

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA**  
**DOKTORA PROGRAMI**  
**DR - 2025 - 0051**

**CARBOXYLATED  $\epsilon$ -POLY-L-LYSINE (CPLL)'NİN**  
**KOÇ SPERMASININ**  
**KISA SÜRELİ SAKLANMASINA ETKİSİ**

**ELİF ÖYKÜ KILIÇ**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Melih AKSOY**

**Elif Öykü KILIÇ doktora tezini 100/2000 doktora bursiyeri olarak tamamlamıştır.**

**AYDIN-2025**

## KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Elif Öykü KILIÇ tarafından hazırlanan “Carboxylated  $\epsilon$ -Poly-L-Lysine (CPLL) ‘nin Koç Spermasının Kısa Süreli Saklanması Etkisi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 30/07/2025

|                                   |                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Üye (T.D): Prof. Dr. Melih AKSOY  | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi |
| Üye: Prof. Dr. Ahmet CEYLAN       | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi |
| Üye: Dr. Öğr. Üyesi Bilginer TUNA | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi |
| Üye: Prof. Dr. Fatih AVDATEK      | Afyon Kocatepe Üniversitesi       |
| Üye: Prof. Dr. Deniz YENİ         | Afyon Kocatepe 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

Doktora tez çalışmamda ilgi, yardım, sabır ve hoşgörüsünü esirgemeyen, sevgili danışmanım Prof. Dr. Melih AKSOY' a çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ahmet CEYLAN, Prof. Dr. İlker SERİN ve Dr. Öğretim Üyesi Uğur Uçan ve Doç. Dr. Niyazi KÜÇÜK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora yaptığımız uzun süre boyunca ve de tez çalışmalarım sırasında beni çokça güldüren ve de yardımcı olan kader ortağım Güney TUZLALIOĞLU'na, çalışmalarım sırasında bana çokça yardımcı olan Begimay AYANA ve Büşra ARABACI'na ve

Tezimin yazma sürecinde beni destekleyen sevgili halam Prof. Dr. Dilek GÜVENÇ'e

Sorularıma sabırla ve içtenlikte cevap veren Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde sevgili Esra ŞİMŞEK 'e

Tez yazma sürecinde tecrübeleriyle beni rahatlatan canım arkadaşlarım Öğr. Gör. Meryem KOÇAŞ ve Halime Eda YALÇIN'a

Tez çalışmam süresince bana her zaman inanan canım annem ve babama ve sevgili İlçe müdürüm Harun ALTUNKAYNAK 'a ayrıca iş arkadaşlarıma teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
| KABUL VE ONAY .....                                                                  | i    |
| TEŞEKKÜR .....                                                                       | ii   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                                                 | v    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                | vi   |
| RESİMLER DİZİNİ .....                                                                | vii  |
| TABLolar DİZİNİ.....                                                                 | viii |
| ÖZET .....                                                                           | ix   |
| ABSTRACT .....                                                                       | x    |
| 1. GİRİŞ.....                                                                        | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                                               | 3    |
| 2.1. Suni Tohumlamanın Önemi.....                                                    | 4    |
| 2.1.1. Koyunlarda Suni Tohumlama.....                                                | 5    |
| 2.2. Koçlarda Üreme Organları .....                                                  | 5    |
| 2.2.1. Koçlarda Spermatogenezis .....                                                | 6    |
| 2.2.2. Koçlarda Spermatolojik Özellikler .....                                       | 7    |
| 2.2.3. Koçlarda Sperma Alma Yöntemleri .....                                         | 8    |
| 2.3. Koçlarda Spermanın Saklanması.....                                              | 8    |
| 2.3.1. Koç Spermasının Uzun Süreli Saklanması (Kriyoprezervasyon) .....              | 10   |
| 2.3.2. Koç Spermasının Kısa Süreli Saklanması .....                                  | 12   |
| 2.3.3. Koç Spermasına Soğuk Şokunun ve Oksidatif Stresin Etkisi .....                | 14   |
| 2.4. Antifriz Proteinler.....                                                        | 15   |
| 2.4.1. Antifriz Proteinlerinin (AFP) Buz Kristali Yüzeyine Bağlanma Mekanizması..... | 18   |
| 2.4.2. Carboxylated ε- Poly L-Lysine.....                                            | 19   |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM .....                                                             | 26   |
| 3.1. Gereç.....                                                                      | 26   |
| 3.1.1. Hayvan Materyali .....                                                        | 26   |
| 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....                                             | 27   |
| 3.1.3. Spermanın Alınması .....                                                      | 27   |
| 3.1.4. Spermanın Sulandırılması Stok solüsyonu Hazırlanması.....                     | 28   |
| 3.2. Yöntem .....                                                                    | 29   |

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1. Deneysel Çalışma .....                                        | 29 |
| 3.2.1.1. Progressif ve Total Motilite .....                          | 29 |
| 3.2.1.2. Ölü Canlı Spermatoozon Oranı .....                          | 30 |
| 3.2.1.3. Prematür Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatazoon Oranı..... | 30 |
| 3.2.1.4. Membran Bütünlüğü Oranı.....                                | 31 |
| 3.2.1.5. Anormal Spermatozoon Oranı.....                             | 32 |
| 3.3. İstatistiksel Değerlendirme .....                               | 32 |
| 4. BULGULAR .....                                                    | 33 |
| 4.1. Motilite Oranı .....                                            | 33 |
| 4.1.1. Total Motilite Oranı.....                                     | 33 |
| 4.1.2. Progressif Motilite Oranı .....                               | 34 |
| 4.2. Ölü Spermatozoon Oranı .....                                    | 35 |
| 4.3. Prematür Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatazoon Oranı.....     | 36 |
| 4.4. Membran Bütünlüğü Oranı.....                                    | 37 |
| 4.5. Anormal Spermatozoon Oranı.....                                 | 38 |
| 5. TARTIŞMA.....                                                     | 40 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....                                           | 45 |
| KAYNAKLAR.....                                                       | 46 |
| EKLER .....                                                          | 62 |
| EK-1 .....                                                           | 62 |
| BİLİMSEL ETİK BEYANI .....                                           | 63 |
| ÖZ GEÇMİŞ.....                                                       | 64 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                  |                                               |
|------------------|-----------------------------------------------|
| <b>CASA</b>      | : Computer Assisted Sperm Analysis            |
| <b>AFP</b>       | : Antifriz Protein                            |
| <b>AFGP</b>      | :Antifrizglikoproteinler                      |
| <b>CPLL</b>      | : Karboksile Edilmiş Poli L-Lizin             |
| <b>FBS</b>       | :Fötal Sığır Serumı                           |
| <b>COOH-PLL</b>  | :Karboksile Edilmiş Poli L-Lizin              |
| <b>kDa</b>       | : Kilodalton                                  |
| <b>FITC</b>      | : Flourescein isothiocyanate                  |
| <b>HOS testi</b> | : Hipo-Ozmotik şişme testi                    |
| <b>DMSO</b>      | : Dimetilsülfoksit                            |
| <b>EE</b>        | : Elektroejekulator                           |
| <b>SP</b>        | : Seminal Plazma                              |
| <b>Cm</b>        | : Santimetre                                  |
| <b>LPO</b>       | : Lipit Peroksidasyonu                        |
| <b>ε-PL,</b>     | : Epsilon Poly L-lysine                       |
| <b>Mg</b>        | : Miligram                                    |
| <b>Mm</b>        | : Milimolar                                   |
| <b>SPSS</b>      | : Statistical Package for the Social Sciences |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b> COOH-PLL molekülünün yapısal formülü.....                                                                                     | 21 |
| <b>Şekil 2.</b> Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince total motilite oranı üzerine etkisi .....                               | 34 |
| <b>Şekil 3.</b> Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince progresif motilite oranı üzerine etkisi.....                            | 35 |
| <b>Şekil 4.</b> Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince ölü spermatozoon oranları üzerine etkisi.....                           | 36 |
| <b>Şekil 5.</b> Çalışma süresince sulandırıcı içerisine Cpll ilavesinin prematür akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranına etkisi ..... | 37 |
| <b>Şekil 6.</b> Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin saklama periyodu boyunca membran bütünlüğü oranı üzerine etkisi .....                     | 38 |
| <b>Şekil 7.</b> Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince anormal spermatozoon oranı üzerine etkisi.....                          | 39 |

## RESİMLER DİZİNİ

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Resim 1.</b> L929 hücrelerinin konfokal mikroskopik görüntüleri,.....                  | 22 |
| <b>Resim 2.</b> COOH- PLL 'nin antifriz proteini benzeri aktiviteleri.....                | 23 |
| <b>Resim 3.</b> Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Çiftliği .....            | 26 |
| <b>Resim 4.</b> Spermanın alınması.....                                                   | 27 |
| <b>Resim 5.</b> Stok solüsyonun hazırlanması .....                                        | 28 |
| <b>Resim 6.</b> Spermatolojik parametrelerin tespiti.....                                 | 29 |
| <b>Resim 7.</b> Ölü ve canlı spermatozoonlar .....                                        | 30 |
| <b>Resim 8.</b> FITC boyaması sonrası aynı alanın ışık mikroskobu ve FITC görüntüsü ..... | 31 |
| <b>Resim 9.</b> Membranı bütün (C) ve bütün olmayan spermatozoon (D).....                 | 32 |



## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> 4 °C de saklanan 10 ml lik koç sperması sulandırıcısının kimyasal bileşimi .....                                 | 28 |
| <b>Tablo 2.</b> Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince total motilite oranı (%) üzerine etkisi .....              | 33 |
| <b>Tablo 3.</b> Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince progresif motilite oranı (%) üzerine etkisi .....          | 34 |
| <b>Tablo 4.</b> Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin saklama periyodu boyunca membran bütünlüğü oranları .....                    | 37 |
| <b>Tablo 5.</b> Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince ölü spermatozoon oranları ..                               | 35 |
| <b>Tablo 6.</b> Çalışma süresince sulandırıcı içerisine CPLL ilavesinin akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranlarına ..... | 36 |
| <b>Tablo 7.</b> Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince anormal (%) spermatozoon oranı üzerine etkisi .....        | 38 |

## ÖZET

### CARBOXYLATED $\epsilon$ -POLY-L-LYSİNE (CPLL)' NİN KOÇ SPERMASININ KISA SÜRELİ SAKLANMASINA ETKİSİ

**Kılıç E.Ö Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Reproduksiyon ve Suni Tohumlama Programı Doktora Tezi, Aydın, 2025.**

**Amaç:** Bu araştırma CPLL ilave edilen koç spermasının 4°C de kısa süreli saklanmasına etkilerini incelemek amacıyla yapılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Araştırma Ocak 2023-Şubat 2023 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Çiftliğindeki 7 adet Kıvırcık koçtan sperma alınarak gerçekleştirildi. Sulandırılan spermadan 1.grup kontrol grubu olarak belirlendi. Deney gruplarından birine 0.05gr CPLL (%0.5) diğerine ise 0.1 gr Cpll (%1) eklendi. Sulandırılan spermalar 4°C de saklandı. Dört farklı zaman aralığında (0,3,6,24.saatler) kontrol ve deney gruplarının spermatolojik kalite parametreleri incelendi. Verilerin analizinde post-hoc Tukey testi uygulanmıştır. Her grup için parametrelerin ortalama ve standart hataları hesaplandı ve tüm değerler çalışma boyunca bu biçimde (mean $\pm$  SEM) sunulmuştur.

**Bulgular:** İncelenen parametrelerin hiçbirisinde CPLL ilavesinin önemli bir etki oluşturmadığı tespit edildi ( $P>0.05$ ) Bu sonucun sentetik bir antifreeze protein analogu olan CPLL nin kriyoprezervasyonda daha etkili olabileceğinden ileri geldiği düşünülmektedir.

**Sonuç:** Koç spermasının kısa süreli 24 saat boyunca saklanmasında önemli bir koruyucu etki sağlamadığı kanısına varılmıştır ( $P>0.05$ ).

**Anahtar kelimeler:** CPLL, kısa süreli saklama, koç, spermatolojik parametre

## ABSTRACT

### EFFECT OF CARBOXYLATED $\epsilon$ -POLY-L-LYSINE (CPLL) ON SHORT-TERM STORAGE OF RAM SPERM

**Kılıç, E. Ö.** Reproduction and Artificial Insemination Program. PhD Thesis, Institute of Health Sciences, Aydın Adnan Menderes University, Aydın, 2025.

**Objective:** This study was conducted to investigate the effects of adding CPLL to ram semen during short-term storage at 4°C.

**Materials and Methods:** The study was carried out between January 2023 and February 2023 using semen collected from seven Kivırcık rams at the Adnan Menderes University Veterinary Faculty Farm. The diluted semen was divided into three groups: the first group was designated as the control, while 0.05 g of CPLL (0.5%) and 0.1 g of CPLL (1%) were added to the two experimental groups, respectively. The semen samples were stored at 4°C. Spermatological quality parameters of both control and experimental groups were evaluated at four different time points (0, 3, 6, and 24 hours). Post-hoc Tukey test was applied for statistical analysis of the data. For each group, the mean and standard error (mean  $\pm$  SEM) of the parameters were calculated and reported accordingly throughout the study.

**Results:** It was determined that the addition of CPLL did not have a statistically significant effect on any of the examined parameters ( $P > 0.05$ ). This result suggests that CPLL, a synthetic antifreeze protein analogue, may be more effective in cryopreservation rather than in short-term storage.

**Conclusion:** It was concluded that CPLL does not provide a notable protective effect for ram semen during 24-hour short-term storage at 4°C ( $P > 0.05$ ).

**Keywords:** CPLL, ram, short-term storage, spermatological parameters

# 1. GİRİŞ

Dondurulmuş spermanın ülkemizdeki yaygın kullanımı yardımcı üreme teknolojileri sayesinde son yıllarda artmıştır. Dondurarak saklamanın sperm hücreleri üzerindeki geri dönüşü olmayan zararlarını ortadan kaldırmak veya azaltmak, çözündürme sonrası sperm kalitesini ve fertilitiyi iyileştirmek için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Sperma sulandırıcısına şekerler (Uçan ve diğerleri, 2016), antioksidanlar (Büyükleblebici ve diğerleri, 2014) ve proteinler (Raza ve diğerleri, 2019) gibi farklı kriyoprotektif maddeler eklenmiştir (Rosato ve Iaffaldano, 2013). Bu sayede sperm hücreleri ozmotik değişikliklerden, apoptozisden, oksidatif strese, DNA hasarından, ozmotik hasardan, buz kristalleri nedeniyle oluşan mekanik hasardan ve dondurma çözündürme işlemi sırasında soğuk şokundan korunur (Ezzati ve diğerleri, 2020). Tavşan, koç ve keçi gibi bazı türlerde çözündürme sonrası yeterli sperma kalitesi henüz sağlamamıştır. Bakteri, böcek ve kutup balıkları gibi bazı türler, doğada bulunan antifriz proteinler (AFP ler) sayesinde çevre sıcaklığı sıfırın altına düştüğünde hücre işlevselliğini başarıyla korumaktadır (Robles ve diğerleri, 2019). Bu proteinler yeniden kristalleşmenin önlenmesi ve düşük sıcaklıklarda hücre membranının korunmasını sağlar (DeLuca ve diğerleri, 1998). Farklı AFP' ler, koç (Payne ve diğerleri, 1994), Japon beyaz tavşanı (Nishijima ve diğerleri, 2014) şempanze, (Younis ve diğerleri, 1998) ve manda (Qadeer ve diğerleri, 2014) gibi bazı türlerde spermanın hem kısa süreli saklanması hem de uzun süreli saklanması için kullanılmıştır. Bu çalışmalar, AFP lerin koç, tavşan, manda ve şempanze spermasının saklanması için çözündürme sonrası spermatozoon motilitesi üzerinde faydalı etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ek olarak, manda ve şempanze spermasına AFP ilave edilen grubun çözündürme sonrası spermatozoon membran ve akrozom bütünlüğü daha yüksek çıkmıştır. Bununla birlikte, iki çalışmada da AFP' lerin 5 °C 'de saklanan sperma üzerine sitotoksik etkileri bildirilmiştir. AFP'lerin çözündürme sonrası spermatolojik parametreler üzerindeki yararlı etkisinin değişken olduğu ve etkinliğinin türe, AFP'nin tipine, AFP dozuna, kombine kriyoprotektan ve uygulanan kriyoprezervasyon ve soğutma protokolüne bağlı olduğu yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Robles ve diğerleri, 2019). Sentetik bir AFP olan CPLL Matsumura ve Hyon tarafından 2009 yılında üretilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda sperma kalitesini ve fertilitiyi artırmak amacıyla kullanımının yanı sıra mandalarda ve boğalarda gliserolün toksisitesini azaltmak amacıyla da kullanılmıştır (Fujikawa ve diğerleri, 2018). Amfolitik bir polimer olan CPLL epsilon poli l-lizin ve

süksinik anhidratın sentezlenmesinden sonra amino gruplarının %65'inin karboksil gruplarına dönüştürülmesi ile elde edilir. CPLL'nin yüksek kriyoprotektif özelliğe sahip olduğu ve hücrelerin dondurulmasında kriyoprotektan madde olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Matsumura ve Hyon, 2009).

Yapılan çalışmalarda DMSO'dan daha düşük sitotoksositeye ve yüksek kriyoprotektif etkinliğe sahip olduğu ortaya konmuştur. Küçük ve diğerlerinin (2021) yaptığı çalışmada sulandırıcıya DMSO varlığında CPLL ilavesinin, spermatolojik parametreleri ve çözündürme sonrası DNA bütünlüğünü iyileştirdiği rapor edilmiştir. Spermanın kriyoprezervasyonunda CPLL'nin kullanıldığı çalışmalar mevcutken, koç spermasının kısa süreli saklama sırasında CPLL ilavesinin etkisini araştıran bir çalışma henüz mevcut değildir. Bu çalışmanın amacı, CPLL ilave edilerek kısa süreli saklanan koç spermasının kalitesini ve fertilizasyon yeteneğini değerlendirmek ve suni tohumlamada soğutulmuş spermanın kullanılmasının arttırılmasını hedeflemektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Hayvancılık, insanlık tarihinin ilk dönemlerinden itibaren en önemli ekonomik faaliyetlerden biri olmuştur. Artan nüfusun yeterli, dengeli ve sağlıklı beslenmesini sağlamada hayvancılık büyük bir rol oynar. Ayrıca, hayvancılıkla ilgili sanayilere hammadde sağlayarak ekonomik değeri artırır. Bu nedenlerle, hayvancılığın ulusal düzeyde stratejik bir sektör olarak geliştirilmesi gerektiği anlaşılmaktadır (Ergün ve Bayram, 2021). Hayvancılık sektörü, toplumun sağlıklı beslenmesi, kırsal kalkınma ve istihdama katkısı bakımından önemlidir (Dalgıç ve diğerleri, 2023).

Türkiye’de küçükbaş hayvan türleri arasında koyun yetiştiriciliği hayvansal üretimin en yoğun faaliyet alanını oluşturmaktadır. Koyun yetiştiriciliğinde, üreticilere düşük kalitedeki meralar ile sığırların yararlanamadığı bitki örtüsünü iyi bir şekilde değerlendirebilme, bakım ve beslemede çeşitli kolaylıklar sağlama gibi birçok yönden çeşitli avantajlar sunmaktadır (Semerci ve Çelik, 2016). "Koyunculuk, küçük ölçekli ve düşük sermaye birikimine sahip işletmelere iş gücünü etkili bir şekilde kullanma imkânı sunmaktadır (Şahin ve Yıldırım, 2002). Türkiye’nin mera alanları, doğal bitki örtüsü, coğrafi özellikleri ve kültürel sosyo-ekonomik yapısı, koyun ve keçi yetiştiriciliğine son derece elverişli bir ortam sunmaktadır (Ergün ve Bayram, 2021). Koyunlar, mera ve otlaklardaki doğal bitki örtüsünü tüketerek et ve süt gibi besin maddeleri üretirler. Pek çok toplumda olduğu gibi bizim toplumumuzda da koyun ve keçi sütü üretim ve tüketimi yaygındır (Yerlikaya ve Karagözlü, 2008). Ayrıca, yapağı ve deri gibi ürünleri ile giyim eşyalarının üretiminde de fayda sağlanmaktadır (Günaydın, 2009). Koyunların bağırsakları, sucuk ve sosis kılıflarının, cerrahi müdahalelerde kullanılan dikiş ipliklerinin (kat güt) imalinde, kemik, boynuz ve tırnakları; düğme, tarak, tutkal ve boya imalinde, yün yağı ise ilaç ve kozmetik sanayiinde kullanılmaktadır (Şahin ve Yıldırım, 2002). Türkiye’de, koyun sayısı bir önceki yıla göre %4,8 artarak 44 milyon 80 bin 584 baş olmuştur (TÜİK, 2024).

## 2.1. Suni Tohumlamanın Önemi

Suni tohumlama, çiftlik hayvanlarının genetik kalitesini ve döl verimini artırmak amacıyla uygulanan ilk önemli biyoteknolojidir (Foote, 2010). Yardımcı üreme teknikleri, cinsiyeti belirlenmiş sperma üretimi, çiftleşme yoluyla bulaşan hastalıkların önlenmesi, verim özellikleri bakımından üstün hayvanların elde edilmesi ve dünya genelinde büyük bir endüstri haline gelmiş spermanın dondurulup saklanması ve satılması gibi çeşitli uygulamaların gelişmesine yol açmıştır (Herdoğan ve diğerleri, 2023). Östrus ve ovulasyonun indüksiyonu/senkronizasyonu gibi diğer teknolojilerle birlikte, yüksek verimli özelliklere sahip erkek hayvanların kullanımını yaygınlaştırır (Alvares ve diğerleri, 2015). Ayrıca, ölü, yaşlı veya yaralı erkek hayvanların kullanımını mümkün kıldığı ve çiftleşme ile bulaşan hastalıkları önleyebildiği bildirilmiştir (Hernández Ballesteros ve diğerleri, 2015).

Küçükbaş hayvanlarda suni tohumlama için taze, taze ve sulandırılmış, soğutulmuş ve dondurulmuş sperma kullanılabilir. Koyunlarda suni tohumlamayı güçleştiren en önemli etken koyun serviksinin morfolojik yapısından kaynaklanmaktadır (Kershaw ve diğerleri, 2005). Koyunlarda suni tohumlama ile ilgili ilk araştırmalar 20. yüzyılda başlamıştır (Foote, 2010). Birinci Dünya Savaşı'ndan sonra, Sovyetler Birliği'nde Milovanov'un önderliğinde bu alanda daha yoğun çalışmalar yapılmış ve 1930'ların başlarında taze ve sulandırılmış sperma ile gerçekleştirilen suni tohumlama, koyun yetiştirme programlarında yaygın olarak kullanılmıştır (Salamon ve Maxwell, 2000).

Suni tohumlamayı yaygın olarak uygulayan ilk ülke Çin'dir, zamanla Avrupa ve Amerika ülkelerinde yaygınlaşmıştır (Foote, 2010). Türkiye'de ise, 1926 yılında bir Rus veteriner hekim Karacabey Harası'na gelerek Türk veteriner hekimlerine suni tohumlama ve döl verimi konularında eğitim vermiştir. Böylece Türkiye, suni tohumlama tekniğini Rusya'dan sonra kullanan ikinci ülke olmuştur. 1950 yılından itibaren Merinoslaştırma programı kapsamında Türkiye'de suni tohumlama yönteminden geniş ölçüde faydalanılmış, 1970 yılından itibaren tohumlanan koyun sayısı 300.000'e ulaşmış ve ülkemizde yaklaşık 300 suni tohumlama istasyonu faaliyet göstermiştir (Herdoğan ve diğerleri, 2023). Bu tarihsel gelişmeler doğrultusunda günümüzde koyunlarda suni tohumlama dondurulmuş ve soğutulmuş sperma ile yapılmaktadır.

### **2.1.1. Koyunlarda Suni Tohumlama**

Koyunlar ve keçiler, mevsimsel poliöstrik hayvanlar olarak bilinir. Bu hayvanların östrus döngüleri genellikle günlerin kısalmaya başladığı sonbahar döneminde başlar ve kışın sonlarına kadar devam eder. Kışın son aylarında başlayan ve yaz ortasında sona eren bu dönem, sezonla ilişkili anöstrus dönemidir. Üremenin kontrolü, koyun ve keçilerin belirli bir zaman diliminde tohumlanmasını ve doğumların aynı dönemde gerçekleşmesini sağlamak amacıyla önemlidir (Habeb ve Kutzler, 2021).

Koyunlarda suni tohumlama genellikle taze sperma ile yapılır, çünkü spermayı dondurmak ve soğutmak teknik olarak zordur. Suni tohumlama işlemlerinde önerilen spermatozoon sayısı, tohumlama yöntemine ve spermanın nasıl elde edildiğine (Tsakmakidis, 2010) ve saklama yöntemine (taze veya dondurulmuş) bağlı olarak değişir. Taze sperma kullanılarak yapılan vajinal (spermanın serviksin önüne bırakılması), servikal (spermanın servikal bölgeye bırakılması) veya intrauterin (laparoskopik teknik) tohumlama yöntemleri genellikle %50-70 oranında gebelik oranları sağlar (Faigl ve diğerleri, 2012).

Dondurulmuş sperma kullanıldığında, laparoskopik veya transservikal intrauterin tohumlama teknikleri, kabul edilebilir gebelik oranı sağlar (Taqueda ve diğerleri, 2011; Kumar ve Naqvi, 2014).

### **2.2. Koçlarda Üreme Organları**

Çoğu türün erkekleriyle karşılaştırıldığında, koçların testisleri oldukça büyüktür (her bir testis vücut ağırlığının yaklaşık %0,5'ini oluşturur) ve oldukça üretkendir. Örneğin, insan testislerine kıyasla vücut ağırlığına oranla 25 kat daha büyüktür. Testisler vücudun dışında skrotumda yer alır ve spermatozoonun, spermatogonia adı verilen öncü kök hücrelerden oluştuğu seminifer tübüller adı verilen tübül ağlarını içerir. Testis boyutu, skrotal çevre (testislerin en geniş noktasındaki çevresi) ile ölçülür ve sperma üretimiyle pozitif bir şekilde ilişkilidir (Wildevs ve diğerleri, 2019).

Sperma, seminifer tübüllerden rete testis ve efferent kanallarla geçerek epididimis içine girer. Epididimis, her bir testisin dış yüzeyinde bulunan, spermatozoonların olgunlaştığı ve depolandığı kısımdır. Epididimis, kaput (baş), korpus (gövde) ve kauda (kuyruk) olmak üzere üç bölüme ayrılır. Epididimis, her bir testisin alt kısmında büyük bir kitle olarak hissedilebilir.



Epididimisin sert ve dolgun bir kuyruğu, koçun iyi miktarda sperma rezervine sahip olduğunu göstermektedir (Wildevs ve diğerleri, 2019).

Sperma daha sonra kauda epididimisten ductus deferens (vas deferens) yoluyla hareket eder. Cinsel uyarılma sırasında, kauda epididimis ve ductus deferens'in kasılmaları, her iki kanalın pelvik üretrada colliculus seminalis adı verilen bölgede birleştiği noktaya taşır. Ductus deferensin son bölümü genişlemiş ve bez yapısındadır, bu kısım ampulla olarak adlandırılır. Sperma colliculus seminalis'e ulaştığında seminal veziküller, prostat bezi ve bulbouretral bez (Cowper bezi)in salgıları ile birlikte seminal plazma ile birleşir. Sperma ve seminal plazma birlikte semen olarak adlandırılır. Koçlarda fibroelastik bir penisi vardır ve bu penis, retractor penis kası tarafından vücut boşluğuna geri çekilerek 'S' şeklinde bir sigmoid fleksiyon oluşturur (Wildevs ve diğerleri, 2019).

### **2.2.1. Koçlarda Spermatogenezis**

Koçlar, ırk ve doğum mevsimine bağlı olarak 5 ile 12 aylık yaşlar arasında pubertaya ulaşır. Spermatogenez 60 ila 70 günlükken başlar ve 120 günde tamamlanır. Spermatogenez, kök hücre spermatogoniasının aynı anda kendini yenileme ve olgun spermatozoaya farklılaşan nesiller oluşturma kapasitesine dayanan karmaşık, oldukça organize, çok etkili bir süreçtir (Brinster ve Avarbock, 1994). Spermatogenez, yani bir spermatogonyal kök hücrenin spermatozoona dönüşme süreci üç ayrı aşamaya ayrılabilir. İlk aşama, çoğalarak spermatositleri oluşturan ve eş zamanlı olarak yenilenerek sayılarını koruyan spermatogonya ile ilgilidir. İkinci aşama, haploid hücrelerin yani spermatidlerin oluşumuna yol açan redüksiyonlu mayotik bölünme sürecinden geçen primer ve sekonder spermatositleri içerir. Üçüncü aşama, spermatozoanın üretimine yol açan bir dizi karmaşık sitolojik dönüşümden geçen spermatidlerle ilgilidir. Her ne kadar spermatogenezin birinci ve üçüncü aşamaları türe özgü morfolojik özellikler gösterse de mayoz bölünme boyunca spermatositler çeşitli memeli türlerinde benzer morfolojik karakterlere sahiptir (Clermont, 1972).

Spermatogenezin başlaması ve devamlılığı, FSH ve LH' nin kontrolü altındadır (Kızılay ve Altay, 2019). Spermatogenez, her bir koç testisinde yaklaşık 7000 metre uzunluğunda olan seminifer tübüllerde gerçekleşmektedir (Clermont, 1972). Diğer türlerde olduğu gibi, koçlarda da spermatogenez, proliferatif/mitotik, mayotik ve haploid post-mayotik olmak üzere üç evreye ayrılır. Bir spermatogoniumun ilk mitotik bölünmesinden başlayarak seminifer tübüllerin merkezine ulaşan olgun bir sperma hücresinin gelişimi 31 gün sürer. Daha sonra

sperm, tübüllerden geçerek testis dışına ve epididimise ulaşmak için 3-4 gün daha harcar. Epididimiste olgunlaşan spermatozoonlar, kauda epididimiste depolanır. Epididimal kanal boyunca sperma transferi 14 gün sürer ve bu s renin çoğu kauda epididimiste geçirilir. Böylece bir spermatogoniumun ilk bölünmesinden, ejak lasyona hazır olgun bir spermatozoon haline gelmesine kadar geçen toplam süre 49 gündür (Jan ve diğerleri, 2012).

Koçlarda yılın her mevsiminde iyi kalitede sperma üretme yeteneği konusunda hala bazı belirsizlikler bulunmaktadır. Fotoperiyodun azalmasıyla birlikte seksüel aktivite düzeyinin sonbaharda zirveye ulaştığı ileri sürülmektedir (Kaya ve diğerleri, 1999).

## **2.2.2. Koçlarda Spermatolojik  zellikler**

Koçlarda spermatolojik özellikler ya , ırk, beslenme, mevsim, sperma alma yöntemi ve sıklığına bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte sperma hacmi düşüktür (Evans ve Maxwell, 1987). Genel olarak, sağlıklı ve ergin bir koçun sperma rengi içerdiği spermatozoon miktarına bağlı olarak de i mekle birlikte, beyazdan krem rengine kadar değişiklik gösterebilmektedir. Koçlarda d l veriminin göstergesi olan sperma miktarı kalitesi ırk, ya , gün uzunluğu, sıcaklık, ejakulasyon sıklığı ve yetiştirme teknikleri gibi faktörler tarafından etkilenmektedir (Aksoy ve diğerleri, 1994; Hafez ve Hafez, 2000; Karagiannidis ve diğerleri, 2000). Bu de i imde ırk ve mevsim en önemli etmenlerdir. Koçlarda sperma hacminin ortalama 1 ml (0.7-2.0 ml), spermatozoon motilitesinin ortalama %75 (%60-80), spermatozoid yoğunluğunun ortalama  $3.0 \times 10^9$  /ml ( $1.5-5.0 \times 10^9$  /ml), normal spermatozoon oranının ortalama %80 (%60- 95) ve sperma pH'sının ortalama 6.9 (5.9-7.3) olduğu bildirilmektedir (Curry ve diğerleri, 1996). Koçlarda spermatozoonların toplam uzunluğunun 60  m, hacminin 31  m<sup>3</sup>, yüz ölçümünün 42  m<sup>2</sup> olduğu; ba  uzunluğu, genişliği ve kalınlığının sırası ile 8,3  m, 4  m ve 1  m olduğu bildirilmektedir (Curry ve diğerleri, 1996). Yapılan çalışmalarda koçlarda sperma üretiminin yıl boyu devamlı olduğu, yılın mevsimlerine bağlı olarak koçlar değişik nicelik ve nitelikte sperma verdikleri, mevsimlere bağlı olarak testis ölçüleri ile spermatolojik özelliklerin de i ti i ve bu değerlerin yazın d  meye ba ladı ı, sonbaharda ise arttığı bildirilmektedir. Spermadaki anormal spermatozoon oranı Ağustos ayında %26, Ekim ayında ise %3 olarak bildirilmiştir (Cupps, 1991).

### 2.2.3. Koçlarda Sperma Alma Yöntemleri

Koçlardan sperma; sun'i vajen, elektroejekülatör ve aşımından sonra koyun vajinasından sperma toplanması yöntemleriyle alınabilmektedir. Suni vajenle sperma alma yöntemi basit, hızlı ve ucuz bir teknik olması sebebiyle sıklıkla tercih edilir. Ayrıca suni vajenle alınan sperma kalitesi doğal ejakülatın en yakın kalitededir. (Tiwari ve Sahni, 1976). Suni vajendeki sıcak su termal stimülasyon sağlarken, yine suni vajendeki basınç mekanik olarak glans penisi uyarır (Donovan ve diğerleri, 2001). Suni vajenle sperma alınması yönteminde koyunun östrusta olması ve koçların suni vajene alıştırılmış olması gerekmektedir.

Sağlıklı olduğu halde suni vajenle sperma alınmayan koçlarda elektroejekülatör yöntemi kullanılabilir. Ancak bu yöntemin hayvanı rahatsız edici olması ve daha fazla iş gücüne ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Evans ve Maxwell, 1987; Yurdaydın, 1994). Elektroejekülatörle alınan spermanın hacmi suni vajenle alınan spermaya kıyasla daha yüksek olurken, sperma yoğunluğu ise daha düşük olmaktadır. Ayrıca elektroejekülatörle alınan sperma idrarla kontaminasyon riski taşımaktadır. Elektroejekülatör (EE), rektuma yerleştirilen bir elektrotla genital organları uyaran sinirlerin elektriksel uygulama ile uyarılması sonucu ereksiyonun ve ejakülasyonun sağlanmasıdır. Bu yöntemde; ilk olarak karboksi metilden üretilmiş 15 cm uzunluğunda, 0,8 cm çapında rektal prop anüse yerleştirilir. Periyodik bir şekilde 3-5 sn aralıklarla kontrollü olarak 0-15 V arası akım artırılarak uygulanır (Nix Orihuela ve Ungerfeld, 2019). EE ile toplanan ejakülatlar, seminal plazmanın (SP) daha yüksek oranda bulunması nedeniyle suni vajenle ile toplanan ejakülatlarla karşılaştırıldığında daha yüksek bir hacme sahiptir (Marco-Jimenez ve diğerleri, 2005). Bu da erkek eklenti bezlerinin aşırı uyarılmasından kaynaklanmaktadır (Mattner ve Voglmayr, 1962).

### 2.3. Koçlarda Spermanın Saklanması

Memeli spermatozoonu, vücut sıcaklığından suyun donma noktasına yakın bir sıcaklığa kadar soğumaya karşı çok hassastır. Soğuk şoku olarak bilinen spermatozoon hasarı, yeniden ısınmayla birlikte geri dönüşümsüz motilite kaybı olarak görülmektedir (Parks, 1997). Soğuk şoku membran geçirgenliğinde seçici geçirgenliğin kaybı ve akrozomal membranın bozulmasıyla kendini gösterir. Soğuk şoku etiyolojisi, membran hasarını ve metabolik fonksiyondaki değişikliği içerir (Parks, 1997). Sıcaklıktaki azalma, membran fosfolipidlerinde sıvı kristalden jel fazına geçişe neden olur ve bu da daha sert membran yapısıyla sonuçlanır.

Soğuk şokunun etkisi, kolesterol/fosfolipit oranı, iki tabakayı tercih etmeyen lipidlerin içeriği, hidrokarbon zinciri doygunluğunun derecesi ve membrandaki protein/fosfolipid oranı gibi membran elemanlarının kombinasyonuna bağlıdır (Parks, 1997).

Koyunlarda dondurulmuş-çözdürülmüş koç sperması ile yapılan servikal suni tohumlama düşük gebelik oranlarıyla sonuçlanırken, laparoskopik intrauterin tohumlama yöntemi daha yaygın olarak tercih edilmektedir (Salamon ve Maxwell, 1995). Ancak, birçok ülkede bu yöntem maliyetli olup, küçük çiftliklerdeki üreticiler için kolayca erişilebilir değildir. Spermanın kısa süreli saklanması, dondurulup çözdürülen sperma yerine tercih edilebilir ve toplandıktan hemen sonra suni tohumlama yapılırsa daha yüksek başarı oranlarına ulaşılabilir. Koç spermatozoonları soğuk şokuna karşı oldukça duyarlıdır (Lopez ve diğerleri, 1999; Barrios ve diğerleri, 2000). Bu durum, membran hasarına, spermatozoonda motilite kaybına ve morfolojik bütünlüğün zarar görmesine sebebiyet verir. Dolayısıyla, dişi üreme kanalındaki spermatozoonların yaşam süresinin kısılmasına, fertilite oranlarının düşmesine ve embriyonik kayıpların artmasına neden olur. Spermanın kriyoprezervasyonunda bu hasar daha belirgindir. Ancak sulandırılmış ve soğutulmuş spermada bu etkiler daha hafif şekilde görülür (Maxwell ve Salamon, 2000).

Milovanov (1940,1951) koç spermasının kısa süreli saklanması ile ilgili çalışmalar yapan ilk araştırmacı olmuştur. Bazı bilim adamları, spermanın kısa süreli saklanmasında uygun sıcaklığın 10-15°C olduğunu öne sürerken (Chang ve Walton, 1940) çoğu araştırmacı koç ve boğa spermasının 0-5°C'de saklandıktan sonra spermatozoonların hayatta kalma oranının daha yüksek olduğunu rapor etmiştir. Bazı araştırmacılar kısa süreli saklama için en uygun sıcaklıkların 10-15°C olduğunu bazıları da koç ve boğa spermatozoonun canlılıklarını devam ettirebilmeleri için 0-5°C' lerin daha iyi olduğunu belirtmişlerdir (Maxwell ve Johnson,1997; Johnson ve diğerleri, 2000). Sperma düşük sıcaklıkta saklandığında, spermatozoonların soğuk şokundan kaynaklanabilecek hasarın en aza indirgenmesi gerekmektedir. Soğuk şokunun zararlı etkileri, 1931'de keşfedilmiştir (Milovanov, 1951). Spermanın oda sıcaklığından yavaşça soğutulmasıyla ya da sperma sulandırıcısına lipidlerin eklenmesiyle soğuk şokunun zararlı etkilerinin önlendiği gözlenmiştir. (Watson, 1995; Moussa ve diğerleri, 2002).

### 2.3.1. Koç Spermasının Uzun Süreli Saklanması (Kriyoprezervasyon)

Spermanın uzun süreli saklanması, genellikle sıvı azotta ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) gerçekleştirilen kriyoprezervasyon işlemi ile sağlanır. Bu yöntem, genetik materyalin uzun vadede korunması, suni tohumlama programlarının yaygınlaştırılması ve farklı yerlerde eş zamanlı kullanılabilmesi açısından büyük avantajlar sunar. Ancak, kriyoprezervasyon işlemi sırasında sperm hücreleri hem fiziksel hem de biyokimyasal birçok zarara maruz kalabilmektedir. Özellikle buz kristali oluşumu, hücre membranının bozulması, soğuk şok ve osmolarite değişimleri, sperma kalitesinde ciddi düşüslere yol açabilir (Holt, 2000; Salamon ve Maxwell, 2000).

Kriyoprezervasyon süreci; spermanın uygun sulandırıcılarla seyreltilmesi, kademeli olarak  $5^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulması, kriyoprotektif maddelerin eklenmesi, belirli bir süre dengelemeye bırakılması (equilibration) ve ardından belirli hızlarda dondurularak sıvı azotta saklanmasını kapsar. Bu süreçte kullanılan sulandırıcılar, sperm hücrelerine enerji sağlamakla kalmaz, aynı zamanda pH dengesi oluşturur, bakteriyel üremeyi baskılar ve hücre membranını stabil tutar. Genellikle Tris-bazlı ya da süt bazlı sulandırıcılar tercih edilir ve bu sulandırıcılara yumurta sarısı, soya lesitini, şekerler, antioksidanlar gibi katkılar da eklenebilir (Hafez ve Hafez 2000; Soylu ve diğerleri, 2007; Forouzanfar ve diğerleri, 2010; Rekha ve diğerleri, 2016).

Kriyoprezervasyonda kullanılan kriyoprotektif ajanlar, spermatozoonları dondurmanın zararlı etkilerine karşı korumak için kritik öneme sahiptir. Bu ajanlar penetre olanlar (intraseküller) ve penetre olmayanlar (ekstraseküller) olmak üzere iki gruba ayrılır. Penetre kriyoprotektanlar, düşük molekül ağırlığına sahip olup hücre membranından geçebilirler. Bu gruba giren gliserol, dimetil sülfoksit (DMSO), etilen glikol ve propanediol gibi maddeler, hücre içi buz oluşumunu azaltır, membran akışkanlığını düzenler ve hücre içi dehidratasyonu kolaylaştırır (Holt,2000; Moore ve Bonilla, 2007; Silva ve diğerleri,2012).

Gliserol, koç spermasının dondurulmasında en yaygın kullanılan kriyoprotektandır. Ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik etki göstererek spermatozoon membranına zarar verebilir. Bu nedenle genellikle %4–7 arasında kullanılır ve optimum konsantrasyonu sulandırıcı bileşimine, soğutma hızına ve ekleme sıcaklığına göre değişir. Gliserolün yanı sıra, etilen glikol gibi alternatif penetran kriyoprotektanlar da bazı çalışmalarda olumlu sonuçlar vermiştir (Silva ve diğerleri, 2012).

Penetre olmayan kriyoprotektanlar ise membrandan geçemezler, ancak hücre dışındaki buz oluşumunu sınırlandırarak dolaylı koruma sağlarlar. Bu gruba yumurta sarısı, süt, trehaloz, sükroz, laktoz, raffinoz gibi şekerler ve dekstrinler dahildir. Özellikle trehaloz ve sükroz gibi disakkaritlerin, hücre membranı stabilizasyonunu desteklediği ve dondurma sonrası canlılığı artırdığı gösterilmiştir (Aboagla ve Terada, 2004; Moustacas ve diğerleri, 2011). Yumurta sarısı ise fosfolipid ve düşük yoğunluklu lipoprotein içeriği sayesinde hücre membranını stabilize ederek soğuk şoka karşı koruma sağlar (Medeiros ve diğerleri, 2002).

Koç spermasının uzun süreli saklanması, programlanabilir bir makine veya manuel makine kullanılarak sıvı nitrojende derin dondurma yoluyla sağlanır. Böyle bir prosedür özel ekipman gerektirir. Ancak çözündürme sonrası spermatozoon canlılık oranı düşüktür. Bununla birlikte, çoğu zaman koç sperması, suni tohumlama için kullanılmadan sadece birkaç gün önce saklanmalıdır. Bu gibi durumlarda, koç sperması sıvı formda (uygun bir sulandırıcıda) birkaç gün boyunca 5 °C'den yüksek olmayan bir sıcaklıkta saklanabilir. Sperma soğutma işlemi sırasında en sık karşılaşılan sorun, lipid peroksidasyonu ve doymamış yağ asitlerinin aşırı oluşumu sonucu spermatozoon membranının hasar görmesidir. Memeli spermatozoonları doymamış yağ asitleri açısından zengindir ve spermatozoon hareketliliğini azaltabilen ve akrozom reaksiyonunu ve spermatozoon kapasitasyonunu bozabilen reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumuna kolayca maruz kalırlar (Sikka, 1996).

Kriyoprezervasyonun başarısı; kullanılan kriyoprotektan türü, sulandırıcı bileşimi, soğutma ve dondurma hızları, gliserolün eklenme zamanı ve ekulibrasyon süresi gibi birçok faktöre bağlıdır. Gliserol, bazı protokollerde sperma 5 °C'ye soğutulduktan sonra eklenir (iki aşamalı yöntem), bazı protokollerde ise tüm içerikle birlikte baştan eklenir (tek aşamalı yöntem). Gelişmiş protokoller genellikle kademeli ve kontrollü soğutma ile birlikte, gliserolün düşük sıcaklıklarda ve yavaşça eklenmesini içerir, bu da hücre stresi ve toksisiteyi azaltır (Evans ve Maxwell 1987; Gill,1999; Watson,2000; Shipley ve diğerleri, 2007).

Sonuç olarak, kriyoprezervasyon işlemi, spermatozoonların canlılık, morfoloji, motilite, akrozom bütünlüğü ve DNA yapısını korumak için dikkatle planlanması gereken çok aşamalı bir süreçtir.

### 2.3.2. Koç Spermasının Kısa Süreli Saklanması

Membranlarında çoklu doymamış yağ asitleri bulunan memeli spermatozoonları, uzun süreli saklama sırasında oksidatif strese son derece duyarlıdır (Vishwanath ve Shannon, 1997; Bansal ve Bilaspuri, 2011). Özellikle koç spermatozoonları, membran fosfolipidlerinin peroksidasyonuna ve buna bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine diğer türlere göre daha duyarlıdır. ROS'un fizyolojik düzeyleri, kapasitasyon, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonu gibi olaylar için gerekli olsa da, bu tür reaktiflerin üretimi ile bunları dengeleyen hücre içi savunma mekanizmaları arasında dengesizlik oluştuğunda, fertilizasyon yeteneği olumsuz etkilenmektedir. ROS'un aşırı üretimi, membran akışkanlığını (Chatterjee ve Gagnon, 2001), kromatin bütünlüğünü ve spermatozoon motilitesini bozabilir (Lopez ve diğerleri, 1999; Kasimanickam ve diğerleri, 2006; Sikka, 1996).

Koç spermasının sıvı halde saklanması, çiftlik koşullarında ve kısa süre içinde yapılacak suni tohumlamalarda, dondurulmuş sperma yerine ucuz ve pratik bir alternatif oluşturmaktadır. Kullanılan sulandırıcı, sperma konsantrasyonu, sıcaklık veya saklama koşullarından bağımsız olarak, koç spermasının uzun süreli saklanması sırasında fertilitede kademeli bir azalma gözlenmektedir (Maxwell ve Salamon, 1993). Fertilitedeki bu azalma, spermatozoonların işlevsel ve morfolojik özelliklerinin bozulmasına, motilitedeki düşüşe ve dişi genital kanalında hayatta kalma yeteneğinin azalmasına bağlıdır (Maxwell ve Salamon, 1993). Koç spermasının uzun süreli saklanmasının ardından servikal tohumlamada elde edilen düşük gebelik oranları hâlâ tam olarak çözülememiş bir sorundur. Günümüzde, soğutulmuş koç sperması genellikle 24 saat içinde kullanılmaktadır ve bu sürede kabul edilebilir gebelik oranları elde edilmektedir (O'Hara ve diğerleri, 2010). Ancak spermanın 4 °C'de daha uzun süre saklanabilmesi, büyük sürülerde üreme yönetimini kolaylaştırmak açısından büyük fayda sağlayacaktır.

Spermanın sıvı olarak kısa süreli saklanmasında kullanılan sulandırıcıların içeriği de fertilite üzerinde önemli rol oynamaktadır. Kısa süreli saklama sırasında ROS oluşumunu önlemek ve oksitleyici süreçlerden kaçınmak için farklı maddeler kullanılabilir. Tris bazlı yumurta sarısının koç spermasını soğuk şokundan korumada etkili olduğu bilinmektedir (Paulenz ve diğerleri, 2002). Soya lesitinini ise hücrelerin etrafında koruyucu bir film oluşturabileceği, fosfolipitlerinin spermatozoon membran fosfolipitlerinin yerini alabileceği rapor edilmiştir. (Simpson ve diğerleri, 1987; Zhang ve diğerleri, 2009). Koç spermasının 5 °C'de 16 güne kadar saklanabildiği, özellikle Tris-tamponlu sulandırıcılara trehaloz ve %10

yumurta sarısı ilavesiyle motilitenin %30 oranında korunabildiği bildirilmiştir (Lopez Saez ve diğerleri, 2000). Yumurta sarısı genellikle %5–40 oranında hem Tris hem de süt bazlı sulandırıcılarda kullanılmıştır (Paulenz ve diğerleri, 2002; Camara ve diğerleri, 2011; Abadjieva ve diğerleri, 2020). Yumurta sarısındaki fosfolipitler, kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL), membran stabilizasyonu ve soğuk şokuna karşı koruma sağlar (Watson, 1981; Moussa ve diğerleri, 2002).

Koç spermasının saklanması uygun sulandırıcı seçimi konusunda literatürde çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Örneğin, bazı çalışmalar Tris bazlı sulandırıcıların süt bazlılara göre daha yüksek motilite ve membran bütünlüğü sağladığını bildirmiştir (Paulenz ve diğerleri, 2002). Ancak bu sulandırıcıların bileşimi heterojen, standardize edilmemiştir ve patojen içerebilmektedir. Bu endişeler, hayvansal protein içermeyen, kimyasal olarak tanımlanmış soya lesitini bazlı sulandırıcıların kullanımını gündeme getirmiştir. Bu tip sulandırıcılar, boğa ve manda (Rastegarnia ve diğerleri, 2014) spermalarının dondurulmasında kullanılmakta olup, günümüzde at (Papa ve diğerleri, 2011) ve koç (Forouzanfar ve diğerleri, 2010; Kasimanickam ve diğerleri, 2006) türlerinde de test edilmektedir. Bu sulandırıcıların koruyucu etkilerinin mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bazı araştırmacılar, hücreler etrafında koruyucu bir film oluşturduklarını (Simpson ve diğerleri, 1987), bazıları ise lesitin fosfolipidlerinin, spermatozoon membranındaki fosfolipidlerin yerine geçebileceğini öne sürmektedir (Zhang ve diğerleri, 2009).

Diğer taraftan, süt bazlı sulandırıcılar ile yapılan tohumlamalarda daha yüksek gebelik oranları rapor edilmiştir (Paulenz ve diğerleri, 2003). Soya lesitini bazlı ticari sulandırıcılardan BioXcell®, AndroMed®'e göre daha yüksek fertilite sağlamıştır (Khalifa ve diğerleri, 2013).

Koç spermatozoonları, yüksek çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içeriği ve düşük kolesterol/fosfolipit oranı nedeniyle reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı oldukça hassastır (White, 1993). Bu nedenle, sıvı saklama sürecinde antioksidan desteği gereklidir. Süperoksit dismutaz, katalaz, melatonin, resveratrol, arı sütü, kinetin, idebenone ve omega-3 PUFA gibi maddelerle desteklenen sulandırıcılarla, spermatozoon motilitesi, akrozom bütünlüğü ve fertiliteyi artırmıştır (Maxwell ve Stojanov, 1996; Eslami ve diğerleri, 2019).

Koç sperması genellikle 4–5 °C'de tüplerde veya tohumlama için doğrudan kullanılabilecek payetlerde saklanır. Saklama süresi ve sıcaklığı, spermatozoonun canlılığı ve fertilitesi üzerinde doğrudan etkilidir. 15 °C'de 6–8 saate kadar saklanan sperma, servikal



tohumlamada etkili şekilde kullanılabilirken; daha uzun süreli saklama için 5 °C tercih edilmektedir (Paulenz ve diğerleri, 2002). Ancak bazı çalışmalar, 15 °C'de 48 saate kadar saklamanın sperma kalitesi açısından daha avantajlı olabileceğini de öne sürmektedir (Mata Campuzano ve diğerleri, 2014).

Saklama süresi arttıkça fertilite oranlarında belirgin düşüşler yaşanmaktadır. 5 °C'de 0, 24, 48 ve 72 saat saklanan spermalarda gebelik oranları sırasıyla %72,7, %64,1, %42,1 ve %29,4 olarak bildirilmektedir. Bu düşüş, spermatoozoon fonksiyonlarının zamanla bozulması ve ROS üretiminin artmasına bağlanmaktadır (O'Hara ve diğerleri, 2010).

Sonuç olarak, kısa süreli sıvı saklama, koç spermasının dondurulmadan korunmasına olanak tanırken, optimum sonuçlar elde edebilmek için uygun sulandırıcı seçimi, antioksidan kullanımı, saklama sıcaklığı ve süresi gibi faktörlerin dikkatle belirlenmesi gereklidir. Ayrıca, servikal tohumlamanın anatomik ve fizyolojik engeller nedeniyle başarı oranı sınırlı olduğundan, intrauterin uygulamalar (örneğin laparoskopik suni tohumlama) veya bu engelleri azaltmaya yönelik çözümler, fertiliteyi artırmada etkili olabilir.

### **2.3.3. Koç Spermasına Soğuk Şokunun ve Oksidatif Stresin Etkisi**

Spermanın +5°C'de kısa süreli saklanması sırasında, spermatozoa motilitesinde ve membran bütünlüğünde azalmalar ile DNA kırıklı spermatozoa oranında artışlar meydana gelmekte ve bu da fertilite oranlarının düşmesine neden olmaktadır. Spermatozoonda gözlenen bu tür değişikliklerin, membran fosfolipitlerinde oluşan lipid peroksidasyonu ve bunun sonucunda ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin (süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali) neden olduğu hasarlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (De Lamirande ve Gagnon, 1992).

Oksidatif stres, vücutta reaktif oksijen türleri üretimi ile antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Sperma saklanması sırasında oluşan oksidatif stres sperma kalitesinin düşmesine sebep olmaktadır. Nükleik asitler, lipidler ve karbonhidratlar gibi biyomoleküller oksidatif stresin hedefi olabilir. Serbest radikallerin üretiminin artışı lipid peroksidasyonuna, motilitenin ve canlı spermatozoon sayısının azalmasına ve orta parçada morfolojik bozukluklara neden olmaktadır (De Lamirande ve Gagnon, 1992). Koç spermatozoon membranı yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asitleri içerdiğinden, serbest radikal saldırılarına karşı hassas olduğu

gözlenmiştir. Bu nedenle, serbest radikaller onlarla kolayca birleşerek doğrudan lipid peroksidasyonuna (LPO) yol açabilmektedir (White,1993).

Spermatozoonlarda geri döndürülemeyen hasarlar meydana getirebilen ani ısı değişikliklerine soğuk şoku adı verilmektedir. Spermayı düşük sıcaklıkta saklarken soğuk şokuna uğrayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle spermatolojik özellikleri belirlenmiş ve sulandırılmış spermanın 5°C'ye soğutulması sırasında çok dikkatli olunması gerekmektedir. Çünkü 17°C'nin altındaki ani sıcaklık değişikliklerinde özellikle spermanın akrozomunda olmak üzere geri döndürülemeyen bozukluklar meydana gelebilmektedir. Sonuçta oluşabilecek değişiklikler spermatozoonun potansiyel fertilitatesini düşürebilmektedir. (Maxwell ve Salamon, 1993).

Soğuk şoku, spermatozoonun motilite ve fertilitasyon kapasitesinin azalmasına sebep olan önemli etkenler arasındadır. Spermatozoon membranı, akrozom ve mitokondri soğuk şokuna karşı oldukça duyarlı yapılardır. Soğuk şoku sonucu spermatozoon membran bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte potasyum, adenosin trifosfat (ATP), lipoproteinler, enzimler ve diğer önemli hücre içi yapıların hücreden dışarıya sızabileceği bildirilmektedir (Cupps, 1991). Kısa süreli saklama yöntemiyle spermayı 2-3 gün süreyle saklamak mümkün olabilmektedir. Ancak, zamana bağlı olarak 4-8 saatten sonra motilitede sürekli bir azalma ve morfolojik bozukluklarda artma meydana gelmektedir. Yapılan bir çalışmada ise, kısa süreli saklanan koç spermasının mitokondriyal aktivitesinin ve akrozomal bütünlüğünün azaldığı tespit edilmiştir (Avdatek ve diğerleri, 2018).

## **2.4. Antifriz Proteinler**

Dünyadaki karasal ve sucul habitatların %80'inden fazlasının sıcaklığı, suyun donma noktasına yakın seyretmektedir (Margesin ve Miteva, 2011; Mangiagalli ve diğerleri, 2017). Düşük çevre sıcaklıkları, hücre membranının akışkanlığını azaltarak biyolojik süreçleri olumsuz etkilemektedir. Kritik derecede düşük sıcaklıklarda, proteinlerin polipeptit zincirleri kırılmakta ve genellikle protein yapısında gizli kalan gruplar açığa çıkmaktadır. Hücrede hidrofobik etkileşimlerin zayıflamasıyla protein katlanması bozulmakta ve transkripsiyon, translasyon, hücre bölünmesi ve kimyasal reaksiyonlar gibi temel süreçlerin hızları ciddi oranda yavaşlamaktadır (De Maayer ve diğerleri, 2014).

Pek çok organizma düşük sıcaklıklarda hücre membranında doymamış lipid oranının artırılması, soğuk şok proteinlerinin ve aktif enzimlerin sentezlenmesi gibi adaptasyonlar

geliştirerek bu koşullarda hayatta kalmayı başarmaktadır (D'Amico ve diğerleri, 2006). Ancak, donmuş topraklar ve denizler gibi sürekli sıfırın altındaki sıcaklıklarda, hücre içi ve dışı buz kristali oluşumu, hücreye zarar vermekte ve hatta organizmanın ölümüne yol açabilmektedir (Mangiagalli ve diğerleri, 2017).

Düşük sıcaklıklarda hayatta kalabilmek için pek çok organizma, AFP olarak bilinen polipeptitleri sentezlemektedir (Üstün ve Turhan, 2015; Lo Giudice ve Rizzo, 2018). Bu proteinler buza bağlanma yeteneğine sahip olup içinde bulundukları solüsyonların donma noktalarını düşürür ancak erime noktalarını değiştirmezler. AFP'ler donmayı engellemez, bunun yerine hidrofilik özellikleri nedeniyle buzla etkileşime girerek buzun büyümesini ve yeniden kristalleşmesini engeller. Erime noktasını değiştirmeden donma noktasında bir düşüşe neden olur (Fei ve diğerleri, 2008). Bu olay “termal histerezis” olarak bilinir. AFP ler buz kristallerinin pürüzsüz yüzeylerine bazal ya da piramidal düzeyde bağlanarak daha fazla büyümelerine engel olurlar. Ayrıca, bu proteinler hücrelerin özellikle düşük sıcaklıklarda (daha düşük hızda) çözündürülmesi sırasında yeniden buz kristallerinin oluşumunu (rekristalizasyon olgusu) engelleyerek bu kristallerin hücrelerde oluşturabileceği mekanik hasarları önler. Antifriz proteinleri, erime ve donma noktaları arasındaki sıcaklığı koruyarak buz kristallerinin büyümesini belirli bir sınırdan tutmaktadır. Antifriz proteinleri mikroorganizmalardan (Xiao ve diğerleri, 2010; Lee ve diğerleri, 2010) balıklara (DeVries ve Wohlschlag, 1969) böceklerden (Kristiansen ve diğerleri, 2011) bitkilere (Middleton ve diğerleri, 2009) ve omurgalı hayvanlara (Feeney ve Hofmann, 1973) kadar pek çok canlı türü tarafından sentezlenmektedir. Genel olarak; böceklere ait AFP lerin antifriz etkileri balıklardan izole edilenlere göre çok daha yoğun ve etkindir (Bang ve diğerleri, 2013). Araştırmacılar, antifriz proteinlerinin balık kanının donma noktasını deniz suyunun donma noktasının altına düşürdüğünü, ancak plazma ozmotik basıncını artırmadığını rapor etmişlerdir (Hamdan, 2018). Scholander ve diğer araştırmacılar balık kanının donma noktasına ulaşıldığında buz kristallerinin büyümesinde belirgin bir gecikme olduğunu bildirmişlerdir (Scholander ve diğerleri, 1957).

AFP'lerin buz bağlama bölgeleri ve yapışma yüzeyleri aracılığıyla hücreleri buz üzerinde konumlandığı, böylece organizmanın besin ve oksijen erişimini kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Lorv ve diğerleri, 2014; Voets, 2017).

AFP ler buz kristallerinin şekillenme ve büyümelerini etkiledikleri için donmuş gıda endüstrisinde, transplante edilecek hücre, doku ve organ dondurulmasında ve kriyocerrahi gibi tıp ve biyolojinin farklı alanlarında kullanılmaktadır. İzole edildikleri hayvan türlerinin

farklı olması nedeniyle antifriz proteinlerin moleküler yapı ve şekilleri farklılık gösterir. Tip 1 antifriz proteinler ilk olarak arktik pisi balıklarında (*Pseudopleuronectes americanus*) tespit edilmiş ve antifriz yetenekleri nedeniyle çeşitli doku ve hücrelerde yapılan dondurarak saklama araştırmalarında kullanılmışlardır. (Rubinsky ve diğerleri, 1992). Tip 1 AFP'ler ayrıca kısa boynuzlu kaya balığında da (*Myoxocephalus scorpius*) tespit edilmiştir. Alanin den zengin hidrofobik bölgeleri nedeniyle Tip 1 antifriz proteinler donmaya karşı yüksek koruyucu etkinlik gösterir. Bu gruptaki AFP ler hücre membranlarının yapısındaki pasif iyon kanallarının bloke edilmesini sağlayarak biyolojik membranların elektrolit geçirgenliğini durdurur veya azaltırlar (Rubinsky ve diğerleri, 1992). Deniz kuzgununda (*Hemirhamphys americanus*), gökkuşağı kokusu balığında (*Osmerus mordax*) ve Atlantik ringa balığında (*Clupea harengus*) bulunan Tip 2 AFP'ler, disülfür bağlarıyla stabilize edilmiş sistein açısından zengin proteinlerdir (11–22 kDa). Okyanus pout'unda (*Zoarces americanus*) ve kurt balığında (*Anarhichas lupus*) bulunan, tip III AFP'ler alanin veya sistein kalıntıları ile birlikte 66 amino asit içeren küresel proteinlerdir (6,5 kDa). Uzun boynuzlu Sculpin'de (*Myoxocephalus octodecimspinosis*) bulunan Tip 4 AFP ise alanin açısından zengin veya glutamin/glutamat açısından zengin proteinlerdir (sırasıyla 6,5 ve 12 kDa). (Harding ve diğerleri, 1999; Üstün ve Turhan, 2015).

Antifriz glikoproteinler, her treyonine bağlı disakkarit galaktoz-N-asetilgalaktozamin ile birlikte, alanin -alanin-treyoninin 4 ila 50 tripeptit tekrarını içerir. Antifriz glikoproteinler (AFGP), bazı Antarktika notothenioidlerinde ve kuzey morina türlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. (Kwan ve diğerleri, 2005; Venketesh ve Dayananda, 2008). Tip 2 antifriz proteinler sitotoksik etki gösterebilirler ve dondurma sırasındaki etkileri değişken olabilir. Bu nedenle bu tip AFP ler sıklıkla kriyocerrahi maksadıyla kullanılırlar (Wang ve diğerleri, 1999). Tümör dokularının kriyocerrahi uygulamaları ile uzaklaştırılması sırasında antifriz proteinlerin tümör dokusuna enjekte edilerek kullanılmasının insanlarda prostatik adenokarsinoma ve subkutan tümörlerin) cerrahi yolla daha başarılı bir biçimde uzaklaştırılmasına yardım ettikleri rapor edilmiştir (Koushafar ve diğerleri, 1997). Tip 3 antifriz proteinler lipid molekülleri ile etkileşmek suretiyle hücre membranının stabilizasyonunu sağlarlar (Payne ve diğerleri, 1994)

Son zamanlarda, tıbbi ve endüstriyel uygulamalar için doğal AFP'nin sınırlı miktarda bulunması nedeniyle, rekombinant teknoloji ve kimyasal sentez yoluyla AFP ve/veya benzer bileşiklerin üretimi araştırılmıştır (Üstün ve Turhan, 2015).

#### 2.4.1. Antifriz Proteinlerinin (AFP) Buz Kristali Yüzeyine Bağlanma Mekanizması

Antifriz proteinlerinin (AFP) işlevselliğini tanımlamak için kullanılan temel kavramlardan biri termal histerezistir (thermal hysteresis, TH). Termal histerezis, bir sıvının erime noktası ile donma noktası arasındaki sıcaklık farkı olarak tanımlanır. Saf suda donma ve erime noktası aynı sıcaklıkta (0 °C) gerçekleşirken, AFP varlığında bu denge bozulur. AFP'ler buz kristallerinin büyümesini engelleyerek donma noktasını düşürürken, erime noktası sabit kalır. Bu durumda, TH değeri pozitif olur ve bu değer, AFP'nin buz kristalizasyonunu engelleme kapasitesiyle doğrudan ilişkilidir (Garnham ve diğerleri, 2011).

Antifriz proteinleri (AFP'ler), canlı organizmalarda düşük sıcaklıklara karşı koruma sağlayan doğal proteinlerdir. Bu proteinler, donma noktasını düşürerek buz kristallerinin büyümesini önler ve bu sayede hücre hasarını azaltır. AFP'lerin bu etkisi, genel olarak “adsorpsiyon-inhibisyon teorisi” ile açıklanmaktadır Farklı türlerden izole edilen AFP'ler yapısal olarak çeşitlilik gösterebilir de, tamamı buz kristallerine bağlanarak benzer işlevleri yerine getirmektedir (Baskaran ve diğerleri, 2021).

AFP'lerin buz yüzeyine bağlanabilmesi için, öncelikle kristalin yüzey yapısını tanıması gerekir. Bu tanıma sürecinde AFP molekülü, buz yüzeyine uygun bir yönelim kazanır ve bu sırada hareket kabiliyeti (difüzyon hızı) azalır. Bu durum, bağlanmadan önce AFP'nin yüzeydeki su molekülleriyle organize bir yapıya sahip olmadığını göstermektedir (Baskaran ve diğerleri, 2021).

AFP, buz yüzeyine doğru şekilde konumlandığında, bağlanma bölgesi ile kristal yüzey arasındaki su molekülleri yeniden organize olarak yer değiştirir ve böylece protein ile buz arasında spesifik bir bağlanma gerçekleşir (Mahatabuddin ve diğerleri, 2018). AFP'ler, yüzeylerindeki su moleküllerini çokgen yapılar hâlinde organize eder ve bu yapılarla düzensiz buz yüzeylerini birleştirerek belirli kristal düzlemlerinde donmayı baskılar (Mahatabuddin ve diğerleri, 2018).

Kristalografik analizler, bazı AFP'lerin buz kristal örgüsüne iki boyutlu olarak düzenli şekilde bağlandığını göstermektedir. Örneğin, böceklerle özgü AFP ler incelendiğinde, bu proteinin üzerindeki su moleküllerinin, buz kristaline benzeyen düzende yer aldığı görülmüştür. Bu bağlanma biçimi,  $\alpha$ -heliks yapısına sahip tip I balık AFP'lerinde gözlenen,

treonin aminoasitleri aracılığıyla gerçekleşen lineer bağlanma düzeninden farklıdır. (Liou ve diğerleri, 2021).

AFP buz yüzeyine bağlandıktan sonra, kristal büyümesi genellikle bağlanma bölgesi olmayan alanlardan engellenir. Bu bölgelerdeki hidrofobik gruplar, buz-su ara yüzeyinde eğrilik oluşturarak donma noktasını düşürür. Bu fiziksel mekanizma, Kelvin etkisi olarak adlandırılır ve kristalleşmeyi termodinamik olarak zorlaştırır (Mahatabuddin ve diğerleri, 2018).

AFP'lerin buz kristaline etkili bağlanabilmesi için, bu bağlanma hızının buz kristali büyüme hızından yüksek olması gerekir. Aksi takdirde, düşük konsantrasyonlardaki AFP'ler buz içerisine hapsolabilir. Floresan işaretleme ile yapılan çalışmalarda, bazı AFP'lerin buz kristallerinin prizmatik veya bazal yüzeylerine yüksek bağlanma afinitesi gösterdiği ve bu özelliğin termal histerezis (TH) aktivitesini artırdığı ortaya konmuştur. Özellikle bazal düzleme bağlanabilen AFP'ler daha yüksek TH aktivitesine sahiptir. Bazal düzleme bağlanamayan proteinlerde ise bu aktivite sınırlı kalmaktadır. (Garnham ve diğerleri, 2011).

Sonuç olarak, bir AFP'nin buz yüzeyine bağlanabildiği alan genişliği, onun buz yeniden kristalleşmesini engelleme kapasitesini belirlemektedir (Garnham ve diğerleri, 2011).

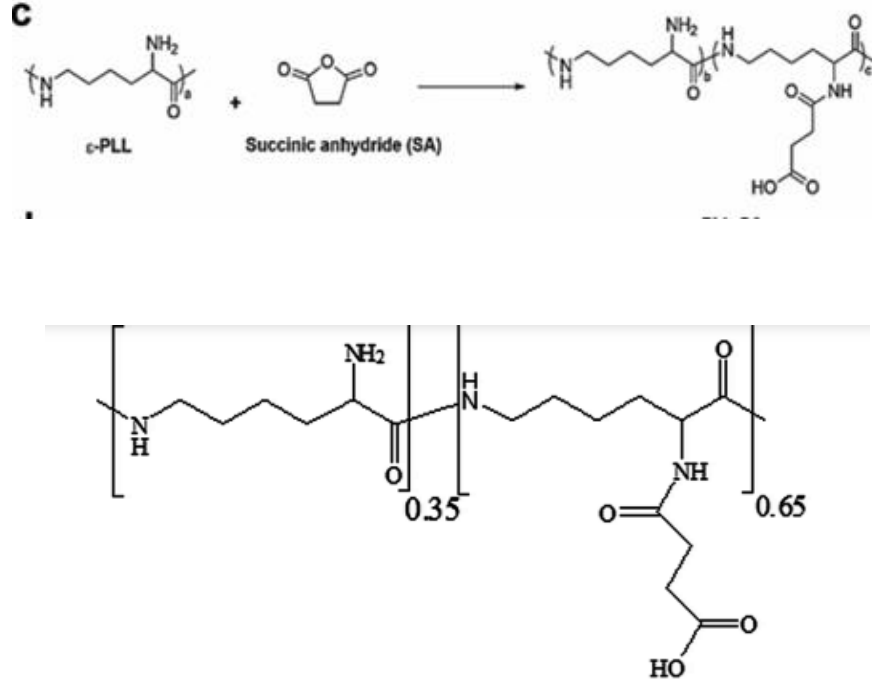
#### **2.4.2. Carboxylated $\epsilon$ - Poly L-Lysine**

1980'lerin sonlarından bu yana, dondurma/çözdürme kaynaklı memeli hücre ölümünü açıklamaya yönelik çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Bu mekanizmalar arasında şunlar yer almaktadır: (i) soğuma sırasında membranların farklı oranlarda büzülmesi ya da jel fazı nükleasyonu ile ilişkili soğuk şok hasarı; (ii) yavaş dondurma sırasında ozmotik dehidrasyon yoluyla hücre hacminde azalma; (iii) hücre içi buz kristali oluşumu ile sistemden suyun uzaklaştırılması sonucu, çözünmüş elektrolit konsantrasyonlarının artışıyla ve/veya enzimlerin ve diğer hücresel yapıların denatürasyonu; (iv) buz kristallerinin hücre membranını delerek ilerlemesi (Shier,1988). Bu koşullar altında hücre ölümüne yol açan birden fazla mekanizmanın eşzamanlı olarak etkili olabileceği düşünülmektedir. Daha düşük sıcaklıklar, daha uzun saklama süreleri ve değişken soğutma/ısıtma hızlarının, etkili olan hücre ölümü mekanizmaların sayısını artırabileceği öngörülmektedir. Kriyoprotektif ajanlar (CPA'lar), sperma ve kırmızı kan hücrelerinin kriyoprezervasyonu amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Gliserol (Polge, 1957) ve dimetil sülfoksitin (DMSO) (Lovelock ve Bishop, 1959) fetal sıgır serumu (FBS) veya albümin gibi proteinlerle karıştırılması yaygındır. Bu

proteinler, dondurma ve çözündürme sırasında hücre içi buz oluşumundan kaynaklanan hasardan hücreyi korumaktadır. Gliserol, kriyoprotektif özelliği zayıf olan bir ajandır. Buna karşın, DMSO daha etkili bir kriyoprotektif ajan olmasına rağmen yüksek sitotoksisiteye sahiptir. DMSO, nöron benzeri hücreler (Oh ve diğerleri, 2006), kardiyak miyositler, (Young ve diğerleri, 2004) ve granülositlerin (Jiang ve diğerleri, 2006) farklılaşmasını olumsuz etkilemekte ve çözüm sonunda ortamdan hızlıca uzaklaştırılması gerekmektedir. Ayrıca, dondurma ve çözündürme sırasında embriyonik kök hücreler ve birincil hepatositler gibi bazı hücre tipleri, mevcut kriyoprotektif maddeler ile uygun bir şekilde kriyoprezervasyona tabi tutulamamaktadır (Zaleski ve diğerleri, 1993).

Dünya genelindeki hücre bankalarında yaygın olarak %10 DMSO ve FBS içeren çözeltiler kriyoprezervasyon için kullanılmaktadır (Son ve diğerleri, 2004; Men ve diğerleri, 2005). DMSO' nun uygun konsantrasyonlarda kullanılması kriyoprezervasyon başarısını arttırırken, FBS bu tekniğin başarısına önemli bir katkıda bulunmaktadır. Fetal sığır serumu, ozmotik basıncı tamponlayan ve hücre membranını koruyan bir ajan olarak dondurma ve çözme sırasında buz kristallerinin yeniden oluşumundan kaynaklanan hasar riskini azaltır (Rana, 1995). Ancak, kök hücre tedavisi gibi klinik uygulamalarda hayvansal proteinlerin kullanımı enfeksiyon riski nedeniyle sınırlıdır. (Pegg, 2002). Hücreler ve dokular, dondurma, düşük sıcaklıkta saklama ve çözme işlemlerine son derece duyarlıdır; bu da geleneksel kriyoprotektan maddelerden daha etkili ajanlara olan ihtiyacı ortaya koymaktadır (Pegg, 2002). AFP' lerin sadece balık ya da böcekler gibi doğal kaynaklardan elde edilmesi bu proteinlerin hem deneysel hem de rutin biçimde kullanımını önemli oranda sınırlamaktadır. Bunun başlıca nedeni üretim teknolojisinin maliyetli olması ve ana ürün dışında pek çok diğer organik maddenin de üretim sırasında ana ürün içerisine karışma riskidir (Matsumura ve Hyon 2009; Bang ve diğerleri, 2013). Bu sebeple yapısal olarak canlı organizmalardan izole edilen AFP moleküllerine benzer sentetik kriyoprotektan moleküllerin tasarlanması ve üretilmesine başlanmıştır (Garnham ve diğerleri, 2011). Son zamanlarda, ise karboksile edilmiş  $\epsilon$ -poli-L-lizinin (COOH-PLL) daha düşük sitotoksisiteye sahip olduğu ve dimetil sülfoksit alternatif bir kriyoprotektif ajan olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir. Carboxylated  $\epsilon$ -poly L-lysine (CPLL) sentetik olarak üretilen AFP etkili proteinlerden biridir (Vorontsov ve diğerleri, 2014). İlk olarak Japonya'da Matsumura ve Hyon tarafından 2009 yılında tasarlanarak üretilmiştir (Matsumura ve Hyon, 2009). COOH-PLL, %25 w/w  $\epsilon$ -poli-L-lysin (PLL) sulu çözeltisi (10 mL; JNC Corp., Tokyo, Japonya) ile süksinik anhidrit (1,3 g; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japonya) karıştırılarak ve 50°C sıcaklıkta 1 saat

boyunca reaksiyona sokularak sentezlenmiştir. Bu işlem sırasında, PLL üzerindeki amino grupların %65'i karboksil gruplarına dönüştürülmüştür. Sentezlenen COOH-PLL' nin moleküler ağırlığı yaklaşık 4000 g/mol olarak belirlenmiştir (Matsumura ve Hyon, 2009).

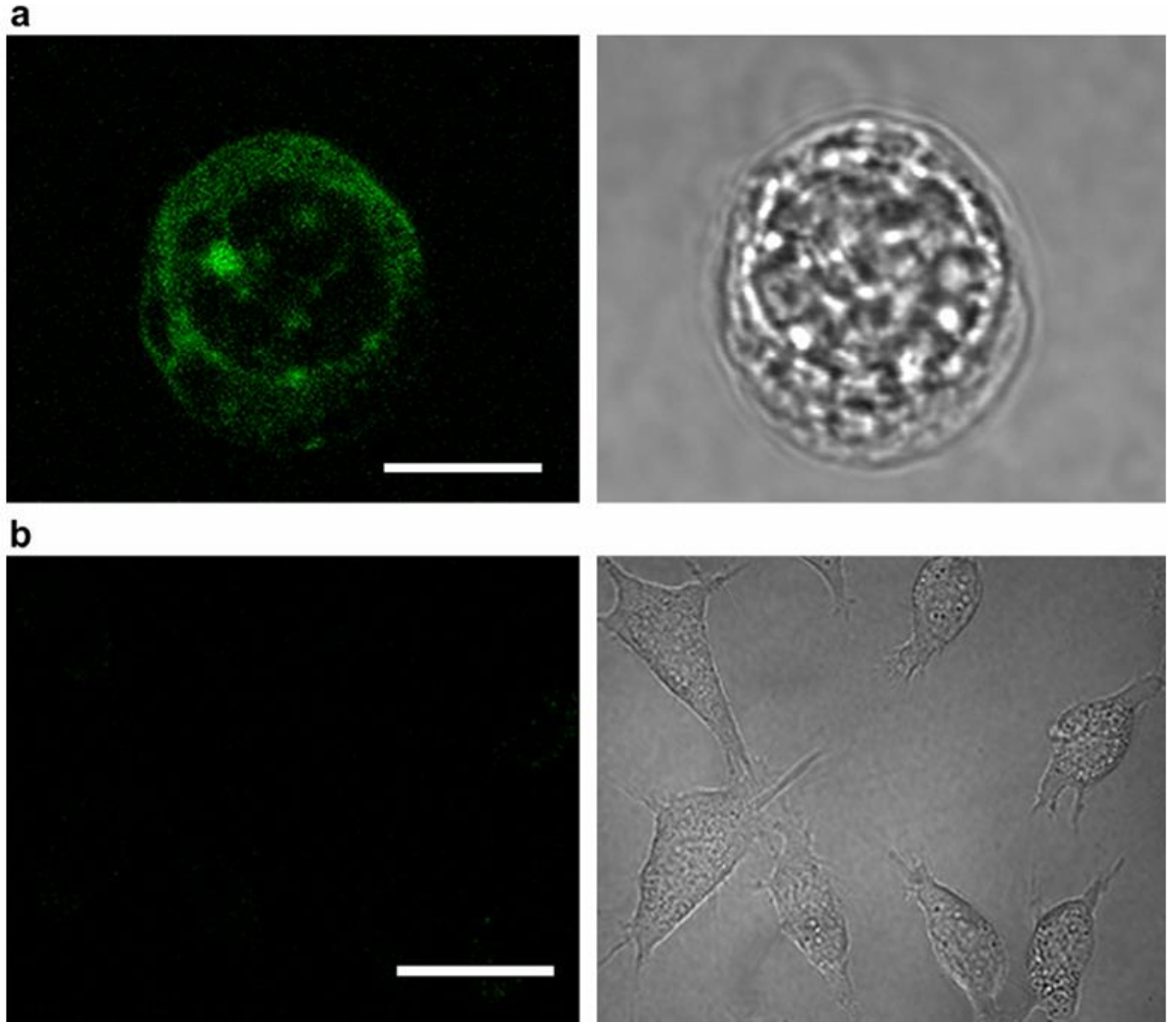


**Şekil 1.** COOH-PLL molekülünün yapısal formülü

COOH-PLL, moleküler yapısı gereği hem pozitif ( $-\text{NH}_3^+$ ) hem de negatif ( $-\text{COO}^-$ ) yük taşıdığı için, biyolojik membranlarla olan elektrostatik etkileşimleri dengeleyebilmekte ve bu sayede membran yapısına zarar vermeden geçici bağlanmalar gerçekleştirebilmektedir (Matsumura ve Hyon, 2009). COOH-PLL, moleküler yapısı gereği hem pozitif (amino grupları  $-\text{NH}_3^+$ ) hem de negatif (karboksil grupları  $-\text{COO}^-$ ) yük taşıyan bir amfolitik polimerdir. Bu özellik, polimerin biyolojik membranlarla olan etkileşimlerini önemli ölçüde şekillendirir. Özellikle spermatozoonlar gibi hassas hücrelerde, hücre membranı çoğunlukla negatif yüklü fosfolipidlerden ve sialik asit gibi yüzeyde yer alan glikokonjugatlardan oluşur. Bu yapılar, spermatozoonlara genel olarak negatif yüzey yükü kazandırır (Pace ve Sullivan, 1975). Negatif yük, hem sperm hücresinin dışı genital kanalında immun sistemden korunmasına hem de fertilizasyon sırasında zona pellucida'ya bağlanma gibi süreçlerde görev alır. Ancak bu durum, pozitif yüklü polimerlerin hücre membranıyla kuvvetli elektrostatik bağlar kurarak membran destabilizasyonuna, geçirgenlik artışına ve potansiyel hücre ölümüne yol açmasına neden olabilir (Pace ve Sullivan, 1975).



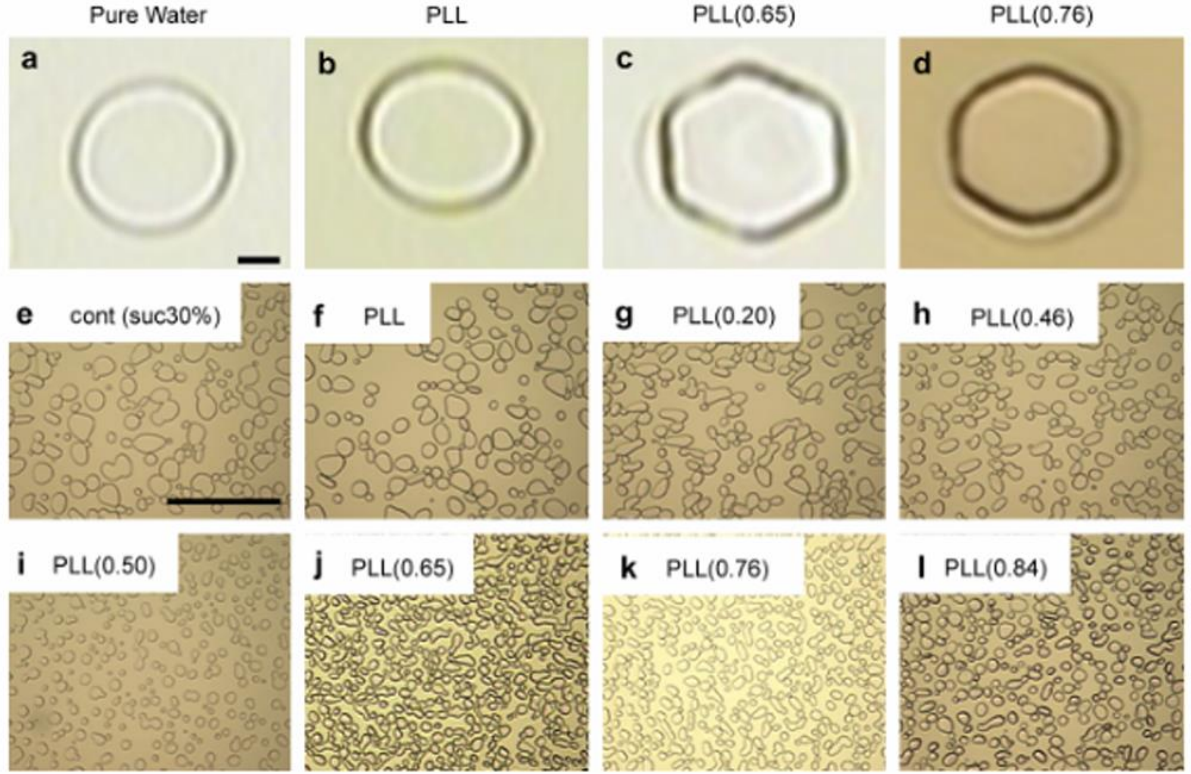
Ancak COOH-PLL'nin amfolitik karakteri, bu elektrostatik bağlanmayı belirli ölçüde dengeleyerek, membrana zarar verme riskini azaltır. Yüzeyle olan etkileşimleri daha zayıf ve geçici hale gelir. Ayrıca bu denge, donma-çözülme süreci sırasında hücre membranlarının birbirine yapışmasını ve mekanik stres kaynaklı zarar görmesini engelleyebilir. Bu nedenle, COOH-PLL düşük sitotoksosite gösteren ve hücre membran doğrudan hedef alarak zarar vermeyen bir polimer olarak değerlendirilmiştir (Matsumura ve Hyon, 2009). Bu özellikleri sayesinde, COOH-PLL hem antifriz etkisi hem de hücresel koruma sağlayarak, kriyoprezervasyon uygulamalarında güvenli bir alternatif olarak öne çıkmaktadır.



**Resim 1.** L929 hücrelerinin konfokal mikroskopik görüntüleri, FITC ile işaretlenmiş PLL (0.65) (a) ile hemen ve (b) çözüldükten 24 saat sonra dondurularak saklanmıştır.

Konfokal mikroskopi ile yapılan çalışmalar, COOH-PLL moleküllerinin kriyoprezervasyon sırasında hücre membranına geçici olarak adsorbe olduğunu göstermiştir. Bu bağlanma zayıf ve geçicidir, muhtemelen karboksil gruplarının PLL üzerindeki iyonik

yükü azaltmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, COOH-PLL'nin toksisitesi DMSO'ya kıyasla oldukça düşüktür ve kriyoprezervasyon sonrası hücrelerden yıkanmasına gerek yoktur (Matsumura ve Hyon, 2009).



**Resim 2.** COOH- PLL 'nin antifriz proteini benzeri aktiviteleri. (a) saf su ve (b) PLL, (c) PLL (0.65) ve (d) PLL (0.76)' nin % 7.5'i (w/w) varlığında buz kristallerinin morfolojileri. (e) % 30 süzkroz kontrolünün ve % 7.5 (w / w) (f) PLL, (g) PLL (0.20), (h) PLL (0.46), (i) PLL (0.50), (j) PLL (0.65), (k) PLL (0.76) ve (l) PLL (0.84) %30 (a / a) süzkroz çözeltisi rekristalizasyonun inhibisyonu.

COOH-PLL' nin buz kristali morfolojisi ve yeniden kristalleşme üzerindeki etkileri çeşitli in vitro sistemlerde değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda %30 (a/a) süzkroz çözeltisi sıklıkla kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Süzkroz, cam benzeri (vitrifiye) yapı oluşturarak buz kristallerinin büyümesini sınırlamakta ve mikroskopik gözlem için uygun bir ortam sağlamaktadır. Böylece, COOH-PLL'nin etkileri, biyolojik kriyoprezervasyon koşullarına benzer bir sistem içinde gözlenmiştir (Matsumura ve Hyon, 2009).

Saf su içinde oluşan buz kristalleri genellikle büyük ve düzensiz yapılara sahiptir. Ancak COOH-PLL'nin farklı karboksilasyon derecelerine sahip formlarının eklenmesiyle buz kristali morfolojisinde belirgin değişiklikler meydana gelmiştir. Özellikle PLL (0.76), daha ince ve yönlü kristaller oluşturarak doğal AFP'lere benzer şekilde kristal gelişimini kontrol

etmiştir. Bunun yanı sıra, %30 sükröz çözeltisi ile birlikte yapılan testlerde, PLL (0.76) ve PLL (0.84) gibi yüksek karboksilasyon derecelerine sahip formların buz kristallerinin yeniden oluşumunu (rekristalizasyon) anlamlı ölçüde inhibe ettiği saptanmıştır. Bu durum, COOH-PLL'nin yalnızca kristal oluşumunu değil, aynı zamanda kristal yeniden yapılanmasını da baskılayarak membran hasarını azaltabileceğini göstermektedir. (Matsumura ve Hyon, 2009). Yüksek karboksilasyon oranlarına sahip PLL türevleri hücre canlılığını biraz düşürse de, hala kriyoprotektif özellik göstermektedir. Bu durum, hem amino hem de karboksil gruplarının kriyoprezervasyon başarısında rol oynadığını düşündürmektedir (Matsumura ve Hyon, 2009).

AFP'ler, buzun prizmatik yüzeylerine bağlanarak buz kristallerinin büyümesini kontrol altına alır ve çoğu zaman altıgen yapılı, zararsız kristallerin oluşumunu teşvik eder. Bu yapı, buzun sivri uçlar oluşturarak hücre zarına zarar vermesini önler ve rekristalizasyonu baskılar. Buna karşılık, PLL'nin %7,5 (a/a) çözeltisi, saf sudaki kristallere benzer şekilde yuvarlak ve düz kenarlı kristaller oluşturmuş ve buz bağlama aktivitesi göstermemiştir. Ayrıca rekristalizasyonu da inhibe edememiştir. Bu da karboksilasyon oranının COOH-PLL'nin antifriz etkisinde belirleyici bir parametre olduğunu göstermektedir (Matsumura ve Hyon, 2009).

COOH-PLL'nin en önemli avantajlarından biri, diğer yaygın kriyoprotektanların (gliserol, etilen glikol, propilen glikol, DMSO) aksine hücre membranından geçememesi ve hücre içine girmemesi nedeniyle metabolize edilmemesidir. Bu sayede toksik metabolit oluşumu riski ortadan kalkar. Yapılan çalışmalarda, COOH-PLL'nin tek başına kullanıldığında bile çeşitli tümör hücrelerinde (L929, MG63, HT1680, B16F1, Caco2, MC3T3 ve KB) çözülme sonrası hücre canlılığını artırdığı bildirilmiştir (Inui ve diğerleri, 2011; Matsumura ve diğerleri, 2013). Ayrıca, insan kökenli pluripotent kök hücrelerin ve nöron benzeri hücrelerin dondurulmasında da COOH-PLL'nin etkinliği gösterilmiştir. Uemura ve diğerleri, (2015), nöronal hücrelerde donmaya bağlı dejeneratif değişikliklerin COOH-PLL kullanımıyla azaldığını bildirmiştir.

L929 hücreleri üzerinde yapılan kriyoprezervasyon çalışmalarında, %7,5 ağırlıkça COOH-PLL çözeltileri kullanılmıştır. Hücre canlılıkları, çözülme sonrası anında ve 6 saat sonra değerlendirilmiştir. Bulgular, karboksilasyon oranı %65'e kadar arttıkça hücre canlılığının da arttığını göstermiştir. Bu oranlarda korunan hücreler, klasik %10 DMSO içeren çözeltilerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha yüksek canlılık sergilemiştir. Özellikle %0,65 karboksilasyon oranına sahip PLL kullanıldığında, %7 ve üzeri konsantrasyonlarda canlılık %10 DMSO'dan daha üstün bulunmuştur (Matsumura ve Hyon, 2009).

COOH-PLL'nin antifriz etkisi, yüksek konsantrasyonlara bağılı olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle 20 mg/mL ve üzeri konsantrasyonlarda, belirli süpersoğutma sıcaklıklarında buz kristallerinin büyümesi tamamen durdurulabilir. Bu durumda oluşan ve kristal büyümesini engelleyen alan, literatürde "ölü bölge" olarak adlandırılmaktadır. Ancak bu etkisi donma noktası üzerinde sınırlı kalmaktadır. Doğal antifriz proteinleri, 0.05 mg/mL gibi düşük konsantrasyonlarda bile donma noktasını 0.6–0.8 K (Kelvin) kadar düşürebilirken, COOH-PLL benzer bir antifriz etkisini yalnızca yaklaşık 20 mg/mL'de ve 0.3 K'lık bir termal histerezisle gösterebilmektedir. Bu da, COOH-PLL'nin kristal büyümesini fiziksel olarak sınırlayabildiğini, ancak donma noktasını termodinamik olarak düşürme kapasitesinin zayıf olduğunu göstermektedir (Matsumura ve Hyon, 2009).

COOH-PLL'nin temel etki mekanizmasının, donma sırasında hücrelerin maruz kaldığı ozmotik stresin azaltılması olduğu ileri sürülmüştür (Matsumura ve diğerleri, 2013). Bu etki, hücrel su dengesinin korunmasına ve donma sonrası hücre hasarının en aza indirilmesine katkı sağlar. Örneğin, Watanabe ve diğerleri (2013), COOH-PLL'nin fare oositlerinin vitrifikasyonunda etilen glikol ile birlikte kullanıldığında başarılı sonuçlar verdiğini bildirmiştir.

Bununla birlikte, COOH-PLL'nin her hücre tipi üzerinde aynı etkiyi göstermediği de bilinmektedir. Simmet ve diğerleri, (2014), COOH-PLL'nin domuz spermatozoonlarında koruyucu etki göstermediğini bildirmiştir. Ancak daha yakın zamanda Japonya'da yürütülen bir çalışmada, gliserol miktarının %6, 5'ten %3,25'e düşürüldüğü ve %0,5 COOH-PLL eklenen tris-sitrik asit-yumurta sarısı bazlı sulandırıcıyla dondurulan sığır spermatozoonlarının çözülme sonrası membran bütünlüğünün anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (%49,6'ya karşılık %60,7). Motilite üzerine belirgin bir etkisi bulunmamasına rağmen, bu grupta gebelik oranlarının önemli ölçüde arttığı (%53,1'e karşılık %79,0) rapor edilmiştir (Fujikawa ve diğerleri, 2018).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Hayvan Materyali

Bu çalışma, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmada hayvan materyali olarak 24-36 aylık 7 baş Kıvırcık ırkı sağlıklı koç kullanıldı. Koçlar çalışma süresi boyunca Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Çiftliği'nde bulunan Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'na ait açık alanda bulunan üstü kapalı padoklarda barındırıldı. Sperma toplanması gibi tüm deneysel işlemler Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Etiği Kurulu (Türkiye) gereklilikleri ve koşullarına uygun olarak gerçekleştirildi. Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'ndan deney hayvanlarının refahı ve kullanımına ilişkin 23/12/2021 tarihli ve sayılı 64583101/2021/175 izin alındıktan sonra gerçekleştirildi.



**Resim 3.** Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Çiftliği



### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler: Tris, sitrik asit, glukoz, FITC, eosin nigrosin, Sigma Aldrich firmasının Türkiye distribütöründen satın alınmıştır. CPLL, Dr. Kazuhiro Matsumura'dan Japonya'dan alınmıştır.

### 3.1.3. Spermanın Alınması



**Resim 4.** Spermanın alınması

Sperma örnekleri Ocak 2023- Şubat 2023 tarihleri arasında haftada 2 kez alındı. Sperma alınmadan önce suni vajen temizlenerek hazırlandı. Şırınga yardımı ile 45°C lik sıcak su ve basınç suni vajen walfine aktarıldı. Sıcak su termosunda 36,5°C suda bekletilen toplama kadehleri suni vajene yerleştirildi. Kızgın koyun sperma alınacak koçun önüne getirildi. Suni vajene alıştırılmış 7 baş koçtan suni vajen yöntemi ile sperma alındı. Alınan ejakülatların hacim ve renk açısından uygun olmayanları kullanılmadı. Uygun özellikte olanlar ise (sperma yoğunluğu  $\geq 3$  milyar spermatozoa/ml; motilite  $\geq 70\%$ ) kontrol edilerek pooling yapılarak kullanıldı.

### 3.1.4. Spermanın Sulandırılması Stok solüsyonu Hazırlanması

Ejekulatların ilk değerlendirilmesinden sonra en iyi ejekulatlar birleştirildi. Pool edilen spermadan 250 mikrolitre ( $\mu$ l) olacak şekilde alındı. 10 ml TCG Solüsyonu sperma alınmadan bir gün önce hazırlandı. Bu solüsyondan hazırlanan stok solüsyonunun formülü şu şekildedir.

**Tablo 1.** 4 °C de saklanan 10 ml lik koç sperması sulandırıcısının kimyasal bileşimi (Evans ve Maxwell, 1987)

|                        | Kontrol           | %0,5 CPLL        | %1 CPLL          |
|------------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Tris                   | 0.363 g           | 0.363 g          | 0.363 g          |
| Sitrik Asit            | 0.199 g           | 0.199 g          | 0.199 g          |
| Glukoz                 | 0.05 g            | 0.05 g           | 0.05 g           |
| Penisilin-Streptomisin | 10000 IU<br>10 mg | 10000 IU<br>10mg | 10000IU<br>10 mg |
| CPLL                   | 0                 | 0,05 g           | 0.1 g            |

TCG solüsyonundan 1250  $\mu$ l eklenerek sperma 6 kat sulandırıldı. Her bir ependorf tüpüne yaklaşık 350  $\mu$ l örnek eklendi. Toplamda 9 ependorf tüpünden oluşan parti, inkübatörde 4°C lik sıcaklıkta sırası ile 3,6 ve 24.saat tutuldu.



**Resim 5.** Stok solüsyonun hazırlanması

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Deneysel Çalışma

Dr. Kazuhiro Matsumura'dan Japonya'dan direkt olarak elde edilen CPLL (carboxylated poly-L-lysine) çalışmada %0,5 ve %1 oranında kullanılmıştır. Bu dozlar ön çalışmalardaki doz-cevap deneyleri sonuçlarına göre tercih edilmiştir. Kontrol grubu ve deney grubu örnekleri 4 °C de inkübe edilerek 0, 3, 6 ve 24. saatlerde seçilen spermatolojik parametreler yönünden muayene edildi. Spermatolojik değerlendirmelerde total motilite, progressif motilite, ölü canlı spermatozoon oranı, membran bütünlüğü, reakte akrozom oranı ve anormal spermatozoon oranları spermatolojik parametreler olarak değerlendirildi.



**Resim 6.** Spermatolojik parametrelerin tespiti

#### 3.2.1.1. Progressif ve Total Motilite

İnkübatörden çıkarılan örnekler muayene öncesi sıcak su banyosunda 36,5 °C de 10 dakika bekletilmiştir. Motilite değerlendirilmesi faz kontrast mikroskobuna (Olympus, CX41, Japonya) bağlı CASA sistemi (SCA®-Sperm Class Analizörü, Microptic S.L. Viladomat, Barselona, İspanya) kullanılarak yapıldı. Sulandırılan spermadan 50 µl alındı. 450 µl TCG solüsyonu ile sulandırılarak (1:9 v/v) motilite muayenesi yapıldı. Sulandırılan örnekten 3 µl örnek lama damlatıldı. Üzeri 18x18lik lamel ile kapatıldı. CASA sistemi koç sperma özelliklerine göre ayarlanarak standardize edildi. Daha sonra ısıtma tablalı mikroskopta



(Olympos CX41) x10 luk objektifte her bir grup için en az üç farklı alandan toplamda 1000 spermatozoon değerlendirildi. Elde edilen değerlerin ortalamaları alındı.

### 3.2.1.2. Ölü Canlı Spermatozoon Oranı

Sulandırılan sperma örneğinden 3 µl alınarak lam üzerine damlatıldı. Üzerine eosin-nigrosin (5gr Eosin ve 10 gr Nigrosin 100 ml suda çözündürülerek hazırlanmıştır) boyasından 3 µl damlatılıp sperma örneği ile karıştırılarak lamel yardımıyla froti çekildi. Isıtma tablasında frothinin kuruması beklendi. Işık mikroskopunda x20 lik objektifte 200 hücre sayıldı. Sayılan hücrelerden kırmızı renk alanlar ve yarı boyalı olanlar ölü, renksiz olanlar canlı olarak değerlendirilmiştir (Emmens, 1947).

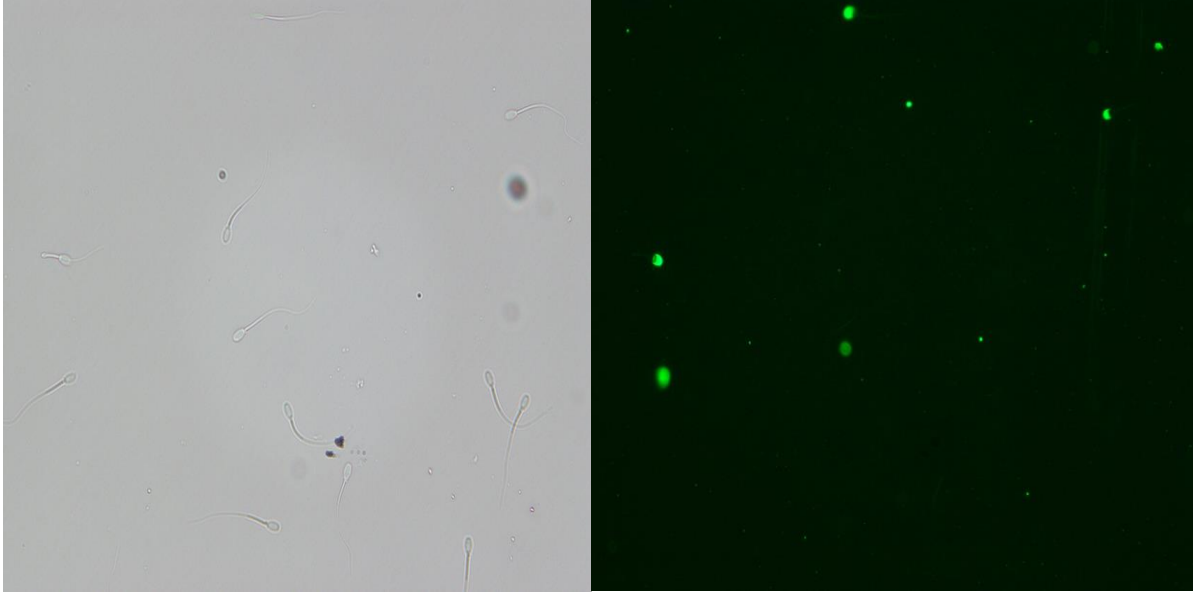


**Resim 7.** Ölü ve canlı spermatozoonlar (A: Ölü spermatozoon, B: Canlı spermatozoon)

### 3.2.1.3. Prematür Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatozoon Oranı

FITC ile reakte akrozom oranının belirlenmesi, floresan özellikli spesifik bağlanma esasına dayanmaktadır. FITC (Fluorescein Isothiocyanate), floresan boyama tekniği ile akrozom reaksiyonunun belirlenmesinde rutin kullanılan bir yöntemdir. Bu teknik, akrozomla ilişkili proteinlerin spesifik antikörlerle işaretlenmesi ve FITC ile bağlanarak floresan mikroskop altında incelenmesi esasına dayanır. Akrozom oranı, bu işaretlenmiş hücrelerin floresan sinyalleri yardımıyla değerlendirilir (Cross ve Meizel, 1989). Sulandırılan spermadan 5 µl alınarak tekrar 45 µl sulandırıcı eklendi. Sulandırılan sperma karanlık bir odada 5 µl FITC (L7381) ile muamele edildi. Reakte akrozom oranına bakılmadan hemen önce ise

reaksiyonun durdurulması için 5 µl fiksatif ortama eklenerek 5 dakika beklendi. Fikze edilmiş numuneden 2 µl alınıp lama damlatılarak üzerine lamel kapatıldı. Ardından hazırlanan preparatlar floresan mikroskop altında incelendi. Spermatozoonun akrozom kısmı FITC tarafından boyanıp yeşil floresan renk veren akrozomlar reakte olarak kabul edildi. Renk vermeyenler ise reakte olmayan akrozoma sahip spermatozoon olarak değerlendirildi. Toplamda en az 200 hücre sayıldı. Reakte akrozoma sahip olan hücrelerin toplam hücrelere oranı hesaplanarak prematüre reakte akrozom oranı % olarak bulundu.



**Resim 8.** FITC boyaması sonrası aynı alanın ışık mikroskobu ve FITC görüntüsü

#### 3.2.1.4. Membran Bütünlüğü Oranı

Bu amaçla Jeyendran ve diğerleri (1984) tarafından tanımlanan Hypoosmotic Swelling Test (HOST) yöntemi kullanıldı. 1,8016 g fruktoz ve 2,941 g sodyum sitrat 100 ml distile su içerisinde çözündürülerek 100 m/Osm/kg basıncına sahip fruktoz çözeltisi hazırlandı (Aisen ve diğerleri, 2002). Hazırlanan çözeltiden 475 µl fruktoz solüsyonu içerisine 25 µl sperma eklenerek sıcak su banyosunda 15 dakika inkübe edildi. Kontrol ve deney gruplarının membran bütünlüğü, 4°C de 0, 3, 6ve 24 saatlik saklama süreleri boyunca incelendi. İnkübasyondan sonra lamel yardımıyla froti çekildi. Işık mikroskobunda 400' lük büyütmede toplamda 200 adet hücre olacak şekilde sayım yapıldı. Kıvrık kuyruklu spermatozoonlar membranı bütün, kuyruğu kıvrık olmayanlar ise membranı hasarlı olarak kabul edildi. Membranı bütün olan spermatozoon sayısının toplam hücre sayısına oranı hesaplanarak membran bütünlüğü oranı değerlendirildi.



**Resim 9.** Membranı bütün(C) ve bütün olmayan spermatozoon (D)

### 3.2.1.5. Anormal Spermatozoon Oranı

Morfolojik bozuklukların incelenebilmesi için sıvı fikzasyon yöntemi kullanıldı. Bu amaçla fikzatif özellik gösteren Hancock solüsyonu (Hancock, 1952) kullanıldı. Anormal spermatozoonlar fikze edildikten sonra faz kontrast mikroskopta belirlendi. Ependorf tüplerinin içine 990 µl Hancock solüsyonu ve 10 µl sperma eklenerek hücrelerin çökmesi için 5 dakika beklendi. Sonrasında hazırlanan her bir örnekten 3 µl alınarak lama damlatıldı. Lam üzerine lamel kapatılıp mikroskopta spermatozoonlar hareketsiz olana kadar beklendi. Her bir grup için dört farklı zaman aralığında (0,3,6 ve 24 saat) X 40' lık objektifte 200 adet spermatozoon sayıldı. Anormal spermatozoonlar lokalizasyonuna göre akrozoma, baş kısma, orta kısma ve kuyruğa ait bozukluklar olarak sınıflandırıldı. Morfolojik bozukluklara sahip hücrelerin sayısı toplam hücre sayısına oranlanarak anormal spermatozoon oranı değerlendirildi.

### 3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm veriler bu çalışmada SPSS 20.0 istatistik paket programı (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel analizlerde farklı grupların karşılaştırılması veriler normal dağıldığından tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırılmıştır. Daha sonra ise post-hoc Tukey testi uygulanmıştır. Her grup için parametrelerin ortalama ve standart hataları hesaplandı ve tüm değerler çalışma boyunca bu biçimde (mean± SEM) sunulmuştur.

## 4. BULGULAR

Deney süresince 0, 3, 6 ve 24. saatlerde spermatolojik kalite parametrelerine ilişkin sonuçlar kaydedilerek aşağıdaki tablo ve grafiklerde özetlenmiştir.

### 4.1. Motilite Oranı

#### 4.1.1. Total Motilite Oranı

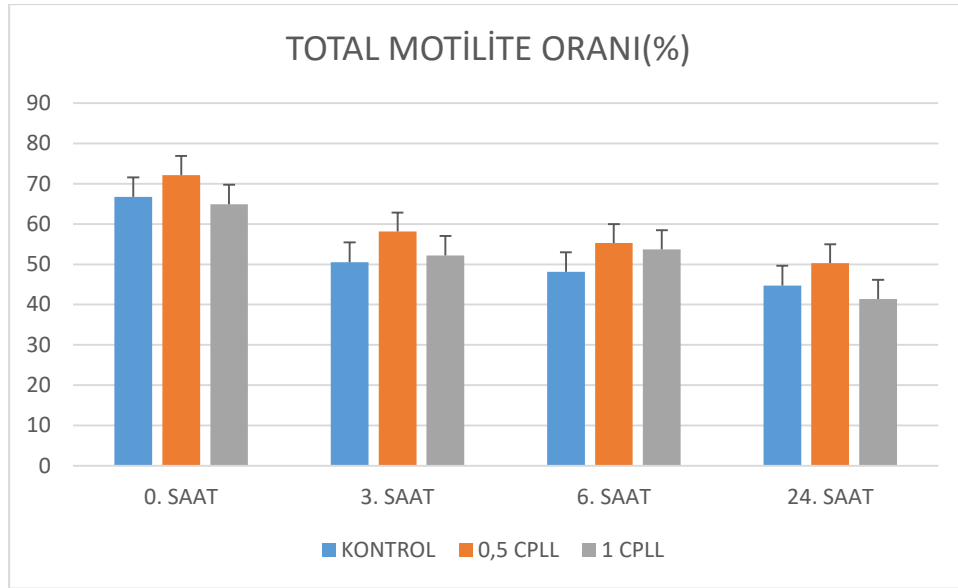
Zaman dilimlerine göre farklı CPLL dozlarının ve kontrol grubunun total motilite değerleri Tablo 2 ve Şekil 2 de sunulmuştur. Kısa süreli saklama süresi boyunca %0,5 CPLL dozunun total motilite değerlerini kontrol grubuna göre nümerik anlamda arttırdığı ancak bu artışın istatistiki olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ( $P>0,05$ ). Deney gruplarında saklama periyodu boyunca %0,5 CPLL grubunun total motilite değeri %1 CPLL içeren grubun total motilite değerine göre yüksek bulunmuştur.

%1 CPLL ilavesinin kontrol grubuna göre total motilite değerlerini 3. ve 6.saatte arttırdığı tespit edilmiştir. Ancak, istatistiksel olarak bu artışın önemli olmadığı belirlenmiştir. ( $P>0,05$ )

Tüm gruplarda sperm hücrelerinin motilitesinin zamanla azaldığı gözlenmiştir. CPLL'nin spermatozoon motilitesi üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu görülse de, 24 saat saklama süresince kontrol ve CPLL grupları (%0,5 ve %1) arasında total motilite açısından anlamlı bir fark görülmemiştir. ( $P>0,05$ ) Ancak, sulandırıcı içerisine %0,5 lik veya %1 lik CPLL ilavesinin deney süresince total motilite değerlerinde nümerik bir yükselmeye neden olduğu tespit edilmiştir.

**Tablo 2.** Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince total motilite oranı (%) üzerine etkisi (mean $\pm$  SEM)

|          | 0.SAAT          | 3.SAAT          | 6.SAAT          | 24.SAAT         |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| KONTROL  | 66,7 $\pm$ 2,67 | 50,5 $\pm$ 4.69 | 48,1 $\pm$ 3.68 | 44,7 $\pm$ 6,01 |
| CPLL 0.5 | 72,2 $\pm$ 4,21 | 58,2 $\pm$ 4.99 | 55,3 $\pm$ 4,07 | 50,3 $\pm$ 5,61 |
| CPLL 1   | 64,9 $\pm$ 3,92 | 52,2 $\pm$ 4,75 | 53,7 $\pm$ 6.76 | 41,4 $\pm$ 4,44 |



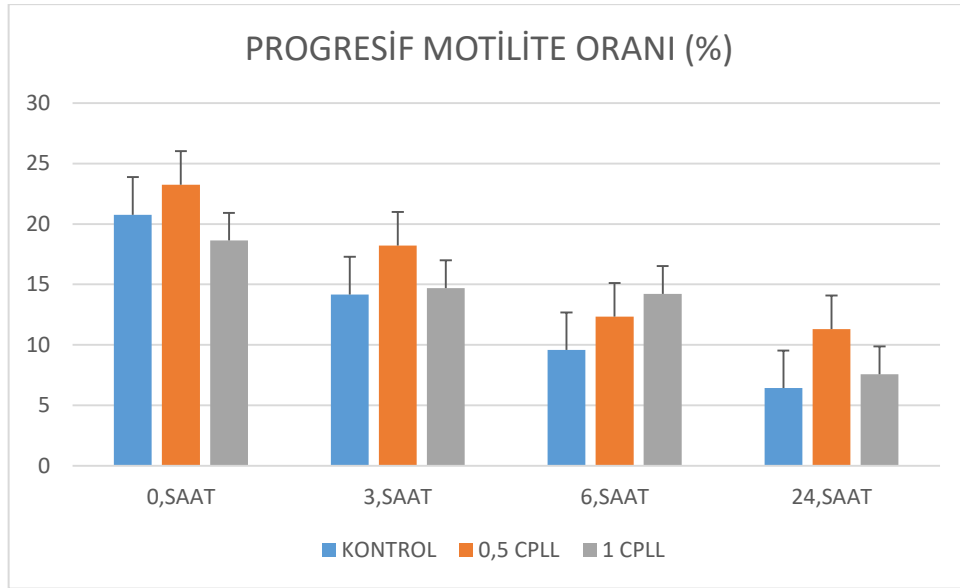
**Şekil 2.** Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince total motilite oranı üzerine etkisi

#### 4.1.2. Progressif Motilite Oranı

Zaman dilimlerine göre farklı CPLL dozlarının ve kontrol grubunun progresif motilite değerleri Tablo 3’de ve Şekil 3 de sunulmuştur. Tabloda saklama periyodu süresince %0,5 CPLL içeren deney grubu kontrol grubuna göre progresif motiliteyi artırmış olup, %1 CPLL içeren grubun ise 3,6 ve 24.saatlerde kontrol grubuna göre yüksek değer verdiği belirlenmiştir. Ancak tüm bu farklar istatistiksel açıdan önemsizdir ( $P>0,05$ ). Tüm gruplarda sperm hücrelerinin progresif motilitesinin zamanla azaldığı gözlenmiştir.

**Tablo 3.** Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince progresif motilite oranı (%) üzerine etkisi (mean $\pm$  SEM)

|                 | 0.SAAT                          | 3.SAAT                          | 6.SAAT                          | 24.SAAT                         |
|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>KONTROL</b>  | <b>20,8<math>\pm</math>2,65</b> | <b>14,2<math>\pm</math>2,74</b> | <b>9,6<math>\pm</math>1,30</b>  | <b>6,4<math>\pm</math>0,92</b>  |
| <b>CPLL 0.5</b> | <b>23,3<math>\pm</math>3,27</b> | <b>18,2<math>\pm</math>2,11</b> | <b>12,4<math>\pm</math>1,65</b> | <b>11,3<math>\pm</math>1,43</b> |
| <b>CPLL 1</b>   | <b>18,6<math>\pm</math>2,95</b> | <b>14,8<math>\pm</math>2,86</b> | <b>14,2<math>\pm</math>3,78</b> | <b>7,6<math>\pm</math>1,67</b>  |



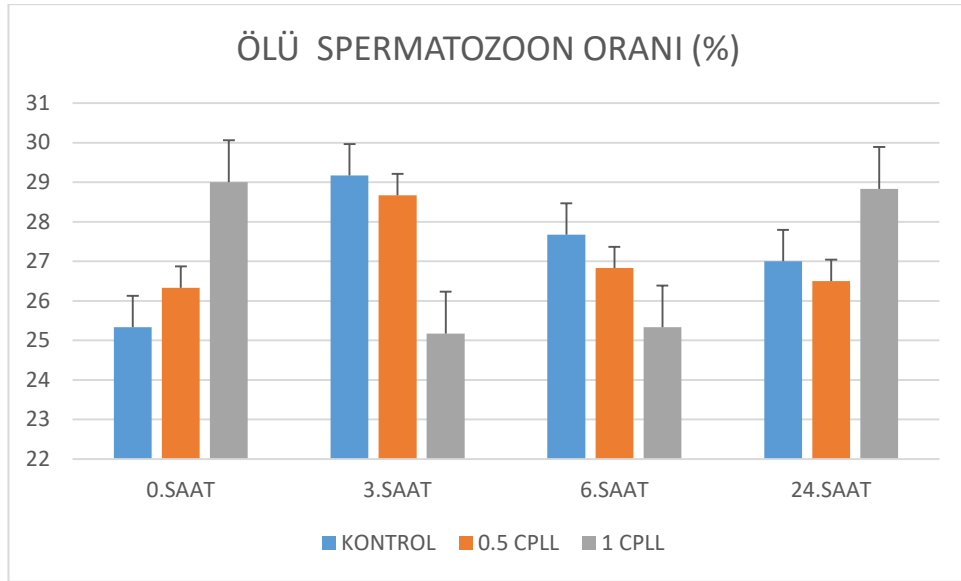
**Şekil 3.** Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince progresif motilite oranı üzerine etkisi

#### 4.2. Ölü Spermatozoon Oranı

Saklama süresince kontrol ve CPLL dozlarının ölü spermatozoon oranları üzerine etkisi Tablo 5 ve Şekil 5 de sunulmuştur. Tablo 5 incelendiğinde %0,5 CPLL içeren grubun kontrol grubuna göre ölü spermatozoon oranını 3, 6 ve 24.saatlerde azalttığı görülmüştür. %1 CPLL içeren grubun 3 ve 6.saatlerde kontrol grubuna göre ölü spermatozoon oranı düşük bulunmuştur. Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin bazı zaman dilimlerinde ölü spermatozoon oranını azalttığı görülsede bu fark istatistiksel açıdan önemsizdir ( $P>0,05$ ).

**Tablo 4.** Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince ölü spermatozoon oranları (%) üzerine etkisi (mean±SEM)

|                 | 0.SAAT           | 3.SAAT           | 6.SAAT            | 24.SAAT          |
|-----------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|
| <b>KONTROL</b>  | <b>25,3±2,89</b> | <b>29,2±3,3</b>  | <b>27,7± 2,63</b> | <b>27.0±1,65</b> |
| <b>CPLL 0.5</b> | <b>26,3±2,47</b> | <b>28,7±2,2</b>  | <b>26,8±2,64</b>  | <b>26,5±1,65</b> |
| <b>CPLL 1</b>   | <b>29.0±2,39</b> | <b>25,2±3,38</b> | <b>25,3±3,50</b>  | <b>28,8±3,19</b> |



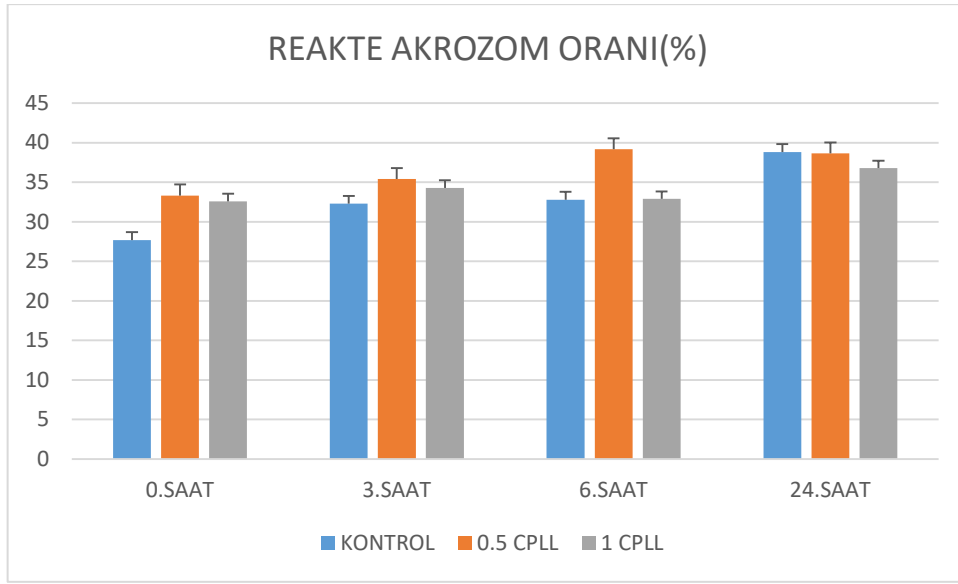
**Şekil 4.** Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince ölü spermatozoon oranları üzerine etkisi

#### 4.3. Prematür Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatozoon Oranı

Zaman dilimlerine göre kontrol ve CPLL eklenen gruplarda prematür akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranlarına ait ortalama değerler Tablo 6 ve Şekil 6 da sunulmuştur. Tablo 6 incelendiğinde ilk 6 saatlik saklama periyodu boyunca CPLL grubunun kontrol grubuna göre reakte akrozom oranını artırdığı görülmüştür. %1 CPLL içeren grup ise 24.saatte diğer gruplara kıyasla reakte akrozom oranını azaltmıştır. Hem kontrol hem de deney gruplarında akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranı zamanla artsa da bu farklar istatistiksel açıdan önemsizdir ( $P>0,05$ )

**Tablo 5.** Çalışma süresince sulandırıcı içerisine CPLL ilavesinin prematür akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranlarına (%) etkisi (mean±SEM)

|                  | 0.SAAT           | 3.SAAT           | 6.SAAT            | 24.SAAT           |
|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| <b>KONTROL</b>   | <b>27,7±4,60</b> | <b>32,3±4,05</b> | <b>32,8± 4,22</b> | <b>%38,8±1,31</b> |
| <b>CPLL %0,5</b> | <b>33,3±6,30</b> | <b>35,4±3,78</b> | <b>39,2±7,70</b>  | <b>%38,6±4,66</b> |
| <b>CPLL %1</b>   | <b>32,6±5,49</b> | <b>34,3±2,93</b> | <b>32,9±3,09</b>  | <b>%36,8±6,32</b> |



**Şekil 5.** Çalışma süresince sulandırıcı içerisine Cpll ilavesinin prematür akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranına etkisi

#### 4.4. Membran Bütünlüğü Oranı

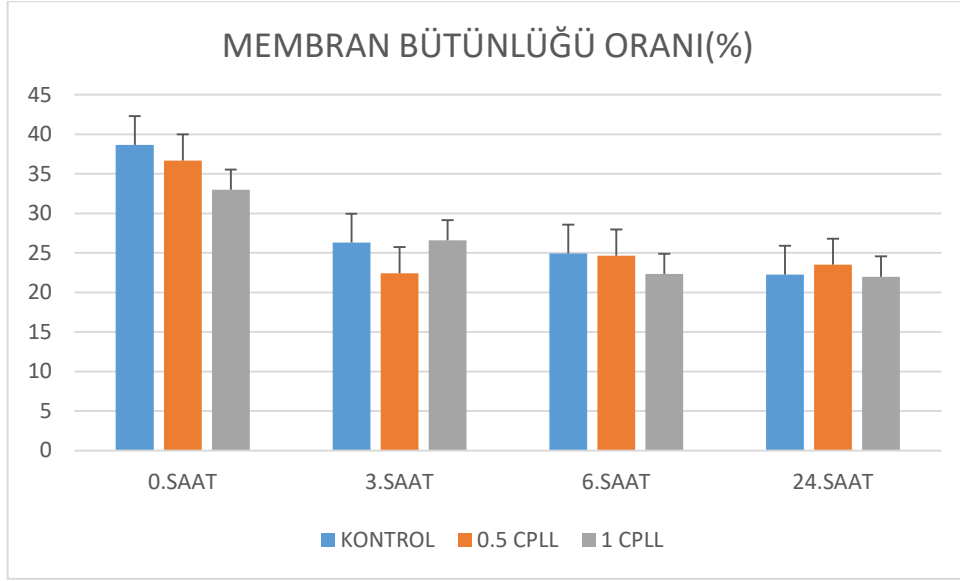
Zaman dilimlerine göre kontrol ve deney grubunun membran bütünlüğü değerleri Tablo 4’de ve Şekil 4 de sunulmuştur. Kontrol grubunun membran bütünlüğü %0,5 ve %1 CPLL gruplarına kıyasla yüksek sonuç verdiği belirlenmiştir. ( $P>0,05$ ). Spermatozoon membran bütünlüğünün kontrol ve deney grubunda zamanla azaldığı görülmektedir.

Verilere göre, %1 CPLL içeren grupta zamana bağlı membran bütünlüğü kaybı daha az olmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P> 0,05$ ).

**Tablo 6.** Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin saklama periyodu boyunca membran bütünlüğü oranları (%) üzerine etkisi(mean±SEM)

|                 | 0.SAAT    | 3.SAAT    | 6.SAAT    | 24.SAAT   |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>KONTROL</b>  | 38,7±4,22 | 26,3±2,23 | 24,9±1,68 | 22,3±2,31 |
| <b>CPLL 0.5</b> | 36,7±5,90 | 22,4±2,00 | 24,7±3,13 | 23,5±1,93 |
| <b>CPLL 1</b>   | 33,0±4,74 | 26,6±2,95 | 22,3±3,24 | 22,0±3,34 |





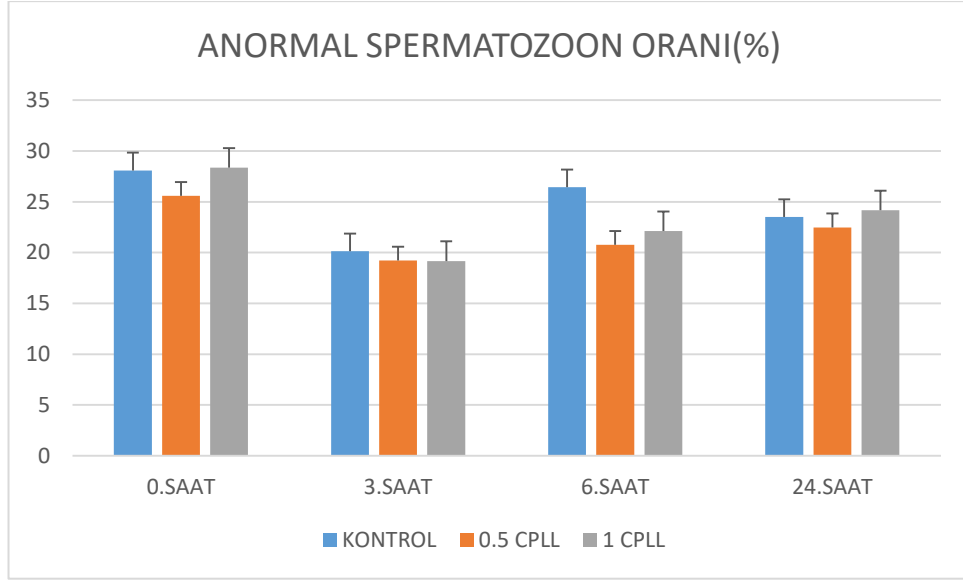
**Şekil 6.** Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin saklama periyodu boyunca membran bütünlüğü oranı üzerine etkisi

#### 4.5. Anormal Spermatozoon Oranı

İnkübasyon dönemi boyunca kontrol ve CPLL ilave edilen gruplarda anormal spermatozoon oranları Tablo 7 ve Şekil 7 de sunulmuştur. Tabloya bakıldığında saklama periyodu boyunca %0,5 CPLL içeren grubun kontrol grubuna kıyasla anormal spermatozoon oranı daha düşük bulunmuştur. Sperma sulandırıcısına %0,5 CPLL ilavesinin 24 saatlik saklama süresi boyunca anormal spermatozoon oranını nümerik olarak azalttığı görülmüştür. %1 CPLL ilavesi 3. ve 6.saatlerde anormal spermatozoon oranını azaltmıştır. Sperma sulandırıcısına CPLL ilavesinin anormal spermatozoon oranını azalttığı görülse de bu fark istatistiksel açıdan önemsizdir ( $P>0,05$ ).

**Tablo 7.** Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince anormal (%) spermatozoon oranı üzerine etkisi (mean $\pm$ SEM)

|                  | 0.SAAT                          | 3.SAAT                          | 6.SAAT                          | 24.SAAT                         |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>KONTROL</b>   | <b>28,1<math>\pm</math>3,43</b> | <b>20,1<math>\pm</math>3,29</b> | <b>26,4<math>\pm</math>6,04</b> | <b>23,5<math>\pm</math>1,22</b> |
| <b>CPLL %0,5</b> | <b>25,6<math>\pm</math>1,91</b> | <b>19,2<math>\pm</math>2,11</b> | <b>20,8<math>\pm</math>3,44</b> | <b>22,5<math>\pm</math>2,00</b> |
| <b>CPLL %1</b>   | <b>28,4<math>\pm</math>2,08</b> | <b>19,2<math>\pm</math>3,99</b> | <b>22,1<math>\pm</math>4,13</b> | <b>24,2<math>\pm</math>2,88</b> |



**Şekil 7.** Sulandırıcıya ilave edilen CPLL nin çalışma süresince anormal spermatozoon oranı üzerine etkisi

## 5. TARTIŞMA

AFP benzeri proteinlerin membran koruyucu özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir (Breton ve diğerleri, 2000; Rubinsky ve diğerleri, 1990). Hücre koruma mekanizmasının, poliamfolitlerin hücre membranına adsorbe olması yoluyla gerçekleştiği ve böylece donma hasarının azaltıldığı düşünülmektedir. Yukarıda açıklanan koruyucu aktiviteleri sergileyen COOH-PLL konsantrasyonlarının aynı zamanda AFP benzeri özelliklere sahip olduğu ortaya konmuştur. AFP'ler, buz kristallerinin yüzeyine bağlanarak suyun donma noktasını düşürerek ve buzun yeniden kristalleşmesini inhibe ederek donmayı engeller (Worrall ve diğerleri, 1998; Griffith ve Yaish, 2004). Büyük buz kristalleri, dondurulmuş hücrelerde ciddi dehidratasyona ve fiziksel hasara yol açar. Buzun yeniden kristalleşmesinin inhibisyonu, AFP'lerin donmaya dayanıklı organizmalardaki fizyolojik işlevini temsil edebilir. AFP'lerin, hücre membranının bütünlüğünü koruyarak hücreleri ve dokuları hipotermiden ve donma hasarından koruduğu bildirilmiştir (Breton ve diğerleri, 2000; Rubinsky ve diğerleri, 1990). Bu olay, hücre membranına bağlanma afiniteleri nedeniyle gerçekleşir (Prathalingam ve diğerleri, 2006). Uygun bir amino ve karboksil grubu oranına sahip CPLL'nin, AFP'ler gibi hücre membranına adsorbe olarak membranı hasardan koruyabileceği öngörülmüştür. Ayrıca, poli-lizin çözeltisindeki polikasyonik moleküller ve CPLL'nin glikoprotein yapıları, hücrelerin hidrofilik yüzeyine kolayca adsorbe olabilir. Bu durum, hücre içinde negatif bir basınç oluşturarak hücre içi suyun dışarı atılmasına ve böylece buz kristali oluşumunun azaltılmasına neden olur; bu da hücre membranını hasardan korur (Grotter ve diğerleri, 2019; Baskaran ve diğerleri, 2021). CPLL karmaşık bir moleküldür, altıgen veya çift piramit şeklindedir; büyük buz kristallerinin morfolojisini değiştirebilir ve küçük buz kristallerini ortadan kaldırabilir. Karboksilatlanmış polilizin (CPLL),  $\epsilon$ -polilizin ve süksinik anhidritin sulu bir çözeltisiyle sentezlenen ve amino gruplarının %65'inin karboksil gruplarına dönüşmesiyle meydana gelen amfolitik bir polimer bileşiktir (Matsumura ve Hyon, 2009). CPLL'nin, birçok hücre ve doku türü için en etkili kriyoprezervasyon ajanı olarak kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO) ile karşılaştırıldığında daha yüksek kriyoprezervasyon etkinliği ve daha düşük sitotoksosite gösterdiği bildirilmiştir (Matsumura ve Hyon, 2009; Fujikawa ve diğerleri, 2017). CPLL, güçlü moleküllerarası etkileşimlerle suyu ve tuzu hücrenin matris boşluklarında hapseder ve dondurma sırasında hücre içi buz oluşumunu ve osmotik şoku engeller (Matsumura ve diğerleri, 2021). CPLL'nin çoğunlukla spermanın kriyoprezervasyonunda sperma

sulandırıcısına eklendiği çeşitli çalışmalar mevcuttur. Sunulan çalışmada koç spermasına eklenen CPLL nin kısa süreli saklamaya etkisi araştırılmış, ancak literatürde CPLL ile ilgili sadece şişe burunlu yunus spermasının kısa süreli saklanması ilişkin çalışma bildirilmiştir (Shimizu ve diğerleri, 2022).

Spermatozoon motilitesi, fertilizasyon kapasitesinin en önemli göstergelerindendir. Çalışmamızda CASA sistemi ile yapılan analizlerde, CPLL ilavesiyle toplam ve progresif motilitede nümerik artışlar saptanmıştır ( $P>0,05$ ). %0,5 lik CPLL ilavesi total ve progresif motilite değerlerinde diğer gruplara göre artış sağlamıştır. %1 CPLL içeren grup ise total motiliteyi 3. ve 6. saatlerde; progresif motiliteyi 3.,6. ve 24. saatlerde kontrol grubuna kıyasla artırmıştır ( $P>0,05$ ). Sunulan çalışmada kontrol grubunun membran bütünlüğü oranı ilk 6 saat boyunca diğer gruplara oranlara yüksek çıkmıştır ( $P>0,05$ ). 24 saatlik saklama süresi sonunda %0,5 CPLL içeren grubun membran bütünlüğü diğer gruplara göre yüksek çıksa da bu fark istatistiksel anlamda önemsizdir. 6 saatlik saklama süresi boyunca CPLL grubu reakte akrozom oranını kontrol grubuna göre artırmıştır ( $P>0,05$ ). 24.saatin sonunda %1 CPLL içeren grubun reakte akrozom oranı diğer gruplara kıyasla daha düşük çıkmıştır. ( $P>0,05$ ). Sperma sulandırıcısına %0,5 CPLL ilavesinin 24 saatlik saklama süresi boyunca anormal spermatozoon oranını nümerik olarak azalttığı görülmüştür. %1 CPLL ilavesi 3. ve 6.saatlerde anormal spermatozoon oranını azaltmıştır. Sperma sulandırıcısına CPLL ilavesinin anormal spermatozoon oranını azalttığı görülse de bu fark istatistiksel açıdan önemsizdir ( $P >0,05$ ). Ancak spermatozoonların soğutulması sırasında morfolojik anlamda daha az zorlanma ve stres yaşadıklarına işaret edebilir.

Sunulan çalışmada koç spermasına katılan CPLL nin kısa süreli saklamaya anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür. Sunulan bulgular, bazı literatür verileriyle paralellik göstermektedir. Küçük ve diğerlerinin (2021) tavşan sperması üzerine yaptığı çalışmada, Karboksilatlı poli-L-lizin (CPLL) ve geleneksel bir kriyoprotektan olan dimetil sülfoksit ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ) kullanılarak kriyoprezervasyon gerçekleştirilmiş; sulandırıcıya %0,5 veya %1 oranında CPLL ilavesinin, çözdürme sonrası canlı spermatozoon ve akrozomu bütün spermatozoon oranlarını anlamlı şekilde artırdığını ( $P < 0,01$ ), ancak motilite ve membran bütünlüğü üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını ortaya koymuştur ( $P>0,05$ ). CPLL'nin temel etkin mekanizması hücre dışı ortamda gerçekleşmekte olup, özellikle buz kristallerinin şekillenmesini ve yeniden kristalleşmesini engelleyerek hücre içi yapılara yönelik bir koruma sağlamaktadır. Dolayısıyla, membran yapısı ve membran geçirgenliği gibi faktörler üzerinde doğrudan bir etkisi sınırlı olabilir. Buna ek olarak, bu çalışmada kullanılan %8 oranındaki

Me<sub>2</sub>SO, sperm hücreleri için toksik etkilere yol açabilecek düzeyde yüksek bir konsantrasyondur. Yüksek Me<sub>2</sub>SO seviyeleri, membran bütünlüğü ve mitokondriyal fonksiyonlar üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir ve bu da motilitenin düşmesine yol açabilir. Bu toksik etkinin, CPLL'nin membran koruyucu etkisini baskılamış olabileceği düşünülmektedir.

Benzer şekilde, Fujikawa ve diğerleri, (2018), boğa sperması üzerinde yürüttükleri çalışmada, kontrol grubunda %6,5 (v/v) gliserol, deney grubunda ise %3,25 (v/v) gliserol + % 0,5 (w/v) CPLL içeren sulandırıcı kullanmış ve çözündürme sonrası spermatozoon motilitesi açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bildirilmemiştir. Ayrıca, spermatozoon motilitesi yalnızca hücre bütünlüğüne değil, aynı zamanda mitokondriyal fonksiyonlara, ATP üretimine ve aksonemal yapının korunmasına da bağlıdır. (Amaral ve diğerleri, 2013; Kumar ve Singh, 2021; Yeste, 2016). CPLL'nin bu yapı ve süreçler üzerinde doğrudan bir etkisi bulunmadığı için, motilite üzerine belirgin bir iyileştirici etki göstermemesi beklenebilir.

Bu bulguların aksine literatürde CPLL' nin olumlu etkiler verdiği çalışmalar da mevcuttur. Şişe burunlu yunus sperması farklı konsantrasyonlardaki CPLL dozları ile 14 gün boyunca saklanmış olup; motilitenin en yüksek olduğu grup %1 lik CPLL olmuştur (Shimizu ve diğerleri, 2022). Şişe burunlu yunus (*Tursiops truncatus*) spermatozoonlarının membran yapısı, deniz memelilerine özgü fizyolojik adaptasyonlar nedeniyle karada yaşayan canlılara kıyasla belirgin yapısal ve biyokimyasal farklılıklar göstermektedir. Özellikle spermatozoon membranı, yüksek düzeyde çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içeriği ile dikkat çekmektedir. Bu yağ asitleri —özellikle dokosaheksaenoik asit (DHA) ve araşidonik asit (AA) membran akışkanlığını artırmakla birlikte, lipid peroksidasyonuna karşı daha duyarlı hale getirmektedir (Montano ve diğerleri, 2012)

Bu farklılığın sebeplerinden biri de sperma sulandırıcısına CPLL ye ilaveten %20 yumurta sarısının kullanılmasından ileri gelebilir. Yumurta sarısının koruyucu etkisi büyük oranda yumurta sarısının içerdiği düşük yoğunluklu lipoproteinlere (LDL) atfedilir. LDL'ler, spermatozoon membranına bağlanarak soğutma ve dondurma sırasında meydana gelen fosfolipid kaybını azaltır ve böylece membran bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur (White,1993). Ayrıca, yumurta sarısındaki antioksidan bileşenler, lipid peroksidasyonunu sınırlayarak spermatozoon canlılığını artırabilir (Moussa ve diğerleri, 2002).

Akhter ve arkadaşlarının 2021 yılında Nili-Ravi manda sperması üzerine yaptıkları çalışmada CPLL ile gliserol arasında oluşan sinerjinin (%4 CPLL + %3 gliserol

kombinasyonu) Nili-Ravi manda spermasının dondurulabilirliğini artırdığı ve oksidatif stresi azaltarak bu etkiyi gösterdiği sonucuna varılmıştır. Buna karşılık CPLL oranının artırılmasıyla spermatozoon membran bütünlüğü, canlılık oranlarında iyileşme sağlandığı gösterilmiştir. Özellikle %4 gliserolün %4 CPLL ile kısmi olarak değiştirilmesi durumunda bu parametrelerde olumlu etkiler bildirilmiştir. Ancak, gliserol oranının %1'in altına düştüğü ve CPLL oranının %6–7'ye çıkarıldığı kombinasyonlarda benzer düzeyde iyileştirici etkiler gözlenmemiştir. Bu durum, CPLL'nin geçirgen olmayan bir kriyoprotektan olması nedeniyle hücre içi dehidratasyonu tek başına sağlayamamasına bağlanabilir. Oysa geçirgen özellikte olan gliserol, hücre içindeki suyun kontrollü şekilde dışarı çıkmasını sağlayarak buz kristali oluşumunu azaltmakta ve donma hasarına karşı koruma sağlamaktadır. Dolayısıyla CPLL' nin gliserolün yerini tamamen alması yerine, kısmen ikame edilmesi daha uygun bir strateji olabilir. Bu bağlamda, boğa sperması üzerine yapılan çalışmalarda da gliserolün CPLL ile kısmen değiştirilmesinin spermatozoon membran bütünlüğünü koruduğu bildirilmektedir (Fujikawa ve diğerleri, 2018). Benzer şekilde, Nili-Ravi mandalarında yapılan çalışmada, %0,75 CPLL ve %5 gliserol içeren kombinasyonun toplam ve progresif motilite, membran bütünlüğü, akrozom bütünlüğü diğer gruplara göre anlamlı derecede daha yüksek ( $P < 0,05$ ) bulunmuştur (Tariq ve diğerleri, 2020). Bu bulgular, CPLL'nin gliserol ile birlikte kullanıldığında sinerjistik bir etki oluşturabileceğini ve spermayı dondurma hasarından koruyabileceğini düşündürmektedir.

Bibi ve arkadaşları (2023), Labeo rohita türü balık spermasının dondurulmasında sulandırıcıya %1,5 oranında CPLL ilavesinin çözündürme sonrası spermatozoon motilitesini anlamlı düzeyde artırdığını bildirmiştir ( $P < 0,05$ ). Zhang ve arkadaşları (2022) tarafından domuz sperması üzerinde yürütülen çalışmada, %0,25 CPLL ilavesinin kriyoprezervasyon sonrası total ve progresif motiliteyi istatistiksel olarak anlamlı biçimde artırdığı gösterilmiştir. Takeuchi ve diğerleri (2021) CPLL, gliserol ve rafinoz içeren kriyoprezervasyon çözeltisinin insan spermasında canlılık ve motilite açısından benzer sonuçlar verdiğini raporlamıştır. Zhang ve arkadaşlarının (2023) keçi sperması kriyoprezervasyonu üzerine yaptıkları çalışmada sperma sulandırıcısına %1 CPLL ilavesinin total motilite, membran bütünlüğü ve akrozom bütünlüğü oranının diğer gruplara göre yüksek sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada koç spermasına farklı oranlarda (%0,5 ve %1) CPLL ilavesi, kısa süreli sıvı saklama süresince spermatolojik parametreler üzerine anlamlı bir etki göstermemiştir ( $P > 0.05$ )

Yukarıda özetlenen literatür bulgularla sunulan çalışma arasında gözlenen sonuçlara ait farklılığın saklama metodundan ve sıcaklık derecelerinden ileri geldiği düşünülebilir. Sentetik bir antifreze protein analogu olan CPLL'nin etkileri dondurma-çözdürme işlemlerinde daha belirgin hale gelirken, kısa süreli sıvı saklama koşullarında bu etkinin sınırlı kalması da olasıdır. Yine soğutulma veya dondurma hızı da AFP lerin etkilerini ön plana çıkartabilmektedir.

Spermatozoon membran yapısının türe özgü farklılıklar göstermesi, CPLL' nin etkinliğini doğrudan etkilemektedir. Örneğin, keçi ve manda spermatozoonları yüksek kolesterol içeriği ile daha stabil membran yapısına sahipken, koç spermatozoonları yüksek doymamış yağ asidi içeriği nedeniyle soğuk şokuna daha duyarlıdır (Watson, 2000; Salmani ve diğerleri, 2014; Andrabi, 2007). Bu nedenle, CPLL' nin hücre dışı etki mekanizması düşünüldüğünde, membranın lipid-protein bileşimi ve geçirgenliği koruyuculuk üzerinde belirleyici olabilir (Fujikawa ve diğerleri, 2018). Keçi ve manda spermatozoonları, membranlarında daha yüksek kolesterol içeriğine sahip olup, bu durum membran stabilitesini artırmakta ve CPLL gibi ekstraselüler kriyoprotektanların membran etkileşimini kolaylaştırmaktadır (Andrabi, 2007; Salmani ve diğerleri, 2014). Özellikle balık spermatozoonlarının, memeli spermatozoon membranına kıyasla daha yüksek oranda doymamış yağ asidi içermesi, CPLL gibi membran koruyucu ajanlardan daha fazla fayda sağlamalarına neden olabilir. CPLL' nin koruyucu etkisi, doğrudan spermatozoonun içine girerek değil, hücre dışı ortamda etkileşim göstererek gerçekleşir. CPLL' nin tek başına kullanıldığında sınırlı etki gösterdiği, ancak dimetilsülfoksit, gliserol gibi diğer bileşenlerle sinerjik etki oluşturarak koruyuculuğunu artırdığı bildirilmiştir. (Matsumura ve diğerleri, 2013; Tariq ve diğerleri, 2020). Nitekim, domuz sperması için 3% gliserol varlığında en uygun CPLL konsantrasyonu %0.25 iken, boğa spermasında %3.25 gliserol varlığında %0,5 CPLL en uygundur (Fujikawa ve diğerleri, 2018). Ayrıca manda spermasında %5 gliserol ile %0,75 CPLL (Tariq ve diğerleri, 2020) insan spermasında %7 gliserol ile %0,3 CPLL (Takeuchi ve diğerleri, 2021) tavşan spermasında ise %8 DMSO ile %1 CPLL (Küçük ve diğerleri, 2021) en uygun olarak rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, spermanın kriyoprezervasyonu için ideal CPLL konsantrasyonunun türe bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, koç spermasına katılan CPLL' nin kısa süreli saklama üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, karboksillenmiş poli L-lizinin sperma saklama süresinin kısa vadeli etkilerinde herhangi bir iyileşme sağlamadığı gözlenmiştir ( $P > 0.05$ ). Bu sonuç, karboksillenmiş poli L-lizinin kısa süreli sperma saklama koşullarında sperma motilitesi veya diğer önemli parametreler üzerinde anlamlı bir fark yaratmadığını göstermektedir. CPLL nin sentetik bir antifriz protein analogu olmasından ötürü kriyoprezervasyon gibi hücre stresinin ve ozmotik basınç değişiminin daha yüksek olduğu saklama koşullarında olumlu etkileri olacağı düşünülmektedir. Kısa süreli saklamada ise farklı konsantrasyonların kullanılması spermatolojik kalite parametrelerinde iyileşme sağlayabilir. CPLL' nin başka koruyucu maddelerle kombine bir şekilde kullanılması da sperma kalitesini iyileştirilebilir.



## KAYNAKLAR

- Abadjieva, D., Yotov, S., Mladenova, V., Lauberte, L., Kalvanov, I., Krasilnikova, J., Telesheva, G. ve Kistanova, E. (2020). Positive effect of natural antioxidant oregonin from *Alnus incana* bark on ram semen quality stored at 5 °C for 48 h. *Research in Veterinary Science*, 131, 153–155 doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.021
- Aboagla, E. M. E. ve Terada, T. (2004). Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6), 1160–1172. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.013
- Aisen, E. G., Medina, V. H. ve Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57(7), 1801-1808. doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00653-2
- Akhter, S., Awan, M. A., Rakha, B. A., Arshad, J., Ansari, M. S. Ve Iqbal, S. (2021). Egg yolk can be partially replaced with carboxylated poly-L-lysine (CPLL) in extender for Nili-Ravi buffalo bull sperm. *Cryoletters*, 42(6), 332–340.
- Aksoy, M., Ataman, M. B., Karaca, F., Kaya, A. ve Tekeli, T. (1994). Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'ne ait çeşitli ırklardan koçların spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 10(1–2), 111–112
- Alvares, C. T. G., Cruz, J. F. ve Ferreira, M. L. (2015). Técnicas de inseminação artificial e implicações fisiopatológicas em ovinos. *PubVet*, 9(5), 195-251.
- Amaral, A., Lourenço, B., Marques, M. ve Ramalho-Santos, J. (2013). Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*, 146(5), R163–R174. doi.org/10.1530/REP-13-0178
- Andrabi, S. M. H. (2007). Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. *International Journal of Agriculture & Biology*, 9, 367–369.
- Avdatek, F., Yeni, D ve Gündoğan, M. (2018). Merinos koçlarda spermaya katılan antioksidanların kısa süreli saklama sırasında spermatolojik parametreler ve DNA hasarı üzerine etkileri. *Kocatepe Veterinary Journal*, 11(2), 126-133. doi.org/10.30607/kvj.376568
- Bang JK, Lee JH, Murugan RN, Lee SG, Do H, Koh HY, Shim H-E, Kim H-C, Kim HJ. Antifreeze Peptides and Glycopeptides, and Their Derivatives: Potential Uses in Biotechnology. *Marine Drugs*. 2013; 11(6):2013-2041.doi.org/10.3390/md11062013

- Bansal, A. K., ve Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, 2011, 686137. doi.org/10.4061/2011/686137
- Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muino-Blanco, T. ve Cebrián-Pérez, J. A. (2000). Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*, 63(5), 1531–1537. doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1531
- Baskaran, A., Kaari, M., Venugopal, G., Manikkam, R., Joseph, J. ve Bhaskar, P. V. (2021). Antifreeze proteins (AFP): Properties, sources and applications—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, 292–305. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.105
- Bibi, S., Awan, M. A., Rakha, B. A., Ejaz, R., Qadeer, S., Arshad, J., Anjum, M. Z. 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
- Breton, G., Danyluk, J., Ouellet, F. ve Sarhan, F. (2000). Biotechnological applications of plant freezing-associated proteins. *Trends in Plant Science*, 6 59-101. doi.org/10.1016/S1387-2656(00)06019-1
- Brinster, R. L. ve Avarbock, M. R. (1994). Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(24), 11303–11307. doi.org/10.1073/pnas.91.24.11303
- Büyükleblebici S, Tuncer PB, Bucak MN, Eken A, Sarıozkan S, Taşdemir U, Endirlik BÜ, (2014). Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results, *Animal Reproduction Science*. 150 77–83. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.006
- Camara, D. R., Mello-Pinto, M. M. C., Pinto, L. C., Brasil, O. O., Nunes, J. F. ve Guerra, M. M. P. (2011). Effects of reduced glutathione and catalase on the kinematics and membrane functionality of sperm during liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, 100, 44–49. doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.05.006
- Chang, M. C. ve Walton, A. (1940). The effects of low temperature and acclimatization on the respiratory activity and survival of ram spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences*, 129(857), 517–527. doi.org/10.1098/rspb.1940.0050

- Chatterjee, S. Ve Gagnon, C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa: A mechanism for human sperm dysfunction. *Molecular Reproduction and Development*, 59(4), 347-474
- Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, 52(1), 198–236. doi.org/10.1152/physrev.1972.52.1.198
- Cross, N. L. ve Meizel, S. (1989). Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction*, 41(4), 635–641. doi.org/10.1095/biolreprod41.4.635
- Cupps, P.T. (1991). Reproduction in domestic animals. Cupps (4.th ed). Elsevier.
- Curry, M. R., Millar, J. D., Tamuli, S. M. ve Watson, P. F. (1996). Surface area and volume measurements for ram and human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 55(6), 1325–1332.
- Dalgıç, A., Sarıca, D.ve Demircan, V. (2023). Türkiye’de sığır eti üretiminin ARIMA (Box-Jenkins) modeli ile öngörüsü. *Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(1), 5–12.
- D’Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G. Ve Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: Challenges for life. *EMBO Reports*, 7(4), 385–389.
- De Lamirande, E. V. E. ve Gagnon, C. L. A. U. D. E. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa: I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of andrology*, 13(5), 368-378. doi.org/10.1002/j.1939-
- De Maayer, P., Anderson, D., Cary, C. ve Cowan, D. A. (2014). Some like it cold: Understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Reports*, 15(5), 508–517. doi.org/10.1002/embr.201338170
- DeLuca, C. I., Comley, R.. ve Davies, P. L. (1998). Antifreeze proteins bind independently to ice. *Biophysical Journal*, 74(3), 1502–1508.
- DeVries, A. L. ve Wohlschlag, D. E. (1969). Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*, 163(3871), 1073–1075. doi.org/10.1126/science.163.3871.1073
- Donovan, A., Hanrahan, J. P., Lally, T., Boland, M. P., Byrne, G. P., Duffy, P., Lonergan, P. ve O’Neill, D. J. (2001). *AI for sheep using frozen-thawed semen* (End of Project Report: Sheep Series No. 11). Athenry, Ireland: Teagasc, Sheep Research Centre. <http://hdl.handle.net/11019/1401>
- Emmens, C. W. (1947). The motility and viability of rabbit spermatozoa at different hydrogen-ion concentrations. *The Journal of Physiology*, 106(4), 471–48. doi.org/10.1113/jphysiol.1947.sp004228

- Ergün, A. ve Bayram, B. (2021). Türkiye’de hayvancılığın mevcut durumu ve geliştirilmesine yönelik politika önerileri. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 10(2), 158-175.
- Eslami, M., Jahan-Roshan, N. ve Farrokhi-Ardabili, F. (2019). Influence of idebenone on ram semen quality stored at 4 °C. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(3) 486–497. doi.org/10.1111/rda.13379
- Evans, G. ve Maxwell, W. M. C. (1987). *Salamon’s artificial insemination of sheep and goats*. Australia: Butterworths.
- Ezzati M, Shanehbandi D, Hamdi K, Rahbar S, Pashaiasl M, (2020) Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview, *Cell Tissue Bank*. 21 1–15.
- Faigl, V., Vass, N., Jávör, A., Kulcsár, M., Solti, L., Amiridis, G. ve Cseh, S. (2012). Artificial insemination of small ruminants A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 60(1), 115-129. doi.org/10.1556/avet.2012.010
- Feeney, R. E. ve Hofmann, R. (1973). Depression of freezing point by glycoproteins from an Antarctic fish. *Nature*, 243(5406), 357–359.
- Fei, Y. B., Cao, P. X., Gao, S. Q., Wang, B., Wei, L. B., Zhao, J., Chen, G. ve Wang, B. H. (2008). Purification and structure analysis of antifreeze proteins from *Ammopiptanthus mongolicus*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 38(2), 172–183. doi.org/10.1080/10826060701885126
- Foote, R. H. (2010). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*, 80, 1–10.
- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N.ve Nasr-Esfahani, M. H. (2010). In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 73(4), 480–487. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.005
- 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
- Fujikawa, T., Imamura, S., Tokumaru, M., Ando, T., Gen, Y., Hyon, S. H. ve Kubota, C. (2018). Cryoprotective effect of antifreeze polyamino-acid (carboxylated poly-L-lysine) on bovine sperm: A technical note. *Cryobiology*, 82, 159–162. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.02.009

- Garnham, C. P., Campbell, R. L. ve Davies, P. L. (2011). Anchored clathrate waters bind antifreeze proteins to ice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), 7363–7367.
- Gill, L. J. (1999). *Evaluation of post-thaw sperm quality in the bull and ram with special emphasis on semen processing* [Licenciate thesis, Swedish University of Agricultural Sciences].
- Griffith, M. ve Yaish, M. W. (2004). Antifreeze proteins in overwintering plants: A tale of two activities. *Trends in Plant Science*, 9(8), 399–405. doi: 10.1016/j.tplants.2004.06.007
- Grotter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E. ve Ferre, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, 54 (4), 655–665. doi.org/10.1111/rda.13409
- Günaydın, G. (2009). Koyun yetiştiriciliğinin ekonomi politiği. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 23(2), 15-32.
- Habeeb, H. M. H. ve Kutzler, M. A. (2021). Estrus synchronization in the sheep and goat. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 37(1), 125-137.
- Hafez, E. S. E. ve Hafez, B. (2000). *Reproduction in farm animals* (7th ed.). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hamdan, A. (2018). Psychrophiles: Ecological significance and potential industrial application. *South African Journal of Science*, 114(5–6), 1–6. doi.org/10.17159/sajs.2018/20170254
- Hancock, J. L. (1952). The morphology of bull spermatozoon. *Journal of Experimental Biology*, 29(3), 445–453. doi.org/10.1242/jeb.29.3.445
- Harding, M. M., Ward, L. G. ve Haymet, A. D. J. (1999). Antifreeze glycoproteins from polar fish. *European Journal of Biochemistry*, 264(3), 653–665. doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00617.x
- Herdoğan, M., Mart, F., Çay, H. A., Kahraman, D., İnanc, M. E., Güngör, Ş. ve Ata, A. (2023). Suni tohumlamanın tarihsel gelişimi ve dönüm noktaları. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 94(1), 84–95. doi.org/10.33188/vetheder.1159178
- Hernández Ballesteros, J. A., Navarrete Méndez, R., Benítez Meza, J. A., Moreno Flores, L. A., Gómez Gurrola, A. ve Bernal Partida, M. A. (2015). *Fertilidad con el uso de inseminación artificial en ovejas*. Editorial BM.

- Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 3–22. doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4
- Inui, H., Mizuno, J., Hyon, S. H., Matsumura, K., Kikuchi, E., Noguchi, K. ve Murayama, Y. (2011). Development of a low toxicity and completely serum-free vitrification system combining a Cryo-Nano-Hole vitrification container with antifreeze polyamino-acid (carboxylated poly-L-lysine) for assisted reproductive technology (ART). *Journal of Reproduction Engineering*, 14(1), 19–28.
- Jan, S. Z., Hamer, G., Repping, S., de Rooij, D. G., van Pelt, A. M. ve Vormer, T. L. (2012). Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Basis of Disease*, 1822(12), 1838–1850. doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.008
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Pérez-Peláez, 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. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70(1), 219–228. doi.org/10.1530/jrf.0.0700219
- Jiang, G., Bi, K., Tang, T., Wang, J., Zhang, Y., Zhang, W., Ren, H., Bai, H. ve Wang, Y. (2006). Down-regulation of TRRAP-dependent hTERT and TRRAP-independent CAD activation by Myc/Max contributes to the differentiation of HL60 cells after exposure to DMSO. *International immunopharmacology*, 6(7), 1204–1213. doi.org/10.1016/j.intimp.2006.02.014
- Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P. ve Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 143–172. doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-3
- Karagiannidis, A., Georgiou, E. ve Banos, G. (2000). Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Fresian rams in Greece. *Small Ruminant Research*, 37(1-2), 125-130. doi.org/10.1016/S0921-4488(99)00143-1
- Kasimanickam, R., Pelzer, K. D., Kasimanickam, V., Swecker, W. S. ve Thatcher, C. D. (2006). Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. *Theriogenology*, 65(7), 1407–1421. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.056
- Kaya A, Yıldız C, Lehimcioğlu NC, Ergin A, Aksoy M. Konya Merinos Koçlarında Sperma Kalitesi, Testis Ölçüleri ve Kan Testesteron Düzeylerine İlişkin Mevsimsel Değişikliklerin Araştırılması. *Hay. Araş. Derg.* 1999; 9(1-2):1-5.

- Kershaw, C. M., Khalid, M., McGowan, M. R., Ingram, K., Leethongdee, S., Wax, G. ve Scaramuzzi, R. J. (2005). The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, 64(5), 1225–1235. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.02.017
- Khalifa, T. I., El-Bahr, S. M. ve El-Moghazy, M. A. (2013). Association of soybean-based extenders with field fertility of ram semen. *Theriogenology*, 79(3), 517-527. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.009
- Kızılay, F. ve Altay, B. (2019). Spermatogenez, spermiyogenezis ve klinik yansımaları. *Androloji Bülteni*, 21(4), 177–184.
- Koushafar, H., Pham, L., Lee, C. ve Rubinsky, B. (1997). Chemical adjuvant cryosurgery with antifreeze proteins. *Journal of Surgical Oncology*, 66(2), 114–121. doi.org/10.1002/(SICI)1096-9098(199710)66:2<114::AID-JSO9>3.0.CO;2-G
- Kristiansen, E., Ramløv, H., Højrup, P., Pedersen, S. A., Hagen, L. ve Zachariassen, K. E. (2011). Structural characteristics of a novel antifreeze protein from the longhorn beetle *Rhagium inquisitor*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(2), 109–117. doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.11.002
- Kumar, D. ve Naqvi, S. M. K. (2014). Effect of time and depth of insemination on fertility of Bharat Merino sheep inseminated trans-cervical with frozen-thawed semen. *Journal of animal science and technology*, 56(1), 8.
- Kumar, N. ve Singh, A. K. (2021). The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: an evolving mystery. *Biology of Reproduction*, 104(3), 508-520. doi.org/10.1093/biolre/ioaa213
- 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
- Kwan, A. H. Y., Fairley, K., Anderberg, P. I., Liew, C. W., Harding, M. M. ve Mackay, J. P. (2005). Solution structure of a recombinant type I sculpin antifreeze protein. *Biochemistry*, 44(6), 1980–1988. doi.org/10.1021/bi047782j
- Lee, J. K., Park, K. S., Park, S., Park, H., Song, Y. H., Kang, S. H. ve Kim, H. J. (2010). An extracellular ice-binding glycoprotein from an Arctic psychrophilic yeast. *Cryobiology*, 60(2), 222–228. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.01.002
- Liou, Y. C., Mahatabuddin, M. ve Kim, H. J. (2021). Structural basis of ice recognition and inhibition by insect antifreeze proteins. *Journal of Structural Biology*, 213(2), 107–118.

- Lo Giudice, A ve Rizzo, C. (2018). Bacteria associated with marine benthic invertebrates from polar environments: Unexplored frontiers for biodiscovery? *Diversity*, 10(3), 80. doi.org/10.3390/d10030080
- Lopez Saez, A., Ortiz, N., Gallego, L. ve Garde, J. J. (2000). Liquid storage (5 °C) of ram semen in different diluents. *Archives of Andrology*, 44(2), 155–164. doi.org/10.1080/014850100262335
- Lopez, A., Söderquist, L. Ve Rodriguez-Martinez, H. (1999). Sperm viability in ram semen diluted and stored in three different extenders. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 40(1), 1.
- Lorv, J. S. H., Rose, D. R. ve Glick, B. R. (2014). Bacterial ice crystal controlling proteins. *Scientifica*, 2014, Article ID 976895. doi.org/10.1155/2014/976895
- Lovelock, J. E. ve Bishop, M. W. H. (1959). Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*, 183(4672), 1394–1395. doi.org/10.1038/1831394a0
- Mahatabuddin, S., Fukami, D., Arai, T., Nishimiya, Y., Shimizu, R., Shibazaki, C., ... & Tsuda, S. (2018). Polypentagonal ice-like water networks emerge solely in an activity-improved variant of ice-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(21), 5456-5461.
- Mangiagalli, M., Bar-Dolev, M., Tedesco, P., Natalello, A., Kaleda, A., Brocca, S., de Pascale, D., Pucciarelli, S., Miceli, C., Braslavsky, I. ve Lotti, M. (2017). Cryo-protective effect of an ice-binding protein derived from Antarctic bacteria. *FEBS Journal*, 284(1), 163–177. doi.org/10.1111/febs.13905
- Marco-Jimenez, F., Puchades, S., Gadea, J., Vicente, J. S.ve Viudes-de-Castro, M. P. (2005). Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*, 64(8), 1756–1765. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.006
- Margesin, R. ve Miteva, V. (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, 162(3), 346–361. doi.org/10.1016/j.resmic.2010.12.004
- Mata Campuzano, M., Álvarez Rodríguez, M., Tamayo Canul, J., López Urueña, E., de Paz, P., Anel, L., ... Martínez Pastor, F. (2014). Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and reduced glutathione: Effect of temperature, extender and storage time. *Animal Reproduction Science*, 151, 137–147. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.10.006
- Matsumura, K., Hayashi, F., Nagashima, T. ve Hyon, S. H. (2013). Long-term cryopreservation of human mesenchymal stem cells using carboxylated poly-l-lysine without the addition of proteins or dimethyl sulfoxide. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 24(12), 1484-1497. doi.org/10.1080/09205063.2013.771318



- Matsumura, K., Hayashi, F., Nagashima, T., Rajan, R., ve Hyon, S. H. (2021). Molecular mechanisms of cell cryopreservation with polyampholytes studied by solid-state NMR. *Communications Materials*, 2(1), 15.
- 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
- Mattner, P. E. ve Voglmayr, J. K. (1962). A comparison of ram semen collected by the artificial vagina and by electro-ejaculation. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 2(4), 78–81.
- Maxwell, W. M. C. Stojanov, T. (1996). Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development*, 8, 1013–1020. doi.org/10.1071/rd9961013
- Maxwell, W. M. C. ve Johnson, L. A. (1997). Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 48(2), 209-219.
- Maxwell, W. M. C., ve Salamon, S. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 77–111.
- Maxwell, W. M., ve Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: A review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(6), 613–638. doi.org/10.1071/rd9930613
- Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D. ve Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327–344. doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00674-4
- Men, H., Monson, R. L., Parrish, J. J. Ve Rutledge, J. J. (2005). Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture *Theriogenology* 47(1) 73-81. doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00070-1
- Middleton, A. J., Brown, A. M., Davies, P. L. ve Walker, V. K. (2009). Identification of the ice-binding face of a plant antifreeze protein. *FEBS Letters*, 583(4), 815–819. doi.org/10.1016/j.febslet.2009.01.035
- Milovanov, V. K. (1940). *Biology of reproduction and artificial insemination of animals* [in Russian]. Moscow: Selhozgiz.
- Milovanov, V. K. (1951). *Artificial insemination of livestock* [in Russian]. Moscow: Selhozgiz.
- Milovanov, V. K. (1962) *The Biology of reproduction and artificial insemination of animals* [in Russian]. Moscow: Selhozgiz.

- Montano, G. A., Kraemer, D. C., Love, C. C., Robeck, T. R. ve O'Brien, J. K. (2012). Evaluation of motility, membrane status and DNA integrity of frozen-thawed bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) spermatozoa after sex-sorting and recryopreservation. *Reproduction* (Cambridge, England), 143(6), 799–813. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0490>
- Moore, K. ve Bonilla, A. Q. (2007). Cryopreservation of mammalian embryos: The state of the art. *Annual Review of Biomedical Sciences*, 8, 19–32.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D. Ve Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: Cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695–1706.[doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00682-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00682-9)
- Moustacas, V. S., Zaffalon, F. G., Lagares, M. A., Andrade, A. F. C., Arruda, R. P., Silva, E. C. B. Ve Celeghini, E. C. C. (2011). Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 75(2), 300–307. [doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.016](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.016)
- 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](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.04.014)
- Nix Orihuela, A., ve Ungerfeld, R. (2019). Acoustic characteristics of vocalisations emitted by the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) during copula ejaculation and electro-ejaculation with or without anaesthesia. *World Rabbit Science*, 27(3), 157–162. [doi.org/10.4995/wrs.2019.10809](https://doi.org/10.4995/wrs.2019.10809)
- O'Hara, L., Hanrahan, J. P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Vans, A. C. O. ve Lonergan, P. (2010). Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, 73(4), 541–549. [doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.009](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.009)
- Oh, J. E., Karlmark Raja, K., Shin, J. H., Pollak, A., Hengstschläger, M. ve Lubec, G. (2006). Cytoskeleton changes following differentiation of N1E-115 neuroblastoma cell line. *Amino acids*, 31(3), 289–298. [doi.org/10.1007/s00726-005-0256-z](https://doi.org/10.1007/s00726-005-0256-z)
- Pace, M. ve Sullivan, J. J. (1975). Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *Journal of Reproduction and fertility. Supplement*, (23), 115-121.

- Papa, F. O., Aires, V. A. ve Silva, L. D. (2011). Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen *Animal Reproduction Science*, 129(1–2), 73–77.
- Parks, J. E. (1997). Hypothermia and mammalian gametes. In A. M. Karow & J. K. Critser (Eds.), *Reproductive tissue banking* (pp. 229–261). Academic Press.
- Paulenz, H., Söderquist, L., Ådnøy, T., Fossen, O. H. ve Berg, K. A. (2003). Effect of milk- and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. *Theriogenology*, 60(4), 759–766. doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00048-7
- Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé, R. ve Berg, K. A. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, 57(2), 823–836. doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00683-5
- 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
- Pegg, D. E. (2002). The history and principles of cryopreservation. *Seminars in Reproductive Medicine*, 20(1), 5–13.
- Polge, E. J. C. (1957). Low-temperature storage of mammalian spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 147(929), 498–508. doi.org/10.1098/rspb.1957.0068
- Prathalingam, N. S., Holt, W. V., Revell, S. G., Mirczuk, S., Fleck, R. A. ve Watson, P. F. (2006). Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology*, 66(8), 1894–1900. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.041
- Qadeer, S., Khan, M., Ansari, M., Rakha, B., Ejaz, R., Husna, A., Ashiq, M., Iqbal, R., Ullah, N. ve Akhter, S. (2014). Evaluation of antifreeze protein III for cryopreservation of Nili-Ravi (*Bubalus bubalis*) buffalo bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 148(1-2), 26–31. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.04.013
- Rana, K. J. (1995). Cryopreservation of fish spermatozoa. In B. Day & G. McLellan (Eds.), *Methods in molecular biology* (Vol. 38, pp. 151–165). Totowa NJ. Humana Press.
- Rastegarnia, A., Shahverdi, A., Topraggaleah, T. R., ve Shafiepour, V. (2014). In vitro comparison of soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Comparative Clinical Pathology*, 23(4), 893–900.

- Raza, S., Uçan, U., Aksoy, M., Erdoğan, G., Ceylan, A., ve Serin, I. (2019). Silk protein sericin pretreatment enhances osmotic tolerance and post-thaw sperm quality but reduces the ability of sperm cells to undergo in vitro induced acrosome reaction in rabbit. *Cryobiology*, 90, 1–7. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.09.008
- Rekha, A., Zohara, B. F., Bari, F. Y. ve Alam, M. G. S. (2016). Comparisons of commercial triladyl and locally manufactured extenders for the chilling of semen and their effects on pregnancy rates after transcervical AI in Bangladeshi Indigenous (*Ovis aries*) sheep. *Animal Reproduction*, 13(4), 735–742. doi.org/10.21451/1984-3143-AR733
- Robles, V., Riesco, M. F., Martínez-Páramo, S. ve Cabrita, E. (2019). The Use of antifreeze proteins in sperm cryopreservation: An overview. *Animal Reproduction Science*, 207, 56–
- Rosato, M. P. ve Iaffaldano, N. (2013). Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, 79(3), 508-516.
- Rubinsky, B., Arav, A. ve Devries, A. L. (1992). The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from antarctic fishes. *Cryobiology*, 29(1), 69-79. doi.org/10.1016/0011-2240(92)90006-N
- Rubinsky, B., Arav, A., Mattioli, M. ve DeVries, A. L. (1990). The effect of antifreeze glycopeptides on membrane potential changes at hypothermic temperatures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173(3), 1369–1374. doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80939-8
- Salamon, S., ve Maxwell, W. M. C. (1995). Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, 38(1-2), 1–36. doi.org/10.1016/0378-4320(94)01328-J
- Salamon, S., ve Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 77–111. doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X
- Salmani, H., Razzaghi, A. ve Esmaeili, V. (2014). Comparative evaluation of antioxidant content and lipid peroxidation of ram and buck semen. *Andrologia*, 46(7), 715–721. doi.org/10.1111/and.12136
- Scholander, P. F., Van Dam, L., Kanwisher, J. W., Hammel, H. T.ve Gordon, M. S. (1957). Supercooling and osmoregulation in arctic fish. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 49(1), 5–24. doi.org/10.1002/jcp.1030490103

- Semerci, A. ve Çelik, A. D. (2016). Türkiye’de küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin genel durumu. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(2).
- Shier, W. T. (1988) Studies on the mechanisms of mammalian cell killing by a freeze-thaw cycle: Conditions that prevent cell killing using nucleated freezing 25(2), 110–120. doi.org/10.1016/0011-2240(88)90002-1
- 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
- Shipley, C. F. B., Buckrell, B. C., Mylne, M. J. A., Pollard, J. ve Hunton, J. R. (2007). Artificial insemination and embryo transfer in sheep. In *Current therapy in large animal Theriogenology* (pp. 629–641). WB Saunders.
- Sikka, S. C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*, 1, e78–e86
- Silva, E. C. B., Cajueiro, J. F. P., Silva, S. V., Soares, P. C. ve Guerra, M. M. P. (2012). Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 77(8), 1722–1726. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.023
- Simmet, K. Wallner, U. Le, Thi, X. Weitze, K.F Waberski, D. 2014 Cryopreservation of boar spermatozoa using carboxylated  $\epsilon$ - poly L- ysine as cryoprotective agent. 47<sup>th</sup> Annual Conference for Physiology and Pathology of Reproduction Domestic Animal 49,42
- Simpson, A. M., Swan, M. A. ve White, I. G. (1987). Susceptibility of epididymal boar sperm to cold shock and protective action of phosphatidylcholine. *Gamete research*, 17(4), 355-373. doi.org/10.1002/mrd.1120170408
- Son, J. H., Kim, K. H., Nam, Y. K., Park, J. K. ve Kim, S. K. (2004). Optimization of cryoprotectants for cryopreservation of rat hepatocyte. *Biotechnology Letters*, 26(10), 829–833.
- Soylu, M. K., Nur, Z., Ustuner, B., Doğan, İ., Sağırkaya, H., Günay, Ü. ve Ak, K. (2007). Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 51(2), 241–246.
- Şahin, A. ve Yıldırım, İ. (2002). Van ili merkez ilçede koyunculuk yapan işletmelerin ekonomik analizi. *YYÜ Tarım Bilimleri Dergisi*, 12(12), 47–52.

- Takeuchi, H., Nishioka, M., Maezawa, T., Kitano, Y., Terada-Yoshikawa, K., Tachibana, R., ... ve Ikeda, T. (2021). Carboxylated poly-L-lysine as a macromolecular cryoprotective agent enables the development of defined and Xeno-free human sperm cryopreservation reagents. *Cells*, 10(6), 1435.
- Taqueda, G. S., Azevedo, H. C., Santos, E. M., Matos, J. E., Bittencourt, R. F. ve Bicudo, S. D. (2011). Influência de aspectos técnicos e anatômicos nos índices de fertilidade baseado no desempenho da inseminação artificial. *Ars Veterinária*, 127–133.
- Tariq, A., Ahmad, M., Iqbal, S., Riaz, M. I., Tahir, M. Z., Ghaffoor, 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
- Tiwari, S. B. ve Sahni, K. L. (1976). Comparative studies on sexual response and semen quality through electric ejaculation and artificial vagina.
- Tsakmakidis, I. A. (2010). Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research*, 92(1–3), 126–130.
- TÜİK. (2024). Hayvansal üretim istatistikleri – Haziran 2024. *Türkiye İstatistik Kurumu*. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-Haziran-202245594> (Erişim tarihi: 2025)
- Uçan, U., Küçük, N., Ahmad, E., Naseer, Z., Aksoy, M., Serin, I. ve Ceylan, A. (2016). Effect of different sugars supplemented to the extender in combination with cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC) on post-thaw quality of ram spermatozoa. *Small Ruminant Research*, 136, 243–246. doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.01.021
- Uemura, M., Ishiguro, H. ve Matsumura, K. (2015). Effect of carboxylated poly-L-lysine on morphological change of adherent neuron-like cells after extracellular-freezing and thawing. *Cryobiology and Cryotechnology*, 61(2), 125–129. doi.org/10.20585/cryobolcryotechnol.61.2\_125
- Üstün, N. S. ve Turhan, S. (2015). Antifreeze proteins: Characteristics, function, mechanism of action, sources and application to foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 3189–3197. doi.org/10.1111/jfpp.12476
- Venketesh S., ve Dayananda, C. (2008). Properties, potentials, and prospects of antifreeze proteins. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(1), 57–82. doi.org/10.1080/07388550801891152
- Vishwanath, R. ve Shannon, P. (1997). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3)23-53. doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00153-6

- Voets, I. K. (2017). From ice-binding proteins to bio-inspired antifreeze materials. *Soft Matter*, 13(28), 4808–4823. doi.org/10.1039/C6SM02867E
- Vorontsov, D. A., Sazaki, G., Hyon, S.-H., Matsumura, K. ve Furukawa, Y. (2014). Antifreeze effect of carboxylated  $\epsilon$ -poly-L-lysine on the growth kinetics of ice crystals. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(34), 10240–10249. doi.org/10.1021/jp507697q
- Wang, J. H., Bian, H. W., Huang, C. N. ve Ge, J. G. (1999). Studies on the application of antifreeze proteins in cryopreservation of rice suspension cells. *Shi yan Sheng wu xue bao*, 32(3), 271-276.
- Watanabe, H., Kohaya, N., Kamoshita, M., Fujiwara, K., Matsumura, K., Hyon, S. H., ... & Kashiwazaki, N. (2013). Efficient production of live offspring from mouse oocytes vitrified with a novel cryoprotective agent, carboxylated  $\epsilon$ -poly-L-lysine. *PLoS One*, 8(12), e83613.
- Watson, P. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, 62, 483–492.
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871–891.
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 481–492. doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3
- White, I. G. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(6), 639-658. doi.org/10.1071/RD9930639
- Wildeus, S., Schoenian, S., Sponenberg, D. P., Bennett, M. B., ve O'Brien, D. (2019). PSX-5 Reproductive organ weights, morphology and sperm reserves in intact and short scrotum post-pubertal male dairy sheep lambs. *Journal of Animal Science*, 97(Suppl 3), 467. https://doi.org/10.1093/jas/skz258.920
- Worrall, D., Elias, L., Ashford, D., Smallwood, M., Sidebottom, C., Lillford, P., ... ve Bowles, D. (1998). A carrot leucine-rich-repeat protein that inhibits ice recrystallization. *Science*, 282(5386), 115–117. doi.org. 0.1126/science.282.5386.115
- Xiao, N., Suzuki, K., Nishimiya, Y., Kondo, H., Miura, A., Tsuda, S. ve Hoshino, T. (2010). Comparison of functional properties of two fungal antifreeze proteins from *Antarctomyces psychrotrophicus* and *Typhula ishikariensis*. *FEBS Journal*, 277(2), 394–403. doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07490.x

- Yerlikaya, O., ve Karagözlü, C. (2008). Koyun sütünün beslenmedeki önemi ve teknolojik özellikleri. *Süt Dünyası Dergisi, Mayıs-Haziran*(14), 58–61.
- Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85(1), 47–64. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047
- Young, D. A., Gavrilov, S., Pennington, C. J., Nuttall, R. K., Edwards, D. R., Kitsis, R. N. ve Clark, I. M. (2004). Expression of metalloproteinases and inhibitors in the differentiation of P19CL6 cells into cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 322(3), 759–765. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.178
- Younis AI, Rooks B, Khan S, Gould KG. (1998) The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (Pan troglodytes) spermatozoa, *Journal of Andrology* 19,207–214. doi.org/10.1002/j.1939-4640.1998.tb01990.x
- Yurdaydın, N. (1994). Spermanın alınması, saklanması ve sun'i tohumlama. *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni tohumlama, Doğum ve İnfertilite* (Ed. E. Alaçam).
- Zaleski, J., Richburg, J. ve Kauffman, F. C. (1993). Preservation of the rate and profile of xenobiotic metabolism in rat hepatocytes stored in liquid nitrogen. *Biochemical pharmacology*, 46(1), 111–116. doi.org/10.1016/0006-2952(93)90354-y
- Zhang, S., Hu, J., Li, Q., Jiang, Z. ve Zhang, X. (2009). The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African Journal of Biotechnology*, 8(22).
- Zhang, W., Cui, H., Ding, K., Zhou, K., Li, Y., Hoque, S. A. M., Min, L. ve Zhu, Z. (2023). Carboxylated  $\epsilon$ -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  $\epsilon$ -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



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



Aydın, 23/12/2021

**Oturum** : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2021 Yılı XII. Oturum  
**Sayı** : 64583101/2021/175  
**Proje Başlığı** : CPLL ilave edilen koç spermasının kısa süreli saklanması.  
**ProjeYürütücüsü** : Melih AKSOY  
**Proje Ekibi** : Elif Öykü KILIÇ

**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. Furhan DOST  
Üye

Prof. Dr. Işıl SÖNMEZ  
Üye

Prof. Dr. Serkan BAKIRCI  
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Solmaz KARAARSLAN  
Üye

Dr. Öğr. Üyesi A. Önder  
ÜSTÜNDAĞ  
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Aysun KOÇ  
Üye

Öğr. Gör. Dr. Ayşe Gülce GÜLER  
ORYAŞIN Sor. Vet. Hek.  
Üye

Hidayet YAMAN  
Serbest Vet. Hek. Üye

Şenay TEKİNBAŞ  
HAYTAP Üye.

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.

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

**BİLİMSEL ETİK BEYANI**

“Carboxylated  $\epsilon$ - Poly L-Lysine (CPLL)’nin Koç Spermasının Kısa Süreli Saklanması Etkisi” başlıklı Doktora 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 eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Elif Öykü KILIÇ

30/07/2025

## ÖZ GEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : KILIÇ Elif Öykü  
**Uyruk** : T.C.  
**Doğum yeri ve tarihi** : Ankara/ 08.02.1994  
**Telefon** : 05520078812  
**E-posta** : [kilicelifoyku@gmail.com](mailto:kilicelifoyku@gmail.com)  
**Yabancı dil** : İngilizce

## EĞİTİM

| Derece  | Kurum                                                           | Mezuniyet tarihi |
|---------|-----------------------------------------------------------------|------------------|
| Doktora | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi<br>Sağlık Bilimleri Enstitüsü | 2025             |
| Lisans  | Konya Selçuk Üniversitesi<br>Veteriner Fakültesi                | 2017             |

## İŞ DENEYİMİ

| Yıl       | Yer/Kurum                              | Ünvan           |
|-----------|----------------------------------------|-----------------|
| 2020-2025 | Muradiye İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü | Veteriner Hekim |