



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
REPRODÜKSİYON VE SUNİ TOHUMLAMA (VETERİNER)
DOKTORA PROGRAMI
VST-2020-0001

KOÇLARDA ÇİNKO KULLANIMININ SICAK STRESİNE VE SPERMANIN DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

UĞUR UÇAN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

AYDIN - 2020

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
REPRODÜKSİYON VE SUNİ TOHURLAMA (VETERİNER)
DOKTORA PROGRAMI

KOÇLARDA ÇİNKO KULLANIMININ SICAK STRESİNE VE
SPERMANIN DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

UĞUR UÇAN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-17038 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2020

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar geçen süreçte destek olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Ahmet CEYLAN'a,

Tezimin çeşitli aşamalarında bilgi birikimini benimle paylaşan, doktora eğitimime yaptığı katkı ve verdiği emek için hocam Prof. Dr. Melih AKSOY'a,

Doktora tez çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyelerimiz Prof. Dr. İlker SERİN'e ve Dr. Öğretim Üyesi Niyazi KÜÇÜK'e,

Anabilim Dalımız Doktora öğrencileri Sanan RAZA, Güney TUZLALIOĞLU ve Elif Öykü KILIÇ'a,

Hayatımın her döneminde her zaman yanımda olan aileme ve doktora eğitimim süresince özveriyle destek veren eşim Merve UÇAN'a ve yaşamımı renklendiren canım kızım Nurşen Nil UÇAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
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. Koçlarda Spermatogenezis	4
2.2. Koçlarda Spermatolojik Parametreler	4
2.3. Koçlarda Sperma Alma Yöntemleri	5
2.3.1. Suni Vajen Yöntemi	5
2.3.2. Elektroejekülasyon Yöntemi	6
2.4. Spermanın Saklanması	7
2.4.1. Kısa Süreli Saklama.....	7
2.4.2. Spermanın Uzun Süreli (Dondurularak) Saklanması	8
2.5. Sıcak Stresinin Etkisi.....	9
2.6. Çinkonun Biyolojik Fonksiyonları ve Üreme Sistemindeki Önemi.....	10
3. GEREÇ ve YÖNTEM	13
3.1. Gereç.....	13
3.1.1. Beslenme Programı	13
3.2. Yöntem	13
3.2.1. Spermanın Alınması	13
3.2.2. Spermanın Dondurulması.....	14
3.2.3. Spermatolojik Parametrelerin Belirlenmesi.....	16
3.2.3.1. Motilite muayenesi	16
3.2.3.2. Canlı spermatozoon oranı.....	16

3.2.3.3. Prematür akrozom rekasiyonuna giren spermatozoon oranının belirlenmesi	16
3.2.3.4. Spermatozoon membran bütünlüğünün belirlenmesi	17
3.2.3.5. Anormal spermatozoon oranı	17
3.2.3.6. Mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi	18
3.2.4. İstatistiksel Analizler	18
4. BULGULAR	19
4.1. Çalışma Süresince Aylık THI Değerleri.....	19
4.2. Progresif Motilite Oranı.....	20
4.3. Canlı Spermatozoon Oranı	21
4.4. Prematür Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatozoon Oranı	22
4.5. Membran Bütünlüğü Oranı.....	23
4.6. Anormal Spermatozoon Oranı.....	24
4.7. Mitokondriyal Aktivite Oranı.....	25
4.8. Yıl Boyu Dondurulup Çözdürülen Spermaların Spermatolojik Değerleri	26
5. TARTIŞMA.....	27
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	31
KAYNAKLAR.....	32
EKLER	43
Ek 1(ADÜ-HADYEK Kararı).....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CASA	: Computer Assisted Sperm Analysis
cm	: Santimetre
Cu	: Bakır
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
FITC-PNA	: Flourescein isothiocyante peanut agglutinin
HOS testi	: Hipo-Ozmotik şişme testi
IU	: International Unit
KM	: Kuru madde
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
Ni	: Nikel
pH	: Power of hydrogen
PI	: Propodium iodide
ppm	: Parts per million
RNA	: Ribo Nükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Se	: Selenyum
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
THI	: Sıcaklık-Nem İndeksi
Vit B	: Vitamin B

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında taze sperma progresif motilite oranları.	20
Şekil 2. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında progresif motilite oranları.	20
Şekil 3. Sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında taze spermaya ait canlılık oranları.	21
Şekil 4. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarına ait canlılık oranları.	21
Şekil 5. Sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında taze spermada prematür akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranları.	22
Şekil 6. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında prematür akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranları.	22
Şekil 7. Sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında taze spermada spermatozoon membran bütünlüğü oranları.	23
Şekil 8. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında spermatozoon membran bütünlüğünü oranları.	23
Şekil 9. Sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında taze sperma anormal spermatozoon oranları.	24
Şekil 10. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarına ait anormal spermatozoon oranları.	24
Şekil 11. Taze sperma örneklerinde sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarına ait mitokondriyal aktivite oranları.	25
Şekil 12. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarına ait mitokondriyal aktivite oranları.	25
Şekil 13. Yıl boyunca dondurulup çözdürülen sperma örneklerinde spermatolojik değerler. .	26

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. PI boyaması sonrası aynı alanın ışık mikroskobu ve PI filtre görüntüsü.....	16
Resim 2. FITC-PNA boyaması sonrası aynı alanın ışık mikroskobu ve FITC-PNA filtre görüntüsü.....	17
Resim 3. Rhodamine 123 boyaması sonrası aynı alanın ışık mikroskobu ve Rhodamine 123 filtre görüntüsü.	18

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Sulandırıcı Kompozisyonu (Uçan ve ark, 2016).	14
Tablo 2. Sıcaklık-nem indeksi (THI) değerleri (Marai ve ark 2007) ve stres düzeyleri.....	15
Tablo 3. Çalışma dönemleri sıcaklık-nem indeksi (THI) değerleri.	15
Tablo 4. Çalışma süresi boyunca ölçülen sıcaklık, bağıl nem ve hesaplanan THI değerleri...19	

ÖZET

KOÇLARDA ÇİNKO KULLANIMININ SICAK STRESİNE VE SPERMANIN DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

Uçan U. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama (Veteriner) Programı Doktora Tezi, Aydın, 2020.

Global ısınma evcil hayvanlarda verim düşüklüğü ve üreme mekanizmalarının aksamasına neden olmaktadır. Sıcak stresinin özellikle çiftlik hayvanlarında yol açtığı zararların azaltılmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesi önemli bir zorunluluk haline gelmiştir. Çinko, metabolizma ile ilgili 300 den fazla enzimin faaliyet göstermesi için gerekli bir mineraldir. Üremeye ilişkin pek çok fizyolojik mekanizmada yer alır. Bu çalışmada yem katkı maddesi olarak kullanılan çinkonun koçlarda sperma kalitesi üzerine sıcak stresinin oluşturduğu olumsuz etkileri ortadan kaldırabilme potansiyeli ve spermanın yıl boyu dondurulabilirliği üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Sperma vericisi olarak 10 baş koç kullanılmıştır. Koçlar kontrol ve deneme grubu olarak eşit iki gruba ayrılmış kontrol grubu kuru yonca ve arpa peleti ile beslenmiştir. Çinko grubuna ise yukarıdaki rasyona ek olarak günlük 50 mg çinko ilave edilmiştir. Koçlar belirtilen rasyonla 18 ay boyunca beslenmiştir. Hayvanların sıcak stresinden etkilendiği aylar sıcaklık-nem indeksi (THI) değerleri yardımıyla belirlenmiş ve stresin görüldüğü ayların Haziran-Eylül arası olduğu tespit edilmiştir. Koçlarda sıcak stresi dönemi içinde ve dışında motilite, canlılık, akrozom reaksiyonu, membran bütünlüğü, anormal spermatozoon oranı ve mitokondriyal aktivite değerleri belirlenmiştir. Ayrıca, çinkonun dondurulan sperma örnekleri üzerinde koruyucu bir etkisinin bulunup bulunmadığını belirlemek için, 12 ay boyunca sperma dondurma işlemi gerçekleştirilmiş ve aynı parametreler dondurulup çözdürülen örneklerde de izlenmiş ve karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak; koçlarda yem katkısı olarak 50 mg/gün çinko kullanımının sıcak stresine karşı koruyucu bir etkisi bulunamamış ($P>0,05$), benzer şekilde dondurulan örnekler üzerinde de herhangi bir kryoprotektif etkinliği gözlenmemiştir ($P>0,05$). Bu sonucun elbette çalışmanın yürütüldüğü şartlar için (yem, kullanılan çinko türü, doz ve coğrafi bölge gibi) doğru olduğu, koşullara ilişkin farklılıkların sonuçları değiştirebileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Çinko, koç, sıcak stresi, sperma dondurma, THI.

ABSTRACT

THE EFFECT OF THE USAGE OF ZINC ON HEAT STRESS AND SPERM FREEZABILITY IN RAMS

Uçan U. Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Sciences, Department of Reproduction and Artificial Insemination (Veterinary) PhD Thesis, Aydın, 2020.

Global warming is associated with reduced productivity and impaired reproductive mechanisms in domestic animals. Thus, developing new strategies to combat these problems in farm animals is required. Zinc is an essential mineral which acts as coenzyme by more than 300 enzymes functioning in the metabolism. It also plays important roles in reproductive physiology. This study was organized to screen the potential of zinc, as a food supplement, to ameliorate the negative effects of the heat stress on semen quality of rams and its effects on the freezability of semen collected annually. A total of 10 rams were used as sperm donors. They were separated into two equal groups as control, fed on dry clover and the barley pellets and the zinc group, fed 50 mg of zinc in addition to the ration mentioned above. The rams were reared on the described ration for 18 months. The months when the animals were affected by heat stress were determined based on the Temperature-Humidity Index (THI) and, accordingly, the time period between June and September was noted as stressful months. The percentages for sperm motility, live, reacted acrosome, membrane integrity, abnormal sperm rate and mitochondrial activity were recorded. Furthermore, the sperm parameters noted above were screened throughout the year in frozen-thawed semen samples to determine whether the zinc feeding had a protective effect on sperm cells during freezing. In conclusion, no protective effect of 50 mg/day zinc as a food supplement was observed on heat stressed rams. ($P>0.05$) Similarly, zinc oxide supplementation did not enhance freezability of the semen samples collected annually ($P>0.05$). It is also noteworthy that the presented results are true only for the present particular circumstances we had (such as feed, the zinc analog used, doses and the geographical location) and that the results might vary if circumstances change.

Keywords: Heat stress, ram, sperm freezability, THI, zinc.

1. GİRİŞ

Türkiye hayvan sayıları açısından dünyada önde gelen ülkelerden biri olmakla birlikte, hayvancılıkta ekonomik karlılığı etkileyen en önemli faktörün hayvan sayısı değil, hayvan başına elde edilen üretim olduğu görülmektedir. Fertilite veya döl verimi yetiştiricilikte hayvan başına elde edilen üretimin, dolayısı ile ekonomik karlılığının devamlılığını sağlayan en önemli faktördür.

Ruminantlarda üreme faaliyetlerinin aksaması, gebelik başına tohumlama sayısının artmasına, buzağılama aralığının uzamasına, dolayısıyla yaşam süresince alınacak buzağı sayısının düşmesine ve tedavi giderlerinin yükselmesine bağlı olarak karlılığı düşürmektedir.

Hayvanlarda gıda unsurlarının eksiklikleri doğru rasyonların kullanılmaması veya rasyonlardaki yetersizlikler neticesinde ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, çiftlik hayvanlarının beslenmesinde söz konusu eksikliklerin tamamlanması için çeşitli yem katkı maddelerinin kullanılması tercih edilen bir yöntemdir. Bu maksatla, yem katkı maddesi olarak kullanılan ürünler arasında aminoasitler, makro/mikro mineraller ve enzimler sıklıkla kullanılmaktadır.

Hayvancılıkta genetik ilerleme, hayvancılığın sürdürülebilir olması için önem taşır. Bu nedenle suni tohumlama, modern hayvan üretiminin ilerlemesine katkı sağlayan en önemli araçlardan birisidir. Suni tohumlama yoluyla genetik açıdan üstün bir erkekte alınan sperma ile kaliteli, yüksek verim özelliklerini determine eden genlerin yurt içi ve yurt dışındaki dağılımını sağlamak ve normalden çok fazla sayıda dişiye gebe bırakmak mümkündür. Ayrıca; venereal hastalıkların yayılması suni tohumlama yöntemiyle önlenir. Ancak, suni tohumlama maksadıyla kullanılacak sperma örneklerinin uzun süreli saklanma zorunluluğu nedeniyle sperma dondurma teknolojisi ile birlikte kullanılması tercih edilmektedir.

Küresel ısınma; iklimlerin değişmesini, deniz seviyesinin yükselmesini, doğal afetlerin artış göstermesini ve özellikle de bu değişen çevrenin yıkıcı etkisi sonucu gıda kaynaklarının daralmasını da beraberinde getirmiştir. Bu nedenle, yükselen çevre sıcaklığının özellikle çiftlik hayvanlarında yol açtığı zararların azaltılmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesi her geçen gün daha da önemli bir zorunluluk haline gelmiştir. İnsanların beslenmesinde büyük bir yer tutan et, süt ve diğer pek çok besin gereksinimlerini karşılayan evcil hayvanlarda yükselen çevre sıcaklığı nedeniyle bazı fizyolojik değişiklikler oluşmakta, bu nedenle de üremeyi kontrol eden temel mekanizmalar aksamakta ya da kalıcı olarak bozulmaktadır. Sıcak

stresinin testis ağırlığını, spermatozoonların yoğunluğunu, motilitesini ve fertilizasyon kabiliyetlerini düşürdüğü bilinmektedir.

Küçük ruminantlar yaşama payı ve düşük düzeyde verim payı için gereksinim duydukları çinkoyu genelde tükettikleri yemlerden sınırlı düzeyde karşılayabilmektedir. Ancak toprakta çinko yetersizliğine ve vejetasyon dönemine bağlı olarak bitki çinko düzeyindeki dalgalanmalar, entansif yetiştiricilikte küçük ruminantlardan beklenen yüksek verim düzeyi (özellikle yüksek üreme gücü) ve stres gibi etmenler çinkoya olan gereksinimi artırmaktadır.

Sunulan çalışmada yaz aylarının çok sıcak geçtiği Aydın bölgesinde, sıcak stresinin yoğunlaştığı aylarda (Haziran-Eylül) doğal nedenlerle koçlarda şekillenen stresin koç spermatozoonları üzerine olan muhtemel olumsuz etkilerinin araştırılması ve evcil hayvanları global ısınmanın olumsuz etkilerinden koruyacak alternatif stratejilerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca; bu çalışmada yemlere ilave edilen çinkonun koçlardan yıl boyunca alınan spermaların dondurulup çözülmesi sonrasında spermatolojik parametreler üzerine etkileri de belirlenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

Koyun yetiştiriciliği halkın kültürel kökenleri ile ilgili olarak Türkiye’de geleneksel bir öneme sahiptir. Bu durumu anlatan “Buğdayla Koyun Gerisi Oyun” gibi deyişler dilimizde mevcuttur. Karlı bir hayvansal yetiştiriciliğin yapılabilmesi ve elde edilen genetik kazanımların gelecek kuşaklara aktararak sürdürülebilmesi için yüksek döl verimine sahip damızlık hayvanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak, beslenme başta olmak üzere pek çok faktör döl verimi düşüklüğüne neden olabilmektedir. Bu faktörler içinde en önemli olanlardan birisi de stres faktörleridir.

Stres bir canlının çevre koşulları ile baş edebilme kabiliyetini yitirmesidir (Dobson ve Smith, 2000). Canlılar çok farklı stres etkenlerine maruz kalabilirler. Bunlar; fiziksel, immünolojik, psikolojik ve çevresel olarak gruplandırılmaktadır. Stresin canlıda oluşturduğu cevap stresin süresine ve niteliğine göre değişiklik göstermektedir. Strese verilen yanıt hayvan türleri arasında farklılık gösterebildiği gibi farklı cinsiyetteki hayvanlar da aynı strese farklı cevaplar verebilirler. Stresin en önemli etkilerinden birisi birçok türde böbrek üstü bezlerinden kortizon salgısını uyarmasıdır. Bu hormonun çeşitli sistemler ve özellikle de reproduktif sistem fonksiyonları üzerine olumsuz bir etki oluşturabilmesi için uzunca bir süre yüksek düzeyde seyretmesi gerekmektedir (Tilbrook ve ark, 2000).

Bir canlının kendisi için normal kabul edilebilecek değerlerin üzerinde çevre sıcaklığına maruz kalması sonucu o canlıda şekillenen stres reaksiyonlarının tamamına “sıcak stresi” denmektedir (Banks ve ark, 2005). Yüksek çevre sıcaklığına bağlı olarak artan metabolik aktivite testis dokusunda hipoksi oluşturmakta böylece dokunun oksijen ihtiyacını da artırmaktadır. Anatomik olarak; bu bölgede bu ihtiyacı karşılayacak kan dolaşımı sağlanamadığı için yüksek çevre sıcaklığında testis dokusunda hipoksik bir ortam oluşmaktadır (Barth ve Bowman, 1994). Hipoksi oksidatif stresin başlıca nedeni olan reaktif oksijen türlerinin üretiminde genel bir artışa neden olmaktadır (Zini ve ark, 1998; Filho ve ark, 2004). Reaktif oksijen türleri ya da oksidatif stres ürünleri DNA başta olmak üzere, proteinler, yağlar, karbonhidratlar ve diğer moleküller üzerinde yapısal hasara sebep olmaktadır. İnsan ve hayvanlarda reaktif oksijen türleri yaşlanma ve kanser oluşumu gibi bazı önemli olayların etiyolojisine katılmanın yanı sıra önemli bir infertilite nedeni olarak belirlenmiştir (Iwasaki ve Gagnon, 1992; Pasqualotto ve ark, 2001).

Koyunların 30-40°C ve %30'luk bir nem oranında tutulmaları embriyonik gelişmenin erken aşamalarında embriyoların toplam blastomer sayılarının azalması ve gebelik döneminde de plasentom büyüklüğünün önemli ölçüde düşmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu olay, plasental protein sentezinin azalması olarak yorumlanmakta, fetüs ağırlığı ve total plasenta ağırlığının azalması ile seyretmektedir (Early ve ark, 1991).

2.1. Koçlarda Spermatogenezis

Spermatogenezis, fertilizasyon için gerekli olan hareketliliğe sahip olgun spermatozoa üretmek için mayotik bölünmeler ve büyük morfolojik değişiklikler ile karakterize bir olgudur. Spermatogenezis doğumdan kısa bir süre sonra spermatogoninin mitotik proliferasyonu ile başlar. Proliferasyon fazından sonra spermatogonia mayotik faza girer ve spermatozoid haline gelir. Homolog kromozom eşleştirmesi, sinapsis ve rekombinasyonu içeren uzun süreli mayoz profazından sonra hücreler, kardeş kromozomların ikincil spermatozoidlerini üretmek için iki hücreye ayrıldığı bir redüksiyon bölünmesine uğrar. Bu hücreler çok hızlı bir şekilde bölünerek haploid yapıdaki yuvarlak spermatozoidlere dönüşür. Akrozom ve flagellum oluşumu, nükleer şekillendirme ve kromatin yoğunlaşması gibi tüm etkileyici morfolojik değişiklikler, mayoz sonrası spermatozoid farklılaşması sırasında ortaya çıkar (Yadav ve Kotaja, 2014).

Spermatogenezis süreci türler arasında değişkenlik göstermektedir. Koçlarda spermatogenezis doğum sonrası 60-70. günlerde başlar ve 120 günlük olduklarında tam bir spermatogenezisten söz edilebilmektedir (Schanbacher ve ark, 1974).

Koçların gün uzunluğuna olan duyarlılıkları koyunlardan farklıdır. Seksüel aktivite genellikle koçlarda koyunlara göre 1-1,5 ay önce uyarılmaktadır. Koyunların seksüel siklusları başladığında, koçlar da yüksek düzeyde seksüel aktivite göstermektedir (Rosa ve Bryant, 2003).

2.2. Koçlarda Spermatolojik Parametreler

Koçların sperma üretimi, cins, yaş, çevresel faktörler (gün uzunluğu, çevre sıcaklığı ve nem) ve beslenme gibi birçok faktörden direk olarak etkilenmekte ve bu da spermatolojik

parametrelerin bireyler arasında farklı olmasına sebep olmaktadır (Karagiannidis ve ark, 2000).

Koç spermasının hacimce düşük olmasına karşın, yüksek yoğunlukta spermatozoa içerdiği bildirilmektedir. Fizyolojik özellikleri bakımından ergin bir koçun sperma hacmi 0.5-1.0 ml, motilitesi %80-90, kitle hareketi (++++) ve anormal spermatozoon oranı %5-15 arasındadır (Ak, 2000).

Koç sperması üzerine yapılan çalışmalarda spermatolojik parametreler koç ırkları arasında farklılıklar göstermektedir. Karagiannidis ve ark (2000), Chios ve Friesian ırkı koçlarda sperma hacmini $1,1\pm 0,06-1,6\pm 0,08$ ml, motiliteyi %69,2 \pm 1,78-75,0 \pm 1,54, spermatozoon yoğunluğunu $3,3\pm 0,12-4,4\pm 0,12\times 10^9$ /ml, anormal spermatozoon oranını %5,4 \pm 0,25-8,2 \pm 0,45 olarak bildirmiştir. Kafi ve ark (2004) Karakul koçlarında yaptığı çalışmada sperma hacmini $1,2\pm 0,30$ ml konsantrasyonunu da $4,4\pm 1,20\times 10^9$ /ml olarak yayınlamışlardır. Kıvırcık koçlarında yapılan bir çalışmada da progresif motilite %63,3 \pm 3,81-76,7 \pm 2,56, sperma hacmi $0,7\pm 0,03-0,9\pm 0,05$ ml, yoğunluğunu ise $1,3\pm 0,23-1,8\pm 0,10\times 10^9$ /ml olarak bildirilmiştir (Elmaz ve ark, 2007). Pırlak ırkı koçlardan yıl boyunca alınan sperma örneklerinin motilite oranı %71,0 \pm 2,33-89,0 \pm 1,00; yoğunluk $2,9\pm 0,30-4,5\pm 0,23\times 10^9$ /ml; ölü spermatozoon %7,1 \pm 0,47-12,7 \pm 0,61; anormal spermatozoon %3,5 \pm 0,43-9,0 \pm 0,52 ve membran bütünlüğü %59,4 \pm 3,43-70,3 \pm 1,61 olarak bildirilmiştir (Yeni, 2010).

Seminal plazma, inorganik iyonlar, şekerler, organik tuzlar, lipidler, enzimler, prostaglandinler, proteinler ve çeşitli diğer faktörlerden oluşur. Koç, seminal proteinlerinin spermatozoon fonksiyonları üzerindeki olumlu etkisiyle seminal plazma proteomunun doğurganlıktaki rolünü incelemek için ilginç bir hayvan modelidir. Seminal plazmanın koçta soğuk şokunun zararlı etkilerini azalttığı ve koç spermatozoonlarını dondurma öncesinde soğuk şokunun hasarından koruduğu bildirilmiştir (Muiño-Blanco ve ark, 2008; Soleilhavoup ve ark, 2014).

2.3. Koçlarda Sperma Alma Yöntemleri

2.3.1. Suni Vajen Yöntemi

Suni vajen sıcaklık ve basınç yardımıyla spermanın alınmasına olanak sağlayan doğal vajenin bir taklididir. Erkeğin ereksiyon olmuş konumdaki penisinin ejakülasyonuna yardımcı olur. Koçlar için suni vajen, 15-20cm x 5-6cm boyutlarında kauçuk veya plastikten bir vajen

dış lastiği ve kauçuk veya lateksten yapılmış bir iç astardan oluşmaktadır. Astar geriye katlanır ve vajen dış lastiğinin üzerine sabitlenir. Vajenin bir ucuna steril, volümetrik işaretli bir sperma toplama kadehi yerleştirilir. Dış vajen ile iç vajen arasındaki boşluk, dış vajene entegre bir musluk ya da valften ılık suyla doldurulur. Vajene daha fazla basınç eklemek için aynı valf kullanılarak hava yardımıyla şişirilebilir. Suni vajenin iç tarafındaki sıcaklık 42-45°C olmalıdır. Suni vajen 50°C-55°C suyla doldurulduğunda bu genellikle doğru iç sıcaklıkları sağlar. Çevrenin sıcaklığı suni vajen iç sıcaklığını etkiler ve bazen doğru sıcaklık ayarlarının yapılması gerekir. Doğru suni vajen iç sıcaklığı ve kullanılacak su sıcaklığını bulmak için bir termometre ile vajen iç sıcaklığı kontrol edilir. Vajenin fazla sıcak olması ejakülasyonu engellediği gibi spermatozoonlar üzerine de olumsuz etkilidir. Serin havalarda soğuk şokunu önlemek için, sperma toplama kadehi spermanın alınmasından önce 30-37°C'ye ısıtılmalıdır. Sperma alma sırasında koçun atlamasına izin veren kızgın bir koyunun bulunması işlemi kolaylaştırır. Koç koyunun üzerine atladığında, prepusyum üzerinden penis nazıkçe tutularak suni vajenin açık ucuna doğru yönlendirilir. Suni vajenin toplama kadehi aşağıya doğru yönlendirilerek yer çekimi etkisiyle verilen spermanın sperma toplama kadehine toplanması sağlanır. Spermanın alınmasından sonra kadeh 30-34°C sıcaklıktaki ılık su banyosuna yerleştirilir (Steyn, 2003).

Suni vajenle sperma almak için, östrus gösteren koyunların yanısıra bir yardımcının olması işlemi kolaylaştırır. Suni vajendeki suyun sıcaklığı, sperma toplama sırasında 40 ila 44 °C arasında olmalıdır (Marco-Jiménez ve ark, 2005).

2.3.2. Elektroejakülasyon Yöntemi

Elektroejakülasyon suni vajen ile sperma almanın mümkün olmadığı durumlarda tercih edilen bir yöntemdir. Bu teknik koçlarda basit ve kullanışlıdır (Cameron, 1977). Sperma toplamak için 10-15 Volt çıkış veren bipolar rektal elektrotlu elektriksel stimülatörler kullanılır. Bu sırada koçlar yan pozisyonda yatırılır. Bu işlem sırasında gaz birikimi olacağı düşüncesiyle rumenin üstte kalması genellikle tercih edilir. Sigmoid fleksura'nın düzleştirilmesi penisi uzatır. Bu maksatla işlemden önce glans penis bir parça gazlı bezle tutulur ve prepusyum dışına çekilir. Rektal prob jel yardımıyla kayganlaştırılır ve yaralanmayı önlemek için 15-20 cm derinliğe kadar rektuma yerleştirilir. Bazı koçlarda, özellikle şiddetli kabızlık nedeniyle rektumun dışkı ile dolu olması bu işlemi ve elektrik iletimini zorlaştırır. Bu nedenle bu işlemden önce rektum içeriğinin boşaltılması yararlı olur. Rektal prob pelvis

tabanına doğru uygulanır ve birkaç saniye aralıklarla kısa uyarılar şeklinde elektrik uyarımları verilir. Elektrik uyarımları hafif hafif arttırılarak yaklaşık 1-2 dakika içerisinde sperma önceden ısıtılmış, steril bir tüpte toplanır (Steyn, 2003).

Boğada yapılan birkaç çalışma, akımın frekansının, uyarının voltaj artış hızının ve uyarımlar arasında izin verilen zaman aralıklarının, elektrojekülasyonla sperma toplarken önemli olduğunu göstermiştir (Cameron, 1977). Elektrojekülasyon yöntemi çok çeşitli yabani ruminantlarda ve kedigiller başta olmak üzere sayıları hızla azalan ve bu nedenle de yardımcı üreme tekniklerinin kullanılması istenen hayvanlarda da başarıyla kullanılmıştır (Santiago-Moreno ve ark, 2009).

2.4. Spermanın Saklanması

Spermanın saklanmasında temel kural spermatozoonların metabolik faaliyetlerini sınırlamak ve hareket enerjilerini azaltarak fertil yaşam sürelerini uzatmaktır. Günümüzde diğer hayvan türlerinde olduğu gibi koçlarda da sperma kısa ve uzun süre saklanabilmektedir

2.4.1. Kısa Süreli Saklama

Spermatozoonların depolanmasında soğuk şoku dikkat edilmesi gereken noktalardan biridir. Uygun bir sulandırıcıyla sulandırılan spermaların 0-5°C ile 10-15°C ler arasında veya oda sıcaklığında 72 saat süresince saklanması mümkündür (Salamon ve Maxwell, 2000). Ortamın hacim olarak arttırılması oluşan metabolik ürünlerin dilüe olmasını sağlamak yanında spermatozoonların beslenmesi için basit şekerlerin ve pH düzenleyici buffer özellikli kimyasalların ortama ilavesine olanak sağlar.

Kısa süreli saklama, diğer sperma depolama tekniklerine alternatif olarak düşük derecelerde spermanın saklanmasına imkan verir. Bununla birlikte soğutma, dondurma ve çözme dahil sperma kriyoprezervasyon prosedürleri, hücre içi buz kristallerinin oluşumu, soğuk şoku ve ozmotik hasarlardan kaynaklanan spermatozoon hasarlarını indükler. Bahsedilen bu değişiklikler spermatozoonların hareket kabiliyeti, canlılık ve biyokimyasal değişikliklerine neden olur ve nihayetinde dölleme kapasitesinin azalmasına yol açar. Dondurma-çözme işlemi, spermatozoanın motilite ve yaşam süresini düşürürken ayrıca oksidatif stres de fertilizasyon kabiliyetinin azalmasına yol açar (Sarıözkan ve ark, 2013).

Maxwell ve Salamon (1993) 24 saatten fazla depolanan spermayla yapılan servikal tohumlamalar da fertilizasyonun hızla azaladığını bildirmişlerdir. Bu azalma günlük %10-35 oranındadır. Koç spermasının toplandıktan kısa bir süre sonra suni tohumlama için kullanılması durumunda, sulandırılmış ve soğutulmuş sperma kullanılması tercih edilen yöntemdir (Amini ve ark, 2019).

2.4.2. Spermanın Uzun Süreli (Dondurularak) Saklanması

Kısa süreli saklamada (4°C de) koç sperma kalitesinin 3-5 gün sonra aşırı derecede düştüğü ve gebelik elde edilemediği bilinmektedir. Spermanın dondurularak saklanması kriyoprezervasyon olarak adlandırılmaktadır. Sperma kriyoprezervasyonu, spermatozoon hücrelerinin saklanmasına ve daha sonra nitelikli erkek ve dişi damızlıkların yüksek verimli hayvanların üretimi için geniş ölçekte kullanılmasına olanak sağlar (Amini ve ark, 2019). Spermatozoonlar dondurularak uzun yıllar saklanabildiği gibi gerekli görülen durumlarda ülkeler ve hatta kıtalar arasında nakledilebilmektedir (Trounson, 1990). Spermanın saklanması -79°C (kuru buz) ya da -196°C'ye (sıvı azot) kadar sıcaklığının düşürülmesi ve bu sıcaklıklarda spermatozoonların zarar görmesini engelleyecek bir ortamda depolanması koşuluna dayanmaktadır (Salamon ve Maxwell, 1995; Holt, 2000).

Spermatozoonların çözüm sonu hasarlarının minimize edilmesi, tohumlama sonucu fertilite oranlarının artırılması ve ölüm oranlarının aşağı çekilmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, dondurulma hızı, çözülme ısısı, sulandırıcı bileşimi ve gliserol konsantrasyonları gibi çözüm sonu parametreleri değiştiren çeşitli etkenler üzerine pek çok araştırma mevcuttur (Pontbriand ve ark, 1989; Abdelhakeam ve ark, 1991; Öztürkler ve ark, 1999). Sulandırıcı tipi, spermanın morfolojik yapısı ve kriyoprotektif maddelerin oranları ve ozmotik basıncı koç spermasının çözüm sonu kalitesini önemli biçimde etkiler (Fiser ve ark, 1986; Aisen ve ark, 2000; El-Alamy ve Foote, 2001). Ayrıca, farklı erkek damızlıkların çözüm sonu spermatolojik özellikleri de önemli ölçüde farklılık gösterebilir. Bu bireye bağlı farklı kriyotolerans aygırlar başta olmak üzere hemen hemen tüm hayvan türlerinde gözlenmektedir (Hoffman ve ark, 2011).

Üreme faaliyetinin mevsimsel olduğu türlerde aşım mevsiminin ve aşım mevsimine geçiş döneminin spermanın dondurulabilirliği üzerine etkisi olduğu bilinmektedir. Koçlarda seminal plazmadaki spesifik proteinlerin yokluğu/azlığı ile toplam protein konsantrasyonlarındaki azalmanın çözüm sonu spermadaki düşük motilite oranları ile ilişkili

olduğu yönünde çalışmalar mevcuttur (Smith ve ark, 1993). Koçlarda çözüm sonrası akrozomal bütünlük ile motilite arasında pozitif bir ilişki, motilite ile akrozomal hasar oranları arasında ise negatif korelasyon bulunduğu ifade edilmektedir (Salamon ve Maxwell, 1995; Salamon ve Maxwell, 2000). Bununla birlikte, aşım sezonu içerisinde alınan ejakulatların dondurulabilme yeteneklerinin mevsim dışı ejakülatlara nazaran daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Fiser ve ark, 1986).

Genel bir prensip olarak, dondurulmuş-çözdürülmüş spermayla yapılan suni tohumlamanın diğer pek çok hayvan türünde olduğu gibi koyunlarda da taze sperma kullanımına göre daha düşük gebelik oranları sağladığı bildirilmektedir. Spermanın dondurulması sırasında ortaya çıkan ozmotik ve fizikokimyasal stres ve donma-çözülme sıcaklık farklılıkları ortamda reaktif oksijen türlerinin oluşumunu hızlandırır. Fosfolipid membranlarda ortaya çıkan lipid peroksidasyonu da canlılık, hareketlilik ve plazma membran bütünlüğü gibi spermatolojik özellikleri düşürür (Amini ve ark, 2019).

Dondurma sırasında koç spermatozoonlarının sadece yarısı hayatta kalırken bu hücrelerin dölleme yetenekleri de olumsuz etkilenir. Hücrede gerçekleşen bu hasarlar membranlar soğutulduğunda meydana gelen faz değişimleri (sıvıdan katıya ve katıdan tekrar sıvıya) ve kriyoprotektan ilavesi nedeniyle oluşan ozmotik değişimlerin yanı sıra dondurma işleminin kendisi tarafından uyarılan hücre içi buz oluşumunun sebep olduğu olumsuz etkilerden kaynaklanır (Mocé ve ark, 2010).

Hücresel değişikliklerin kökenini belirlemek için, kriyoprezervasyon işlemi, dondurma aşamaları arasındaki önemli farklılıklar ile birlikte bir bütün olarak düşünülmelidir. Bu nedenle, 37°C den 5°C ye soğutma, membran lipid faz geçişleriyle ilgili bazı değişikliklere neden olur. Bu donma ve çözülmeden kaynaklanılardan çok farklıdır çeşitli mekanik ve ozmotik değişiklikleri kapsar (Ollero ve ark, 1998).

2.5. Sıcak Stresinin Etkisi

Memeli testislerinde spermatogenezis oluşumu için gerekli olan sıcaklık vücut sıcaklığının 2-8°C altındadır (Banks ve ark, 2005). Bu durum “termoregülasyon mekanizmaları” olarak bilinen bir dizi doku ve organın işlevi ile gerçekleşir. Yüksek çevre sıcaklığında termoregülasyon mekanizmalarının aksamasının yanısıra testis dokusunun sıcaklığı, metabolik aktivitesi ve oksijen ihtiyacı artarak yeterli kan dolaşımı sağlanamaz ve testis dokusu hipoksik bir hal alır (Barth ve Bowman, 1994). Hipoksi reaktif oksijen türlerinin

(ROS) üretiminde genel bir artışa yol açarak yüksek düzeyde serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır (Zini ve ark, 1998; Filho ve ark, 2004).

Memelilerde hipotalamus ve özellikle de suprachiasmatic nukleus bölgesi üreme olgusu da dahil olmak üzere çeşitli biyolojik fonksiyonların günlük ve mevsimsel ritmini düzenlemekten sorumludur (Pando ve Sassone-Corsi, 2001). Burada hormonların fazik ve tonik salınımları ile östrüs ve bazı hallerde de gonadal gelişme düzenlenir (Buijs ve ark, 2003). Son yıllarda elde edilen bilimsel kanıtlar bu suprachiasmatic nukleus bölgesinin çevre sıcaklığına duyarlı olduğunu, buradaki bazı hücrelerin soğukta bazılarının ise sıcakta daha aktif hale geldiğini ortaya koymuştur (Burgoon ve Boulant, 2001).

Sıcak stresini tetikleyen ve ortalama çevre sıcaklığının 35°C den yüksek olduğu bölgelerde sperma kalitesinin olumsuz etkilendiği bilinmektedir (Nichi ve ark, 2006). Farelerde skrotal ısının fizyolojik sınırların birkaç derece üzerine çıkartılmasıyla spermatogenezde aksamalar oluştuğu ve sıcak stresinin testis dokusunda DNA, RNA ve protein sentezine zarar verdiği, protein denatürasyonuna ve anormal kromatin paketlenmesine yol açtığı ve ayrıca spermatozoonların DNA bütünlüğünün düştüğü belirlenmiştir (Sailer ve ark, 1997; Jannes ve ark, 1998; Banks ve ark, 2005).

Koçlarda skrotal deri sıcaklığı ile serum testosteron, libido, motilite, spermatozoon yoğunluğu ve fertilité düzeyi arasında önemli negatif, ölü ve total anormal spermatozoon oranları ile de önemli pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir (El-Darawany, 1999). Sıcak stresine maruz kalan testis dokusunda fonksiyonlar kademeli olarak bir veya iki spermatogenik siklus geçtikten sonra normale dönebilmektedir (Jannes ve ark, 1998).

2.6. Çinkonun Biyolojik Fonksiyonları ve Üreme Sistemindeki Önemi

Çinkonun gen ekspresyonu, DNA sentezi, enzimatik faaliyetler, hormonların yapımı ve salınımı, büyüme ve gelişme, sinirsel iletim, hafıza ve görme gibi metabolik olaylarda rol oynadığı bildirilmiştir (Vallee ve Falchuk, 1993).

Çinko, organizma için oldukça önemli esansiyel bir mineraldir. Hücrelerin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü için kritik rol oynar. Çinko yaklaşık 300 den fazla metallo enzimin yapısına katılan eser bir iz elementtir. DNA ve RNA gibi makromoleküllerin polimerik organizasyonu, protein sentezi ve hücre bölünmesi gibi önemli olayların yürütülmesinde önemli görevler yapar (Smith ve Akinbamizo, 2000).

Çinko erkek üreme sisteminde çeşitli fonksiyonları yürütür. Hormon metabolizması, spermatozoon oluşumu ve olgunlaşması gibi erkek üreme sisteminin her aşamasında görevlidir. Çinko eksikliğinde testosteron seviyesinde ve spermatozoon sayısında azalma meydana gelir (Ebisch ve ark, 2003; Wroblewski ve ark, 2003). Aynı zamanda, çinko prostat, epididimis ve testis fonksiyonlarının yürütülmesini sağlar (Ebisch ve ark, 2003). Çinkonun spermatogenesis (Wong ve ark, 2002), motilitenin düzenlenmesi (Wroblewski ve ark, 2003), membran komponentlerinin stabilizasyonu (Kendall ve ark, 2000), nükleer kromatinin dekonduksiyon yeteneğinin korunması ve spermatozoon fonksiyonlarının düzenlenmesi (Suzuki ve ark, 1995) gibi işlevleri olduğu da bilinmektedir. Ayrıca prostat, epididimis ve testiküler sıvıda bulunan çinko minerali spermanın olgunlaşmasında da yardımcı olmaktadır (Ebisch ve ark, 2003). Bununla birlikte spermatozoonların kuyruğunda aksonemi saran dış yoğun liflerde yoğun miktarda çinko bulunur. Bu sayede spermatozoon kuyruğu prematür oksidasyondan korunup sağlam bir yapı kazanır. Ayrıca spermatozoonların epididimal geçişi sırasında çinkonun %60'dan fazlasının spermatozoonlardan atılmasıyla, disülfid köprülerinde artış ve sülfidril grubunda azalma gerçekleşir, böylelikle spermatozoonların dış yoğun lifli yapısının sertleşmesi ve stabilizasyonu sağlanır. Ortamda çinko bulunmasının spermatozoon motilitesini belirgin şekilde artırdığı bildirilmiştir (Andrews ve ark, 1994; Wroblewski ve ark, 2003).

Kanda çinkonun normal değerlerin altına düşmesi testiküler fonksiyonun bozulması, seminifer tubul atrofi, testiste küçülme ve spermatogenezin tamamen durması gibi bir dizi sorunun ortaya çıkmasına neden olur (Martin ve ark, 1994). Ayrıca, çinko erkek üreme sisteminde olduğu gibi spermada da yüksek konsantrasyonda bulunur (Chia ve ark, 2000). Boğa ve koç, spermasında ortalama yoğunlukları sırasıyla 83.15 ± 61.61 , 60.46 ± 35.37 mg/kg olarak bildirilmiştir (Massányi ve ark, 2004).

Çinko aynı zamanda antioksidan etkiye sahiptir ve antioksidan enzim olan süperoksid dismutazın fonksiyonunda görev alır. Bu etkisiyle vücutta oksidatif stresin elimine edilmesini sağlayan antioksidan savunma sistemine katılır. Eksik olduğunda oksijen radikallerinin oluşturduğu membran hasarlarının arttığı bildirilmiştir (Oteiza ve ark, 1996). Çinkonun antioksidan etkinliğini nasıl gösterdiği tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen muhtemelen serbest oksidatif radikalleri tutan sistein'den zengin bir protein olan metallothionein sentezini uyarmasının bu etkiyi sağladığı düşünülmektedir (Oteiza ve ark, 1996). Kanatlı hayvanlarda sıcak stresinin etkilerinin azaltılması amacıyla çinko kullanılmaktadır (Şahin ve Küçük, 2003; Şahin ve ark, 2009). Çinko takviyesinin sperma kalitesi üzerine etkisinin incelendiği çalışmaların çoğu insanlar üzerinde yürütülmüştür

(Mohan ve ark, 1997; Chia ve ark, 2000). Boğa (Kumar ve ark, 2006) ve tavşanlarda (Oliveira ve ark, 2004) yapılan çalışmalar çinko takviyesinin spermatolojik parametreleri olumlu etkilediğini ifade etmektedir.

Türkiye’de özellikle Konya ili ve çevresinde toprakta çinko noksanlığı dikkati çekmektedir. Noksanlık bölgesi Isparta, Burdur, Aydın, Uşak ve Kütahya illerine doğru genişleme göstermektedir. Bölgede özellikle küçük ruminantlar çinko eksikliğinden daha çok etkilenmektedir (Fidancı, 1986). Genellikle çiftlik hayvanlarının rasyonlarına ilave olarak çinko sülfat gibi çinko tuzları katılabildiği gibi, parenteral çinko bileşikleri de uygulanabilir.

Koyunların çinko gereksinimini karşılamak üzere rasyonda gerekli çinko düzeyi, büyümekte olan hayvanlarda kuru maddede 20 mg/kg, erkek ve dişilerde optimum üreme performansı için ve laktasyondaki koyunlar için kuru maddede 33 mg/kg olarak bildirilmektedir (National Research Council, 1985). Kuru otlarda 13-25, mısır silajı 12-45, tahıl taneleri 16-49 mg/kg KM (kuru madde) çinko içermektedir (Suttle, 2010).

Bu çalışmada koçların bazal rasyonlarına ilave edilen çinkonun sıcak stresi sırasında (özellikle sıcak ve nemli Haziran-Eylül dönemi) spermatolojik parametrelere muhtemel etkisi hem de yılın farklı dönemlerinde (sıcak stresi varlığında ve yokluğunda) toplanan sperma örneklerinin dondurulabilirliği üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu perspektif içerisinde özellikle sıcak stresine karşı çinkodan zengin diyetle beslenmenin sıcak stresinin olumsuz etkilerinin hafifletilmesi amacıyla uygun bir strateji olup olmadığı test edilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışmada hayvan materyali olarak yaşları 24-36 ay, canlı ağırlıkları 50-60 kg arasında değişen 10 baş, sağlıklı kıvırcık ırkı koç kullanıldı. Koçlar çalışma süresi 12 ay (2017 Şubat-2018 Ocak) ve öncesi 6 ay toplam 18 ay boyunca Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Çiftliği'nde bulunan Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'na ait açık alanda her grup için üstü kapalı ve eşit büyüklükteki padoklarda barındırıldı. Koçlar çalışma süresi boyunca 1 kez nisan ayında kırım yapıldı.

3.1.1. Beslenme Programı

Kontrol ve deneme grubundaki koçlar deneme süresince yaşama payı beslenme gereksinimlerini karşılayacak şekilde dengelenmiş, kabayem (yonca kuru otu) ve arpa peleti karışımından oluşan rasyon ile beslendi. Orta kaliteli yonca kuru otu hayvanlara sabah ve akşam toplamda günlük yaklaşık 1,5 kg, peletlenmiş arpa kırması ise günde bir öğün 150 gr miktarında bireysel olarak verildi. Deneme grubu karma yemine ek olarak katılan %72 düzeyinde elementer çinko kapsayan çinko oksit ile hayvanların rasyondan gelen (yaklaşık 25-30 mg) çinko dışında günde 50 mg çinko daha tüketmesi sağlandı. Koçlar deneme süresi olan 12 ay ve öncesi 6 ay olmak üzere 18 ay boyunca yukarıda belirtilen rasyonla beslendi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Spermanın Alınması

Sperma örnekleri 12 ay boyunca 10 baş koçtan elektroejekülasyon yöntemiyle alındı. Bu koçlardan 5 tanesi kontrol 5 tanesi çinko grubu olarak ayrıldı. Koçlar yan yatırılıp temiz bir gazlı bezle glans penis tutulup prepusyum dışına doğru çekildi. Rektum dışkı yönünden temizlenip rektal prob jel yardımıyla kayganlaştırılarak rektuma yerleştirildi.

3.2.2. Spermanın Dondurulması

Alınan sperma örnekleri hemen motilite ve anormal spermatozoon oranları yönünden muayene edildi. Total motilite oranı %70 ve üzerinde, anormal spermatozoon oranları ise %20 ve altında olan ejakülatlar dondurma işleminde kullanılmak üzere sperma toplama kadehinden alınarak önceden 37°C lik su banyosunda bekletilerek ısıtılmış kuru bir deney tüpüne aktarıldı. Toplanan ve karıştırılan ejakülatlarda spermatozoon yoğunlukları hemositometrik yöntemle belirlendikten sonra her iki grupta aşağıda kompozisyonu verilen sulandırıcıyla ml de 400×10^6 hücre olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırma işlemi sırasında sulandırıcının sperma üzerine ilave edilmesine özen gösterildi.

Tablo 1. Sulandırıcı Kompozisyonu (Uçan ve ark, 2016).

Sulandırıcı Maddeleri	Miktar
Tris	300 mM
Sitrik Asit	95 mM
Glukoz	28 mM
Gliserol	%5 (hacmen)
Yumurta Sarısı	%14 (hacmen)
Penisilin	100.000 IU /100ml
Streptomisin	100 mg/100ml

Grupların sulandırma işlemlerinden sonra, sperma örnekleri 0.25 ml lik payetlere çekildi ve payetler ekilibrasyon işlemi için soğutmalı inkübatörde 2 saat boyunca 37°C den kademeli bir şekilde 4°C ye düşürüldü. Ekilibrasyon işlemi beklenirken su banyosunda bekleyen taze spermaların spermatolojik parametreleri değerlendirildi. Ekilibrasyon işleminden sonra payetler 7 dakika süre ile sıvı azot seviyesinin üzerine (5 cm üzerinde olacak şekilde) yatay bir şekilde dizildi (Uçan ve ark, 2016). Bu sürenin bitiminden sonra depolama için sıvı azotun içine daldırıldı ve bir süre sonra konteynerlere aktarıldı. Spermatolojik parametrelerin tespitine yönelik çalışmalara kadar konteynerlerde saklandı. Spermatolojik muayenelerin yapılmasından hemen önce payetler 37°C ye ayarlanmış bir su banyosunda 30 saniye boyunca çözdürüldü.

Yıl boyunca hem taze hem de dondurulup çözdürülmüş sperma örneklerinden elde edilen spermatolojik parametreler, sıcak stresinin görüldüğü aylar (Haziran-Eylül) ve görülmediği aylar (Ekim-Ocak) olarak iki kısma ayrıldı. Bu iki bölümde aşım sezonunun

sperma kalitesini etkileyebileceği düşünülerek aşım sezonu içi ve dışı ayların sayısı eşitlendi. Taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örnekleri ayrı ayrı değerlendirildi. Koçların sıcak stresinden etkilendiği aylar belirlenirken, Marai ve ark (2007) belirttiği sıcaklık-nem indeksi (THI) değerleri kullanıldı (Tablo 2). Aydın ili için günlük sıcaklık ve bağıl nem değerleri Aydın ili Meteoroloji Müdürlüğünden temin edilip aylık ortalaması bulundu ve aşağıdaki formülle sıcaklık-nem indeksi değerleri hesaplandı.

$$THI = \text{Sıcaklık} - (0.31 - 0.0031 \times \text{Bağıl Nem}) \times (\text{Sıcaklık} - 14.4)$$

Tablo 2. Sıcaklık-nem indeksi (THI) değerleri (Marai ve ark 2007) ve stres düzeyleri.

THI Değerleri	Sıcaklık Stresi Dereceleri
< 22.2	Sıcaklık stresi yok
22.2 - 23.2	Orta derecede sıcaklık stresi
23.3 - 25.5	Şiddetli sıcaklık stresi
≥ 25.6	Çok şiddetli sıcaklık stresi

Tablo 3. Çalışma dönemleri sıcaklık-nem indeksi (THI) değerleri.

Dönemler	Aylar	THI	Sıcaklık Stresi Derecesi
Sıcak Stresi Dönemi	Haziran	24.4	Şiddetli sıcaklık stresi
	Temmuz	27.1	Çok şiddetli sıcaklık stresi
	Ağustos	26.6	Çok şiddetli sıcaklık stresi
	Eylül	23.1	Orta derecede sıcaklık stresi
Kontrol Dönemi	Ekim	18.0	Sıcaklık stresi yok
	Kasım	12.7	Sıcaklık stresi yok
	Aralık	11.4	Sıcaklık stresi yok
	Ocak	9.1	Sıcaklık stresi yok

Ayrıca, tüm aylar (2017 Şubat- 2018 Ocak) dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örnekleri karşılaştırılarak aşağıda belirtilen spermatolojik parametreler çerçevesinde çinkonun dondurma-çözdürme işleminin olumsuz etkilerine karşı herhangi bir koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırıldı.

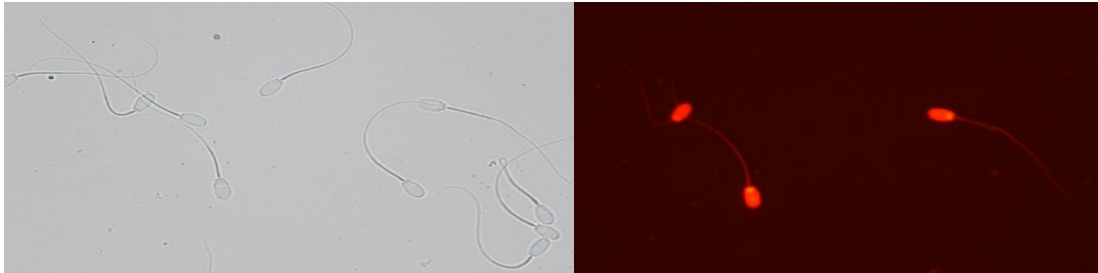
3.2.3. Spermatojik Parametrelerin Belirlenmesi

3.2.3.1. Motilite muayenesi

Sperma örnekleri uygun şekilde lam-lamel arasına yerleştirilerek ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskopta kamera ile bağlantılı CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) programı (Microptic, Spain) yardımıyla progresif motilite oranları belirlendi. Bu amaçla en az 4 farklı alandan en az 1000 hücre değerlendirildi. Değerlendirmelerin ortalaması alınarak hesaplamalarda kullanıldı.

3.2.3.2. Canlı spermatozoon oranı

Canlı spermatozoon oranının belirlenmesi amacıyla Propodium iodide (PI) boyama tekniği kullanılmıştır (Naseer ve ark, 2018). 50µl sulandırılmış spermanın üzerine 2,5 µl PI (200 µg/ml) ilave edildi, 37°C de 5 dk inkube edildi ve ardından 2,5 µl %4 lük fiksatif (%4'lük paraformaldehit) eklendi. Floresan mikroskop yardımıyla en az 200 hücre, x400 büyütmede sayılarak boya alanlar (kırmızı) ölü, boya almayanlar canlı olarak kabul edildi (Resim 1). Bu rakamlar üzerinden canlı spermatozoon oranları tespit edildi.

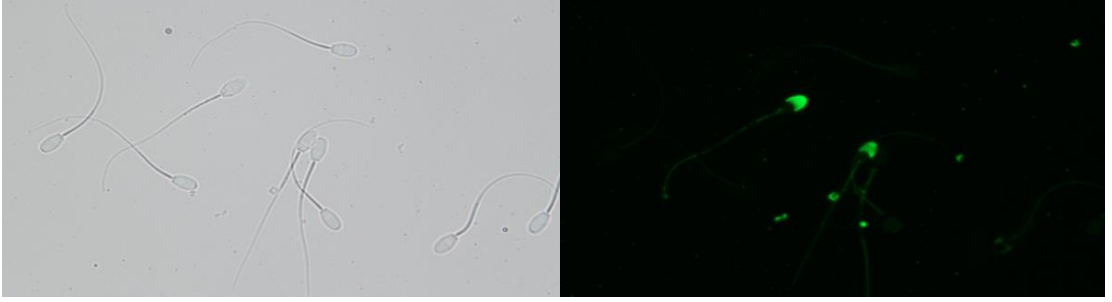


Resim 1. PI boyaması sonrası aynı alanın ışık mikroskobu (solda) ve PI filtre görüntüsü (sağda).

3.2.3.3. Prematür akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranının belirlenmesi

Prematür akrozom reaksiyonu geçirmiş hücreleri belirlemek için akrozoma spesifik floresan boya fluorescein isothiocyanate peanut agglutinin (FITC-PNA) kullanıldı (Naseer ve

ark, 2018). 50 µl sulandırılmış spermanın üzerine 5 µl (200µg/ml) boya ilave edildi ve 5 dk boyunca 37°C de inkübe edildi. Ardından 2,5 µl %4 lük fiksatif tüplere eklendi. Floresan mikroskop altında hazırlanan preparatlardan toplam 200 hücre sayılarak, akrozom reaksiyonuna giren hücre oranı belirlendi. Ön bölümü FITC-PNA ile yeşil renkte boyanan spermatozoonlar akrozom reaksiyonuna giren hücreler olarak kabul edildi ve herhangi bir floresan ışımaya vermeyen spermatozoonlar ise akrozom reaksiyonuna girmeyen hücreler olarak sayıldı (Resim 2).



Resim 2. FITC-PNA boyaması sonrası aynı alanın ışık mikroskobu (solda) ve FITC-PNA filtre görüntüsü (sağda).

3.2.3.4. Spermatozoon membran bütünlüğünün belirlenmesi

Spermatozoon membran bütünlüğünün belirlenmesi için hipo-ozmotik şişme testi (HOS testi) uygulandı. Bu amaçla Jeyendran ve ark (1984) tarafından tanımlanan yöntemden yararlanılarak sperma örneklerinin 100 mOsm/L ye ayarlanmış (Aisen ve ark, 2005) fruktoz solüsyonu içerisinde 15 dk inkübe edilmesinden sonra preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatlardan toplam 200 hücre sayılıp, kıvrık kuyruklu spermatozoonların oranı belirlendi ve bu hücreler membran bütünlüğüne sahip spermatozoonlar olarak kabul edildi.

3.2.3.5. Anormal spermatozoon oranı

Sıvı fikzasyon yöntemiyle belirlendi. Hancock solüsyonu (Hancock 1952) kullanılarak 1:100 oranında sulandırılarak fikze edilen hücreler lam-lamel arasında bir faz-kontrast mikroskop altında x400-1000 büyütmede incelenerek çeşitli spermatozoon kısımlarına

(akrozom, baş, orta kısım ve kuyruk) ait bozukluklar ve bunların spermatozoon örneklerinde görülme oranları tespit edildi.

3.2.3.6. Mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi

Spermatozoonlarda mitokondriyal aktivite mitokondrilere spesifik rhodamine 123 boyama tekniğiyle saptandı (Naseer ve ark, 2018). 125 µl sulandırılmış spermanın üzerine 2,5 µl rhodamine 123 boyası ilave edildi ve 37°C de 30 dk boyunca inkübe edildi. Ardından 2,5 µl %4 lük fiksatif ilave edildi. Floresan mikroskop altında hazırlanan preparatlardan x400 büyütmede toplam 200 hücre sayılarak, orta bölümlerinde parlak, floresan ışımaya veren hücreler tespit edilip oranları belirlendi. Parlak ışımaya veren hücrelerin mitokondriyal potansiyale sahip oldukları kabul edildi ve oranları hesaplandı (Resim 3).



Resim 3. Rhodamine 123 boyaması sonrası aynı alanın ışık mikroskobu (solda) ve Rhodamine 123 filtre görüntüsü (sağda).

3.2.4. İstatistiksel Analizler

Elde edilen bulguların istatistiksel analizleri SPSS[®] 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences) programı aracılığıyla gerçekleştirildi. Her grup için parametrelerin ortalama ve standart hataları hesaplandı ve tüm değerler çalışma boyunca bu biçimde (mean±SEM) sunuldu. Her dönemin (stres dışı ve stres içi) kendi içinde karşılaştırılması ve farkların belirlenmesi amacıyla "Independent sample T-testi" kullanıldı. Tüm analizlerde P<0,05 fark anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Süresince Aylık THI Değerleri

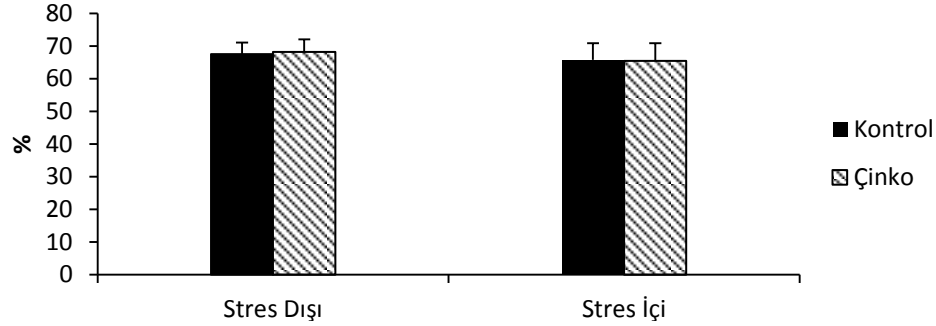
Çalışma süresince (Şubat 2017- Ocak 2018) ölçülen ortalama aylık sıcaklıklar, nem oranları ve bu iki veri çerçevesinde hesaplanan THI değerleri Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4. Çalışma süresi boyunca ölçülen sıcaklık, bağıl nem ve hesaplanan THI değerleri.

	2017	2017	2017	2017	2017	2017	2017	2017	2017	2017	2017	2018	2018
	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Ocak
Sıcaklık	10,1	13,2	16,4	21,0	26,2	29,8	28,8	24,7	18,6	12,5	11,1	8,6	8,6
(°C)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,66	0,47	0,46	0,34	0,52	0,35	0,30	0,41	0,34	0,46	0,59	0,39	0,39
Nem	65,9	68,3	59,6	58,9	52,0	43,2	51,7	50,6	57,4	70,5	74,2	74,5	74,5
(%)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	2,41	1,41	1,94	2,32	1,67	1,62	1,34	1,52	2,20	1,69	1,67	2,27	2,27
THI	10,6	13,3	16,1	20,2	24,4	27,1	26,6	23,1	18,0	12,7	11,4	9,1	9,1

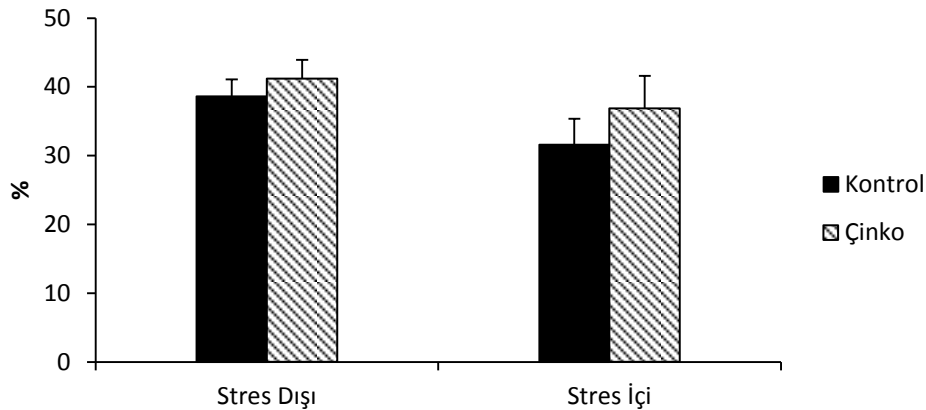
4.2. Progresif Motilite Oranı

Kontrol ve çinko gruplarında taze spermaya ait progresif motilite oranları sıcak stresi dışı dönemde sırasıyla %67,5±3,54 ve %68,2±3,80 olarak bulundu. Sıcak stresi döneminde ise motilite kontrol ve çinko gruplarında sırasıyla %65,7±5,14 ve %65,5±5,41 olarak belirlendi (Şekil 1). Bu gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamadı ($P>0,05$).



Şekil 1. Sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında taze sperma progresif motilite oranları.

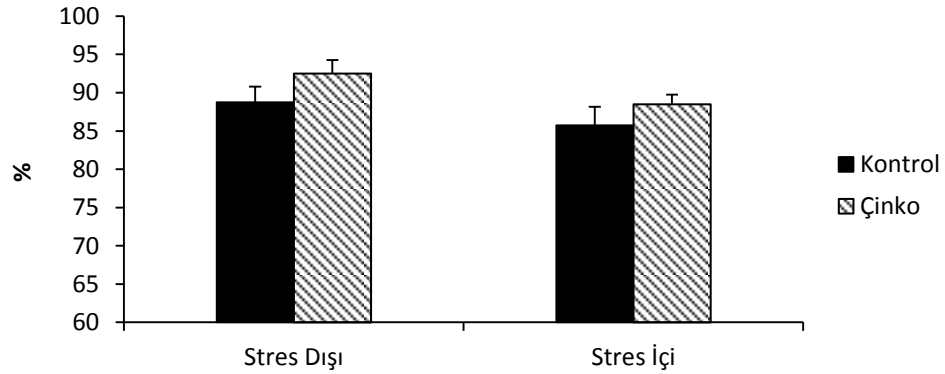
Yapılan değerlendirmeler sonucunda kontrol ve çinko gruplarında dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde progresif motilite oranları sıcak stresi dışındaki dönemde sırasıyla %38,6±2,46 ve %41,1±2,75 olarak bulundu. Sıcak stresi döneminde ise kontrol ve çinko gruplarında bu oranlar sırasıyla %31,5±3,77 ve %36,8±4,75 olarak tespit edildi (Şekil 2). Bu gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunamadı ($P>0,05$).



Şekil 2. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında progresif motilite oranları.

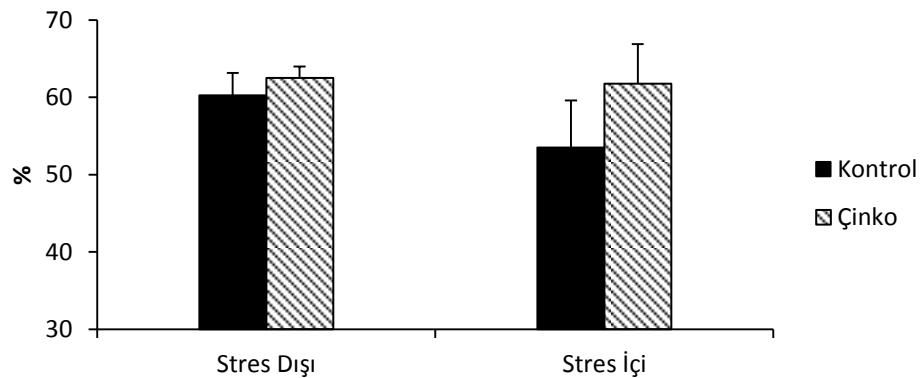
4.3. Canlı Spermatozoon Oranı

Kontrol ve çinko gruplarında taze sperma örneklerinde canlı spermatozoon oranları sıcak stresi dışı dönemde sırasıyla %88,7±2,05 ve %92,5±1,75 olarak bulundu. Sıcak stresi döneminde ise gruplarda bu değerler sırasıyla %85,7±2,42 ve %88,5±1,25 olarak belirlendi (Şekil 3). Bu gruplar arasında istatistiksel farklılık bulunmadı ($P>0,05$).



Şekil 3. Sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında taze spermaya ait canlılık oranları.

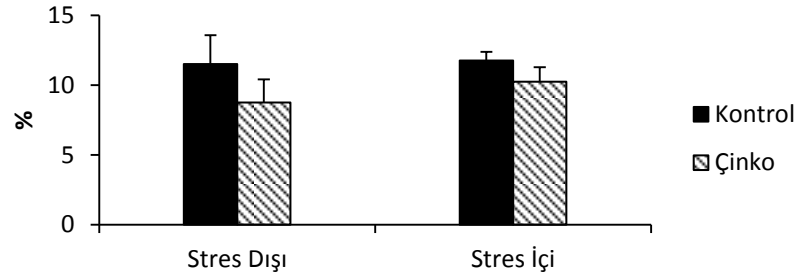
Kontrol ve çinko gruplarında dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde canlı spermatozoon oranları aylar boyunca dalgalanma gösterdi, sıcak stresi dönemi dışında sırasıyla %60,2±2,89 ve %62,5±1,50 olarak bulundu. Sıcak stresi döneminde ise sırasıyla bu değerler %53,5±6,08 ve %61,7±5,13 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4). Bu gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamadı ($P>0,05$).



Şekil 4. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarına ait canlılık oranları.

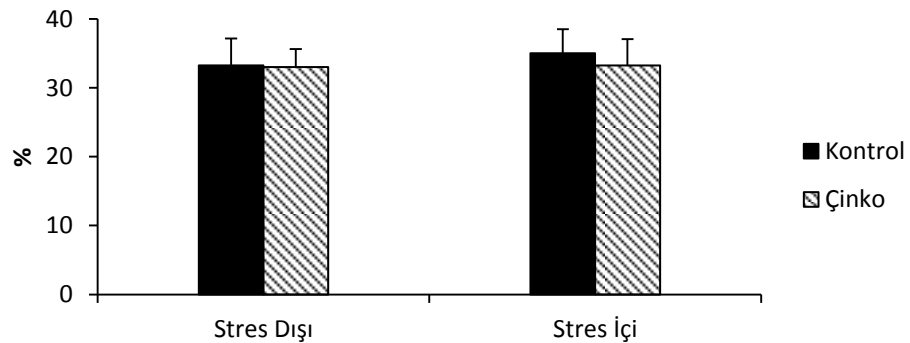
4.4. Prematür Akrozom Reaksiyonuna Giren Spermatozoon Oranı

Kontrol ve çinko gruplarında taze sperma örneklerinde prematür akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranları sıcak stresi dönem dışında sırasıyla $11,5 \pm 2,06$ ve $8,7 \pm 1,65$ olarak bulundu. Sıcak stresi döneminde ise sırasıyla bu değerler $11,7 \pm 0,62$ ve $10,2 \pm 1,03$ olarak gözlemlendi (Şekil 5). Gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamadı ($P > 0,05$).



Şekil 5. Sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında taze spermada prematür akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranları.

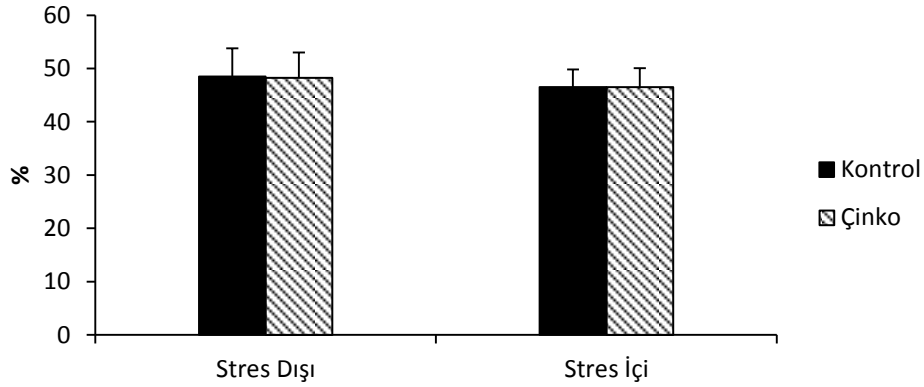
Kontrol ve çinko gruplarında dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde prematür akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranları sıcak stresi dönemi dışında sırasıyla $33,2 \pm 3,90$ ve $33,0 \pm 2,61$ olarak bulundu. Sıcak stresi döneminde ise bu değerler sırasıyla $35,0 \pm 3,48$ ve $33,2 \pm 3,81$ olarak tespit edildi (Şekil 6). Gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunamadı ($P > 0,05$).



Şekil 6. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında prematür akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranları.

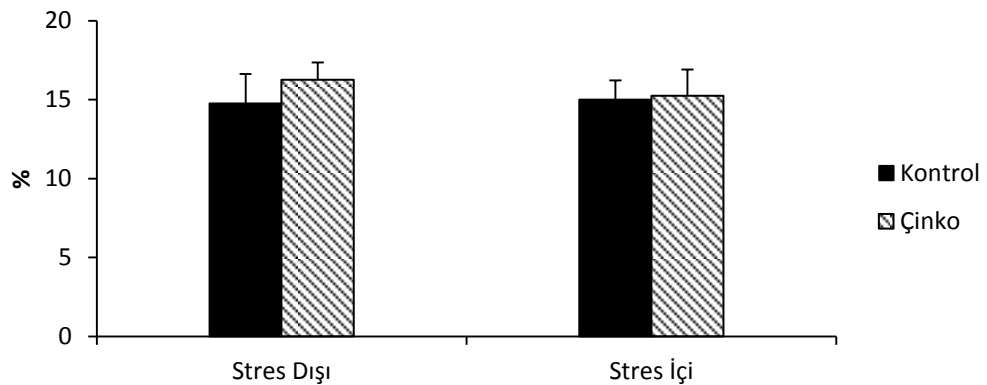
4.5. Membran Bütünlüğü Oranı

Taze spermada membran bütünlüğü oranları kontrol ve çinko gruplarında sıcak stresi dönemi dışında sırasıyla %48,5±5,31 ve %48,2±4,75 olarak bulundu. Sıcak stresi döneminde ise bu oran gruplarda sırasıyla %46,5±3,30 ve %46,5±3,57 olarak belirlendi (Şekil 7). Kontrol ve çinko grupları arasında bu parametre yönünden istatistiksel bir fark bulunamadı ($P>0,05$).



Şekil 7. Sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında taze spermada spermatozoon membran bütünlüğü oranları.

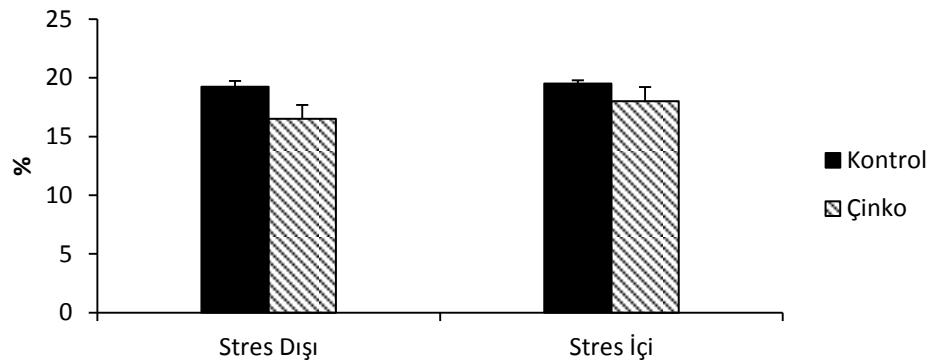
Kontrol ve çinko gruplarında dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde membran bütünlüğü oranları sıcak stresi dışında sırasıyla %14,7±1,88 ve %16,2±1,10 olarak bulundu. Sıcak stresi döneminde ise bu parametre sırasıyla %15,0±1,22 ve %15,2±1,65 olarak belirlendi (Şekil 8). Bu parametre yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı ($P>0,05$).



Şekil 8. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında spermatozoon membran bütünlüğünü oranları.

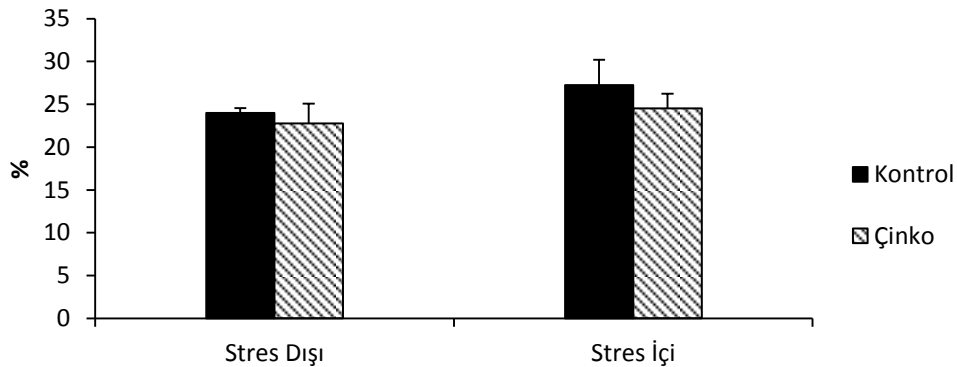
4.6. Anormal Spermatozoon Oranı

Bu çalışmada kontrol ve çinko gruplarında taze sperma örneklerinde anormal spermatozoon oranları sıcak stresi dışında sırasıyla %19,2±0,47 ve %16,5±1,19 olarak bulundu. Sıcak stresi içeren dönemde ise bu oranlar sırasıyla %19,5±0,28 ve %18,0±1,22 olarak belirlendi (Şekil 9). Bu parametre açısından kontrol ve çinko grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($P>0,05$).



Şekil 9. Sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarında taze sperma anormal spermatozoon oranları.

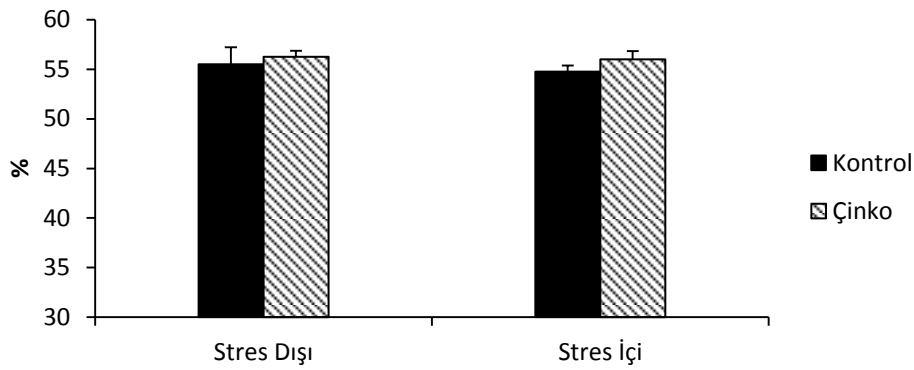
Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde kontrol ve çinko gruplarında anormal spermatozoon oranları sıcak stresi dışında sırasıyla %24,0±0,57 ve %22,7±2,32 olarak belirlendi. Sıcak stresi döneminde ise bu oran %27,2±2,95 ve %24,5±1,75 olarak bulundu (Şekil 10). Kontrol ve çinko grupları arasında bu parametre açısından istatistiksel bir fark bulunamadı ($P>0,05$).



Şekil 10. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarına ait anormal spermatozoon oranları.

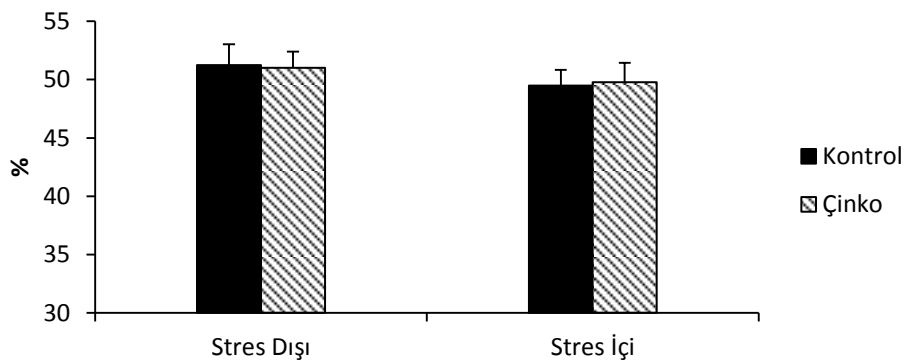
4.7. Mitokondriyal Aktivite Oranı

Kontrol ve çinko gruplarında taze sperma örneklerinde spermatozoonlarda mitokondriyal aktivite oranları sıcak stresi dışında sırasıyla %55,5±1,70 ve %56,2±0,62 olarak elde edildi. Sıcak stresi içeren dönemde ise sırasıyla bu oranlar %54,7±0,62 ve %56,0±0,81 olarak tespit edildi (Şekil 11). Bu parametre yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadı ($P>0,05$).



Şekil 11. Taze sperma örneklerinde sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarına ait mitokondriyal aktivite oranları.

Kontrol ve çinko gruplarında spermatozoonlarda çözüm sonu mitokondriyal aktivite oranları sıcak stresi dönemi dışında sırasıyla %51,2±1,79 ve %51,0±1,41 olarak bulunurken sıcak stresi döneminde gruplarda bu oranlar sırasıyla %49,5±1,32 ve %49,7±1,70 olarak gözlemlendi (Şekil 12). Gruplar arasında bu parametre açısından önemli bir fark bulunmadı ($P>0,05$).

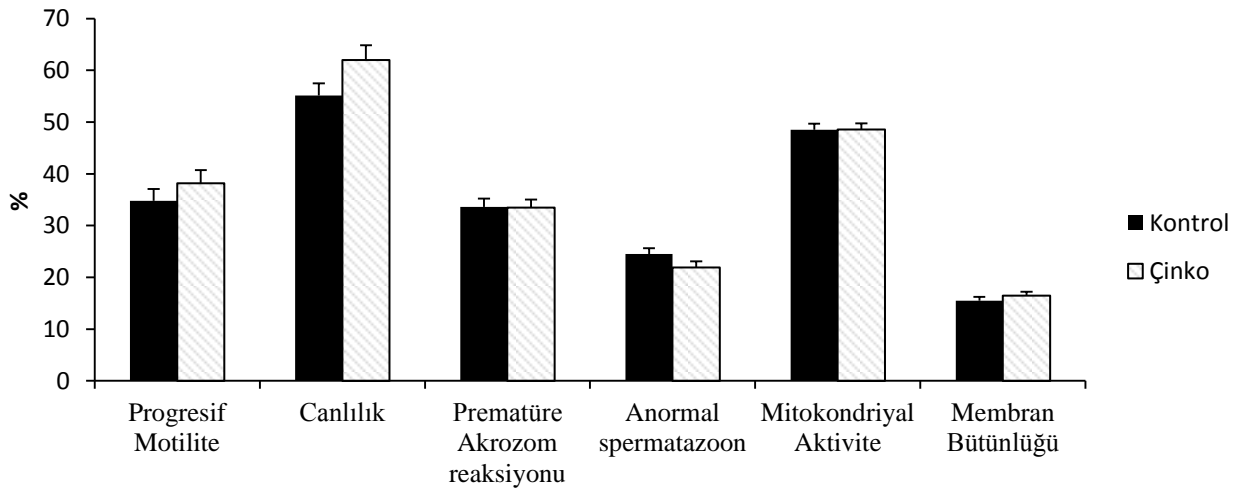


Şekil 12. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde sıcak stresi dışı ve sıcak stresi döneminde kontrol ve çinko gruplarına ait mitokondriyal aktivite oranları.

4.8. Yıl Boyu Dondurulup Çözdürülen Spermaların Spermatojik Değerleri

12 aylık çalışma dönemi boyunca (2017 Şubat-2018 Ocak) dondurulup çözdürülen sperma örneklerinde kontrol ve çinko gruplarının spermatojik değerleri sırasıyla progresif motilite için %34,8±2,30 ve %38,2±2,49, canlılık için %55,1±2,35 ve %62,0±2,86 olarak bulunmuştur. Bu parametreler açısından çinko grubunun kontrol grubuna göre nümerik olarak yüksek olduğu görülmektedir. Ancak, bu farklılıklar istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır (P>0,05).

Aynı gruplar için anormal spermatozon oranları %24,5±1,12 ve %21,9±1,18, mitokondriyal aktivite %48,5±1,17 ve %48,6±1,12, membran bütünlüğü %15,5±0,76 ve %16,5±0,71, prematür akrozom reaksiyonu %33,6±1,63 ve %33,5±1,53 olarak hesaplanmıştır. Bu parametreler de istatistiksel olarak benzer bulunmuştur (P>0,05).



Şekil 13. Yıl boyunca dondurulup çözdürülen sperma örneklerinde spermatojik değerler.

5. TARTIŞMA

Çinko dünyada en yaygın bulunan elementlerden birisidir. Tüm canlı türleri için gerekli bir mikro-besin olmasının yanında orta şiddette indirgeme yeteneğine sahip bir katyon metaldir. Sinyal iletimi, enzimatik faaliyetler, normal büyüme, seksüel olgunlaşma, sindirim, santral sinir sisteminin homeostasis faaliyeti ve mitokondriyal oksidasyon gibi pek çok yaşamsal olayda çeşitli roller üstlenmiştir (Lee, 2018; Levaot ve Hershinkel, 2018). Ayrıca, vücutta çinko dengesinin bozulması veya çinko temelli sinyal iletimi sorunları insanlardaki Alzheimer hastalığı yanında, çeşitli körlük tipleri, kanser, sindirim sistemi sorunları, büyüme geriliği ve yangı gibi çeşitli olaylardan sorumludur (Lovell, 2009; Prasad, 2009; Prakash ve ark, 2015). Çinko tuzlarının tedavi edici etkilerini ilk olarak Etrüskler ve Romalılar tespit etmişlerdir (Giachi ve ark, 2013).

Çinko iyonları 300 den fazla enzimin fonksiyon gösterebilmesi için gereklidir. Bu 300 enzim 50 den fazla enzim grubunu kapsar. Çinko altı farklı enzim grubu (oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, lizazlar, izomerazlar ve ligazlar) içinde fonksiyon gösteren tek metaldir (Vallee ve Falchuk, 1993).

İnsan vücudunda mevcut bulunan çinkonun yaklaşık %90'ı kas ve kemiklerde bulunur. Çinkonun çok rastlandığı diğer organlar prostat, gastro-intestinal kanal, böbrek, deri, akciğerler, beyin, kalp ve pankreasır (Wastney ve ark, 1986; Llobet ve ark, 1988; Bentley ve Grubb, 1991; Liu-Sheng ve ark, 1991). Ağız yoluyla alınan ve ince barsaktan emilen çinkonun vücut içindeki dolaşımı serum yoluyla olur. Serumda çinko %60'a kadar albümine bağlı olarak bulunur (Kerns ve ark, 2018). Hücresel düzeyde bakıldığında total çinko miktarının % 30-40'ı nükleus içinde, % 50'si stoplazma da ve kalanı da hücre membranında bulunmaktadır (Vallee ve Falchuk, 1993).

Çinko iyonlarının spermatogenezis olgusunda ilk ortaya çıkması spermatid aşamasındaki hücrelerin çekirdeğine (Barney ve ark, 1968; Baccetti ve ark, 1976) ve onu çevreleyen dış fibröz yapılar yerleşmesiyle başlar (Bedford ve Calvin, 1974). Çekirdekte bulunan çinko nükleusu saran protaminle birlikte bulunur (Porath ve ark, 1975). Spermatozoonlara çinko takviyesi ikinci olarak ejakülasyon sırasında olur (Björndahl ve ark 1986). Özellikle prostat ve veziküler gland sıvıları yüksek miktarda çinko içerir. Köpek (Johnson ve ark, 1969; Mogielnicka-Brzozowska ve ark, 2015) ve domuzlarda (Mogielnicka-Brzozowska ve ark, 2011) seminal plazma sıvısında çinko bağlayıcı proteinler mevcuttur.

Ejekülasyon sırasında spermaya eklenen çinko kromatin yapılarının korunması (Björndahl ve Kvist, 2010; Björndahl ve Kvist, 2011), motilite (Riffo ve ark, 1992), membran stabilizasyonu (Bettger ve O'Dell, 1981) ve antioksidan aktivite (Bray ve Bettger, 1990; Narasimhaiah ve ark, 2018) için gereklidir.

Ayrıca, çinko spermatozoonların kapasite olabilmeleri için yaşamsal bir öneme sahiptir. Kapasitasyon olgusu için hücre içine Ca^{+} girişinin önemi öteden beri bilinmesine rağmen çinkonun hücreden çıkışı ile bu mekanizmanın başlatıldığı, bu Ca^{+} girişi için giriş kanallarını açma fonksiyonunu yürüttüğü yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Loeb, 1914; Yanagimachi ve Usui, 1974).

Gerek koçlarda gerekse diğer erkek hayvanlarda spermatolojik parametrelerin iyileştirilmesi amacıyla organik ve inorganik çinko tuzları rasyon içerisinde farklı dozlarda kullanılmaktadır.

Manda boğalarında normal rasyon yanında günlük 0,8 gramlık oral doz çinko oksit verilmesinin ejakulat hacmi yanı sıra progresif motilite, canlı spermatozoon oranları ve spermatozoon yoğunluğunu arttırdığı ve anormal spermatozoon oranlarını düşürdüğü belirlenmiştir. Çinko verilen manda boğalarında reaksiyon süresi kısalmış, scrotal çevre uzunlukları ve testis hacimleri artmıştır (Gabr ve Basuini, 2018).

Hindistan da lokal bir ırk olan Gir boğaları üzerinde yapılan bir araştırmada günlük diyetle ek olarak 60 gün boyunca hayvan başına 40ppm/gün çinko propiyonat yedirmenin kalitatif ve kantitatif spermatolojik parametreleri kontrol grubuna göre yükselttiği belirtilmektedir (Chaudhary ve ark, 2017).

Koçlarda anöstrüs döneminde yapılan çalışmalarda rasyona günlük olarak 80 ppm çinko nanopartikülü ilave edilmiş ve spermatolojik parametreler üzerine etkisi incelenmiştir. Motilite, canlı spermatozoon oranı ve spermatozoon yoğunlukları çinko grubunda önemli oranda yüksek bulunmuş, anormal spermatozoon oranlarında düşme belirlenmiştir. Aynı zamanda spermanın antioksidan potansiyalinde çinko kullanımına bağlı yükselme gözlenmiştir (Abaspour Aporvari ve ark, 2018).

Sunulan çalışmada, çinko ilavesi yapılmış yemle beslenen koçlarda taze sperma örneklerine ait bazı spermatolojik parametrelerde (canlılık, akrozom reaksiyonu, morfoloji) rakamsal olarak ufak düzeltilmeler tespit edilmesine rağmen çinko ve kontrol grubu arasında herhangi bir istatistiksel fark gözlenmemiştir ($P>0,05$). Sıcak stresinin şiddetli olduğu ve THI değerlerinin kritik düzeylerin üzerine çıktığı aylarda (Haziran-Eylül) da herhangi bir fark görülmemiştir. Yukarıda özetlenen literatür bulgularla sunulan çalışma arasında gözlenen sonuçlara ait farklılığın kontrol grubu koçlarının da normal günlük diyetleri ile (özellikle kaba

yem) yeterli miktarda çinkoyu almalarından ve deneme grubuna verilen ek çinko dozunun ekstra bir etki veya düzelme sağlamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer biçimde, günlük rasyonlarına çinko-amino asit kombinasyonu veya çinko sülfat ilave edilerek ekstra çinko alması sağlanan koçlarda skrotal sirkumferens uzunluğu, testosteron düzeyi, spermatozoon yoğunluğu, motilite, canlı ve anormal spermatozoon oranları açısından çinko verilmeyen kontrol grubu koçları arasında fark bulunmamıştır (Page ve ark, 2019).

Rasyona ilave edilen çeşitli çinko preparatlarının taze spermaya ait spermatolojik parametreler yanında bu sperma örneklerinin dondurulmasından sonra çözüm sonu parametreler üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar da literatürde mevcuttur. Çinkodan zengin beslemenin tekelerde çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkisinin izlendiği bir çalışmada teke rasyonlarına 20, 40 veya 60 mg/kg KM (kuru madde) oranında çinko takviyesi yapılmıştır. Bu tekelerden alınan sperma örneklerinde çözüm sonu canlı spermatozoon oranları, membran ve akrozom bütünlüğünün çinko grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edilmiş, ancak 20 ve 40 mg lık dozların tersine 60 mg lık çinko dozunun bu parametreler üzerine olumlu bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. (Arangasamy ve ark, 2018). Sunulan çalışmada rasyona ilave edilen çinko, sıcak stresi veya yıl boyu alınan sperma örneklerinde dondurulabilirliği önemli oranda değiştirmemiştir. Bu sonucun da yukarıda belirtildiği gibi kontrol grubu koçlarının normal günlük diyetleri ile yeterli miktarda çinko almalarından ve herhangi bir eksiklik bulunmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çinko erkek hayvanların günlük rasyonları dışında sperma sulandırıcılarına direk olarak katılarak da kullanılmaktadır. Epididimal deve spermasının dondurulması sırasında kullanılan SHOTOR sulandırıcısına ilave edilen 50 µg/ml nano partikül çinkonun çözüm sonu spermatolojik parametreleri ilerlettiği, motilite, canlılık ve membran bütünlüğüne ait değerlerde artış sağladığı gösterilmiştir (Shahin ve ark, 2020). Yine benzer bir çalışmada, sulandırıcı içerisine çinko oksit nanopartiküllerinin ilavesinin insan spermatozoonlarını dondurmaya bağlı oluşan hasarlara karşı koruduğunu, kromatin hasarlarını azalttığını ve MDA (Malondialdehit) düzeylerini düşürdüğünü ifade etmişlerdir (Isaac ve ark, 2017). Sunulan çalışmada çinkonun sulandırıcı içerisine katılarak spermanın dondurulduğu bir deney bulunmadığı için burada bu yönde bir tartışma olanağı elde edilememiştir.

Spermatozoonlarda mitokondriyal aktivite ya da mitokondriyal membran potansiyelinin tespit edilmesi amacıyla JC-1 boyaması en sık kullanılan ve eski yöntemdir (Garner ve ark, 1997). Ancak, Uribe ve ark (2017) JC-1 yerine tetramethyl rhodamine methyl ester perchlorate kullanımını önermiş, her iki boyama sonuçlarının çok benzer olduğunu ifade etmiştir. Bu çalışmada mitokondriyal potansiyel ya da mitokondriyal membran bütünlüğü

tespiti için rhodamin boyama tekniği kullanılmıştır. Mitokondriyal aktivite ile sperma motilitesi arasında önemli bir korelasyon olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Oksitleyici ajanlarla inkübe edilen aygır spermatozoonlarında motilite parametrelerinin kinematik parametrelerle paralel biçimde düştüğu ancak JC-1 boyama tekniği yardımıyla tespit edilen mitokondriyal membran potansiyelinde herhangi bir değişiklik olmadığı ifade edilmiştir (Baumber ve ark, 2000). Bu sonuç, genel olarak sperma kalitesi ile mitokondriyal membran potansiyeli değerleri arasındaki paralelliğin her zaman gözlenemediğinin ifadesidir. Sunulan çalışmada da bazı spermatolojik parametrelerle mitokondriyal aktivite değerleri arasında korelasyon olmadığı tespit edilmiştir. Kontrol ve çinko gruplarında taze sperma örneklerinde spermatozoonlarda mitokondriyal aktivite oranları sıcak stresi dışında sırasıyla %55,5±1,70 ve %56,2±0,62 olarak bulundu. Sıcak stresi içeren dönemde ise sırasıyla bu oranlar %54,7±0,62 ve %56,0±0,81 olarak tespit edildi. Dondurulmuş çözdürülmüş spermatozoon oranları ise sıcak stresi dönemi dışında sırasıyla %51,2±1,79 ve %51,0±1,41 olarak bulunurken sıcak stresi döneminde gruplarda bu oranlar sırasıyla %49,5±1,32 ve %49,7±1,70 olarak gözlemlendi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; rasyona ilave edilen 50 mg çinko gerek sıcak stresinin yoğunlaştığı Haziran-Eylül ayları arası dönemde ve gerekse de yıl boyu sürdürülen gözlemlerde spermatolojik parametreleri üzerine olumlu etkileri görülmesine rağmen istatistiksel olarak gruplar arasında bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). Benzer biçimde, çözüm sonu spermatolojik parametreler açısından da çinko tüketimi koç spermatozoonlarında kriyotolerans düzeyini istatistiksel olarak etkilememiştir. Elde edilen bu sonucun doğal olarak bu çalışmada yem katkısı olarak kullanılan çinko türü, kullanılan doz, beslenme düzeni ve coğrafi konumla (bölgesel olarak topraktaki çinko düzeyleri değiştiği için) da önemli ölçüde ilgili olduğu düşünülmektedir.

Genel olarak; tüm minerallerin canlı organizma içerisinde çeşitli sistemler düzeyinde birbirleriyle yakından ilişkili ve etkileşimli olması nedeniyle yeme sadece çinko ilavesi ile diğer bazı minerallerin ve vitaminlerin (Ni, Cu, Se, Vit B) düzeyleri bilinmeden elde edilecek sonuçların literatürdeki birbirlerinden farklı gözlemlerden kısmen sorumlu olabileceği de göz ardı edilmemelidir.

KAYNAKLAR

Abaspour Aporvari MH, Mamoei M, Tabatabaei Vakili S, Zareei M, Dadashpour Davachi N. The effect of oral administration of zinc oxide nanoparticles on quantitative and qualitative properties of arabic ram sperm and some antioxidant parameters of seminal plasma in the non-breeding season. *Archives of Razi Institute* 2018,73(2), 121-129.

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

Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Gadre JJ. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 2000, 53, 1053-1061.

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

Ak K. Evcil hayvanlarda reproduksiyon ve suni tohumlama. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını. Ders Notu* no:133, 2002, 197.

Amini S, Masoumi R, Rostami B, Shahir MH, Taghilou P, Arslan HO. Effects of supplementation of Tris-egg yolk extender with royal jelly on chilled and frozen-thawed ram semen characteristics. *Cryobiology* 2019, 88, 75-80.

Andrews JC, Nolan JP, Hammerstedt RH, Bavister BD. Role of zinc during hamster sperm capacitation. *Biology of Reproduction* 1994, 51, 1238-1247.

Arangasamy A, Krishnaiah MV, Manohar N, Selvaraju S, Rani GP, Soren NM, Ravindra JP. Cryoprotective role of organic Zn and Cu supplementation in goats (*Capra hircus*) diet. *Cryobiology* 2018, 81, 117–124.

Baccetti P, Pallini V, Burrini AG. The accessory fibers of the sperm tail. *Journal Of Ultrastructure Research* 1976, 54, 261-275.

Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PTK. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005, 129, 505-514.

Barney GH, Orgebin-Crist MC, Macapinlac MP. Genesis of esophageal parakeratosis and histologic changes in the testes of the zinc-deficient rat and their reversal by zinc repletion. *The Journal of Nutrition* 1968, 95(4), 526-534.

Barth AD, Bowman PA. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. *The Canadian Veterinary Journal* 1994, 35, 93–102.

Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology* 2000, 21(6), 895-902.

Bedford JM, Calvin HI. Changes in -S-S- linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observations in sub-mammalian species. *Journal of Experimental Zoology* 1974, 187, 181–204.

Bentley PJ, Grubb BR. Effects of a zinc-deficient diet on tissue zinc concentrations in rabbits. *Journal Animal of Science* 1991, 69, 4876-4882.

Bettger WJ, O'Dell BL. A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sciences* 1981, 28, 1425–1438.

Björndahl L, Kjellberg S, Roomans GM, Kvist U. The human sperm nucleus takes up zinc at ejaculation. *International Journal of Andrology* 1986, 9, 77–80.

Björndahl L, Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Molecular Human Reproduction* 2010, 16(1), 23–29.

Björndahl L, Kvist U. A model for the importance of zinc in the dynamics of human sperm chromatin stabilization after ejaculation in relation to sperm DNA vulnerability. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 2011, 57, 86–92.

Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine* 1990, 8, 281–291.

Buijs RM, Van Eden CG, Goncharuk VD, Kalsbeek A. The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *Journal of Endocrinology* 2003, 177, 17–26.

Burgoon PW, Boulant JA. Temperature-sensitive properties of rat suprachiasmatic nucleus neurons. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology* 2001, 281, R706–R715.

Cameron RDA. Semen collection and evaluation in the ram the effect of method of stimulation on response to electroejaculation. *Australian Veterinary Journal* 1977, 53, 380–383.

Chaudhary JM, Murthy KS, Patil SS, Savsani HH, Garg DD, Marandi S, Solanki GB, Boradiya PC. Effect of organic zinc supplementation on growth performance and sexual behaviour and semen quality in gir bulls. *International Journal of Science, Environment and Technology* 2017, 6(5), 3079–3094.

Chia SE, Ong CN, Chua LH, Ho LM, Tay SK. Comparison of zinc concentration in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *Journal of Andrology* 2000, 21, 53–57.

Dobson H, Smith RF. What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science* 2000, 60–61, 743–752.

Early RJ, McBride BW, Vatnick I, Bell AW. Chronic heat stress and prenatal development in sheep: II. Placental cellularity and metabolism. *Journal of Animal Science* 1991, 69, 3610–3616.

Ebisch IMW, Van Heerde WL, Thomos CMG, Vander Put, N., Wong WY, Steegers Theunissen RPM. C677T methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms interfere with effect of folic acid and zinc sulphate on sperm concentration. *Fertility and Sterility* 2003, 80(5), 1190–1194.

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

El-Darawany AA. Tunica dartos thermoregulatory index in bull and ram in Egypt. *Indian Journal of Animal Science* 1999, 69, 560–563.

Elmaz Ö, Cirit Ü, Demir H. Relationship of testicular development with age, body weight, semen characteristics and testosterone in Kivircik ram lambs. *South African Journal of Animal Science* 2007, 37 (4), 269-274.

Fidancı UR. Yurdumuz Hayvanlarında İz Element Noksanlıkları. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi* 1986, 56 (1), 37-44.

Filho DW, Torres MA, Bordin A, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Molecular Aspects of Medicine* 2004, 25, 199–210.

Fiser PS, Fairful RW, Marcus GJ. The effect of thawing velocity on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa frozen at optimal and suboptimal rates in straws. *Cryobiology* 1986, 23, 141-149.

Gabr AA, El Basuini MF. Effect of tonophosphan, zinc oxide, and ascorbic acid on semen, sexual desire, and the fertility rate of Egyptian buffalo bulls. *Annals of Agricultural Sciences* 2018, 63, 215–221.

Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE. Fluorometric Assessments of Mitochondrial Function and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1997, 57(6), 1401–1406.

Giachi G, Pallecchi P, Romualdi A, Ribechini E, Lucejko JJ, Colombini MP, Mariotti Lippi M. Ingredients of a 2,000-y-old medicine revealed by chemical, mineralogical, and botanical investigations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013, 110(4), 1193–1196.

Hancock JL. The morphology of bull spermatozoa. *The Journal of Experimental Biology* 1952, 29, 445-453.

Hoffmann N, Oldenhof H, Morandini C, Rohn K, Sieme H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified “good” or “poor” for freezing. *Animal Reproduction Science* 2011, 125, 112–118.

Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000, 53, 47-58.

Isaac AV, Kumari S, Nair R, Urs DR, Salian SR, Kalthur G, Adiga SK, Manikkath J, Mutalik S, Sachdev D, Pasricha R. Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2017, 494(3-4), 656–662.

Iwasaki, A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility* 1992, 57, 409–416.

Jannes P, Spiessens C, Van der Auwera I, D’Hooghe T, Verhoeven G, Vanderschueren D. Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice. *Human Reproduction* 1998, 13, 372–375.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 1984, 70, 219- 228.

Johnson L, Wikström S, Nylander G. The vehicle for zinc in the prostatic secretion of dogs. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 1969, 3, 9–11.

Kafi M, Safdarian M, Hashemi M. Seasonal variation in semen charecteristic, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. *Small Ruminant Research* 2004, 53, 133-139.

Karagiannidis A, Varsakeli S, Alexopoulos C, Amarantidis I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Ruminant Research* 2000, 37, 125-130.

Kendall NR, McMullan S, Green A, Rodway RG. Effect of zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. *Animal Reproduction Science* 2000, 62, 277–283.

Kerns K, Zigo M, Sutovsky P. Zinc: A necessary ion for mammalian sperm fertilization competency. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, 19, 4097.

Kumar N, Verma RP, Singh LP, Varshney VP, Dass RS. Effect of different levels and sources of zinc supplementation on quantitative and qualitative semen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (*Bos indicus* X *Bos taurus*) bulls. *Reproduction Nutrition Development* 2006, 46, 663-675.

Lee SR. Critical role of zinc as either an antioxidant or a prooxidant in cellular systems. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018, 1–11.

Levaot N, Hershinkel M. How cellular Zn² signaling drives physiological functions. *Cell Calcium* 2018, 75, 53-63.

Liu-Sheng H, Xiao-Shan Y, De-Chang W. Age-dependent variation of zinc-65 metabolism in LACA mice. *International Journal of Radiation Biology* 1991, 60(6), 907-916.

Llobet JM, Domingo JL, Colomina MT, Mayayo E, Corbella J. Subchronic oral toxicity of zinc in rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1988, 41, 36-43.

Loeb J. On some non-specific factors for the entrance of the spermatozoon into the egg. *Science* 1914, 40(1026), 316–318.

Lovell MA. A potential role for alterations of zinc and zinc transport proteins in the progression of alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 2009, 16(3), 471–483.

Marai IFM, El-Darawany AA, Fadiel A, Abdel-Hafez MAM. Physiological traits as affected by heat stress in sheep-A review. *Small Ruminant Research* 2007, 71,1-12.

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

Martin GB, White CL, Markey CM, Blackberry MA. Effect of dietary zinc deficiency on the reproductive system of young male sheep: testicular growth and the secretion of inhibin and testosterone. *Journal of Reproduction and Fertility* 1994, 101, 87–96.

Massányi P, Toman R, Trandžik J, Nad P, Skalická M, Koréneková N. Concentration of copper, zinc, iron, cadmium, lead and nickel in bull, ram, boar, stallion and fox semen. *Trace Elements and Electrolytes* 2004, 21, 45–49.

Maxwell WMC, Salamon S. Liquid Storage of Ram Semen: a Review. *Reproduction Fertility and Development* 1993, 5, 613-638.

Mocé E, Purdy PH, Graham JK. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science* 2010, 118, 236–247.

Mogielnicka-Brzozowska M, Strzeżek R, Wasilewska K, Kordan W. Prostatomes of canine seminal plasma - zinc-binding ability and effects on motility characteristics and plasma membrane integrity of spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* 2015, 50, 484–491.

Mogielnicka-Brzozowska M, Wysocki P, Strzeżek J, Kordan W. Zinc-binding proteins from boar seminal plasma isolation, biochemical characteristics and influence on spermatozoa stored at 4°C. *Acta Biochimica Polonica* 2011, 58(2), 171-177.

Mohan H, Verma J, Singh I, Mohan P, Marwah S, Singh P. Inter-relationship of zinc levels in serum and semen in oligospermic infertile patients and fertile males. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 1997, 40(4), 451–455.

Muiño-Blanco, T, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez J. Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. *Reproduction in Domestic Animals* 2008, 43, 18–31.

Narasimhaiah M, Arunachalam A, Sellappan S, Mayasula V, Guvvala P, Ghosh S, Kumar H. Organic zinc and copper supplementation on antioxidant protective mechanism and their correlation with sperm functional characteristics in goats. *Reproduction in Domestic Animals* 2018, 53, 644–654.

Naseer Z, Ahmad E, Şahiner HS, Epikmen ET, Fiaz M, Yousuf MR, Aksoy M. Dietary quercetin maintains the semen quality in rabbits under summer heat stress. *Theriogenology* 2018, 122, 88-93.

National Research Council. Nutrient requirements of sheep (6th ed), National Academy Press, Washington DC, 1985, 20.

Nichi M, Bols PEJ, Züge RM, Barnabe VH, Goovaerts IGF, Barnabe RC, Cortada CNM. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology* 2006, 66, 822–828.

Oliveira CEA, Badu CA, Ferreira WM, Kamwa EB, Lana AMQ. Effects of dietary zinc supplementation on spermatic characteristics of rabbit breeders. Proceedings of 8th World Rabbit Congress, September 7-10, 2004, Puebla, Mexico, 315-321.

Ollero M, Perez-Pe R, Muiño-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Improvement of Ram Sperm Cryopreservation Protocols Assessed by Sperm Quality Parameters and Heterogeneity Analysis. *Cryobiology* 1998, 37, 1–12.

Oteiza PL, Olin KL, Fraga CG, Keen CL. Oxidant defense systems in testes from Zn deficient rats. *Experimental Biology and Medicine* 1996, 213, 85–91.

Öztürkler Y, Ak K, İleri İK. Koç spermasının yoğun gliserollü sulandırıcılarda dondurulması. *İstanbul Üniveristesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1999, 25(2), 399-414.

Page CM, Van Emon M L, Murphy TW, Larson CK, Berardinelli JG, McGregor IR, Stewart WC. Effects of zinc source and dietary concentration on serum zinc concentrations, growth performance, wool and reproductive characteristics in developing rams. *Animal* 2019, 1–9.

Pando MP, Sassone-Corsi P. Signaling to the mammalian circadian clocks: in pursuit of the primary mammalian circadian photoreceptor. *Science Signaling* 2001, 107, RE16.

Pasqualotto FF, Sharma RK, Kobayashi H, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *Journal of Andrology* 2001, 22(2), 316–322.

Pontbriand D, Howard JG, Schiewe MC, Stuart LD, Wildt DE. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 1989, 26, 341-354.

Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 1975, 258, 598–599.

Prakash A, Bharti K, Majeed ABA. Zinc: indications in brain disorders. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2015, 29, 131–149.

Prasad AS. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2009, 12, 646-652.

Riffo M, Leiva S, Astudillo J. Effect of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction, *International Journal of Andrology* 1992, 15, 229–237.

Rosa HJD, Bryant MJ. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research* 2003, 48, 155–171.

Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *Journal of Andrology* 1997, 18(3), 294–301.

Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen. I. Processing freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science* 1995, 37, 185–249.

Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 2000, 62, 77-111.

Santiago-Moreno J, Coloma MA, Dorado J, Pulido-Pastor A, Gómez-Guillamon F, Salas-Vega R, Gómez-Brunet A, López-Sebastián A. Cryopreservation of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm obtained by electroejaculation outside the rutting season. *Theriogenology* 2009, 71, 1253-1260.

Sarıözkan S, Türk G, Cantürk F, Yay A , Eken A , Akcay A. The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. *Cryobiology* 2013, 67, 1-6.

Schanbacher BD, Gomes WR, VanDemark NL. Developmental Changes in Spermatogenesis, Testicular Carnitine Acetyltransferase Activity and Serum Testosterone in the Ram. *Journal of Animal Science* 1974, 39(5), 889–892.

Shahin MA, Khalil WA, Saadeldin IM, Swelum AA, El-Harairy M. Comparison between the effects of adding vitamins, trace elements, and nanoparticles to shotor extender on the cryopreservation of dromedary camel epididymal spermatozoa. *Animals* 2020, 10, 78.

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

Smith OB, Akinbamizo OO. Micronutrients and reproduction in farm animals. *Animal Reproduction Science* 2000, 60-61, 549–560.

Soleilhavoup C, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Kohnke PL, Dacheux, JL, Guerin Y, Gatti JL, Graff SP, Druart X. Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. *Journal of Proteomics* 2014, 109, 245–260.

Steyn JJ. Application of Artificial Insemination (AI) on commercial sheep and goat production." *Proceeding Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte 2*, 2003, 367-379.

Suttle NF. Mineral Nutrition of Livestock (4th ed), MPG Books Group, London, 2010, 429-430.

Suzuki T, Nakajima K, Yamamoto A, Yamanaka H. Metallothionein binding zinc inhibits nuclear chromatin decondensation of human spermatozoa. *Andrologia* 1995, 27, 161–164.

Şahin K, Küçük Ö. Zinc supplementation alleviates heat stress in laying Japanese quail. *The Journal of Nutrition* 2003, 133, 2808-2811.

Şahin K, Şahin N, Küçük O, Hayırlı A, Prasad AS. Role of dietary zinc in heat-stressed poultry: a review. *Poultry Science* 2009, 88, 2176-2183.

Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of Reproduction* 2000, 5, 105–113.

Trounson AO. Cryopreservation. *British Medical Bulletin* 1990, 46(3), 695-708.

Uçan U, Küçük N, Ahmad E, Naseer Z, Aksoy M, Serin, İ, Ceylan A. 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* 2016, 136, 243-246.

Uribe P, Villegas JV, Boguen R, Treulen F, Sánchez R, Mallmann P, Isachenko V, Rahimi G, Isachenko E. Use of the fluorescent dye tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate for mitochondrial membrane potential assessment in human spermatozoa. *Andrologia* 2017, E12753.

Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews* 1993, 73(1), 79–118.

Wastney ME, Aamodt RL, Rumble WF, Henkin RI. Kinetic analysis of zinc metabolism and its regulation in normal humans. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 1986, 251(2), R398–R408.

Wong WY, Merkus HMW, Thomas CMG, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RPM. Effect of folic acid and zinc sulphate on male factor sub fertility, a double blind, randomized placed controlled trial. *Fertility and Sterility* 2002, 77(3), 491–498.

Wroblewski N, Schill WB, Henkel R. Metal chelators change the human sperms motility pattern. *Fertility and Sterility* 2003,79(3), 1584–1589.

Yadav RP, Kotaja N. Small RNAs in spermatogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2014, 382,498-508.

Yanagimachi R, Usui N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Experimental Cell Research* 1974, 89, 161–174.

Yeni D. Koçlarda Bazı Androlojik Parametrelerin ve Biyokimyasal Özelliklerin Mevsimle İlişkisi, Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon, 2010, 99.

Zini A, Abitbol J, Girardi SK, Schulsinger D, Goldstein M, Schlegel PN. Germ cell apoptosis and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression following ischemia-reperfusion injury to testis. *Archives of Andrology* 1998, 41, 57–65.

EKLER

Ek 1



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



Aydın, 25 Ağustos 2016

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2016 Yılı VII. Oturumu
Sayı : 64583101/2016/154
Proje Başlığı : Koçlarda çinko kullanımının sıcak stresine ve spermanın dondurulabilirliği üzerine etkisi
Proje Yürütücüsü : Ahmet CEYLAN
Proje Ekibi : Uğur UÇAN

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:

İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

Hayvan Çalışması : İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN
Başkan

Prof. Dr. Turhan DOST
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Işıl SÖNMEZ
Üye

Prof. Dr. Deniz ÇOBAN
Üye

Prof. Dr. Yücel KOCA
Üye

(Yıllık İzinli)
Yrd. Doç. Dr. Evrim DERELİ FIDAN
Üye

Vet. Hek. Serdar AKTAŞ
Üye

(Toplantıya Katılmadı)
Vet. Hek. Atıla M. UÇMAKLIOĞLU
Üye

(İzinli)
Yurdagül ALTINBAŞ
Üye

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

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : UÇAN Uğur
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi: İzmir 02.01.1988
Telefon : 0256 247 07 00/6239
E-mail : ugun.uan@adu.edu.tr
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	2014
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	2011

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2016-Devam Ediyor	Aydın Adnan Menders Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

1.MAKALELER

Ceylan A, Aksoy M, Serin İ, Küçük N, Uçan U, Ahmed E, Naseer Z. Farklı Antioksidanlarla Kısa Süreli Saklanılan Kıvrıcık Koç Spermalarının In Vitro ve In Vivo Değerlendirilmesi. Animal Health, Production and Hygiene 2013, 2(2) , 216 – 220.

Ahmad E, Aksoy M, Serin İ, Küçük N, Ceylan A, Uçan U. Cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment of ram spermatozoa protects structural integrity of plasma membrane during osmotic challenge and reduces their ability to undergo acrosome reaction in vitro. Small Ruminant Research 2013,11(1-3),77-81.

Küçük N, Aksoy M, Uçan U, Ahmad E, Naseer Z, Ceylan A, Serin İ. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. *Cryobiology* 2014,68(3),327-331.

Ahmad E, Naseer Z, Aksoy M, Küçük N, Uçan U, Serin İ, Ceylan A. Trehalose enhances osmotic tolerance and suppresses lysophosphatidylcholine-induced acrosome reaction in ram spermatozoon. *Andrologia* 2015,47(7),786-792.

Uçan U, Küçük N, Ahmad E, Naseer Z, Aksoy M, Serin İ, Ceylan A. 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* 2016,136, 243-246.

Naseer Z, Ahmad E, Epikmen ET, Uçan U, Boyacıoğlu M, İpek E, Aksoy M. Quercetin supplemented diet improves follicular development, oocyte quality, and reduces ovarian apoptosis in rabbits during summer heat stress. *Theriogenology* 2017, 96, 136-141.

Ahmad E, Naseer Z, Uçan U, Serin İ, Ceylan A, Aksoy M. Seasonal variations in sperm acrosome reaction, osmotic tolerance and serum testosterone concentrations in rams. *Animal Reproduction Science* 2018, 198, 112-120.

Raza S, Uçan U, Aksoy M, Erdoğan G, Ceylan A, Serin I. 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* 2019, 90, 1-7.

Sevim Ö, Tatlı O, Kuter E, Karimiyan E, Kaya M, Karaarslan S, Uçan U, Köksal BH, Cengiz Ö, Önel AG. Nano selenyumun damızlık bıldırcınlarda verim, yumurta ve sperm kalitesi ile kuluçka parametreleri üzerine etkileri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2019, 8(1), 33-37.

Tatlı O, Sevim Ö, Karaarslan S, Kuter E, Kaya M, Khamseh EK, Uçan U, Köksal BH, Cengiz Ö, Önel AG. Damızlık bıldırcın rasyonlarına katılan nano çinkonun performans, yumurta özellikleri, sperm kalitesi ve kuluçka parametreleri üzerine etkisi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2019, 9(4), 2390-2397.

2.PROJELER

Ceylan A, Uçan U. Fruktoz trehaloz ve sükröz içeren tris bazlı sulandırıcıya kolesterol yüklü siklodekstrin (CLC) ilavesinin koç spermasının dondurulabilirlik ve çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkilerinin araştırılması. ADÜ, BAP VTF-13020.

Ceylan A, Uçan U. Koçlarda çinko kullanımının sıcak stresine ve spermanın dondurulabilirliği üzerine etkisi. ADÜ, BAP VTF-17038.

Aksoy M, Ceylan A, Serin İ, Uçan U. Sericin proteininin spermatozoon membran karakteristikleri üzerine etkilerinin ve cryoprotective etkinliğinin araştırılması ADÜ, BAP VTF-18042.

Aksoy M, Ceylan A, Serin İ, Uçan U (Bursiyer).Tavşanlarda sperma dondurma teknolojisinin geliştirilmesi amacıyla kolesterol yüklenmiş cyclodextrin molekülünün kullanılabilirliğinin araştırılması. Tübitak 112O032 (COST).

3.BİLDİRİLER

A)Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Ahmad E, Naseer Z, Uçan U, Aksoy M, Serin I, Ceylan A. Effect Of Cholesterol-Loaded Cyclodextrin Pretreatment On Freezability Of Rabbit Spermatozoa. 6th American Rabbit Congress in association with annual meeting of Zootecnia Brasil 27 a 30 de agosto de 2018.

B)Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Uçan U, Aksoy M, Serin İ, Küçük N, Ceylan A, Ahmad E,Naseer Z. Trehaloz koç spermatozoonlarında in vitro akrozom reaksiyonunu baskılar. 7.Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi 1-4 Temmuz 2013.

Ceylan A, Aksoy M, Serin İ, Küçük N, Uçan U, Ahmad E,Naseer Z. Farklı antioksidanlarla kısa süreli saklanılan kıvrıkcık koç spermasının in-vitro değerlendirilmesi. 7.Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi 1-4 Temmuz 2013.

Ahmad E, Aksoy M, Serin İ, Küçük N, Ceylan A, Uçan U, Naseer Z. Cholesterol yüklenmiş cyclodextrin molekülü ile muamele edilen koç spermatozoonlarında invitro uyarılmış akrozom reaksiyonunun baskılanması. 7.Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi 1-4 Temmuz 2013.

Küçük N, Aksoy M, Uçan U, Ahmad E, Naseer Z, Ceylan A, Serin İ. Çözüm sonu spermatolojik parametrelere bakılarak teke spermasının dondurulmasında kullanılan iki farklı protokolün karşılaştırılması. 7.Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi 1-4 Temmuz 2013.