

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YL-2025-0085

SENTETİK ANTİFRİZ PROTEİN CARBOXYLATED
POLY-L-LYSINE' İN TEKE SPERMASININ
DONDURULARAK SAKLANMASINDA
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

BÜŞRA ARABACI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi UĞUR UÇAN

AYDIN-2025

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Büşra ARABACI tarafından hazırlanan “Sentetik Antifriz Protein Carboxylated Poly-L-Lysine’in Teke Spermasının Dondurularak Saklanması Kullanılabilirliğinin Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06/08/2025

Üye (T.D.) : Dr. Öğr. Üyesi Uğur UÇAN Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Melih AKSOY Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Mehmed Berk TOKER Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda yardımını esirgemeyen danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Uğur UÇAN' a teşekkür ederim. Bana desteğini esirgemeyen Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Melih AKSOY' a teşekkür ederim. Ayrıca her konuda bana yardımcı olan ve desteklerini esirgemeyen meslektaşlarım Veteriner Hekim Deniz DOĞAN, Güney TUZLALIOĞLU' na ve diğer lisansüstü arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince gösterdiği sabırları, özverileri, sonsuz destekleriyle her zaman yanımda olan, yokluklarını hiç hissetmediğim canım babam Gürol ARABACI, canım annem Leyla ARABACI ve motivasyonumu hiç düşürmeyen canım abim Burak ARABACI' ya ayrıca minnettarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Keçilerde Üreme.....	4
2.1.1. Keçilerde Pubertas	4
2.1.2. Tekelerde Reprodüktif Organ Özellikleri	5
2.1.3. Teke Spermasının Karakteristik Özellikleri.....	6
2.2. Spermanın Alınması	6
2.2.1. Elektroejakülatör Yöntemi.....	6
2.2.2. Suni Vajen Yöntemi.....	6
2.3. Spermanın Saklanması	7
2.3.1. Spermanın Kısa Süreli Saklanması	8
2.3.2. Spermanın Dondurularak Saklanması.....	8
2.4. Teke Spermasının Çözdürülmesi.....	9
2.5. Antifiriz Proteinler Hakkında Genel Bilgiler	9
2.5.1. AFP’ nin Molekül Yapısı.....	9

2.5.2. AFP’ ler Hakkında Yapılan Bazı Çalışmalar	11
2.6. CPLL Hakkında Genel Bilgiler	12
2.6.1. CPLL’ in Molekül Yapısı	12
2.6.2. CPLL Hakkında Yapılan Bazı Çalışmalar	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Gereç	15
3.1.1. Deney Kurgusu.....	15
3.2. Yöntem	15
3.2.1. CPLL Solüsyonunun Hazırlanması.....	15
3.2.2. Deney Gruplarının Belirlenmesi ve Dondurulması.....	15
3.2.3. Spermatolojik Değerlendirmeler	17
3.2.3.1. Motilite Muayenesi.....	17
3.2.3.2. Ölü-Canlı Muayenesi	17
3.2.3.3. Anormal Spermatozoon Oranı.....	18
3.2.3.4. Prematüre Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatozoon Oranı	18
3.2.3.5. Membran Bütünlüğü.....	19
3.2.3.6. İstatiksel Analiz Yöntemi.....	20
4. BULGULAR.....	21
4.1. Motilite Değerlendirmesi.....	21
4.2. Canlılık Değerlendirmesi.....	22
4.3. Morfoloji Değerlendirmesi	23
4.4. Prematüre Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatozoon Oranı.....	23
4.5. Membran Bütünlüğü Değerlendirmesi	24
4.6. Bulguların Değerlendirmesi	25
5. TARTIŞMA	26
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	30

KAYNAKLAR.....	31
EKLER	40
Ek 1: (ADÜ-HADYEK)	40
BİLİMSEL ETİK BEYANI	41
ÖZ GEÇMİŞ.....	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
µl	: Mikrolitre
AFP	: Antifiriz Protein
CASA	: Computer Assisted Sperm Analysis
Cm	: Santimetre
COOH-PLL	: Carboxylated Poly-L-Lysine
CPLL	: Karboksillenmiş Poly-L-Lysine
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FBS	: Fetal Bovine Serum
FITC-PNA	: Fluorescein-Labelled Lectin From The Peanut Plant, Arachis Hypogaea
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
G	: Gram
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
HOS	: Hypo Osmolar
IM	: Intramuskuler
IU	: International Unit
kDA	: Kilodalton
LH	: Lutein Hormon
Log	: Logaritma
Me₂SO	: Dimetil Sülfoksit
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mOsm	: Miliosmol

°C	: Santigrat Derece
P	: Sig / Significance (Anlamlılık)
pH	: Power Of Hydrogen (Potansiyel Hidrojen)
PLL	: Poli-L-Lizin
SPSS®	: Statistical Package for the Social Sciences
SV	: Suni Vajen
TRIS	: Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
w/v	: Hacimde Ağırlıkça Yüzde
w/w	: Ağırlıkça Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Antifriz proteinlerde ortak monomer yapı (Bektaş, 2007).....	10
Şekil 2. COOH-PLL sentezi ve kriyoprezervasyon özellikleri, PLL süksinilasyon reaksiyonunun şematik gösterimi (Matsumura ve diğerleri, 2010).	12

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Laboratuvarında sperma sulandırıcısı hazırlama aşaması.....	16
Resim 2. Faz-kontrast mikroskopta x10 objektifte CASA programında spermatozoonların mikroskobik görüntüsü.....	17
Resim 3. Işık mikroskobunda eosin-nigorsin ile boyanmış spermaların canlı (A) ve ölü (B) ayrımı.....	18
Resim 4. Faz-kontrast mikroskopta x40 büyütmede kuyruğa bağlı (a), başa bağlı (b) bozuklukların ve normal (c) mikroskobik görüntüsü.	18
Resim 5. FITC ile boyanmış spermatozoonların ışık mikroskobundaki (a) ve floresan mikroskobundaki (b) görüntüsü.	19
Resim 6. 100 mOsm/l ye ayarlanmış fruktoz solüsyonunda bekletilmiş spermaların mikroskobik görüntüsü.....	19
Resim 7. % 3.5 ve % 5 Gliserol içeren grupların progresif motilite değerlendirmesi.	21
Resim 8. % 3.5 ve % 5 Gliserol içeren grupların total motilite değerlendirmesi.	22
Resim 9. % 3.5 ve % 5 Gliserol içeren grupların canlılık değerlendirmesi.....	22
Resim 10. % 3.5 ve % 5 Gliserol içeren grupların anormal değerlendirmesi.....	23
Resim 11. % 3.5 ve % 5 Gliserol içeren grupların prematüre akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranı değerlendirmesi.....	24
Resim 12. % 3.5 ve % 5 Gliserol içeren grupların membran bütünlüğü değerlendirmesi.....	24

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Deney gruplarında sulandırıcı kompozisyonları.....	16
Tablo 2. % 3.5 Gliserol içeren grupların spermatolojik değerlendirmeleri.	25
Tablo 3. % 5 Gliserol içeren grupların spermatolojik değerlendirmeleri.	25

ÖZET

SENTETİK ANTİFRİZ PROTEİN CARBOXYLATED POLY-L-LYSİNE' İN TEKE SPERMASININ DONDURULARAK SAKLANMASINDA KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Arabacı B, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2025.

Amaç: Bu araştırmanın amacı yapay bir antifriz protein analogu olarak bilinen CPLL (Carboxylated Poly-L-lysine)'in teke sperması dondurmasında sulandırıcı içeriğinde gliserol miktarının azaltılması amacıyla kullanılma olanaklarının araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada sperma örneği almak amacıyla 5 baş cinsel olgunluğa ulaşmış 18-24 aylık yaşta, 45-55 kg canlı ağırlığında olan Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi çiftlik hayvanları ağılında bulunan Saanen tekeleri kullanılmıştır. Suni vajen yöntemi ile alınan dondurulabilir kalitede olan ($\geq 70\%$ motil oranına sahip spermatozoon içeren ve anormal spermatozoon oranı $\leq 20\%$) sperma örneklerinde çalışma yapılmıştır. % 3.5 gliserol ile % 0 - % 0.2 – % 0.5 CPLL içeren ve % 5 gliserol ile % 0 - % 0.2 - % 0.5 CPLL içeren sulandırıcı içeriklerinde çözüm sonucunda motilite, canlılık, morfoloji, prematüre akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranı ve membran bütünlüğü değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler istatistiksel analiz amacıyla SPSS[®] 22.0 programında One Way ANOVA Post Hoc Tukey testiyle analiz edilmiş olup veriler mean $\pm$ SEM şeklinde sunulmuştur. Anlamli farklılıklar $P < 0,05$ düzeyinde belirlenmiştir.

Bulgular: Yapılan çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizinde motilite, eosin-nigrosin ile canlılık, morfoloji, prematüre akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranı ve membran bütünlüğü oranlarında gruplar arasında anlamlı farklılıklar $P < 0,05$ saptanmamıştır.

Sonuç: Dondurma çalışmalarında gliserolün fazla kullanımının toksik etki yarattığı bilinmektedir. Yapılan çalışmada gruplar arasında istatistiksel farklılıkların ortaya çıkmamasına rağmen CPLL farklı kriyoprotektanlarla kombine edilmesi ihtimali halen mevcuttur, bu kombinasyonların her birinin fertilite düzeyleri üzerine etkisi de yeni araştırma konularının temelini oluşturabilir.

Anahtar kelimeler: CPLL, Dondurma, Sperma, Sulandırıcı, Teke.

ABSTRACT

USABILITY OF A SYNTETIC ANTRIFREEZE PROTEIN CARBOXYLATED POLY L-LYSINE FOR FROZEN STORAGE OF GOAT SPERM

Arabacı B, Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Reproduction and Artificial Insemination Program, Master Thesis, Aydın, 2025.

Objective: The aim of this study was to investigate the possibilities of using CPLL (Carboxylated Poly-L-lysine), which is known as an artificial antifreeze protein analogue, to reduce the amount of glycerol in the extender used in goat semen freezing.

Material and Methods: In this study, 5 sexually mature Saanen goats aged 18-24 months and 45-55 kg body weight, which were kept in the farm animals pen of Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, were used for semen collection. The study was performed on semen samples of freezable quality (containing $\geq 70\%$ motile spermatozoa and abnormal spermatozoa $\leq 20\%$) obtained by artificial vagina. In the extender containing either 3.5% glycerol with 0, 0.2, or 0.5 CPLL, or 5% glycerol added 0, 0.2, or 0.5% CPLL sperm samples were frozen and thawed at least 5 times. Sperm motility, viability, morphology, premature acrosome reacted sperm rate, and membrane integrity were evaluated. The data obtained were analysed by One Way ANOVA following Post Hoc Tukey test in SPSS© 22.0 programme for analysis and the data were presented as mean $\pm$ SEM. Significant differences were determined at $P < 0.05$ level.

Results: In the statistical analysis, no significant differences $P < 0.05$ were found between the groups in terms of motility, viability assessed by eosin-nigrosin staining, morphology, premature acrosome reacted sperm rate, and the membrane integrity..

Conclusion: It is well known that high glycerol concentrations in the extender may have toxic effects. Although no statistical differences were observed between the groups in the present study, the possibility of combining CPLL with different cryoprotectants still exists. Each of these combinations may form the basis for new research topics regarding their effects on fertility levels.

Keywords: CPLL, Extender, Freezing, Goat, Semen.

1. GİRİŞ

Son yıllarda, yardımcı üreme teknikleri sayesinde dondurularak saklanan spermanın önemi ortaya çıkmıştır. Kriyoprezervasyon, kan hücreleri, spermatozoon ve embriyolar gibi hücrelerin, deri ve kemik iliği gibi dokuların ve gıdaların uzun süreli depolanması için tıbbi bakım ve tarım dahil olmak üzere çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Uemura ve Ishiguro, 2015). Ülkemizde yapılan veri araştırmaları sonucunda TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) verilerine göre 2009’dan 2022 yılına kadar keçi-teke sayısında artma gözüksede artış hızı yavaşlamıştır (Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK], 2023). Bu azalmanın önüne geçmek amacıyla suni tohumlama yöntemleri uygulanmaktadır. Suni tohumlama uygulamasının doğal çiftleşmeye göre birçok avantajı vardır. Bunlar; genetik kaliteyi arttırmak ve yavrulara aktarmak, bir ejakülattan birden fazla tohumlama dozu elde etmek ve gebelik oranlarını artırmak olarak örneklenebilmektedir (Brinsko ve diğerleri, 1992). Dondurulması amaçlanan sperma örnekleri; saklama koşullarını iyileştirmek, spermaların alabileceği hasarı azaltmak, oluşabilecek şokları engellemek amacıyla çeşitli sulandırıcılar ve katkı maddeleri ile muamele edilip dondurma işlemine daha dirençli hale getirme çalışmaları yapılmaktadır. Bu sulandırıcı içerikleri farklı şekerler (Uçan, 2014) ve kriyoprotektan maddelerle desteklenip çözüm sonu spermatolojik kaliteyi arttırmaya ve gebelik oranını yükseltmeye çalışılmaktadır.

Hücrelerin dondurulması sırasında ekstraselüler solüsyon kendiliğinden ya da etkime yöntemi ile kristalleşir. Bu sırada intraselüler ortam hücre membranının etkisiyle henüz donma noktasına gelmemiştir. Bu olay sırasında ekstraselüler sıvının kristalleşmesi sebebiyle ortamda bulunan maddelerin yoğunluğunda yükselme gözlemlenir (Coşkun ve Karaca, 2016).

Kristalleşme endotermik bir olay olup, ortamda latent ısı dalgasını oluşturmaktadır. Sıvılardaki kristalleşmeyi takiben, donmamış fraksiyondaki fiziksel özellikleri değiştirir, oluşan gaz ortam viskozitesini artırır ve pH (Power of Hydrogen)’ de değişim yaparak hücrede ozmotik büzüşmeye ve polimerizasyona, membran lipid fazında değişimlere yol açar (Bucak ve Tekin, 2007). Bu sırada da hücre zarı strese maruz kalır. Bu duruma “solution effect” sıvı etkisi denir (Arı ve Yıldız, 2018).

Kriyoprotektan maddeler ortamdaki donmamış fraksiyonu arttırarak ve iyon miktarını azaltarak; soğuk şoku zararına, intrasellüler kristal oluşumuna, çözüm esnasında dekristalizasyona ve gelişen membransel destabilizasyona karşı koruyuculuk sağlayan

maddelerdir (Narlıçay ve Ataman, 2022). Ortamdaki donmamış fraksiyonu arttırarak ve ortamdaki iyon miktarını azaltarak koruyucu etkisini gösterirler (Bucak ve Tekin, 2007). Kriyoprotektan maddeler düşük molekül ağırlığı ve belirli oranda kullanıldığında toksik etkisi sınırlı olan kimyasal maddelerdir (Yavaş, 2008).

Teke spermasının yumurta sarısı veya süt içeren sulandırıcılarla sulandırılması, soğutma ve kriyoprezervasyonu sırasında sperma hücrelerinin kalitesi üzerinde zararlı bir etkiye sahip olabilir (Dorado ve diğerleri, 2007). Seminal plazmada fosfolipaz A olarak tanımlanan yumurta sarısı pıhtılaştırıcı enzimin varlığı, sperma sulandırıcılarında bulunan yumurta sarısı lesitini üzerinde bir lipaz aktivitesi sergiler (Sias ve diğerleri, 2005). Martínez-Pastor ve diğerleri (2019), % 4' lük gliserol içeren sperma sulandırıcısının içine yumurta sarısını farklı oranlarda (% 10 - % 15) ilave ederek çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmalar sonucunda çözüm sonunda % 10' luk yumurta sarısı ilave edilen sperma sulandırıcısındaki sperma hücrelerinin hızlarının daha yüksek olduğunu fakat morfoloji ve canlılık yönünden benzer sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Kriyoprotektan madde olan gliserol ozmotik basıncı yükselterek hücre içi sıvı çıkışını kolaylaştırarak koruma sağlar ve plazma membranın korunmasına yardım eder (Katkov ve diğerleri, 1998). Fakat sulandırıcı içeriğinde gliserolun kullanımının yararlı etkilerinin yanı sıra spermatozoonun membran yapısını değiştirmektedir (Yavaş, 2008) ve sulandırıcı içeriğinde yüksek oranda kullanılması hücreler üzerine zararlı bir etki oluşturmaktadır (Hammerstedt ve diğerleri, 1990).

Antifiriz proteinler (AFP' ler); modifiye buz kristallerinin geliştirilmesi, sıkılaşması ve yeni buz kristallerinin oluşmasını engellenmesinde rol alan, buz kristallerinin şeklini, büyüklüğünü değiştiren ve yeniden oluşmalarını kontrol eden, düşük sıcaklıklarda organizmayı soğuk çevre şartlarına karşı koruyan özel proteinlerdir (Yangılar ve Oğuzhan Yıldız, 2016).

Karboksillenmiş poly-L-lysine (CPLL); ε-poli-L-lizin (PLL) ve süksinik anhidritin sulu bir çözeltisinin sentezlenmesi ve sonrasında amino gruplarının % 65 molünün karboksil gruplarına dönüştürülmesiyle elde edilen amfolitik bir polimer bileşiğidir (Matsumura ve Hyon, 2009).

PLL solüsyonlarının hazırlanması ve biyosentezi Matsumura ve Hyon tarafından tanımlanmıştır (Matsumura ve Hyon, 2009).

Bu çalışmada amfolitik polimer yapısındaki antifriz protein analoğu poly-L-lysin ve süksinik anhidritin karışımı sonucu % 65 amino grubunun karboksil grubuna dönüşmesiyle sentezlenen CPLL (Matsumura ve Hyon, 2009) protein yapısında bir kimyasal ajandır. CPLL' in spermatozoon hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, teke spermasının kriyoprezervasyon işlemi sırasında sulandırıcı içeriğinde gliserol miktarının azaltılmasına olanak verebilir. Bu projenin amacı bu maddenin (CPLL) bu amaçla kullanılabilirliğinin belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Keçilerde Üreme

Keçiler mevsime bağlı poliöstrik gösteren hayvanlardır ve üreme sezonunda gebe kalmadıkları sürece sezon sonuna kadar östrüs gösterebilirler (İbiş ve Ağaoğlu, 2016). Puberta zamanında dişi hayvanlar ovum meydana getirirken erkek hayvanlarda spermatozoid oluşturmaktadır ve çiftleşme isteği gösterirler. Fakat puberta gösteren hayvanlar hemen damızlık için kullanılmaz böylece; puberta yaşı ile damızlıkta ilk kez kullanma yaşı farklıdır (Demir ve diğerleri, 2018).

2.1.1. Keçilerde Pubertas

Puberta dişilerin ilk ovulasyon ve östrüs göstermeye başladığı zamana denir (Foster ve Jackson, 2006).

Simplfcio ve diğerleri (1990), Brezilya Ulusal Keçi Araştırma Merkezinde yapılan bir çalışmada doğal şartlarda yetiştirilen 4 farklı keçi (Caninde, Marota, Moxotó, ve Repartida) ırkına ait sonuçlara bakıldığında, ırk farklılığının puberta yaşı ve puberta canlı ağırlığı üzerine bir etkisinin olmadığını söylemişlerdir. Prepubertal dişi oğlakların pubertasa ulaşmalarının genetik, ırk, beslenme, doğum zamanı, erkek hayvan varlığı, iklim koşulları, stres etkenlerinin varlığı veya yokluğundan etkilendiğini bildirmiştir. Araştırmacılar doğum zamanının, pubertasa ulaşma süresinde daha etkin bir faktör olduğunu söylemişlerdir (Aksu, 2023).

Pubertas, ilk ovulasyonla birlikte görülen östrüs ile başlamakla birlikte; hipofiz, hipotalamus ve ovaryumlardan salınan hormonlar tarafından kontrol edilir (Aköz ve diğerleri, 2015).

Waldron ve diğerleri (1999), Boer x Spanish ile Spanish dişi keçilerin plazma progesteron konsantrasyonuna bakarak ilk östrüs gösterme yaşını sırasıyla 7.7 ve 7.5 ay olarak bildirmişlerdir. Her iki keçi ırkının ilk östrüs gösterdikleri yaştaki canlı ağırlıkları 18 aylık ergin yaştaki canlı ağırlıklarının sırasıyla % 45 ve % 50 oranına denk geldiğini bildirmişlerdir. Aköz ve diğerleri (2015), keçilerin pubertas yaşını 5-10 aylık, yetiştirme olgunluğuna ise 9 - 15 aylık olduklarında eriştiklerini söylemiştir. Aksu (2023), ise optimal çevre koşullarında keçilerde pubertas yaşının 5 - 12 aylık sürece yayıldığını belirtmiştir. Yazıcı (2014), Saanen keçilerinde ilk damızlıkta kullanılma yaşının 6.6 - 12.2 ay arasında

değiştiğini ortalama 9.7 ay olduğunu söylemiştir ve Türk Saanen keçilerinin aşım sırasında ergin ağırlığının % 55.6' sına yani 34.5 kg' a ulaşmaları durumunda başarılı bir gebelik oluştuğunu söylemiştir.

Mevsimsel üreme zamanı Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) salınımı ile başlar. GnRH ise gün uzunluğunun kısalması ve alınan ışık miktarının azalmasıyla epifizden salgılanan melatonin hormonunun artmasıyla ve hipotalamustaki eminensiya mediyana uyarılarak nörosekrotik hücrelerden salınır (Aksu, 2023).

2.1.2. Tekelerde Reprodüktif Organ Özellikleri

Tekelerde çeşitli çevresel etmenler hipotalamusta GnRH üretimini sağlar. GnRH' nin hipofiz ön lobun uyarmasıyla Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) salgılanır. FSH ise erkek hayvanlarda sperma üretimini sağlar, Luteinizan Hormon (LH) ise testosteron salgılanmasını uyarır (İnce, 2011).

Testis ağırlığı ve skrotum çevresi sperma üretimini belirleyen özelliklerdendir. Tekelerde sperma verimi mevsim, ırk, yaş, beslenme gibi etkenlere göre değişiklik gösterir. Sperma hareketliliği kışın en az olup, sonbaharda sperma üretimi ve hareketliliği en yüksek seviyededir (Öziş ve Kaymakçı, 2003).

Testis, ergin tekelerde ortalama 100 - 150 g ağırlığındadır ve çiftleşme mevsiminde ağırlık maksimum seviyeye ulaşır. Testislerin iki ana görevi vardır; bunlardan birincisi erkek gamet üretimi (spermatozoon), ikincisi ise erkek üreme hormonlarının (androjenler) üretimidir (Kulaksız, 2009).

Tekelerin skrotumu seyrek ve kısa kıllara sahiptir ve testislerinin kranialinde rudimenter memeler bulunur. Testis ağırlıkları eşit değildir. Teke penisinde kavernoöz doku çok yoğun değildir. Sulkus uretralis korporis penis ventralden çok açık bir yarık ihtiva eder. Muskulus ischiokavernosus sivri ucu kaudovertrale dönük bir koniye benzer (Çalışlar, 1966).

Epididimis testislere yapışık olarak bulunur ve baş, gövde ve kuyruk bölümlerinden oluşur. Her epididimisin kuyruk kısmında 12 - 16 milyar spermatozoon depo edilir. Epididimisin spermatozoonların taşınması, yoğunlaşması, olgunlaşması ve depolanması görevleri vardır (Kulaksız, 2009).

2.1.3. Teke Spermasının Karakteristik Özellikleri

Erkek hayvanlar dişilere göre mevsimsel farklılıklardan daha az etkilenir. Fakat ırklar arasında ya da aynı ırk olan hayvanlar arasında spermatolojik değerlerde farklılıklar olabilmektedir (İnanç ve diğerleri, 2014).

Teke spermasında ejakülat miktarı az spermatozoon yoğunluğu fazla olması sebebiyle sperma kıvamlıdır ve spermatozoon sayısına bağlı olarak sulu kıvamdan koyu kıvama kadar değişkenlik gösterebilir (Kulaksız, 2009). Teke sperması beyaz ya da krem rengindedir. Saanen tekelerinde ejakülat miktarı 1.5 ml, spermatozoon motilitesi % 84.25, spermatozoon yoğunluğu 3.6×10^9 /ml, anormal spermatozoon oranı % 8.12, ölü spermatozoon oranı % 15.4 ve sperma pH değeri 6.7 olarak bildirilmiştir (İnanç ve diğerleri, 2014).

Karagiannidis (2000), Saanen tekelerde ejakülat miktarını 1.15 ml, sperma konsantrasyonunu 3.63×10^9 /ml, motil spermatozoon oranını % 64.40, anormal spermatozoon oranını % 8.41 olarak bildirmiştir.

2.2. Spermanın Alınması

Tekelerden sperma alınması için birçok yöntem geliştirilse de genellikle elektroejakülatör ve suni vajen yöntemi kullanılmaktadır. Bunun yanısıra en sık kullanılan yöntem suni vajen yöntemidir (Tekin, 1996).

2.2.1. Elektroejakülatör Yöntemi

Elektroejakülatör yöntemiyle spermanın alınması elektrik akımı yöntemiyle gerçekleşir. Hayvanın bel ve sağrı bölgesinden kök alan ve genital organlara giden sinirlerin elektrik akımıyla uyarılması sonucu ereksiyon ve ejakülasyon sağlanır (Aral ve Aral, 2004).

Sperma üç elektrotlu rektal problu elektroejakülatörün kayganlaştırılarak rektuma yerleştirilmesinden sonra aralıklarla verilen elektrikselsel uyarımlarla 8-16 voltaj aralığında, 1-2 saniyelik periodlar ile 0.5-2 saniye boyunca alınır ve direkt gün ışığından ya da soğuk şokundan korunması amacıyla en fazla 10 dakika içinde değerlendirmeye alınmalıdır (Üstüner ve Günay, 2009; Napolitano ve diğerleri, 2020). Aralıklarla verilen güç her 2 ila 3 saniyede bir frekansın geri sıfıra düşürülmesi ile oluşturulur (Memon ve diğerleri, 1986).

2.2.2. Suni Vajen Yöntemi

Çiftleşme dönemi içinde olan kızgın keçilere tekeler atlatılarak suni vajen (SV) ile sperma alınır. Eğer sezon dışında ise keçilere IM (Intramuskuler) yolla östrojen verilerek

tekelerin keçilere atlatılması sağlanır (Tekin, 1996). Suni vajen ile sperma almak için erkek hayvanları suni vajene önceden alıştırmış olması gerekir (Ömür ve Akarsu, 2022). Suni vajen yöntemi; ejakülasyon olan tüm spermanın kolay ve temiz şekilde alınması, erkeklerde strese neden olmadığı ve basit bir yöntem olmasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Konyalı, 2020).

Suni vajen hazırlığı için sıcak su yardımıyla iç sıcaklık 39 °C' ye ayarlanır. Hava ile yeterli basınç sağlanır ve kayganlık sağlanma amacıyla jöle, jel ya da kayganlaştırıcı kullanılmalıdır (Memon ve diğerleri, 1986). Kısaca suni vajen için uyarıcı özellikte sıcaklık, basınç ve kayganlık olmak üzere üç temel özellik vardır (Ömür ve Akarsu, 2022).

Spermayı toplayacak kişi hangi elini kullanıyorsa hayvanın aynı yönünde durarak hazırda bekler. Dişi hayvan zapt edilerek erkek hayvanın koklamasına izin verilir. Erkek hayvan tam dişi hayvanın üzerine aşım yapacağı sırada erekte olmuş penis suni vajene yönlendirilir. Erkek hayvan suni vajene aşım yaptıktan sonra spermalar suni vajenin ucunda bulunan toplama kadehine akar. Bu sırada sperma kaybını önlemek amacıyla suni vajen nazıkçe geri çekilir ve toplama kadehinde olan spermalar 37 °C' de işleme almak üzere kısa süre saklanır (Dowsett ve Pattie, 1980; Yamashiro ve diğerleri, 2007).

Suni vajen ve elektroejakülatörle sperma alma tekniklerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda elektroejakülatörle alınan sperma hacminin suni vajenle alınana göre daha fazla olduğu, sperma yoğunluğunun ise daha düşük bulunduğu belirtilmektedir (Memon ve diğerleri, 1986). Sperma alma yöntemleri üzerinde çalışan Tiwari ve Sahni genel olarak suni vajen ile alınan spermaların elektroejakülatör yöntemi ile alınan spermalardan daha kaliteli olduğunu bildirmişlerdir (Aral ve Aral, 2004).

2.3. Spermanın Saklanması

Spermalar kısa süreli veya dondurularak (uzun süreli) iki farklı yöntemle saklanabilmektedir. Sperma örnekleri saklanmak istendiğinde çeşitli sperma sulandırıcıları kullanılarak saklanır.

Spermatozoonlar pH değişikliklerine karşı tolerans aralıkları düşük olduğundan sulandırıcıların buffer (tampon) özelliklerine sahip olmaları gerekir (Kulaksız, 2009).

Teke spermasının dondurulmasında yağsız süt tozu, sodyum sitrat - glukoz - yumurta sarısı, laktoz - yumurta sarısı, raffinöz - yumurta sarısı, spermasol - yumurta sarısı, Tris -

yumurta sarısı gibi pek çok sulandırıcılarla birlikte gliserol kullanıldığı bildirilmektedir (Üstüner, 2009). Tris en yaygın kullanılan tampon maddelerdendir (Kulaksız, 2009).

Sulandırıcı içeriğinde spermatozoonların enerji ihtiyacını karşılamaları amacıyla glukoz, fruktoz, mannoz ve arabinoz gibi şekerler ilave edilir (Kulaksız, 2009).

Spermalar soğutulurken veya dondurulurken sıvı-katı ilişkisinden kaynaklanan ve buz kristallerinin oluşmasından kaynaklanan olumsuz etkilere maruz kalır (Arı, 2018). Kriyoprotektan maddeler; soğutma, dondurma, çözündürme sırasında oluşan fiziksel, kimyasal, oksidatif stres ve bunlardan oluşan ısı şoku, ozmotik değişim ve kristal oluşumunu azaltmak amacıyla kullanılan maddelerdir (Chen ve diğerleri, 1993; Ball ve diğerleri, 2001).

2.3.1. Spermanın Kısa Süreli Saklanması

Kısa süreli saklanması istenilen teke sperması 4 °C' den 25 °C' ye kadar farklı sıcaklıklarda saklanabilmektedir. Düşük sıcaklıklarda saklanması düşünülen teke spermasının ani ısı değişimlerine maruz kalacağı unutulmamalıdır (Arı, 2018). Hayvanlardan alınan sperma örneklerinin sağlıklı bir şekilde muhafaza edilebilmesi için uygun ortamın oluşturulması ve kaliteli sperma sulandırıcıları ile muamele edilmesi gerekmektedir. Kaliteli sperma sulandırıcıları spermatozoonlar için gerekli enerjiyi sağlamalı, oluşabilecek bakteriyel üremeyi kontrol etmeli ve soğuk şokuna karşı spermatozoonları korumalıdır (Özcan, 2019).

2.3.2. Spermanın Dondurularak Saklanması

Dondurma yöntemi uzun süreli sperma saklama amacıyla sıvı azot içerisinde -196 °C' de depolanma prensibine dayanmaktadır (Özcan, 2019).

Bazı hücreler soğuma hızıyla orantılı olarak hızla soğutulduğunda zarar görür, bu yüzden soğuk şok etkisini azaltmak için donmadan önce uzun bir soğutma süresine ihtiyaç duyar (Watson, 2000).

Sulandırılmış teke sperması 4 – 5 °C' de 1,5 - 4 saat ekilibrasyona bırakıldıktan sonra payet şeklinde dondurma işlemine alınabilir (Leboeuf ve diğerleri, 2000). Sulandırılmış spermalar payetlere çekildikten sonra yatay olarak sıvı azotun 4 - 5 cm üzerinde sıvı azot buharında 7-8 dakika tutulur ve bu sürenin sonunda sıvı azota daldırılır (Leboeuf ve diğerleri, 2000).

Dorado ve diğerleri (2007), önceden ısıtılmış (37 °C) steril cam şişelerde spermalar sperma sulandırıcıları ile sulandırıldıktan sonra örnekler 5 - 10 dakika inkübe edilip 5 °C olan

soğuk kaba yerleştirilmiştir. 5 saatlik soğutmadan sonra spermalar payetlere çekilip uçları otomatik kapatma makinası ile kapatılıp payetler sıvı azotun 5 cm üzerinde 20 dakika süreyle bekletilerek donmasını sağlanmışlardır. Donan payetler sıvı azota daldırılarak saklamaya alınmıştır.

Shi ve diğerleri (2014), yaptıkları çalışmada sperma dondurma işleminde payetlere çekilen spermalar oda sıcaklığından 4 °C' ye 2 saat boyunca sıcaklığın kademeli düşmesi sağlandıktan sonra 2 saat boyunca 4 °C' de bekletilerek ekilibre edilmesini sağlamışlardır. Daha sonra soğuyan payetlerin sıvı azotun 4 cm üstünde yatay olarak 10 dakika boyunca bekletilerek donması sağlanmıştır. Donmuş payetler kullanılana kadar sıvı azotta bekletilmiştir.

Martín ve diğerleri (2023), yaptıkları çalışmada ultra hızlı dondurma işlemi uygulamışlardır. Bu işlemde 50 µl/damla olacak şekilde yaklaşık 11 cm yükseklikten doğrudan sıvı azot (-196 °C) içerisine damlatmışlardır. Donma işleminin yaklaşık 20 saniyede tamamlandığı bildirilmiştir.

Teke spermasında; çözüm sonrası maksimum motilite ve akrozom bütünlüğü elde etmek amacıyla seminal plazmanın ayrılması gerektiğini belirten çalışmalar olduğu gibi spermanın yıkanmadan dondurulmasında pozitif sonuçlar elde edildiği çalışmalar da bulunmaktadır (Üstüner, 2009).

2.4. Teke Spermasının Çözdürülmesi

Çözdürme işlemi için her bir payet 30 saniye boyunca 39 °C' lik su banyosuna daldırılarak çözdürme işlemi yapılmaktadır (Dorado ve diğerleri, 2007). Payetler kullanılmak istendiğinde sıvı azotun içinden çıkartılıp 1 - 2 dakika su banyosuna (37 °C) konularak çözülmesini sağlamışlardır (Shi ve diğerleri, 2014). Payetlerde dondurulan sıvı azot içinde saklanan spermaların çözdürülmesi için en iyi gebelik oranlarını sağlayacak çözdürme şekli 37 °C' de 30 saniye olarak kabul edilmiştir ve saha koşullarında yapılan suni tohumlamada bu yöntemin daha uygun olduğu görülmüştür (Kulaksız, 2009).

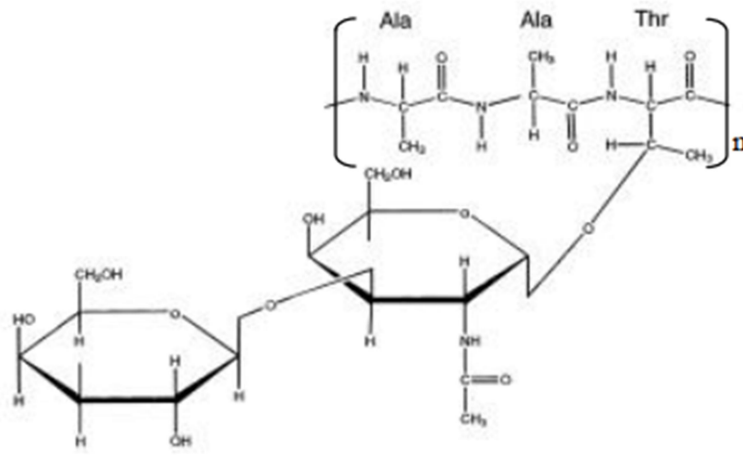
2.5. Antifiriz Proteinler Hakkında Genel Bilgiler

2.5.1. AFP' nin Molekül Yapısı

AFP' ler dondurucu sıcaklıklarda hayatta kalabilmek için çeşitli organizmalar tarafından sentezlenir (Melnik, 2022). Buzullarda yaşayan balıkların soğuk okyanuslarda yaşamlarını

sürdürmelerinin sebebi glikoprotein yapıda antifriz moleküler salgılamalarıdır (Bektaş, 2007). AFP' ler ilk kez donmuş denizlerde yaşayan balıkların kanında keşfedilmiştir (Crevel, 2002).

AFP' lerin yapısına bakıldığında; glikopeptid yapıda olup her biri üç amino asitlik bir peptid zincirinin üçüncü amino asidine kovalan bağlarla bağlanmış bir disakkarit molekülünden oluşan birimlerin tekrar etmesiyle oluşur (Bektaş, 2007). Antifriz proteinler genel bir molekül yapıya sahip değildir fakat bununla birlikte balıklarda beş farklı antifriz protein belirlenmiştir (Yangılar ve Oğuzhan Yıldız, 2016).



Şekil 1. Antifriz proteinlerde ortak monomer yapı (Bektaş, 2007).

AFP' lerin önemli bir rolü, erime işlemi sırasında ve sıcaklık döngüsü sırasında donmuş halde buzun yeniden kristalleşmesini engellemektir. Buzun yeniden kristalleşmesi, toplam yüzey enerjisini en aza indirmek için daha büyük buz kristallerinin küçük olanlara göre daha tercihli olarak büyümesi olgusunu ifade eder. Küçük buz kristalleri bir araya gelerek boyutlarını önemli ölçüde artırır ve hücrelerde fiziksel hasara neden olur. Buzun yeniden kristalleşmesinin inhibisyonu, hücrelerin ve dokuların kriyoprezervasyonunda kristal boyutunun kontrolünde önemlidir (Sreter, 2022). Melnik ve Finkelstein (2022) yaptıkları çalışmada AFP' lerin organizmada oluşmuş olan buz kristallerine bağlanmak ve büyümelerini durdurmaktan ziyade, buz çekirdeklerinin oluşabileceği yüzeylere bağlanmak ve böylece aşırı soğutulmuş su veya biyolojik sıvıda buz oluşumunu engellediğini ifade etmişlerdir.

2.5.2. AFP' ler Hakkında Yapılan Bazı Çalışmalar

Koç spermalarının dondurma işleminde AFP kullanan Payne ve diğerleri (1994), çözündürme sonunda hareketli spermatozoon yüzdesinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttırdığını ($P < 0,05$) bildirmişlerdir.

Payne ve Young (1995), kuzulara kesim öncesi AFP uygulamasının, etlerin çözüldükten sonra kuzu eti kalitesi üzerindeki etkisini araştırmışlardır.

Şempanze sperması üzerinde AFP' lerin spermatozoonların motilite, membran bütünlüğü ve akrozom reaksiyonu üzerine olan etkisini araştıran Younis ve diğerleri (1998), çözüm sonu spermatozoon hareketliliğini, plazma membran bütünlüğünü ve akrozom bütünlüğünü önemli ölçüde arttırdığını ($P < 0,05$) söylemişlerdir.

Anarhichas lupus balık türünün düşük su sıcaklarına maruz kaldığında yüksek konsantrasyonlarda plazma AFP üretme kapasitesine sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla ilgili çalışma yapılmıştır. Sonucunda bu balık türünün düşük sıcaklıklarda yüksek seviyelerde AFP ürettiğini görmüşlerdir (Desjardins ve diğerleri, 2007).

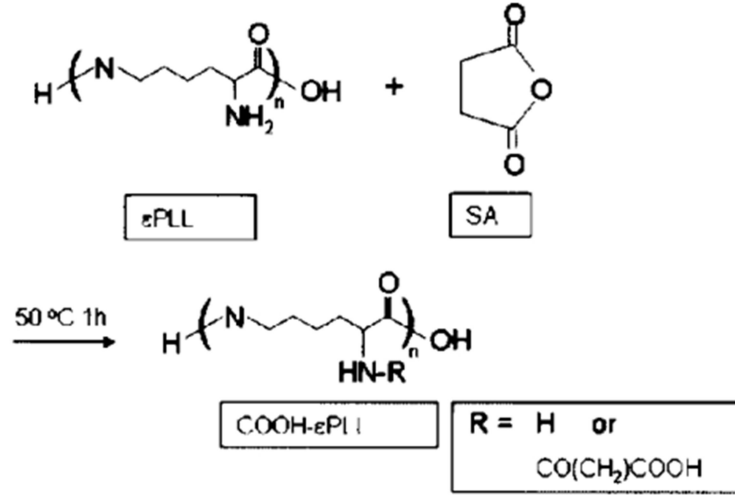
Martínez-Páramo ve diğerleri (2009), kriyoprotektif etki analizi yapmak amacıyla AFP' leri protein içeren ortamda inkubasyon yoluyla zebra balığı embriyolarına vermişlerdir. AFP içeren blastomer kriyoprezervasyon denemelerinde dondurma sonrasında canlılıkta önemli bir artış olduğunu tespit etmiş olup embriyo kriyoprezervasyonu için daha ileri bir protokolde kullanılmasını teşvik etmişlerdir.

Hawes ve diğerleri (2014) *Gomphiocephalus hodgsoni* balığından 9 kDA molekül ağırlığına sahip AFP' leri izole etmişlerdir. Sonuç olarak kromatografik ayırma tekniklerine gerek duymadan izole etmenin mümkün olduğunu bildirmişlerdir.

Tavşan spermatazoon hücrelerinin ve embriyoların dondurma işlemi sırasında AFP III ilavesinin etkilerinin araştırılması sonucunda; dondurma ve çözüm sonu hareketli sperma sayısını ve embriyonun hayatta kalma oranını arttırdığını söylemişlerdir (Nishijima ve diğerleri, 2014).

2.6. CPLL Hakkında Genel Bilgiler

2.6.1. CPLL' in Molekül Yapısı



Şekil 2. COOH-PLL sentezi ve kriyoprezervasyon özellikleri, PLL süksinilasyon reaksiyonun şematik gösterimi (Matsumura ve diğerleri, 2010).

CPLL, amino gruplarından % 65 amino grubunun karboksil grubuna dönüşmesiyle sentezlenen amfolitik polimer bileşiğidir (Fujikawa T. ve diğerleri, 2017). Jin ve diğerleri (2013), CPLL' nin dondurma/çözülme sırasındaki kriyoprezervatif etkisini incelediğinde % 25 (w/v) konsantrasyonda fibroblast hücreler için toksik olmadığını, % 7.5 (w/v) CPLL içeren ortamda hücre morfolojisini koruduğunu bildirmişlerdir. Matsumura ve Hyon (2009), CPLL' nin hücre membranından geçerek AFP' lere benzer bir şekilde membran korumasında çalışabileceğini öne sürmüşlerdir. Matsumura ve Hyon CPLL kullanımının donma önleyici protein benzeri aktivitelerle donma ve çözünme sırasında su kristallerinden kaynaklanan hasar riskini azalttığını bulmuşlardır (Watanabe ve diğerleri, 2013).

2.6.2. CPLL Hakkında Yapılan Bazı Çalışmalar

İlk olarak Matsumura ve Hyon 2009 yılında L929 hücreleri ve rat kemik iliği mazenkimal kök hücreleri üzerinde % 10 fetal bovine serum (FBS) ile destekleyip kültür elde etme çalışması yapmışlardır.

Jin ve diğerleri (2013), CPLL' nin dondurma/çözülme sırasındaki kriyoprotektif etkisini incelediğinde % 25 (w/v) konsantrasyonda fibroblast hücreler için toksik olmadığını, % 7.5 (w/v) CPLL içeren ortamda hücre morfolojisini koruduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen

verilere göre CPLL' nin iyi bir kriyoprotektan olduğu; hücre nakli, doku mühendisliği ve tıp alanında kullanılması amacıyla memeli hücrelerinde tekrarlanan dondurma/çözdürme döngülerine karşı koruma ve hücre muhafazası için uygun olduğunu söylemişlerdir.

CPLL' nin oositler üzerinde etkisini araştırmak isteyen Watanabe ve diğerleri (2013), çalışmalarını sonucunda vitrifiye oositlerin in vivo gelişiminin önemli derecede iyileştirdiğini görmüşlerdir. Bunun sonucunda, CPLL' nin kullanımı vitrifikasyonun görünmez hasarlarının azaltılabileceği sonucuna ulaşmışlardır. Bu etkinin blastosist aşamasının ötesinde in vivo gelişim kabiliyetinin artmasına katkıda bulunabilir sonucuna varmışlardır. Fakat tek başına CPLL kullanımının hayatta kalma ve gelişim oranlarını arttırmamıştır. Bu durumda CPLL' nin tam anlamıyla koruma sağlamadığı, düşük de olsa membran geçirgenliğini arttırdığı görülmüş fakat daha fazla çalışma yapılması gerektiğini öne sürmüşlerdir (Watanabe ve diğerleri, 2013).

Fujikawa ve diğerleri (2017), CPLL kullanılan sığır hücrelerinde yaptıkları çalışmalarda, fibroblast ve kumulus hücrelerinde canlılık oranlarına bakmışlardır. Çözüm sonu fibroblast hücrelerinde, % 5 CPLL' nin canlılığı arttırdığını bulmuşlardır. Sonuç olarak CPLL' nin sığır hücreleri için kriyoprotektan madde olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Fare ve domuz oositi üzerinde Kamoshita ve diğerleri (2017) çalışmalar yürütmüşlerdir. Yapılan çalışmada, CPLL' nin fare oositleri için koruyuculuğunu yetersiz bulmuşlardır. Hayatta kalma kabiliyetinin etkilendiği ve geçirgenliğin fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Fakat domuz embriyosunda vitrifikasyonda başarı sağlanmıştır. Bunun sonucunda koruyuculuğun türler arasında değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Ek olarak domuz embriyolarının vitrifiye edilmesinde CPLL' nin olumlu etkilerinden biri de membrana bağlanarak kristalleşme ve yeniden kristalleşmeyi engelleyerek membranı korumak olarak açıklamışlardır.

% 30 yumurta sarısı içeren vitrifikasyon solüsyonuna % 20 CPLL ilavesi yapıldığında, izole edilmiş fare pankreas adacıklarının çözüm sonrası canlılık oranı yükselmiştir (Nakayama ve diğerleri, 2019).

Akhter ve diğerleri (2020); boğa sperması dondurma işleminde kullanılan sperma sulandırıcı içeriklerine farklı oranlarda CPLL ekleyerek çalışma yapmışlardır. İstatistiksel sonuçlara göre; sperma sulandırıcısına eklenen CPLL olumlu sonuçlar vermiştir. Sperma

sulandırıcısına CPLL ilave edilmesi oksidatif stresi azaltarak spermanın dondurulabilirliğini yükseltmiştir.

Tavşan sperma sulandırıcısında CPLL ve dimetil sülfoksit (Me_2SO) kombinasyonları ile çalışma yapan Küçük ve diğerleri (2021), sulandırıcı içeriğine Me_2SO ile CPLL ilavesinde DNA bütünlüğünün daha iyi olduğunu görmüşlerdir. Sonucunda DNA bütünlüğünün korunması üzerinde CPLL ve Me_2SO arasında önemli bir etkileşim tespit etmişlerdir.

Yunus spermasında yapılan çalışmada; % 0.5 - 1 - 2 ve 3 CPLL içeren sperma sulandırıcıları ile spermalar muamele edilmiştir. Kısa süreli saklanan spermalarda 37°C ' de sonuçlara bakmışlardır. Çıkan sonuçlar ışığında sperma sulandırıcı içeriğinde CPLL kullanımı olumlu sonuçlar vermiştir. Sperma hareketliliği ve sperma kalitesi açısından en iyi sonuç % 1' lik CPLL sulandırıcı içeriğinde bulunmuştur (Shimizu ve diğerleri, 2022).

Teke spermasında çalışma yapan Zhang ve diğerleri (2023) farklı olarak bu çalışmada teke spermasının kriyoprezervasyon işlemi sırasında sulandırıcı içeriği olarak gliserol miktarını azaltarak CPLL' in farklı oranlarının kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan sperma sulandırıcılarına eklenen CPLL yüzdeleri sırasıyla % 0 - 0.5 - 1 - 1.5 ve 2 olarak belirlemişlerdir. Çözüm sonunda sperma hareketliliğinde, akrozom ve membran bütünlüğü, mitokondriyal hücre potansiyeli (mitokondriyal aktivite) yüzdeliklerini karşılaştırdıklarında elde edilen veriler ışında en yüksek spermatolojik parametrelerin % 1 CPLL ilavesi içeren sulandırıcı ile elde edildiği bildirmişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Kurgusu

Bu çalışmada sperma örneği almak amacıyla 5 baş cinsel olgunluğa ulaşmış 18 - 24 aylık yaşta, 45 - 55 kg canlı ağırlığında olan Saanen tekeleri kullanıldı. Bu tekeler her gün beslenip ad libitum su verildi. Toplanan spermalar ayrı toplama kadehlerinde mikroskopik ve makroskopik muayeneleri yapıldı. Toplanan spermalarda motilite muayenesi sonucunda motilite oranı % 70 ve üzerinde, ve anormal spermatozoon oranı % 20 ve altında olan sperma örnekleri çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan sperma örnekleri önceden ısıtılmış 37 °C' de olan su banyosunda bekletilen içi kuru deney tüpünde otomatik pipet yardımıyla eşit olarak birleştirildi. Daha sonra her biri eşit hacimde sperma olacak şekilde 6 deney tüpüne bölüştürüldü. Bölüştürülen sperma örnekleri daha önceden hazırlanan 6 farklı sulandırıcı içeriği ile karıştırılıp sulandırıldı.

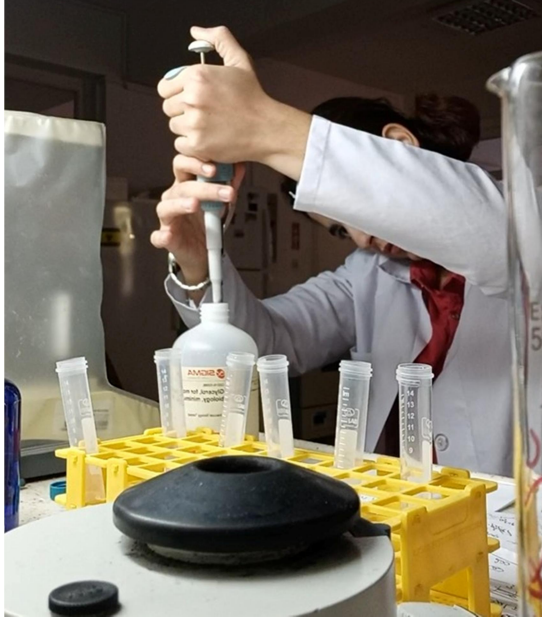
3.2. Yöntem

3.2.1. CPLL Solüsyonunun Hazırlanması

Üretimi Matsumura ve Hyon (2009) tarafından tanımlanmış olan CPLL anabilim dalımız tarafından Japonya' dan temin edilmiştir.

3.2.2. Deney Gruplarının Belirlenmesi ve Dondurulması

Tris 300mM, sitrik asit 95mM, glikoz 28mM, % 15 yumurta sarısı, 100.000 IU/100ml penisilin, 100 mg/100ml streptomisin içeren sulandırıcı solüsyonu temel sulandırıcı olarak hazırlandı ve CPLL gliserol oranlarına göre Tablo 1' deki deney grupları oluşturuldu. Sulandırıcı içerikleri her gruba eklendikten sonra toplam hacim 5 ml'ye tamamlanacak şekilde distile su eklendi. Hazırlanan sulandırıcı içerikleri +4 °C' de buzdolabında iki hafta boyunca saklandı ve iki haftada bir taze sulandırıcı içeriği hazırlandı. Hazırlanan sulandırıcılar sperma örnekleri ile kademeli olarak karıştırılmadan önce, daha önceden 37 °C' ye ayarlanmış su banyosunda bekletilerek ısınması sağlandı ve kullanıma hazır hale getirildi.



Resim 1. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Laboratuvarında sperma sulandırıcısı hazırlama aşaması.

Tablo 1. Deney gruplarında sulandırıcı kompozisyonları.

1.Grup (Kontrol Grubu)	Tris – Sitrik Asit – Glikoz – Antibiyotik - %15 Yumurta Sarısı	% 3.5 Gliserol	% 0 CPLL
2. Grup	Tris – Sitrik Asit – Glikoz – Antibiyotik - %15 Yumurta Sarısı	% 3.5 Gliserol	% 0.2 CPLL
3. Grup	Tris – Sitrik Asit – Glikoz – Antibiyotik - %15 Yumurta Sarısı	% 3.5 Gliserol	% 0.5 CPLL
4. Grup (Kontrol Grubu)	Tris – Sitrik Asit – Glikoz – Antibiyotik - %15 Yumurta Sarısı	% 5 Gliserol	% 0 CPLL
5. Grup	Tris – Sitrik Asit – Glikoz – Antibiyotik - %15 Yumurta Sarısı	% 5 Gliserol	% 0.2 CPLL
6. Grup	Tris – Sitrik Asit – Glikoz – Antibiyotik - %15 Yumurta Sarısı	% 5 Gliserol	% 0.5 CPLL

1:5 (Sperma:Sulandırıcı) olacak şekilde kademeli olarak sperma örnekleri 37 °C’ de sulandırıldı. Sulandırılan sperma örnekleri 0.25 ml’lik payetlere doldurulup açık olan kısmı hava almayacak şekilde ısı ile kapatıldıktan sonra programlanmış inkübatör cihazı içerisinde 140 dakika sürede kademeli olarak sıcaklığın 37 °C’ den 4 °C’ ye düşüp soğuması beklendi.

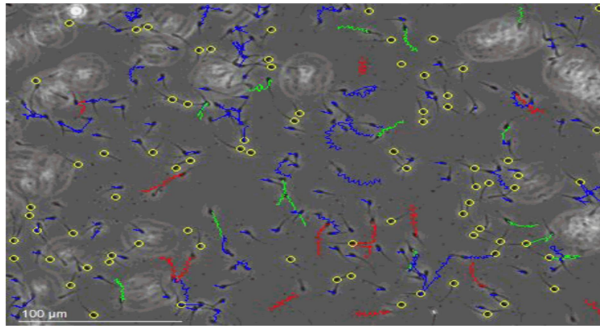
Soğuyan sperma örnekleri sıvı azot buharında dondurularak (sıvı azottan 5 cm yükseklikte 7 dakika bekleme süresi) spermatolojik değerlerin incelenmesine kadar sıvı azot içeren azot tankında saklandı. Sperma dondurma çalışmaları en az 6 kez tekrarlandı.

3.2.3. Spermatolojik Değerlendirmeler

Payetler içerisinde dondurulup saklanan sperma örnekleri 37 °C' lik su banyosunda 30 saniye süresince çözölmeye bırakılıp, çözölen sperma örnekleri payetlerden steril ependorf tüpüne aktarıldı. İki haftada bir hazırlanmış her grubun dondurulma sırasında kullanılan kendi sulandırıcısı ile 1/3 oranında (Sperma/Sulandırıcı) olacak şekilde kademeli olarak sulandırıldı ve ayrı bir steril ependorf tüpünde spermatolojik değerlendirme için kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.3.1. Motilite Muayenesi

Kullanıma hazır halde ependorf tüpünün içinde bulunan sperma örneklerinden 3 µl sperma örneği çekilip ısıtma tablalı (37 °C) faz-kontrast mikroskopta x10 büyütmede en az 5 farklı alan taranarak CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) programı (Microptic, İspanya) yardımıyla motilite tayini yapıp bulunan ortalama değer yüzdelik (%) olarak ifade edildi.

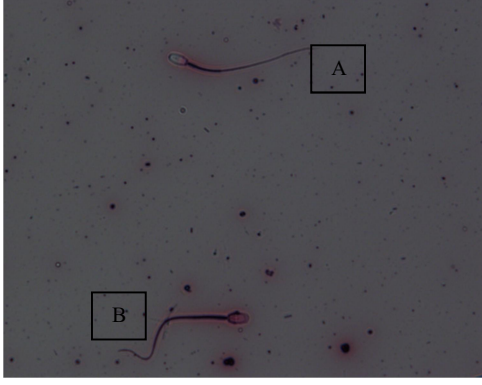


Kırmızı: Progresif
Yeşil: Medium Progresif
Mavi: Non Progresif
Sarı: Immotil

Resim 2. Faz-kontrast mikroskopta x10 objektifte CASA programında spermatozoonların mikroskobik görüntüsü.

3.2.3.2. Ölü-Canlı Muayenesi

Canlı hücrelerin tespiti için eosin/nigrosin boyaması kullanıldı. Bu amaçla kullanıma hazır halde ependorf tüpünün içinde bulunan spermadan 3 µl örnek alınıp lam üzerine damlatılıp yanına da 3 µl eosin/nigrosin boyası damlatıldı. Lamel ile karıştırılarak ayrı bir lam üzerine froti çekilip ışık mikroskopunda incelemesi yapıldı. Boya alanlar ölü, yarı boyalı ve boya almayanlar canlı hücre olarak sayılıp (Öztürk ve diğerleri, 2019) sonuçlar yüzde (%) ile ifade edildi.



- A) Boya almayan canlı hücre
B) Boya alan cansız hücre

Resim 3. Işık mikroskobunda eosin-nigorsin ile boyanmış spermaların canlı (A) ve ölü (B) ayrımı.

3.2.3.3. Anormal Spermatozoon Oranı

Sperma numunelerindeki anormal spermatozoon oranı sıvı fikzasyon yöntemiyle belirlendi. Bu yöntemde Hancock solüsyonu (Hancock, 1952) kullanılarak, 990 µl Hancock solüsyonu 10 µl sperma örneği, 5 dakika süresince fikse edildikten sonra faz-kontrast mikroskop altında morfolojik olarak incelendi. x40 büyütmede en az 200 spermatozoonun çeşitli kısımlarının (akrozom, baş, orta kısım ve kuyruk) incelenmesi sonunda anormal yapı gösteren spermatozoon sayıları belirlenerek yüzde (%) olarak ifade edildi.

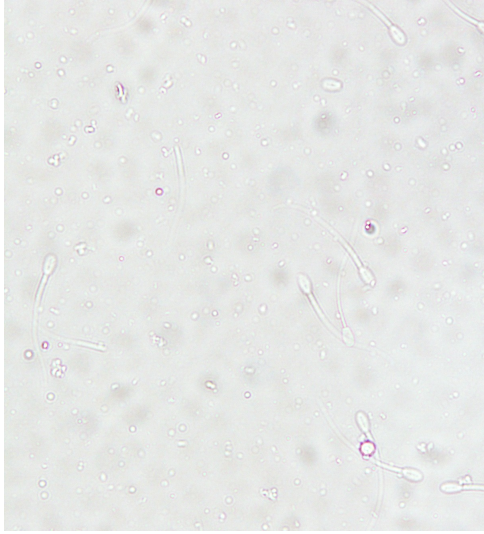


Resim 4. Faz-kontrast mikroskopta x40 büyütmede kuyruğa bağlı (A), başa bağlı (B) bozuklukların ve normal (C) mikroskobik görüntüsü.

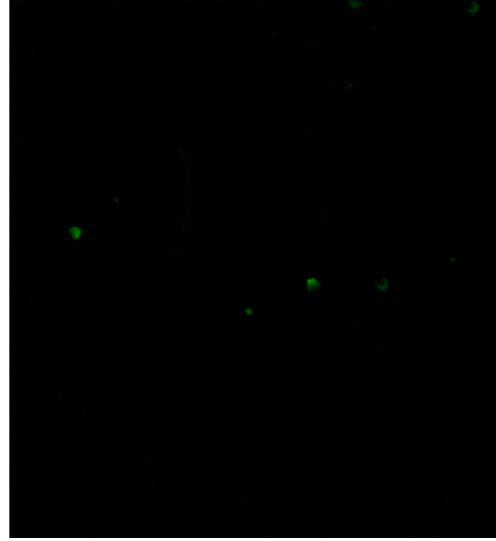
3.2.3.4. Prematüre Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatozoon Oranı

Prematüre akrozom reaksiyonu geçiren hücreleri belirlemek amacıyla FITC-PNA (fluorescein-labelled lectin from the peanut plant, *Arachis hypogaea*) boyama yöntemi kullanıldı. Bu amaçla kullanıma hazır halde ependorf tüpünün içinde bulunan spermadan 50 µl örnek alınıp üzerine 5 µl FITC ilave edilip 37 °C ' de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda stokta bulunan 5 µl fiksatif eklenerek florasen mikroskopta inceleme

yapılıp toplamda 200 hücre sayıldı. Hiç floresan vermeyen hücreler akrozom reaksiyonu geçirmemiş, yeşil floresan veren hücreler akrozom reaksiyonu geçirmiş olarak sayılıp (Hernández ve diğerleri, 2012) sonuçlar yüzde (%) ile ifade edildi.



(A)

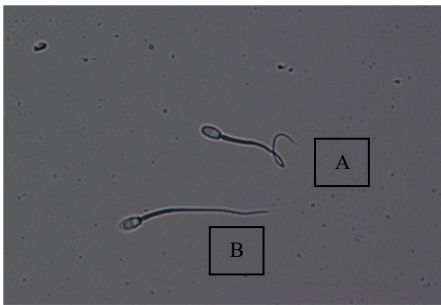


(B)

Resim 5. FITC ile boyanmış spermatozoonların ışık mikroskopundaki (A) ve floresan mikroskopundaki (B) görüntüsü.

3.2.3.5. Membran Bütünlüğü

Spermatozoon membran bütünlüğünün belirlenmesi için HOS testi uygulandı. Bu amaçla Jeyendran ve diğerleri (1984) tarafından belirtilen yöntemden yararlanıldı. 25 µl sperma örnekleri önceden 100 mOsm/l ye ayarlanmış 475 µl fruktoz solüsyonu içerisinde 15 dakika 37 °C’ de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 3 µl örnek alınıp preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatlardan toplam 200 hücre sayılıp, kıvrık kendi üzerine katlanmış kuyruklu spermatozoonlar membran bütünlüğüne sahip olarak kabul edildi. Çıkan sonuçlara göre ortalama değer alınıp yüzde (%) ile ifade edildi.



A) Kıvrılmış kuyruk membran bütünlüğüne sahip

B) Düz kıvrılmamış kuyruk membran bütünlüğüne sahip olmayan

Resim 6. 100 mOsm/l ye ayarlanmış fruktoz solüsyonunda bekletilmiş spermaların mikroskopik görüntüsü.

3.2.3.6.İstatiksel Analiz Yöntemi

Kontrol ve CPLL gruplarından elde edilen spermatolojik değerlerin istatistiksel analizleri için SPSS[®] 22.0 (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanıldı. Her grup için parametrelerin ortalama ve standart hataları hesaplandı ve kolmogorov smirnow testi ile kontrol edildi. Normal dağılım göstermeyenlerde log dağılımı kullanıldı ve kontrol edildi. Anlamlı farklılıklar $P < 0,05$ düzeyinde kullanıldı. Bütün değerler çalışma boyunca One-Way ANOVA Post Hoc Tukey testiyle analiz edilip $\text{mean} \pm \text{SEM}$ şeklinde sunuldu.

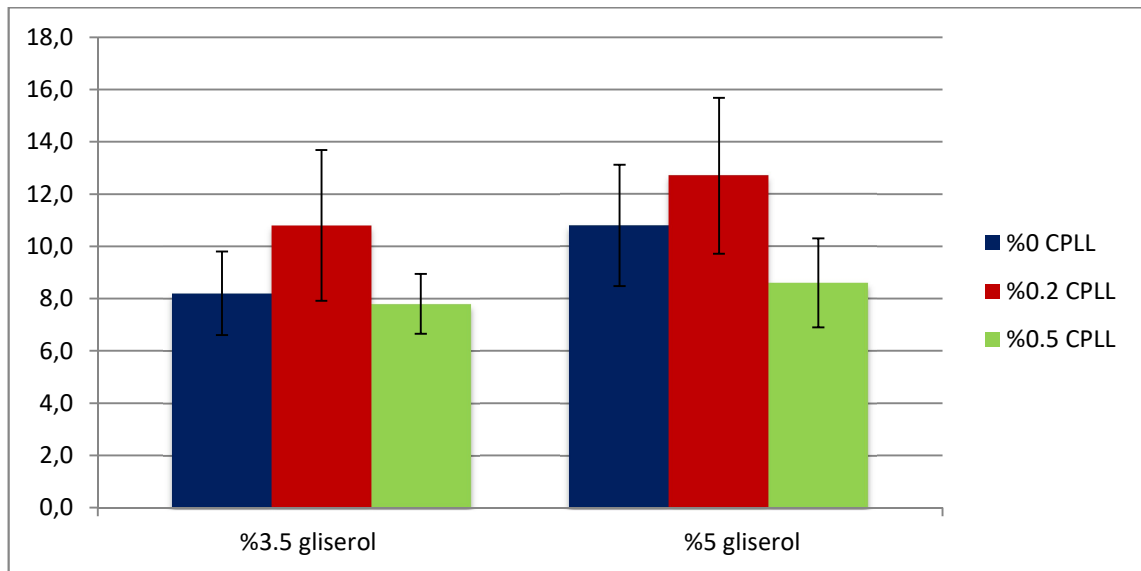
4. BULGULAR

4.1. Motilite Değerlendirmesi

Çözüm sonu % 3.5 gliserol içeren grupların % 0, % 0.2 ve % 0.5 CPLL içeren gruplarda progresif motilite değerleri sırasıyla % $8,2 \pm 1,36$, % $10,8 \pm 2,88$ ve % $7,8 \pm 1,14$ olarak kaydedilmiştir.

Çözüm sonu % 5 gliserol içeren grupların % 0, % 0.2 ve % 0.5 CPLL içeren gruplarda progresif motilite değerleri sırasıyla % $10,8 \pm 2,32$, % $12,7 \pm 2,98$ ve % $8,6 \pm 1,7$ olarak kaydedilmiştir.

Gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır ($P > 0.05$).

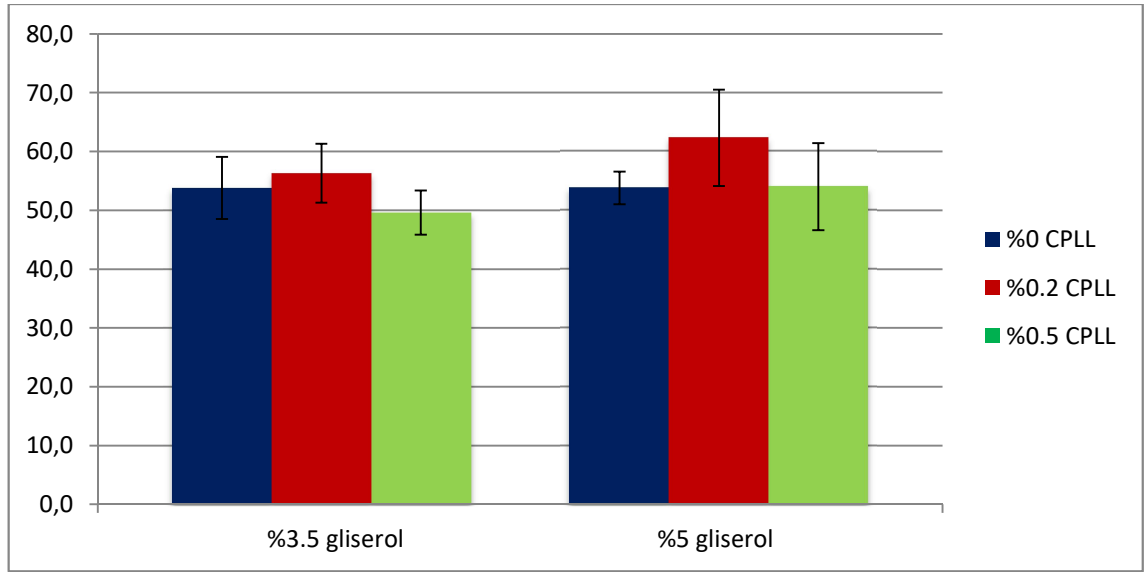


Resim 7. % 3.5 ve % 5 Gliserol içeren grupların progresif motilite değerlendirilmesi.

Çözüm sonu % 3.5 gliserol içeren grupların % 0, % 0.2 ve % 0.5 CPLL içeren gruplarda total motilite değerleri sırasıyla % $53,8 \pm 5,3$, % $56,3 \pm 5$ ve % $49,6 \pm 3,75$ olarak kaydedilmiştir.

Çözüm sonu % 5 gliserol içeren grupların % 0, % 0.2 ve % 0.5 CPLL içeren gruplarda total motilite değerleri sırasıyla % $53,8 \pm 2,78$, % $62,3 \pm 8,19$ ve % $54,0 \pm 7,4$ olarak kaydedilmiştir.

Gruplar arasında istatistiksel açıdan bir fark saptanmamıştır ($P > 0.05$).



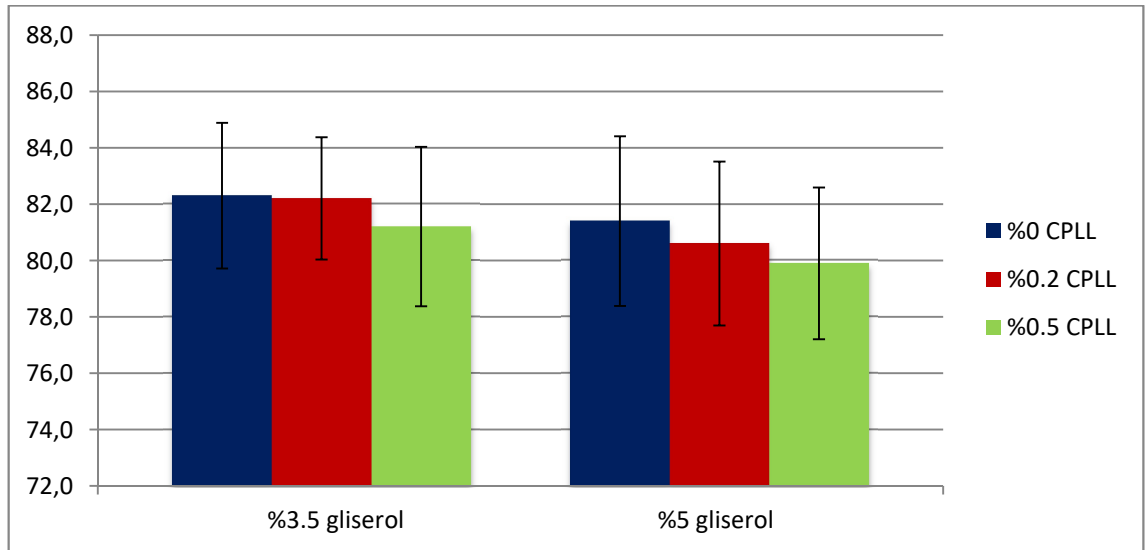
Resim 8. % 3.5 ve % 5 Gliserol içeren grupların total motilite değerlendirilmesi.

4.2. Canlılık Değerlendirmesi

Çözüm sonu % 3.5 gliserol içeren grupların % 0, % 0.2 ve % 0.5 CPLL içeren gruplarda canlılık oranı değerleri sırasıyla % $82,3 \pm 2,58$, % $82,2 \pm 2,17$ ve % $81,2 \pm 2,83$ olarak kaydedilmiştir.

Çözüm sonu % 5 gliserol içeren grupların % 0, % 0.2 ve % 0.5 CPLL içeren gruplarda canlılık oranı değerleri sırasıyla % $81,4 \pm 3,01$, % $80,6 \pm 2,91$ ve % $79,9 \pm 2,69$ olarak kaydedilmiştir.

Gruplar arasında istatistiksel bakımdan bir fark görülmemiştir ($P > 0.05$).



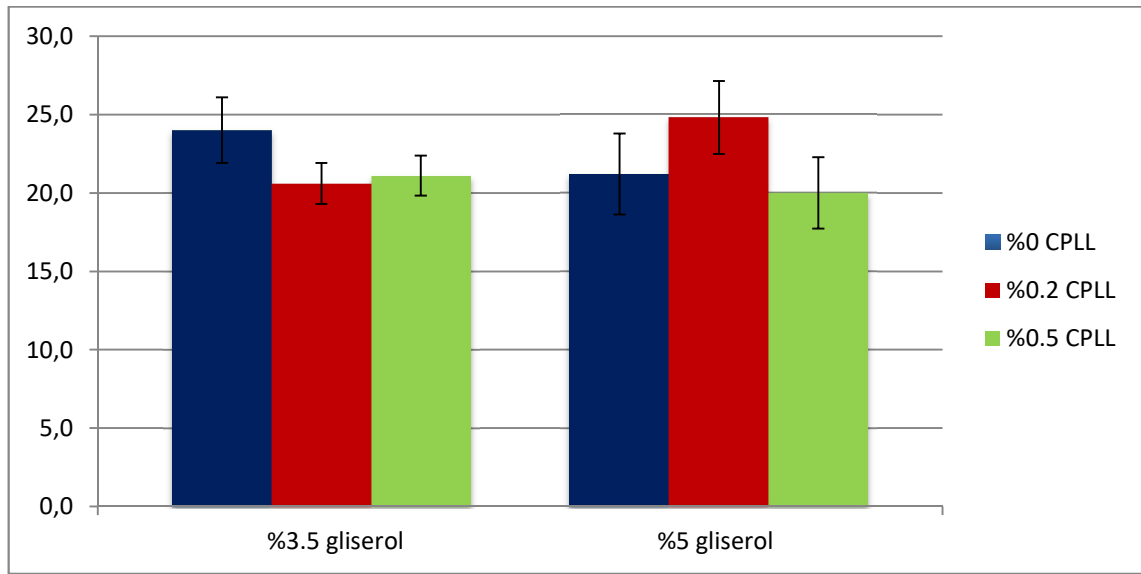
Resim 9. % 3.5 ve % 5 Gliserol içeren grupların canlılık değerlendirilmesi.

4.3. Morfoloji Değerlendirmesi

Çözüm sonu % 3.5 gliserol içeren grupların % 0, % 0.2 ve % 0.5 CPLL içeren gruplarda anormal hücre oranı değerleri sırasıyla % $24,0 \pm 2,09$, % $20,6 \pm 1,31$ ve % $21,1 \pm 1,28$ olarak kaydedilmiştir.

Çözüm sonu % 5 gliserol içeren grupların % 0, % 0.2 ve % 0.5 CPLL içeren gruplarda anormal hücre oranı değerleri sırasıyla % $21,2 \pm 2,58$, % $24,8 \pm 2,33$ ve % $20,0 \pm 2,28$ olarak kaydedilmiştir.

Gruplar arasında istatistiksel açıdan bir fark saptanmamıştır ($P > 0.05$).



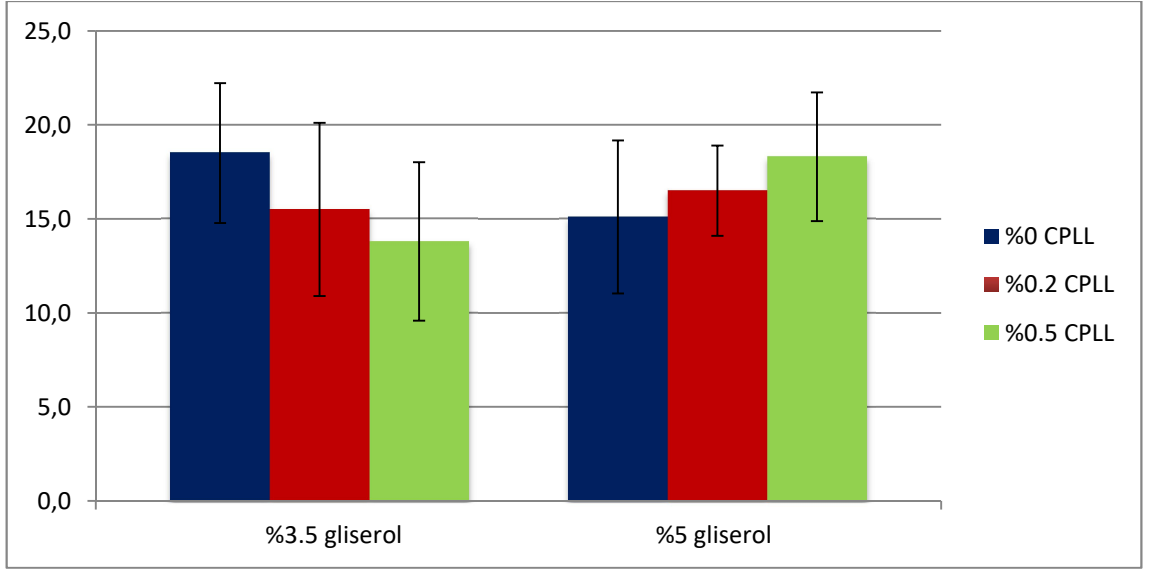
Resim 10. % 3.5 ve % 5 Gliserol içeren grupların anormal değerlendirilmesi.

4.4. Prematüre Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatozoon Oranı

Çözüm sonu % 3.5 gliserol içeren grupların % 0, % 0.2 ve % 0.5 CPLL içeren gruplarda akrozom reaksiyonu geçiren hücrelerin değerleri sırasıyla % $18,5 \pm 3,72$, % $15,5 \pm 4,61$ ve % $13,8 \pm 4,21$ olarak kaydedilmiştir.

Çözüm sonu % 5 gliserol içeren grupların % 0, % 0.2 ve % 0.5 CPLL içeren gruplarda akrozom reaksiyonu geçiren hücrelerin değerleri sırasıyla % $15,1 \pm 4,07$, % $16,5 \pm 2,4$ ve % $18,3 \pm 3,42$ olarak kaydedilmiştir.

Gruplar arasında istatistiksel bakımdan bir fark görülmemiştir ($P > 0.05$).



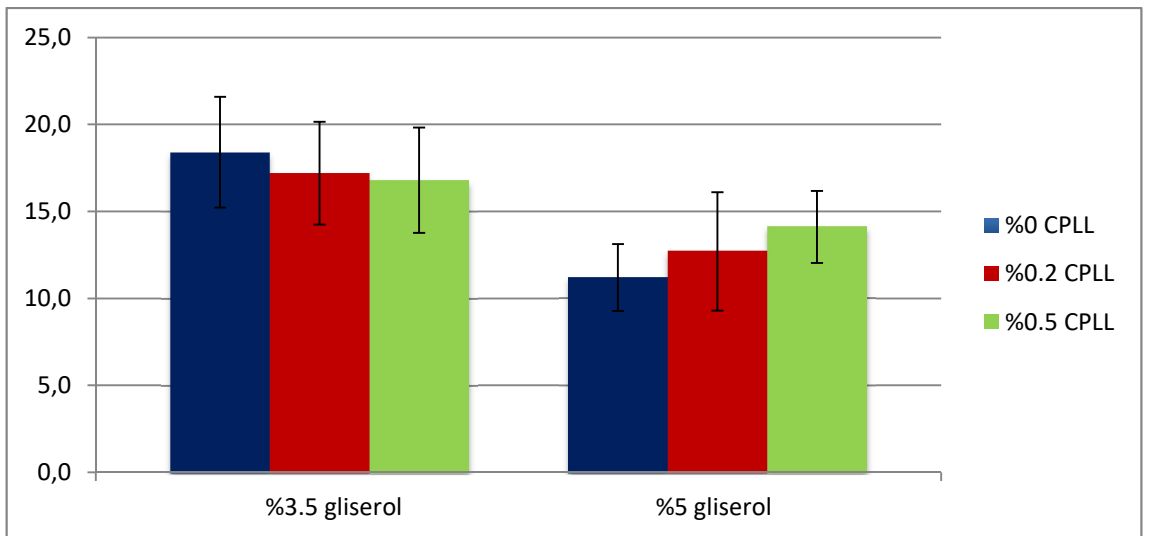
Resim 11. % 3.5 ve % 5 Gliserol içeren grupların prematüre akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranı değerlendirilmesi.

4.5. Membran Bütünlüğü Değerlendirmesi

Çözüm sonu % 3.5 gliserol içeren grupların % 0, % 0.2 ve % 0.5 CPLL içeren gruplarda membran bütünlüğü değerleri sırasıyla % $18,4 \pm 3,18$, % $17,2 \pm 2,95$ ve % $16,8 \pm 3,03$ olarak kaydedilmiştir.

Çözüm sonu % 5 gliserol içeren grupların % 0, % 0.2 ve % 0.5 CPLL içeren gruplarda membran bütünlüğü değerleri sırasıyla % $11,2 \pm 1,93$, % $12,7 \pm 3,41$ ve % $14,1 \pm 2,07$ olarak kaydedilmiştir.

Gruplar arasında istatistiksel açıdan bir fark bulunmamıştır ($P > 0.05$).



Resim 12. % 3.5 ve % 5 Gliserol içeren grupların membran bütünlüğü değerlendirilmesi.

4.6. Bulguların Değerlendirmesi

Çalışmadaki tüm farklı grupların incelenen spermatolojik değerlendirme sonuçları Tablo 2. ve Tablo 3.'te gösterilmiştir.

Tablo 2. % 3.5 Gliserol içeren grupların spermatolojik değerlendirmeleri.

Gruplar	Progresif Motilite	Total Motilite	Canlılık	Morfoloji	Prematüre Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatozoon Oranı	Membran Bütünlüğü
% 0 CPLL	% 8,2 ± 1,36	% 53,8 ± 5,3	% 82,3 ± 2,58	% 24,0 ± 2,09	% 18,5 ± 3,72	% 18,4 ± 3,18
% 0.2 CPLL	% 10,8 ± 2,88	% 56,3 ± 5	% 82,2 ± 2,17	% 20,6 ± 1,31	% 15,5 ± 4,61	% 17,2 ± 2,95
% 0.5 CPLL	% 7,8 ± 1,14	% 49,6 ± 3,75	% 81,2 ± 2,83	% 21,1 ± 1,28	% 13,8 ± 4,21	% 16,8 ± 3,03

Tablo 3. % 5 Gliserol içeren grupların spermatolojik değerlendirmeleri.

Gruplar	Progresif Motilite	Total Motilite	Canlılık	Morfoloji	Prematüre Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatozoon Oranı	Membran Bütünlüğü
% 0 CPLL	% 10,8 ± 2,32	% 53,8 ± 2,78	% 81,4 ± 3,01	% 21,2 ± 2,58	% 15,1 ± 4,07	% 11,2 ± 1,93
% 0.2 CPLL	% 12,7 ± 2,98	% 62,3 ± 8,19	% 80,6 ± 2,91	% 24,8 ± 2,33	% 16,5 ± 2,4	% 12,7 ± 3,41
% 0.5 CPLL	% 8,6 ± 1,7	% 54,0 ± 7,4	% 79,9 ± 2,69	% 20,0 ± 2,28	% 18,3 ± 3,42	% 14,1 ± 2,07

5. TARTIŞMA

Artan dünya nüfusu bilim insanlarını yaşam için kullanılan kaynaklardan daha verimli bir şekilde yararlanma olanaklarını araştırmaya yöneltmiştir. Hayvancılık sektörünün olmazsa olmazı reproduksiyon biyoteknolojisi özetle suni tohumlama, in vitro fertilizasyon, gen transferi ve klonlama gibi yenilikleri kapsamaktadır. Bu yeniliklerden en yaygın ve etkin olanı sperma hücrelerinin dondurulması ve daha sonrasında çözündürülerek dişi hayvana nakledilmesine dayanan suni tohumlama işlemidir (Nur ve Ak, 2003).

Hayvan popülasyonunu ve verim düzeyini arttırmak, refah ve ıslah seviyesini iyileştirmek (Uçan, 2014), genetik kaliteyi yükseltmek ve bir sonraki jenerasyona aktarmak (Brinsko ve diğerleri, 1992) amacıyla verimli ve sağlıklı hayvanların spermalarını kullanarak suni tohumlama yapılmaktadır. Suni tohumlamanın diğer bir amacı da daha az sperma hücresi kullanarak daha fazla hayvan tohumlamaktır. Bu yüzden ejakülatı çoğaltmak amacıyla sperma sulandırıcıları kullanılır. Spermalar kısa süreli ve dondurularak saklama yöntemli ile saklanır ve kullanılır. Dondurma işlemi sırasında spermatozoonlar serbest radikallerin saldırısı (Çınar, 2019) ekstraselüler sıvının kristalleşmesi (Coşkun ve Karaca, 2016) gibi birçok zararlı etkilere maruz kalmaktadır. Dondurma esnasında soğuk şokuna karşı spermatozoonları koruma, canlılığını uzun süre devam ettirebilmek, enerji ihtiyaçlarını karşılamak ve çeşitli bakterilerin spermatozoonlara zarar vermesini önlemek amacıyla sperma sulandırıcı içeriğine birçok madde katılır. Bunlardan biri de kriyoprotektan maddelerdir.

Kriyoprotektan maddeler spermanın dondurulması ve çözündürülmesi sırasında değişen ani sıcaklık nedeniyle ortamda oluşan osmotik basınç farkına ve kimyasal bileşimde oluşan değişikliklere karşı spermatozoonları koruyan maddelerdir (Çınar, 2019). En yaygın kullanılan kriyoprotektan maddelerden biri gliseroldür. Fakat yüksek oranda kullanımı hücreye toksik etki oluşturabilmektedir (Karaşör, 2022). Gliserolün yüksek miktarda kullanımının toksik etkisi sebebiyle farklı kriyoprotektan madde arayışına girilmiştir.

Laboratuvar çalışmalarından farklı olarak, bakteriler, böcekler ve balıklar gibi bazı türler, doğadaki AFP' ler yardımıyla sıfırın altındaki koşullarda organlarını, hücre işlevselliğini başarıyla korumaktadır. Bu proteinler için donma sıcaklığının azaltılması, çözülme sırasında yeniden kristalleşmenin engellenmesi ve düşük sıcaklıklarda plazma

membranının korunması gibi çeşitli koruyucu mekanizmalar önerilmiştir (Küçük ve diğerleri, 2021).

Bu amaçla Matsumura ve Hyon (2009), buz kristallerinin sperma hücreleri üzerine etkisini engellemesinde rol oynayan AFP etkili bir ajan olan (Yanglar ve Oğuzhan Yıldız, 2016), CPLL' yi üretmişlerdir. CPLL hakkında yapılan birçok çalışmada hücre morfolojisinin korunduğu (Jin ve diğerleri, 2013), oositlerin in vivo gelişimini olumlu yönde etkilediği (Watanabe ve diğerleri, 2013), membrana bağlanarak kristalleşme ve yeniden donmayı engelleyerek membranı koruduğu (Kamoshita ve diğerleri, 2017), sığır sperma motilitesini, çözülme sonrası akrozomal aktivite ve canlılığı iyileştirdiği (Tariq ve diğerleri, 2020), yaban domuzu spermasının çözülme sonrasında sperma kalitesini, antioksidan savunma sistemini ve mitokondriyal fonksiyonunu koruduğunu (Zhang ve diğerleri, 2022) bildirmişlerdir. Büyük buz kristallerinin morfolojisini değiştirebilen ve küçük buz kristallerini uzaklaştırabilen altıgen veya bipiramit şeklinde karmaşık bir molekül olduğunu ve PLL çözeltisindeki polikasyonik moleküller ve CPLL' nin glikoprotein molekülleri hücrelerin hidrofilik yüzeyine kolayca adsorbe olduğunu (Zhang ve diğerleri, 2023) söylemişlerdir.

Akter ve diğerleri (2020), boğa sperması sulandırıcı içeriğinde CPLL kullandığı çalışmada CPLL içeren gruplarda sperma motilitesinin arttığını ($P < 0.05$) bildirmişlerdir. Tariq ve diğerleri (2020), sığır spermasında kullandığı sperma sulandırıcı içeriğindeki gliserol miktarını azaltıp (% 7' den % 5' e) CPLL miktarını arttırdığı (% 0.5 veya % 0.75) gruplarda spermanın total motilitesinin arttığını ($P < 0.05$) söylemişlerdir. Shimizu ve diğerleri (2022), yunus spermasında yaptıkları çalışmada sperma sulandırıcı içeriğinde % 1 CPLL kullanımı kontrol grubuna ve yüksek CPLL kullanılan gruplara göre motilite karşılaştırılmasında daha yüksek sonuçlar ($P < 0.05$) sağladığını bildirmişlerdir. Zhang ve diğerleri (2022), yaban domuzu spermasında yaptıkları çalışmada % 0.25 veya % 0.5 CPLL içeren sperma sulandırıcılarında total motilite ve progresif motilite oranının kontrol ve diğer gruplara göre iyileştiğini gözlemlemişlerdir. Rohu balığı spermasında çalışma yapan Bibi ve diğerleri (2023), % 1.5 CPLL içeren sulandırıcı içeriğinin kontrol grubuna göre sperma motilitesinin daha yüksek ($P < 0.05$) olduğunu bildirmişlerdir. Teke spermasının dondurularak saklanması üzerine çalışma yapan Zhang ve diğerleri (2023), kullandığı sulandırıcı içeriğine farklı oranlarda CPLL ilave etmiştir. Hazırladıkları sulandırıcılarda çözüm sonucu analizlerde % 1' lik CPLL içeren grubun en iyi total motilite ve progresif motilite oranı ($P > 0.05$) elde etmişlerdir. Bu çalışmalara karşılık teke spermasının sulandırıcı içeriğine CPLL ekleyerek

yaptığımız çalışmalarda sulandırıcı içeriğinde CPLL kullanımı motilitede istatistiksel açıdan iyileşme söz konusu olmamıştır ($P > 0.05$).

Sulandırıcı içeriğine % 4 CPLL % 3 gliserol olan grubunda Akter ve diğerleri (2020), diğer gruplarına karşılık canlılık oranını daha yüksek ($P < 0.05$) olarak ölçmüşlerdir. Tariq ve diğerleri (2020), % 5 gliserol içeren % 0.5 ve % 0.75' lik CPLL içeren grupları ($P < 0.05$) kontrol ve farklı oranlarda CPLL ve gliserol içeren gruplarına göre canlılık oranının daha iyi olduğunu belirtmişlerdir. Bibi ve diğerleri (2023), rohu balığındaki çalışmalarında canlılık oranını diğer gruplara göre % 1.5 CPLL içeren grupta ($P < 0.05$) daha yüksek bulmuşlardır. Yaptığımız çalışmada sulandırıcı içeriğine farklı gliserol miktarlarında farklı oranlarda CPLL ilavesi sonucunda canlılık oranlarında istatistiksel olarak belirgin bir fark görülmemiştir ($P > 0.05$).

Anakkul ve diğerleri (2013) % 7, % 10 ve % 14 gliserol ilavesi kullandıkları teke sperma sulandırıcıları arasındaki morfoloji karşılaştırmasında, çözüm sonu değerlendirmelerinde anlamsal bir farka ulaşmamışlardır. Ankara, Kilis ve Saanen teke türlerinde sperma sulandırıcı içeriğine farklı gliserol ilavesi ile birbirleri ile karşılaştırma yapan Kulaksız ve diğerleri (2013), anormal spermatozoon oranlarını karşılaştırdığı verilerde % 5 gliserol ilavesi olan sperma sulandırıcısının diğer farklı oranda (% 0, % 3, % 7, % 9) gliserol ilavesi olan sulandırıcılara göre daha düşük anormal spermatozoon oranı bildirmişlerdir. % 4 ve % 8 gliserol içeren sperma sulandırıcıları arasında karşılaştırma yapan Martínez-Pastor ve diğerleri (2019), gruplar arası karşılaştırmasında anormal spermatozoon oranında bir fark bildirmemişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada sulandırıcı içeriğinde farklı oranlarda gliserol ve CPLL ilavesi morfoloji bakımından anormal spermatozoon oranlarında istatistiksel olarak fark görülmemiştir ($P > 0.05$).

Sperma sulandırıcı içeriğine CPLL ilavesi yapılan grupların diğer gruplara göre akrozom bütünlüğünün daha iyi korunduğunu ($P < 0.05$) Akter ve diğerleri (2020) söylemişlerdir. Farklı gliserol ve CPLL içeren gurplarda çalışma yapan Tariq ve diğerleri (2020), akrozom bütünlüğünün % 5 gliserol ve % 0.75 CPLL içeren sulandırıcı grubunda ($P < 0.05$) daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Zhang ve diğerleri (2022), % 0.25 içeren CPLL grubun diğer gruplara göre akrozom bütünlüğünü daha iyi koruduğunu belirtmişlerdir. Zhang ve diğerleri (2023) teke spermasında yaptıkları başka bir çalışmada sperma sulandırıcısına % 2 CPLL ilavesi kontrol grubuna ve diğer gruplara göre akrozom bütünlüğünü daha az koruduğunu ayrıca % 1 CPLL eklendiği grubun ise kontrol ve diğer gruplara göre akrozomal

bütünlüğünü daha iyi koruduğunu tespit etmişlerdir. Elde ettiğimiz veriler sonucunda yapılan çalışmada prematüre akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranında istatistiksel bakımdan bir fark tespit edilmemiştir ($P > 0.05$).

CPLL içeren grupların kontrol ve diğer gruplara göre plazma membran bütünlüğünün daha iyi korunduğu ($P < 0.05$) sonucuna varmışlardır (Akter ve diğerleri, 2020). Gruplar arasında plazma membran bütünlüğü karşılaştırması yapan Tariq ve diğerleri (2020), % 7 gliserol ve CPLL içermeyen kontrol grubuna göre sulandırıcı içeriği % 5 gliserole indirilmiş ve % 0.75 CPLL içeren grubun plazma membran bütünlüğünün daha iyi olduğunu bildirmişlerdir. Shimizu ve diğerlerinin (2022) yaptığı çalışmada plazma membran bütünlüğü açısından gruplar arasında belirgin bir fark kaydetmemişlerdir fakat % 1 CPLL içeren grubun diğer gruplara göre daha iyi olduğunu yazmışlardır. Zhang ve diğerleri (2022), sulandırıcı içeriğine % 0,125 ile % 0,5 CPLL eklenmesi çözüm sonrasında membran bütünlüğünü önemli ölçüde arttırmış olduğunu ve % 0.25 CPLL grubunun en yüksek değerde olduğunu bildirmişlerdir. Zhang ve diğerleri (2023) yaptıkları diğer bir çalışmada sulandırıcı içeriğine % 2 CPLL ilavesi kontrol grubuna ve diğer gruplara göre plazma membran bütünlüğünü daha az koruduğunu fakat % 1 CPLL ilavesi olan grubun ise kontrol ve diğer gruplara göre plazma membran bütünlüğünü daha iyi koruduğunu bildirmişlerdir. Bunlara karşılık bizim yaptığımız çalışmalarda membran bütünlüğü açısından gruplar arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir ($P > 0.05$).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada, elde edilen istatistiksel veriler sonucunda teke sperma sulandırıcı içeriğine CPLL ilave edilmesi çözüm sonu parametrelerinde istatistiksel anlamda bir ilerleme sağlamamıştır. Ancak, CPLL kullanımı parametreleri olumsuz bir biçimde de etkilememiştir. Özellikle yapılan birçok çalışma sonucunda gliserolün fazla kullanımına bağlı olarak toksik etkisinin ortaya çıkması dondurma çalışmalarında gliserol kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle CPLL ve diğer kriyoprotektan kombinasyonlarının dondurma çalışmalarında kullanılabilirliği ve bunun fertilite üzerine etkisi halen çalışmaya değer diğer konuları oluşturmaktadır. Böylelikle suni tohumlama çalışmalarında CPLL kullanımı ve gebelik oranları ilişkisinin bundan sonraki çalışmalara yön vermesi muhtemeldir.

KAYNAKLAR

- Akhter, S., Awan, M. A., Arshad, J., Rakha, B. A., Ansari, M. S. ve Iqbal, S. (2020). Effect of synergism between carboxylated poly-l-lysine and glycerol on freezability of nili-ravi buffalo (*bubalus bubalis*) semen. *Biopreservation and Biobanking*, 18(5), 367–375. doi.org/10.1089/bio.2019.0120
- Aköz, M., Bodu, M., Acibaeva, B. (2015). Koyun ve keçilerde östrus senkronizasyonunda güncel yöntemler. *Türkiye Klinikleri Journal Reproduction and Artificial Insemination-Special Topics*, 1(2), 1-8.
- Aksu, C. (2023). *Prepubertal dişi keçilerde kisspeptin uygulamasının pubertas ve fertilité üzerine etkinliğinin araştırılması*. Doktora Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Anakkul, N., Suwimonteerabutr, J., Tharasanit, T., Phutikanit, N., Singlor, J. ve Techakumphu, M. (2013). Glycerol concentration effects on quality and longevity of post-thaw goat semen. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 43(2), 179-186.
- Aral, F. ve Aral, S. (2004). Merinos koçlarda sperma alma yöntemlerinin karşılaştırılması. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(1), 47-53.
- Arı, U. Ç. ve Yıldız, S. (2018). Teke spermasının saklanması. *Türkiye Klinikleri Reproduction and Artificial Insemination-Special Topics*, 4(2), 8-18.
- Ball, B. A., Medina, V., Gravance, C. G. ve Baumber, J. (2001). Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. *Theriogenology*, 56(4), 577-589. doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00590-8
- Bektaş, G. I. ve Altıntaş, A. (2007). Antifriz proteinler. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 18(1-2), 27-32.
- Bibi, S., Awan, M. A., Rakha, B. A., Ejaz, R., Qadeer, S., Arshad, J. ve Akhter, S. (2023). Evaluation of carboxylated poly-l-lysine for cryopreservation of Labeo rohita sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 58(7), 990-996. doi.org/10.1111/rda.14391

- Brinsko, S. P. ve Varner, D. D. (1992). Artificial insemination and preservation of semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 8(1), 205-218. doi.org/10.1016/s0749-0739(17)30476-5
- Bucak, M. N. ve Tekin, N. (2007). Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54(1), 67-72. doi.org/10.1501/Vetfak_0000000255
- Chen, Y., Foote, R. H. ve Brockett, C. C. (1993). Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 30(4), 423-431. doi.org/10.1006/cryo.1993.1042
- Coşkun, N. ve Karaca, F. (2016). Effects of cryopreservation on sperm quality and fertility. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 56(1), 32-39.
- Crevel, R. W., Fedyk, J. K. ve Spurgeon, M. J. (2002). Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 40(7), 899-903. doi.org/10.1016/s0278-6915(02)00042-x
- Çalışlar, T. (1966). Karaman Koç ve Tiftik Tekesinin genital organları (organa genlt alla musculina) üzerinde komparativ araştırma. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 13(02), 174-185. doi.org/10.1501/Vetfak_00000002147
- Çınar, E. M. (2019). *Koç spermasının modifiye edilmiş sperma sulandırıcıları ile dondurulması*. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul.
- Demir, H., Elmaz, Ö. ve Cerit, H. (2018). Keçilerde puberta ve eşeyssel olgunluk yaşı. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 37(2), 143-150. doi.org/10.30782/uluvfd.415214
- Desjardins, M., Le François, N. R., Fletcher, G. L. ve Blier, P. U. (2007). High antifreeze protein levels in wolffish (*Anarhichas lupus*) make them an ideal candidate for culture in cold, potentially ice laden waters. *Aquaculture*, 272(1-4), 667-674. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.08.016.
- Dorado, J., Rodríguez, I. ve Hidalgo, M. (2007). Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility

- rates after artificial insemination. *Theriogenology*, 68(2), 168-177. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.048
- Dowsett, K. F. ve Pattie, W. A. (1980). Collection of semen from stallions at stud. *Australian Veterinary Journal*, 56(8), 373-378. doi.org/10.1111/j.1751-0813.1980.tb09562.x
- Foster, D.L. ve Jackson, L.M. (2006) Puberty in the sheep. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 39(3), 2127–2176. doi: 10.1016/B978-012515400-0/ 50044-0
- Fujikawa, T., Ando, T., Gen, Y., Hyon, S. H. ve Kubota, C. (2017). Cryopreservation of bovine somatic cells using antifreeze polyamino-acid (carboxylated poly-L-lysine). *Cryobiology*, 76, 140–145. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.01.010
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K. ve Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11(1), 73–88.
- Hancock, J. L. (1952). The morphology of bull spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, 29(3), 445-453.
- Hawes, T. C., Marshall, C. J. ve Wharton, D. A. (2014). A 9 kDa antifreeze protein from the antarctic springtail, *gomphiocephalus hodgsoni*. *Cryobiology*, 69(1), 181-183. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.001
- Hernández, P. J. E., Fernández, R. F., Rodríguez, S. J. L., Juárez, R. E., Soto, M. Y. G. ve García, R. A. D. (2012). Effect of cryopreservation of sheep semen related to its viability and acrosomal status. *Revista de Salud Animal*, 34(2), 78-78.
- İbiş, M. ve Ağaoğlu, A.R. (2016) Koyun ve Keçilerde üremenin senkronizasyonu, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(2), 47–47. doi:10.24880/maeuafd.287352.
- İnanç, M. E., Uysal, O. ve Gürcan, I. S. (2014). Farklı ırklardan tekelerde başlıca spermatolojik parametreler. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(1), 13-19.
- İnce, D. (2011). Türk Saanen Tekelerinde eşeyssel performanslarının belirlenmesi. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6(2), 24-29.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G. ve 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.
- Jin, O. S., Lee, J. H., Shin, Y. C., Lee, E. J., Lee, J. J., Matsumura, K., Hyon, S. H. ve Han, D. W. (2013). Cryoprotection of fibroblasts by carboxylated poly-L-lysine upon repeated freeze/thaw cycles. *Cryoletters*, 34(4), 396–403.
- Kamoshita, M., Kato, T., Fujiwara, K., Namiki, T., Matsumura, K., Hyon, S. H., Ito, J. ve Kashiwazaki, N. (2017). Successful vitrification of pronuclear-stage pig embryos with a novel cryoprotective agent, carboxylated ϵ -poly-L-lysine. *PloS One*, 12(4), e0176711. doi.org/10.1371/journal.pone.0176711
- Karagiannidis, A., Varsakeli, S. ve Karatzas, G. (2000). Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology*, 53(6), 1285–1293. doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00272-7
- Karaşör, Ö. F. (2022). *Ankara tekelerinde sperma sulandırıcısına farklı dozlarda eklenen rock inhibitörü, antifreeze protein uı ve bor'un sperma dondurulabilirliği üzerine etkileri*. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Katkov, I. I., Katkova, N., Critser, J. K. ve Mazur, P. (1998). Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, 37(4), 325-338. doi.org/10.1006/cryo.1998.2128
- Konyalı, C. (2020). Teke spermasının kriyokonservasyonu ve uygun yöntem kullanımı. *Lapseki Meslek Yüksekokulu Uygulamalı Araştırmalar Dergisi*, 1(2), 118-129..
- Kulaksız, R. (2009). *Farklı antioksidanlar eklenmiş sulandırıcılarla dondurulmuş Saanen teke spermasının in vitro değerlendirilmesi*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kulaksız, R., Arı, U. C., Daşkın, A. ve Üner, A. G. (2013). The effect of different glycerol concentrations on freezability of semen from Angora, Kilis and Saanen goats. *Slovak Journal of Animal Science*, 46(2), 39-44.
- Küçük, N., Raza, S., Matsumura, K., Uçan, U., Serin, İ., Ceylan, A. ve Aksoy, M. (2021). Effect of different carboxylated poly l-lysine and dimethyl sulfoxide combinations on

- post thaw rabbit sperm functionality and fertility. *Cryobiology*, 102, 127-132. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.07.001
- Leboeuf, B., Restall, B. ve Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 113-141. doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00156-1
- Martín, A., Castaño, C., O'Brien, E., Toledano-Díaz, A., Guerra, R., Gómez-Guillamón, F. ve Santiago-Moreno, J. (2023). Equilibration time improves the sperm variables of wild ruminant ejaculated and epididymal sperm cryopreserved by ultra-rapid freezing. *Cryobiology*, 113, 104579. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2023.104579
- Martínez-Páramo, S., Barbosa, V., Pérez-Cerezales, S., Robles, V. ve Herráez, M. P. (2009). Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology*, 58(2), 128-133. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.013
- Martínez-Pastor, F., Álvarez, M., Guerra, C., Chamorro, C. A., Anel-López, L., de Paz, P. ve Álvarez-Rodríguez, M. (2019). Extender osmolality, glycerol and egg yolk on the cryopreservation of epididymal spermatozoa for gamete banking of the Cantabric Chamois (*Rupicapra pyrenaica parva*). *Theriogenology*, 125, 109-114. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.10.022
- Matsumura, K. ve Hyon, S. H. (2009). Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties. *Biomaterials*, 30(27), 4842-4849. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.025
- Matsumura, K., Bae, J. Y. ve Hyon, S. H. (2010). Polyampholytes as cryoprotective agents for mammalian cell cryopreservation. *Cell transplantation*, 19(6), 691-699. doi.org/10.3727/096368910X508780.
- Melnik, B. S., & Finkelstein, A. V. (2022). Physical basis of functioning of antifreeze protein. *Molecular Biology*, 56(2), 297-305. doi.org/10.31857/S0026898422020112
- Memon, M. A., Bretzlaff, K. N. ve Ott, R. S. (1986). Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology*, 26(6), 823-827.
- Nakayama, K., Yamanaka, T., Tamada, Y., Hirabayashi, M. ve Hochi, S. (2019). Supplementary cryoprotective effect of carboxylated ϵ -poly-L-lysine during vitrification of rat pancreatic islets. *Cryobiology*, 88, 70-74. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.03.009

- Napolitano, F., Arney, D., Mota-Rojas, D. ve De Rosa, G. (2020). Reproductive technologies and animal welfare. *Reproductive Technologies in Animals* (275-286). Academic Press. doi.org/10.1016/B978-0-12-817107-3.00017-5
- Narlıçay, S. ve Ataman, M. B. (2022). Spermanın uzun süreli saklanması için kullanılan güncel yöntemler. *Turkish Veterinary Journal*, 3(2), 41-50. doi.org/10.51755/turkvetj.1203288
- Nishijima, K., Tanaka, M., Sakai, Y., Koshimoto, C., Morimoto, M., Watanabe, T., Fan, J. ve Kitajima, S. (2014). Effects of type III antifreeze protein on sperm and embryo cryopreservation in rabbit. *Cryobiology*, 69(1), 22–25. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.04.014
- Nur, Z. ve Ak, K. (2003). Donmuş spermanın saklanması ve eritilmesi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22(1-2-3), 97-102.
- Ömür, A. ve Akarsu, S. A. (2022). Tavşanlarda Spermanın Alınması, İşlenmesi ve Saklanması. *Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi*, 2(2), 105-110..
- Özcan, T. (2019) *Serisinin farklı derecelerde saklanan tavşan spermatozoonları üzerine koruyucu etkisinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Öziş, Ş. ve Kaymakçı, M. (2003). Tekelerde eşeyssel davranışlar. *Hayvansal Üretim*, 44(1), 69-75.
- Öztürk, C., Güngör, Ş. ve Demir, H.F. (2019) The effect of different additives on semen freezing of Aksaray Malaklı shepherd dog, *Kocatepe Veterinary Journal*, 12(3), 329-335. doi:10.30607/kvj.594063.
- Payne, S. R. ve Young, O. A. (1995). Effects of pre-slaughter administration of antifreeze proteins on frozen meat quality. *Meat science*, 41(2), 147–155. doi.org/10.1016/0309-1740(94)00073-g
- Payne, S. R., Oliver, J. E. ve Upreti, G. C. (1994). Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 31(2), 180–184. doi.org/10.1006/cryo.1994.1021
- Shi, L., Ren, Y., Zhou, H., Hou, G., Xun, W., Yue, W., Zhang, C. ve Yang, R. (2014). Effect of rapid freezing-thawing techniques on the sperm parameters and ultrastructure of

- Chinese Taihang black goat spermatozoa. *Micron*, 57, 6–12. doi.org/10.1016/j.micron.2013.09.004
- Shimizu, K., Honkawa, Y., Akiyama, Y., Kashiwagi, N., Otsuka, M. ve Ando, T. (2022). Utility of carboxylated poly L-lysine for the liquid storage of bottlenose dolphin semen. *Animal Reproduction Science*, 236, 106889. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106889
- Sias, B., Ferrato, F., Pellicer-Rubio, M. T., Forgerit, Y., Guillouet, P., Leboeuf, B., & Carrière, F. (2005). Cloning and seasonal secretion of the pancreatic lipase-related protein 2 present in goat seminal plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1686(3), 169-180. doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.09.008
- Simplfcio, A. A., De Figueiredo, E. A. P., Riera, G. S. ve Foote, W. C. (1990). Puberty in four genotypes ce female goats jn northeast brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasilia*, 25(3), 455-459.
- Sreter, J. A., Foxall, T. L. ve Varga, K. (2022). Intracellular and extracellular antifreeze protein significantly improves mammalian cell cryopreservation. *Biomolecules*, 12(5), 669. doi.org/10.3390/biom12050669
- Tariq, A., Ahmad, M., Iqbal, S., Riaz, M. I., Tahir, M. Z., Ghafoor, A. ve Riaz, A. (2020). Effect of carboxylated poly l-Lysine as a cryoprotectant on post-thaw quality and in vivo fertility of Nili Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology*, 144, 8–15. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.12.012
- Tekin, N. (1996). Ankara keçilerinden değişik yöntemlerle sperma alınması ve değerlendirilmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 43(04).
- Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK]. (2022). *Türkiye İstatistik Kurumu*. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-2022-49682> adresinden erişildi.
- Uçan, U. (2014) *fruktoz, trehaloz ve sükroz içeren tris bazlı sulandırıcıya kolesterol yüklü siklodekstrin (clc) ilavesinin koç spermasının dondurulabilirlik ve çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkilerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

- Uemura, M. ve Ishiguro, H. (2015). Freezing behavior of adherent neuron-like cells and morphological change and viability of post-thaw cells. *Cryobiology*, 70(2), 122–135. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.01.006
- Üstüner, B. ve Günay, Ü. (2009). Teke spermasının saklanması ve suni tohumlama. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 28(1), 53-58.
- Waldron, D. F., Willingham, T. D., Thompson, P. V., Eckhoff, R. G. ve May, B. J. (1999). Age at first estrus, ovulation rate, and age at anestrus in puberal Boer× Spanish and Spanish does. *Small Ruminant Research*, 31(2), 173-176.
- Watanabe, H., Kohaya, N., Kamoshita, M., Fujiwara, K., Matsumura, K., Hyon, S. H., Ito, J. ve Kashiwazaki, N. (2013). Efficient production of live offspring from mouse oocytes vitrified with a novel cryoprotective agent, carboxylated ϵ -poly-L-lysine. *PloS One*, 8(12), e83613. doi.org/10.1371/journal.pone.0083613
- Watson P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481–492. doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3
- Yamashiro, H., Narita, K., Sugimura, S., Han, Y. J., Sugawara, A., Morohaku, K., Nakazato, F., Konno, T., Yoshida, M. ve Sato, E. (2007). Trehalose enhanced the freezability of Poodle dog sperm collected by an artificial vagina (AV). *Animal Reproduction Science*, 102(1-2), 165–171. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.026
- Yangılar, F. ve Oğuzhan Yıldız, P. (2016). Gıda endüstrisinde antifriz proteinlerin önemi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 32(1), 81-87.
- Yavaş, İ. (2008). *Koç spermasının farklı oranlarda sükröz içeren sulandırıcılar ile gliserollü ve gliserolsüz dondurulması*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yazıcı, E. (2014) *Türk saanen keçilerinde embriyonik ve fetal gelişimin transrektal ve transabdominal ultrasonografi yöntemleri ile izlenmesi*, Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
- Younis, A. I., Rooks, B., Khan, S. ve Gould, K. G. (1998). The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa. *Journal of Andrology*, 19(2), 207–214.

- Zhang, W., Cui, H., Ding, K., Zhou, K., Li, Y., Hoque, S. A. M., Min, L. ve Zhu, Z. (2023). Carboxylated ϵ -Poly-L-lysine improves post-thaw quality, mitochondrial functions and antioxidant defense of goat cryopreserved sperm. *Biology*, 12(2), 231. doi.org/10.3390/biology12020231
- Zhang, W., Li, Y. ve Zhu, Z. (2022). Carboxylated ϵ -Poly-L-Lysine supplementation of the freezing extender improves the post-thawing boar sperm quality. *Animals*, 12(13), 1726. doi.org/10.3390/ani12131726

EKLER

Ek 1: (ADÜ-HADYEK)



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(AYDIN ADÜ-HADYEK)

Ay

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2023 Yılı VIII. Oturum
Sayı : 64583101/2023.134
Proje Başlığı : Sentetik antifriz protein carboxylated poly-L-lysine'in teke sperması saklanması kullanılabiliğinin araştırılması.
Proje Yürütücüsü : Uğur UÇAN
Proje Ekibi : Büşra ARABACI

Hayvan Çalışması

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde

İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması

İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması

Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

İnsanlarda araştırma

İnsan olmayan primatların kullanılması

Transgenik hayvanların kullanılması

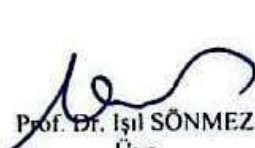
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.


Prof. Dr. Murat SARIERLER
Başkan


Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN
Başkan Yardımcısı


Prof. Dr. Tural ÜYE


Prof. Dr. Işıl SÖNMEZ
Üye


Prof. Dr. Serkan BAKIRCI
Üye

(Yıllık
Dr. Öğr. Üyesi Solm
Üye

BİLİMSEL ETİK BEYANI

T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

‘Sentetik Antifriz Protein Carboxylated Poly-L-Lysine’in Teke Spermasının Dondurularak Saklanması Kullanılabilirliğinin Araştırılması’ başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Büşra Arabacı

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı : ARABACI Büşra
Uyruk : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum yeri ve tarihi : İzmir / 25.05.1997
E-mail : baarabaci97@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı	2025
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği (İngilizce)	Devam Ediyor
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2022

BURSLAR

Tubitak Projesi 219O208, Yeni Nesil Antifriz Protein Cpl'nin Koç Spermasının Dondurulmasında Kriyoprotektan Molekül Olarak Kullanılması, Burslu, TOVAG - Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Destek Grubu, 1001 - Araştırma, ARDEB. Proje Yöneticisi; Prof. Dr. Melih AKSOY

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Unvan
2023-2025	Bağlı Ticaret - AYDIN	Sorumlu Veteriner Hekim