382-390.
- McWilliams RB, Gibbons WE, Leibo SP. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. *Human Reproduction* 1995; 10(5):1163-1171
- Mocé E, Purdy PH, Graham JK. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science* 2010;118(2-4):236-247.
- Molinia FC, Evans G, Quintana Casares PI, Maxwell WMC. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 1994;36(1-2):113-122.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 2005;51(3):241-249.
- Morrell JM, Hodge JK. Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research. *Animal Reproduction Science* 1998;53(1-4):43-63.
- Motamed Khorasani A, Cheung AP, Lee CY. Cholesterol inhibitory effects on human sperm-induced acrosome reaction. *Journal of Andrology* 2000;21(4):586-594.
- Nolan JP, Hammerstedt RH. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *The FASEB Journal* 1997;11(8):670-682.
- Özkoca A. Çiftlik hayvanlarında reproduksiyon ve suni tohumlama. İstanbul Ünivesitesi Veteriner Fakültesi Yayınları Rektörlük No: 3209. İstanbul; 1984.
- Öztürkler Y, Ak K, İleri İK. Koç spermasının yoğun gliserollü sulandırıcılarda dondurulması. *İstanbul Üniveristesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1999;25(2):399-414.
- Palasz AT, Mapletopt RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances* 1996;14(2):127-149.
- Pitha J, Irie T, Sklar PB, Nye JS. Drug solubilizers to aid pharmacologists—amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sciences*, 1988;43(6):493-502.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949;164(4172):166.
- Pontbriand D, Howard JG, Schiewe MC, Stuart LD, Wildt DE.. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 1989;26(4):341-354.

- Purdy PH, Graham JK. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biology of Reproduction* 2004b;71(2):522-527.
- Purdy PH, Graham JK. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 2004a;48(1):36-45.
- Purdy PH. A review on goat cryopreservation. *Small Ruminant Research* 2006b;63(3):215-225.
- Purdy PH. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48h at 5°C prior to cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 2006a;93(1-2):114-123.
- Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek AP, Waalkens-Berendsen DH, Shigoyuki A, Kurimoto M. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology* 2002;40(7):871-898.
- Rottem S, Yashouv J, Ne'eman Z, Razin S. Cholesterol in mycoplasma membranes. Composition, ultrastructure and biological properties of membranes from *Mycoplasma mycoides* var. *capri* cells adapted to grow with low cholesterol concentrations. *Biochimica et Biophysica Acta* 1973;323(4):495-508.
- Rudolph AS, Crowe JH. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology*. 1985;22(4):367-377.
- Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen. Part I. Processing freezing-thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 1995;37(3-4):185-249.
- Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 2000;62(1-3):77-111
- Salamon S, Robinson TJ. Studies on the artificial insemination of Merino sheep. II. The effects of semen diluents and storage on lambing performance. *Australian Journal of Agricultural Research* 1962;13(2):270-281.
- Serin I, Aksoy M, Ceylan A. Cholesterol-loaded cyclodextrin inhibits premature acrosomal reactions in liquid-stored rabbit spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2011;123:106-111
- Shadan S, James PS, Howes EA, Jones R. Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biology of Reproduction* 2004;71(1):253-265.

Smith JF, Asher GW, Briggs RM, Morrow CJ, Murray GR, Oliver JE, Parr J, Veldhuizen FA, Upreti GC. Effect of diluent and storage time on pregnancy rate in ewes after intrauterine insemination. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 1993;53:295-298.

Steponkus PL, Dowgert MF, Gordon-Kamm WJ. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during a freeze-thaw cycle: the influence of cold acclimation. *Cryobiology*. 1983;20(4):448-465.

Tekin N, Secer S, Akçay E, Bozkurt Y. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Israeli Journal of Aquaculture* 2003;55:208-212.

Thomas AD, Meyers SA, Ball BA. Capacitationlike changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology* 2006;65(8):1531-1550.

Töpfer-Petersen E, Cechová D, Henschen A, Steinberger M, Friess AE, Zucker A. Cell biology of acrosomal proteins. *Andrologia* 1990;22(1):110-121.

Trounson AO. Cryopreservation. *British Medical Bulletin* 1990;147:427-433.

Vicente JS, Viudes-De-Castro MP. A sucrose-dmsO extender for freezing rabbit semen. *Reproduction Nutrition Development* 1996;36(5):485-492.

Wales RG, Choong CH. The effects of ultraviolet radiation on ram and bull spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences* 1963;16(4):885-895.

Watson PF. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reproduction in Domestic Animals* 1996;31:135-140.

Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development* 1995;7:871-891.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 2000;60-61:481-92.

Watson PF. The role of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility* 1981;62:483-492.

White IG, Blackshaw AW, Emmens CW. Metabolic and motility studies relating to low temperature storage of ram and bull spermatozoa. *Australian Veterinary Journal* 1954;30:85-94.

White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction Fertility and Development*, 1993;5(6):639-658.

Woelders H, Matthijs A, Engel B. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 1997;35(2):93-105.

Woods EJ, Gilmore JA, Liu J. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Human Reproduction* 2000;15(2):335-343.

Yurdaydın N. Spermanın Alınması, Saklanması, ve Sun'i Tohumlama. Ed. E.Alaçam *Theriogenoloji Ders Kitabı*. Ankara: NuroI Matbaacılık; 1990.p.77-90

Zahn FS, Papa FO, Dell'aqua Jr, JA. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology* 2002;58(2):237-240

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında İzmir-Karşıyaka'da doğdu. İlköğretimini Piyale İlköğretim okulunda, lise öğrenimini Bayraklı Lisesi'nde tamamladıktan sonra, 2006 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesine girdi ve 2011 yılında mezun oldu. Aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı

TEŞEKKÜR

Tezimin fikir aŐamasından sonuçlanmasına kadar geçen sűrete, her an bilimsel yűnlendirmeleriyle bűyűk yardımlarını gűrdűğűm, karŐılaŐtığűm problemleri űzmemde tavsiyeler sunan, akademik dűŐűnmeyi űğreten, sűrekli ilgi, anlayıŐ ve sabır gűsteren, baŐta danıŐmanım Prof. Dr. Ahmet CEYLAN olmak űzere, çalıŐmalarımın yűrűtűlmesinde yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr.Melih AKSOY, Doç.Dr. İlker SERİN, AraŐ.Gűr.Niyazi KŪŪK, Doktora Őğrencileri Zahid NASEER, ve Ejaz AHMAD, her zaman yanımda olan canım annem ,teyzem ve ablama, bu çalıŐmam sırasında űz veriyle her an yanımda olan Veteriner Hekim Merve GŪDEK ve Veteriner Hekim Selçuk Ertűrk ADIYAMAN'a teŐekkűrű bir borç bilirim.