



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ANKARA TEKESİ SPERMASI DONDURULMASINDA
POLİVİNİL ALKOLÜN SPERMATOZOA CANLILIĞI
VE FONKSİYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Koray TEKİN

**DÖLERME ve SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali DAŞKIN**

**ANKARA
2017**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANKARA TEKESİ SPERMASI DONDURULMASINDA
POLİVİNİL ALKOLÜN SPERMATOZOA CANLILIĞI
VE FONKSİYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Koray TEKİN

DÖLERME ve SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali DAŞKIN

Bu tez Tübitak-CNR tarafından 213O034 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
2017

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Ankara Tekesi sperması dondurulmasında polivinil alkolün spermatozoa canlılığı ve fonksiyonu üzerine etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak hazırlanmıştır. Tezimin fikir ve hipotezi tümüyle tez danışmanıma ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Koray TEKİN

Tarih: 17.07.2016

İmza:

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	
Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xii
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Spermanın Kriyobiyolojisi	1
1.2. Sperm Kriyobiyolojisinin Tarihi	2
1.2.1. Buz Hasarı	4
1.2.2. Kriyoprotektan Toksisitesi	5
1.2.3. Kriyoprotektanların Ozmotik Etkileri	6
1.2.4. Spermanın Dondurulmasında Kullanılan Sulandırıcılar	6
1.3. Reprodüktif Kriyoprezervasyon Stratejileri	8
1.3.1. Gamet Kriyoprezervasyon Stratejileri	9
1.3.1.1. Spermanın Dondurulması	9
1.3.1.2. Oosit Dondurulması	11
1.3.1.3. Embriyo Dondurulması	13
1.3.2. Reprodüktif Organ Kriyoprezervasyon Stratejileri	13
1.4. Kriyobiyolojiye Yönelik “Tabiattan Ne Öğrenebiliriz?”	14
1.5. Antifriz Protein ve Glikoproteinleri	17
1.5.1. Antifriz Glikoproteinleri	17
1.5.2. Antifriz Proteinleri	19
1.6. Polivinil Alkol	20
1.7. Polivinil Alkolün Kriyoprotektif Etkileri	21
1.7.1. Buz Kristalizasyonun Kinetik İnhibisyonu	21
1.7.2. Termal Histerezis	23
1.7.3. Dinamik Buz Şekillendirme	24
2. GEREÇ ve YÖNTEM	27
2.1. Hayvan Materyali	27
2.2. Hayvanların Bakım ve Beslenmesi	28
2.3. Damızlık Hayvan Seçimi	29
2.3.1. Bütünleştirilmiş Androlojik Muayene Sistematiği	29
2.3.1.1. Fiziksel Muayene	30
2.3.1.2. Üreme Organlarının Görüntülenmesi	32
2.3.1.3. Transrektal Digital Masaj	33
2.3.1.4. Spermanın CASA ile Değerlendirmesi	34
2.3.2. Spermanın Alınması ve Uyum Testi	36
2.4. Sulandırıcı	37
2.4.1. PVA Dozunun Belirlenmesi ve Sitotoksosite	39
2.4.1.1. Metiltiazol Difenil Tetrazolyum Testi	40

2.4.1.2. Sitotoksosite Değerlendirmesi	40
2.4.2. Sulandırıcının Çekirdeklenme ve Donma Noktasının Belirlenmesi	41
2.5. Sperma Dondurulabilirliğinin Belirlenmesi	42
2.6. Spermanın Dondurulması	43
2.7. Taze Spermatolojik Parametreler	45
2.7.1. Motilite	46
2.7.2. Konsantrasyon	46
2.7.3. Canlı Spermatozoa Oranı	47
2.7.4. Anormal Spermatozoa Oranı	47
2.8. Spermanın Çözdürülmesi	47
2.9. Çözüm Sonu Parametrelerin Değerlendirilmesi	48
2.9.1. CASA Motilite ve Kinetik Parametreler	48
2.9.2. Ölü-Canlı Spermatozoa SYBR-PI	50
2.9.3. Akrozom Bütünlüğü FITC/PNA-PI	51
2.9.4. Mitokondriyel Aktivite JC-1	52
2.10. İstatistiksel Değerlendirme	53
3. BULGULAR	54
3.1. PVA Sitotoksitesi ve Nötral Red	54
3.2. Bütünleştirilmiş Androlojik Muayene Sistemi	55
3.2.1. Fiziksel Muayene ve Ölçümler	55
3.2.2. Üreme Organlarının Görüntülenmesi	56
3.2.3. Transrektal Digital Masaj	58
3.3. Çekirdeklenme	59
3.4. Sperma Dondurulabilirliği	60
3.5. Taze Spermatolojik Parametreler	61
3.6. Çözüm Sonrası Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi	64
3.6.1. CASA Motilite ve Progresivite Değerleri	65
3.6.2. CASA Kinetik Parametreler	66
3.6.3. Canlı Spermatozoa Oranı (SYBR-PI)	69
3.6.4. Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi (FITC-PNA)	70
3.6.5. Mitokondriyel Aktivite Oranı (JC-1)	70
4. TARTIŞMA	72
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	88
ÖZET	91
SUMMARY	92
KAYNAKLAR	93
EKLER	108
Ek-1. Etik Kurul Belgesi	108
ÖZGEÇMİŞ	110

ÖNSÖZ

Ankara keçisi ismini 13. yüzyıldan günümüze yetiştiriciliğinin sürdürüldüğü Ankara şehrinden almaktadır. “Mohair” ve “Angora goat” olarak tüm dünyada tiftik üretimiyle tanınan Ankara keçisi “elmas lifi” olarak adlandırılan parlak tiftik üretmektedir. Tiftik kullanılarak üretilen kıyafetler, mükemmel izolasyon özelliğine sahiptir. Tiftik, radyoaktif ışınlar karşı insanı koruma özelliği ile diğer lif türlerinden ayrılmaktadır. İtfaiyecilik, hava ve savunma sanayisinde koruyucu iş elbiselerinde, ve radyasyondan korunmak için astronot kıyafetlerinde tiftik kumaşı kullanılmaktadır. Bu özelliği ile de Ankara keçisinin uzaya giden ilk keçi ırkı olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 1.1. Sultan 2. Mahmud, Ankara Keçisi ile Balta Limanı Antlaşması (1938) Figürü (Kay: erişim adresi: <https://tarihvearkeoloji.blogspot.com.tr/2014/08/ankara-tiftik-kecisi-nasil-british.html>).

Balta limanı antlaşmasına kadar tiftik üretimi sadece Anadolu'da sürdürülmekteyken, bu ırkın Güney Afrikada kurulan çiftliklere götürülmesi ile tiftik üretim tekeli sonlandırılmıştır (Şekil 1.1). Ancak, günümüzde tekstil piyasasında tiftiğin çok az kullanılıyor olması, Ankara keçisi popülasyonunu hızlı bir şekilde azaltmıştır. Ankara keçisi yetiştiriciliği yapan ülkelere baktığımızda; ülkemizin, Güney Afrika ve Amerika Birleşik Devletleri'nin ardından, 207 765 baş hayvan varlığı ile 3. büyük popülasyona sahip olduğu görülmektedir. Burada dikkati çeken, 1960'lı yıllarda 6 milyon baş civarındaki Ankara keçisi sayımızın hızla azalması ve bugünkü seviyeye gerilemesidir (TÜİK, 2016). Ankara keçisi, ülkemizin yerli gen kaynakları içerisinde % 85 oranında azalma ile en çok etkilenen keçi ırkı olmuştur. Bu yüzden Ankara keçisi; Tarım, Gıda ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından 2005 yılında koruma altına alınmıştır.

Hayvan genetik kaynakları 2 temel yöntem ile (*in-situ* ve *ex-situ*) koruma altına alınmaktadır. *In situ* yöntem hayvanları bulundukları ortamda canlı olarak korumaktır. *Ex-situ* yöntem ise; hayvanları bulundukları ortam dışında bir hayvanat bahçesinde ya da bir çiftlikte canlı olarak bulundurmak veya bu hayvanların gamet, embriyo, hücre ya da DNA'larını dondurarak koruma altına almaktır (TURKHAYGEN, 2008). Bu koruma yöntemleri modern biyoteknolojilerin (Kriyoprezervasyon, ICSI, IVF vb.) kullanımı ile daha etkin hale getirilmektedir. Kriyoprezervasyon ile çok geniş kapsamlı ve bol miktarda örneğin uzun süreli saklanarak korunması sağlanabilmektedir. Spermanın soğukta saklanması ile sadece popülasyondaki dişi materyal kullanılarak, o popülasyonu geriye çevirme ve takibinde suni tohumlama çalışması ile genetik açıdan yeniden başlangıçtaki durumuna yakın hale getirmek mümkün olabilmektedir. Bu yüzden, Ankara keçisinde dondurulmuş spermanın güncel pratik kullanım alanları yaratılmalı ve ırk spesifik kriyoprezervasyon stratejileri geliştirilmelidir.

Bu araştırma, "Ankara Keçileri Temelinde Keçi İşletmelerinde Yönetim Sisteminin Yardımcı Üreme Teknikleri ile Bütünleştirilmiş bir Modelinin Geliştirilmesi" isimli 213O034 numaralı TUBITAK-CNR (İtalya Ulusal Araştırma Merkezi) projesi ile desteklenmiştir.

Öncelikle, doktora öğrenimim, tez çalışmam ve yaşamımda bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ali DAŞKIN'a ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Prof. Dr. Ergun AKÇAY, Prof. Dr. Calogero STELLETTA, Doç. Dr. Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU, Doç. Dr. Begüm Yurdakök DİKMEN ve Araş. Gör. Beste ÇİL'e, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nın tüm akademik ve idari personeline; Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne bağlı Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü (Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi) personeline; doktora çalışmamda yardımcı olan Vet. Hek. Derya ŞAHİN, Vet. Hek. İlktan BAŞTAN, Vet. Hek. Ömer Onur PARILDAR, Vet. Hek. Mustafa BARAN, Biyolog. Pınar ARSLAN, Araş. Gör. Dr. Doğukan ÖZEN'e, akademik hayata adım atmamda yol gösterici bir rol üstlenen, hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu dönemde de bana her zaman destek olan aileme ve gölgesini her zaman üzerimde hissettiğim babam Fetullah TEKİN'e şükranlarımı sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Degree Celsius (Santigrat Derece)
~	: Yaklaşık
O	: Oxygen (Oksijen)
AFGP	: Anti Friz Gliko Proteinleri
AFP	: Anti Friz Proteinleri
ALH	: Lateral Head Displacement
ATP	: Adenosine Triphosphate (Adenozin Trifosfat)
BAMS	: Bütünleştirilmiş Androlojik Muayene Sistematığı
BB	: Bulbouretral Bez
BCF	: Beat Cross Frequency (Çapraz Geçiş Frekans Ritmi)
BKİ	: Buz Kristalizasyon İnhibisyonu
Ca	: Calcium (Kalsiyum)
cAMP	: Cyclic Adenosine Monophosphat (Siklik Adenozin Monofosfat)
CASA	: Computer Aided Sperm Analyser (Bilgisayar Destekli Sperm Analiz Cihazı)
CCD	: Charge Coupled Device
CEP	: Cauda Epididimis
cm	: Centimetre (Santimetre)
DBŞ	: Dinamik Buz Şekillendirme
DMP	: Düşük Membran Potansiyeli
DMSO	: Dimethyl sulfoxide (Dimetil sülfoksit)
DNA	: Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
DOP	: Doppler
EE	: Elektroejerkülatör

FITC-PNA	: Flurescein Isothiocyanate Conjugated Peanut Agglutinin (Floresan izosiyanata bağlı Agglutinin)
g/kg	: Gram/Kilogram
g/mol	: Gram/Moleköl
GDN	: Gecikmeli Donma Noktası
GnRH	: Gonadotropin-Releasing Hormone (Gonadotropin Salgılatıcı Hormon)
gr	: Gram
H	: Hidrojen
H ₂ O	: Di Hidrojen Monooksit (Su)
H _d KKA	: Hücre dışı Kriyo Koruyucu Ajan
HDN	: Hızlı Donma Noktası
H _i KKA	: Hücre içi Kriyo Koruyucu Ajan
Hz	: Hertz
İ	: İyi
ICSI	: Intra-Cytoplasmic Sperm Injection (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu)
kcal/kg	: Kilokalori/Kilogram
kg	: Kilogram
KKA	: Kriyokoruyucu Ajan
LIN	: Linearity (Çizgisellik)
lt	: Litre
ME	: Metabolik Enerji
Me ₂ SO	: Dimethyl Sulfoxide
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MS	: Microsoft
MTT	: Microculture Tetrazolium
Mw	: Moleküler Ağırlık
Nab	: Nükleik Asit Boyası
NaCl	: Sodium Chloride (Sodyum Klörür)

NADH/ NADPH	: Nicotinamide Adenine dinucleotide (Nikotinamid Adenin Din�kleotit)/ Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase (Nikotinamid Adenin Din�kleotit Fosfat-Oksidaz)
NDF	: Neutral Detergent Fiber
OH	: Hidroksil
OD	: Optical Density (Optik Yoğunluk)
PBS	: Phosphate Buffer Saline (Fosfat Buffer Salin)
PEG	: Polyethylene Glycol (Polietilen Glikol)
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojen Basıncı)
PI	: Propidium Iodide (Propidyum İyodid)
PGY	: Piksek Gri Yoğunluğu
PİS	: Piksel Intensity Skor
Prog. Motilite	: Progresive Motility (Progresif Motilite)
PVA	: Polivinil Alkol
Ş	: Şüpheli
SÇ	: Skrotal �evre
SCA	: Sperm Class Analyser
SEM	: Standart Error Mean
Sn	: Saniye
STR	: Straightness (Doğruluk)
SV	: Suni Vajina
$S_{\bar{x}}$	: Standart Sapma
TDM	: Transrektal Digital Masaj
TDİ	: Testiküler Dejenerasyon İndeksi
TH	: Termal Histerezis
TMR	: Total Mix Ratio
TTP	: Testis Parankimi
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
TUS	: Testiküler Ultrason Skoru
US	: Ultrasonografisi

USS	: Ultrason Skor
VAP	: Velocity Average Path (ortalama yörünge hızı)
VCL	: Velocity Curve Linear (Eğrisel Hız)
VK	: Vasküler Kord
VKS	: Vücut Kondüsyon Skoru
VS	: Vezikula Seminalis
VSL	: Velocity Straight Line (Doğrusal hız)
WOB	: Wobble (Sallanmak)
$\bar{X}$	: Aritmetik Ortalama
Y	: Yetersiz
YMP	: Yüksek Membran Potansiyeli
μ/s	: Micron/Second (Mikron/saniye)
μl	: Microlitre (Mikrolitre)
μm	: Mikrometre
$\mu m/s$	: Mikrometre/Saniye

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Sultan 2. Mahmud, Ankara Keçisi ile Balta Limanı Antlaşması (1938) Figürü	v
Şekil 1.2. Vitrifikasyon T_g Sıcaklık Grafiği	12
Şekil 1.3. Protein Bazlı Olmayan Düşük Moleküler Ağırlıklı Kriyoprotektanlar	16
Şekil 1.4. Tipik bir AF(G)P'nin Yapısal Gösterimi	18
Şekil 1.5. Farklı Moleküler Ağırlık ve Tipteki Antifriz Proteinlerinin 3 Boyutlu Modelleri	19
Şekil 1.6. "Sıçrama" BKİ Ölçümlerinden Alınan Örnek Mikrograflar	22
Şekil 1.7. Adsorpsiyonu Nedeniyle Prizm Yüzlerinde Büyümenin Engellenmesi ile Altıgen Bipirramidal Buz Kristallerinin Oluşumu	24
Şekil 1.8. Dinamik Buz Şekillendirme (DIS) ve Buz Kristalizasyon İnhibisyonu (IRI) Aktivitesini Gösteren Fotoğraflar	24
Şekil 1.9. DBŞ'in Mekanizmaları ve Sonuçları	25
Şekil 2.1. Çalışmada Kullanılan Ankara Keçileri	27
Şekil 2.2. Hayvanların Genel Fiziksel Muayeneleri ve Ölçümler	31
Şekil 2.3. BAMS Ait Genel ve Reprodüktif Muayene Formu	31
Şekil 2.4. Testiküler Yapıların B-mode ve Renkli Doppler Ultrason Görüntüsü	32
Şekil 2.5. Transrektal Dijital Masaj ile Sperma Alımı ve Ampulla Üzerinde Gösterimi	33
Şekil 2.6. Spermanın İvos Sistemi ile Değerlendirilmesi	35
Şekil 2.7. Suni Vajen ile Sperma Alma	37
Şekil 2.8. Sulandırıcıların Laminar Kabinde Hazırlanması	38
Şekil 2.9. MTT için Örneklerin Hazırlanması.	40
Şekil 2.10. Çekirdeklenmenin Görüntülenmesi	41
Şekil 2.11. Payetlerin Basılması ve Sterilizasyonu	43
Şekil 2.12. Spermanın Sulandırılması ve Yoğunluğunun Belirlenmesi	44
Şekil 2.13. Spermanın Payetlenmesi ve Kapatılması	44
Şekil 2.14. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması	45
Şekil 2.15. Sperma Motilitesinin Belirlenmesi Faz Kontrast Mikroskop ile Belirlenmesi	46
Şekil 2.16. Sperma Konsantasyonunun ile Belirlenmesi	46
Şekil 2.17. Spermanın Çözdürülmesi	47
Şekil 2.18. Çözüm Sonu Spermatolojik Parametrelerin Belirlenmesinde Kullanılan Spectra Max i3 ve SCA Microptics	48

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Kullanılan Yem Rasyonunun Bileşim ve Kompozisyonu	28
Çizelge 2.2. Suni Vajen Uyum Testi	36
Çizelge 2.3. Sulandırıcı Grupları	39
Çizelge 3.1. PVA Dozları için MTT Test IC 50 Değerleri	54
Çizelge 3.2. PVA Dozları için Nötral Red Testi Değerleri	54
Çizelge 3.3. Fiziksel Muayene Değerleri	56
Çizelge 3.4. Testiküler US Ölçümleri ve Skor Çizelgesi	56
Çizelge 3.5. Eklenti Bezleri US Ölçümleri ve Skor Çizelgesi	57
Çizelge 3.6. Toplam Skor Çizelgesi	57
Çizelge 3.7. Transrektal Dijital Masaj ile Alınan Örneklerle Ait Spermatolojik Özellikler	58
Çizelge 3.8. Azalan Gliserol Konsantrasyonlarında Çekirdeklenme, Latent Isı ve Toplam Donma Süre Şeması	59
Çizelge 3.9. Spermanın Taze (T) ve Çözüm (Ç) Sonrasında IVOS parametreleri	60
Çizelge 3.10. Suni Vajen Uyum Parametrelerinin Ortalamaları	61
Çizelge 3.11. Taze Spermatolojik Özellikler	62
Çizelge 3.12. Suni Vajen Uyum Testi ve Gruplara Göre Taze Spermatolojik Marjinal Dağılım	63
Çizelge 3.13. Seksüel deaktivitenin spermatolojik parametreler etkisi	64
Çizelge 3.14. SCA ile Analiz Edilen Örneklerle Ait Çözüm Sonu Motilite Sonuçları	65
Çizelge 3.15. SCA ile Analiz Edilen Örneklerle Ait Çözüm Sonu Progresivite Sonuçları	66
Çizelge 3.16. Kinetik Parametre Ortalamalarının Gruplara ve Farklı Dozlara Göre Marjinal Dağılımları	66
Çizelge 3.17. Alt Gruplara Ait Dozların Çözüm Sonu Kinetik Parametre Ortalamaları	68
Çizelge 3.18. Dozlardan Bağımsız Olarak PVA Grupları Arası Motilite ve Kinetik Parametre Ortalamalarının ($X \pm Sx$) Karşılaştırılması	69
Çizelge 3.19. Çözüm Sonu Gruplara Göre Canlı Spermatozoa Değerleri	69
Çizelge 3.20. Gruplar Arası Çözüm Sonu İntakt Akrozom Değerleri	70
Çizelge 3.21. Gruplar Arası Çözüm Sonu Mitokondriyel Aktivasyon Değerleri	71

1. GiRiŞ

1.1. Spermanın Kriyobiyojisi

Sperm hücrelerinin dondurularak yaşam biyokimyasını uzun süreler saklayıp, daha sonra hayata geri döndürme, "geçici olarak durdurulmuş reanimasyon", spermanın kriyobiyojisi olarak tanımlanmaktadır. Bu olgunun benzer şekilleri doğada nadiren görülse de, donma eylemi canlı hücreler için genelde öldürücüdür. Çok düşük sıcaklıkların hücrelerdeki etkilerini anlamak için, birçok yapının ve işlemin sıcaklık ve suya bağımlı olduğunu ve bunun sonucunda donma eyleminin normal fizyolojiden çok uzak olan koşulları üreten olağanüstü karmaşık etkilere sahip olduğunu bilmeliyiz.

Hücreler 0 °C'nin altındaki sıcaklıklara soğutulduğunda, biyolojik etki tipik olarak doku kütlelerini oluşturan suyun % 80'inin donması şeklindedir. Donma, sıvı formda olan suyun kristalleşerek buza dönüşmesidir. 1948 yılına dek, pek çok türde hayvan hücresinin dondurulmasında, yapının ve fonksiyonun restorasyonuna izin veren genel bir yöntem bulunmuyordu. Ancak Polge, Smith ve Parkes tarafından 1949'da, % 10-20 gliserolün kriyoprotektan olarak kullanımının, sperm dondurmada etkili olduğunun anlaşılmasıyla, kriyobiyojide bir dönüm noktası yaşanmıştır.

Spermanın kriyobiyojisi alanında yukarıda bahsi geçen keşiften sonra elde edilen relatif başarı, genetik olarak üstün hayvanların gamet hücrelerine uluslararası düzeyde ulaşımı mümkün kılmıştır. Biyoteknoloji alanında, bilimsel açıdan önem taşıyan türlerin etkili bir şekilde artışı; nesli tükenmekte olan türlerin korunmasını ve yetiştiricilikte sığır reproduktif hekimliğinin belirgin düzeyde ilerlemesini sağlamıştır. Ancak spermanın suni tohumlamada rutin kullanım için ilk dondurulduğu 1950'li yıllardan beri, dondurma (Chapsky ve Rubinsky, 1997 ve Fowler ve Toner,

2005) ve çözdrme hızları (Curry ve ark., 1994 ve Petrunkina, 2007), kriyoprotektan konsantrasyonlarının optimize edilmesi (Fowler ve Toner, 2005; Mazur, 1966 ve Lovelock, 1959), buz kristalizasyonu (Budke ve Koop, 2006; Ewart ve ark., 1999; Fahy ve ark., 2004a,b ve Mazur, 1970) konularında birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan bu araştırmalara rağmen, güncel kriyoprezervasyon teknikleri, son 40 yılda çok az ilerleme kaydederek, hala dondurma-zdrme işlemleri sırasında canlı spermatozoanın % 50'sine yakınının kaybıyla sonuçlanmaktadır (Auriemma ve ark., 2006). Bu yüzden, spermanın dondurulmasında kullanılan geçmiş yöntemlerin tarihsel olarak gözden geçirilmesi, mevcut yöntemlerin geliştirebilmesi konusundaki farkındalığı artıracaktır.

1.2. Sperma Kriyobiyolojisinin Tarihi

Polge, Smith ve Parkes tarafından 1948 yılında, gliserolün horoz spermasının -70 ° C'ye dondurulmasında kazara kullanımı, günümüz "kriyobiyoloji" tekniklerin başlangıcı olmuştur. Bu keşfin nasıl yapıldığı konusundaki bilgiler farklılık gösterse de, buzdolabında bulunan bir şişe çözeltinin etiketlenmesindeki bir hata ile horoz spermasının, istenilen levamizol çözeltisi yerine; gliserol, albümin ve su karışımı içinde dondurulduğu düşüncesi ağır basmaktadır. Sperma dondurmada levamizol çözeltisi etkisiz olsa da, gliserol çözeltisi oldukça başarılı olmuştur. İlk başlarda araştırmacılar görünüşteki bu mucizevi çözeltinin bileşiminden habersizlerdi. Ancak analitik bir kimyager yardımıyla çözeltinin gerçek kimliğinin ortaya konulması ve daha sonra gerçekleştirilen birkaç deney sayesinde gliserolün etken madde olduğu grlmştir. şans eseri ortaya çıkan bu keşif, "şans, hazırlıklı olandan yanadır!" diyen Hans Krebs'in söylemini hatırlatmaktadır. Gerçekten de, Tıbbi Araştırma Konseyi Mill Hill Enstitüsünde, zellikle Audrey Smith tarafından gerçekleştirilen ileriki gelişmeler ve genç meslektaşların başarıları bu yeni bilim alanın yaratıcısı olmuştur. Bu temel gözlemi açıklayan makalenin başlığının "Düşük Sıcaklıklardaki Vitrifikasyon ve Dehidrasyon Sonrası Spermilerin Canlandırılması" olması ilginçtir; çünkü bu deneylerde günümüzde bu terimle ifade edilen şekilde bir vitrifikasyon

gerçekleştirilmemiştir. Bu yöntem, günümüzde "klasik dondurma" yaklaşımı olarak adlandırılmaktadır (Pegg, 2002).

Sonraki araştırmaların çoğu ve belki de tüm kriyoprezervasyon çalışmalarının en pratik etkisinin; reproduksiyon tıbbi, hayvan yetiştiriciliği ve şimdilerde ise nesli tükenmekte olan türlerin korunması alanlarında olduğunu belirtmek gereklidir. Audrey Smith'in (1961) tarif ettiği gibi boğa spermelerini dondurmak için gliserol tekniğinin uygulanması, sığır yetiştiriciliği endüstrisinde devrim yaratacaktır.

“Çiftçiler (artık) istedikleri spermayı gerekli olduğunda mevcut olmayan boğalar arasından seçebilirler. Değerli sperma artık boşa gitmeyecek ve üstün verimli boğalardan elde edilen spermalar, yavruları olgunlaşıp süt verimi ve diğer nitelikler test edilene kadar birkaç yıl saklanabilecekler. Metodun bir başka potansiyel avantajı da, ayak ve ağız hastalığı gibi pandemik enfeksiyonlar sırasında daha fazla bulaşma tehlikesi kalmayana kadar, önceden toplanan bir sperma bankasının bulunacak olmasıdır. Sperma bankaları, bir ülkede üretim için kullanılan boğa sayısı bakımından ekonomiye katkı sağlayabilecekler. Buna ek olarak, dünya genelinde hayvanların genetik olarak iyileştirilmesi için dondurulmuş spermelerin uluslararası ticaretinin de yaygınlaşması ihtimali ortaya çıkacaktır”

İlk büyük gelişmenin ardından klasik dondurma yöntemindeki mekanizmalara, gliserol gibi kriyoprotektan bir bileşiğin eklenmesi ve canlılığı etkileyen diğer çeşitli etkenlerin belirlenmesi, araştırmacıları ampirik olarak optimizasyona doğru yöneltmiştir (Pegg, 2002). Bu pratik başarılar, içerdikleri bir dizi mekanizmanın ortaya çıkarıldığı; toplam buz miktarı kristalizasyonu (Ewart ve ark., 1999; Fahy ve ark., 2004a,b ve Mazur, 1970), buz kristallerinin hücrelere ilişkin konumu (Budke ve Koop, 2006), kriyoprotektanların toksisitesi (Lovelock, 1959), toksisitenin bağlı olduğu sıcaklık (Petrunkina, 2007) ve ozmotik olarak ortaya çıkan hacim değişikliklerinin büyüklüğünün belirlenmesi (Ağca ve ark, 1998 ve Mazur, 1966) gibi daha temel çalışmaları stimüle etmiştir.

1.2.1. Buz Hasarı

Seyreltik bir solüsyon dondurulduğunda oluşan buz, esas olarak saf su kristalidir. Aslında buz, çözünenleri çözmek için önemli bir kabiliyete sahiptir. Çözücüler bu nedenle sıcaklık düşüşüyle beraber buzla kimyasal olarak dengelenirler. Donma sırasında artan konsantrasyona bağlı olarak azalan sıvının hacminde yoğunlaşırlar. Böylece, sulu bir çözeltinin donma noktası baskılanır. Buz varlığının dengede kalması, var olan süspansiyonun donma sıcaklığı ile belirlenir ve bu nedenle başlangıç kompozisyonundan bağımsızdır. Dolayısıyla, izotonik serumun dondurulması sırasında oluşan sodyum klorür (NaCl) konsantrasyonundaki artışın -21°C 'de 32 kat fazla olduğunu anlamak önemlidir (Lovelock, 1982).

Bu durumda soru şu şekilde ortaya çıkmaktadır: Dondurma sırasında hücrelere buz mu, yoksa artan yüksek tuz konsantrasyonu mu, veya her ikisi de mi, zarar vermektedir? Mill Hill'de Polge, Smith ve Parkes'ın bir meslektaşları olan Jim Lovelock tarafından, 1960'ların başında bu soruya oldukça kesin bir cevap verilmiştir. Lovelock, NaCl çözeltileri ile farklı sıcaklıklarda dondurulmuş olan insan eritrositlerinin hemoliz derecesinin, dondurularak üretilen tuz konsantrasyonuna etkisinin nicel olarak hesaplanabileceğini göstermiştir.

Lovelock, gliserol ve diğer toksik olmayan kriyoprotektanlarda donma esnasında meydana gelen tuz konsantrasyonundaki artışın, ozmotik basıncı değiştirerek donma sırasında "tuz hasarı" ile zarar verme teorisini ortaya koymuştur. Buna ek olarak; gliserol ilavesinin, tuz konsantrasyonunun donma üzerindeki etkisine benzer şekilde, yüksek konsantrasyonlarda tuz ile aynı toksik etkiye sahip olduğunu bildirmiştir (Lovelock, 1959).

Buzun, normalde yüksek düzeyde koruma sağlaması beklenen kriyoprotektan konsantrasyonlarının varlığında bile, bir dizi mekanizma aracılığı ile dokulara aşırı derecede zarar verdiği sonucuna ulaşılmıştır. Dolayısıyla, bu tür sistemlerin etkili bir şekilde kriyoprezervasyonuna giden yol, buzsuz soğutma veya vitrifikasyondan geçmektedir. Sıvılar için vitrifikasyon terimi; suyun herhangi bir kristalizasyonu

olmaksızın, dolayısıyla buzun tamamen yokluğunda, sadece viskozite artışı aracılığıyla, akışkan formdan katı forma dönüştürülmesi olarak tanımlanabilir. Bu noktada önemli olan, vitrifikasyon için kullanılan kriyoprotektan konsantrasyonlarının, konvansiyonel dondurmaya oranla çok daha fazla olmasıdır. Bu yüzden iki faktör daha iyi değerlendirilmelidir: Bunlar, katkı maddelerinin kimyasal toksisitesi ve bunların eklenmesi ve çıkarılmasının ozmotik sonuçları olarak sıralanabilmektedir.

1.2.2. Kriyoprotektan Toksisitesi

Kriyoprotektanlar yüksek konsantrasyonlara kadar tolere edilebilirler. Gliserol, bu anlamda, hücrelere NaCl'den çok daha az zararlıdır, ancak yeterince yüksek konsantrasyonda, herhangi bir bileşik bile "toksik" olacaktır. Bu durumun iki önemli sonucu vardır: Dokunun dondurulmadan önce tolere edebileceği en yüksek konsantrasyon sınırlıdır ve dondurma esnasında konsantrasyon, buz kristalleştikçe artacaktır. Dondurma işleminin tersine vitrifikasyonda ise başlangıç konsantrasyonunun çok daha yüksek olmasına ihtiyaç duyulmakta ancak soğutma esnasında konsantrasyon artışı meydana gelmemekte çünkü donma olmamaktadır (Lovelock, 1959).

Her iki teknikte de; dondurma işleminde tuz konsantrasyonunun düşürülmesi için ve vitrifikasyonda dondurmadan vitröz hale ulaştırmak için en yüksek tolere edilebilir konsantrasyon aranmaktadır. Pratikte, canlılık bozulmadan elde edilebilecek maksimum konsantrasyonun, kriyoprotektan ekleme ve çıkarma sıcaklığına ve hızına bağlı olduğu belirlenmiştir. Sıcaklığa bağlı değişim, kısmen kimyasal toksisiteye (sıcaklık düşüşü ile azalan) ve kısmen de ozmotik etkilere (sıcaklık düşüşü ile artan) bağlıdır. Bu yüzden sperma ve embriyolar kademeli olarak soğutulup, farklı hızlarda dondurulmaktadır (Pegg, 2002).

1.2.3. Kriyoprotektanların Ozmotik Etkileri

En etkili kriyoprotektanlar hücre membranlarını geçebilen, ancak bunu sudan daha yavaş bir şekilde yapan bileşiklerdir. Ne var ki bu durum bileşiklerin eklenmesi veya çıkarılması sırasında bazı ozmotik dengesizliklerin kaçınılmaz olduğu anlamına gelmektedir. Yoğun ozmotik şok, hücre ölümüne neden olan hücre hasarına yol açmakta ve bu nedenle kabul edilebilir sınırların aşılması gerekmektedir. Bu nedenle, kriyoprezervasyon yöntemlerini tasarlamada önemli bir basamak da, hücre membranlarını geçemeyen bir kriyoprotektanın dış ozmolaritesindeki değişimlere olan hacim yanıtını ölçmek ve her hacmi sonraki yapısal ve işlevsel zararlarla ilişkilendirmektir (Mazur, 1966). Bir sonraki adım, seçilen kriyoprotektan için suyun ve kriyoprotektan geçirgenliğinin ölçülmesi veya ölçülememesi durumunda ise tahmin edilmesidir. Hücre içine nüfuz eden çözünenlerin ilavesi ve uzaklaştırılması sırasında hacim kontrolü için iki yöntem bulunmaktadır: İlki, konsantrasyonu birkaç küçük adımda değiştirmek; diğer yaklaşım ise, hücrelere nüfuz etmeyen ve dolayısıyla kriyoprotektan konsantrasyonu düştükçe su girişini kısıtlayarak "ozmotik tamponlar" olarak işlev gören sulandırıcı bileşenleri kullanmaktır (Fahy ve ark., 2004a,b).

1.2.4. Spermanın Dondurulmasında Kullanılan Sulandırıcılar

Spermatozoayı soğuk şokundan korumak için spermaya bir kriyoprotektan ilavesi gerekmektedir. Bu amaçla, çeşitli sulandırıcı bileşenleri (şekerler, elektrolitler, tamponlar, yumurta sarısı, süt ve ürünleri) içeren farklı sulandırıcılar önerilmiş ve sperma dondurulmada kullanılmıştır (Kulaksız ve ark., 2011; Kulaksız ve ark., 2014 ve Tırpan ve Tekin, 2015). Süt ve süt bazlı sulandırıcılar, çeşitli türlerin spermatozoasını korumada pratik ve etkili olarak bilinmektedir (Batellier ve ark., 1997 ve Tekin ve Daşkın, 2016 ve Varner ve ark., 1989). Spermatozoon membranlarının bileşim ve dinamiklerine dayanarak, kriyoprezervasyona bağlı sperm hasarlarını azaltmak amacıyla yağ asitleri ve lipitler (İnanç ve ark., 2017), antioksidanlar (Uysal ve Bucak, 2007), farklı türlerin yumurta sarıları (Kulaksız ve ark., 2010) ve proteinler gibi bazı maddeler spermaya eklenmiştir (Akçay ve ark., 2012 ve Tekin ve ark., 2006). Gliserol

ve yumurta sarısı, spermanın dondurulmasında ilk kullanılan kriyoprotektanlardandır (Garner ve ark., 1994; Holt, 2000 ve Medeiros ve ark., 2002). Halen günümüzde pek çok sulandırıcıda temel kriyoprotektan olarak gliserol kullanılmaktadır. Gliserol nispeten yüksek bir konsantrasyonda kullanılmaktadır; bu da yüksek sıcaklıklarda spermatozoanın canlılığı için zararlı olabilmekte; bu nedenle iki kademedeki, sperma soğutulduktan sonra ilave edilmektedir (Purdy, 2006). Zararlı etkiler; ozmotik stres, membran organizasyonundaki değişiklikler, akışkanlık ve permeabiliteye ek olarak lipid kompozisyonundaki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, bir kriyoprotektan olarak gliserolün yararlı etkilerini en üst düzeye çıkararak, toksik etkilerini en aza indirmek için; gliserol konsantrasyonuna ve gliserolün dondurmadan önce spermatozoa ile temasta bulunduğu süreye ilişkin bir uzlaşmaya varılmalıdır. Bir çalışmada, % 20 yumurta sarısı içeren bir sulandırıcıya % 4 oranında gliserol ilavesinin progresif motilite açısından % 2 veya % 6'lık gliserol ilavesine göre daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir (Cochran ve ark., 1984). Buna ek olarak, gliserolün etkinliği, eklendiği sulandırıcıların yanı sıra depolama yöntemiyle de değişebilmektedir.

Disakkaritler ve lipozomlar dahil birçok başka maddenin de kriyoprotektan niteliği ispat edilmiştir. Örneğin, trehalozun spermatozoon plazma membranı üzerinde stabilize edici bir etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Steinmann, 1996 ve Büyükleblebici ve ark., 2016). Bu disakkaritler, spermatozoanın motilitesini tetikleyen mekanizmanın ihtiyaç duyduğu fruktoz, inositol ve sorbitol gibi başlıca enerji kaynakları olup eklenti bezlerinden (seminal plazma) sentezlenmektedir. Boğa, koç ve teke spermasının aksine, bazı türlerde (örn. aygır) sulandırıcıya metabolik aktivite ve spermatozoa hareketinin temel enerji kaynağı olarak glikoz eklenmektedir (Katila, 2001). Sulandırıcılarda kullanılan disakkarit içeriği de türler arasında farklılık göstermektedir. Bu yüzden disakkarit seçiminde tür spesifik stratejiler kullanılmaktadır.

1.3. Reprodüktif Kriyoprezervasyon Stratejileri

Kriyoprezervasyon stratejileri, reproduktif organ ve dokulardan; spermatozoa, oosit ve embriyo dondurulmasına kadar geniş bir şekilde kategorize edilebilmektedir. Geliştirilen bu stratejiler, hücre biyolojileri arasındaki geniş farklılıktan dolayı önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. Örneğin, reproduktif doku ve organlar aktif hareket kabiliyetine sahip değildirler. Ayrıca, reproduktif doku ve organ dondurulması sırasında yüksek hacimlerde kriyoprotektan gerekirken, reproduktif biyoteknolojide ise ihtiyaç duyulan kriyoprotektan miktarı (spermatozoa için) ve dondurulan hücre sayısı (öz. embriyo için) oldukça düşüktür (Fuller and Paynter, 2004). Biyolojik hücre ve dokuların çeşitliliği nedeniyle, çoğu araştırmacı bu stratejileri diğer hücre tiplerine uygulayarak başarılı bir dondurma protokolü elde etmek için kullanmıştır.

Günümüze kadar sıklıkla kullanılan kriyoprezervasyon protokolleri, kriyoprezervasyon işlemine bol miktarda esneklik sağlayan kriyokoruyucu ajanların (KKA) molar konsantrasyonlarının kullanımına bağlanmıştır (Mazur, 1984). Ancak bu KKA'lar eklenme ve uzaklaştırılmaları sırasında hücreler üzerinde ciddi ozmotik etkilere neden olabilmekte ve gerekli KKA konsantrasyonu arttıkça oluşabilecek hasar riski de artmaktadır. Çoğu hücre membranı, su ve KKA'lara geçirgen oldukları için her ikisinin birlikte geçişi şekillenmektedir. Kriyoprezervasyon işlemleri sırasında ikili geçişin dinamiği, hücre hacmini ve hücre içi konsantrasyonları kontrol etmektedir. Hücrede, hacim değişimine bağlı olarak plazma membran genişlemesi ve hatta rupturu gibi mekanik yollarla, membran hasarı gerçekleşerek hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Bu durum, kısmen hücrelerin yüksek ozmohassasiyetine bağlıdır (Si ve ark., 2006). Dolayısıyla, şekerler gibi hücre zarını geçemeyen çözünenler de hücrenin aşırı şişmesini önlemek için çözüm-sonu KKA uzaklaştırılması sırasında eklenebilmektedir (Aboagla ve Terada, 2004). İkili geçiş, soğutma ve dondurma sırasında hücre içi KKA konsantrasyonunu belirlemektedir (Varışlı ve ark., 2013 ve Ağca ve ark., 1998). Hücre içi KKA konsantrasyonu, donma sırasında yeterli düzeyde değilse, bir başka deyişle “kritik konsantrasyon” henüz oluşmamışsa, hücrelere zarar verebilecek buz kristalleri oluşmaktadır. Kritik konsantrasyona ulaşıldıysa, daldırma aşamasında karşılaşılan hücre içi solüsyonun vitrifiye olması beklenmektedir (Woods ve ark., 2004).

Reproduktif kriyoprezervasyon stratejileri, memeli türlerinin korunmasında artan bir öneme sahiptir. Reprodüktif hücreler tampon özellikte ve kriyoprotektan içeren sulandırıcılar yardımıyla; yavaş (konvansiyonel) dondurma, hızlı dondurma, süper soğutma, vitrifikasyon ve liyofilizasyon gibi yöntemlerle dondurulmaktadır. Yukarıda sıralan her bir yöntemden yüksek verimin alınabilmesi için önemli ölçüde hücre tipi ve tür spesifik optimizasyon gerekmektedir.

1.3.1. Gamet Kriyoprezervasyon Stratejileri

1.3.1.1. Spermanın Dondurulması

Reproduktif kriyobioloji, en hızlı ilerlemeyi boğa spermasının dondurulmasında sağlamıştır. Temel olarak kullanılan 2 tip dondurma stratejisi bulunmaktadır. Bunlardan ilki konvansiyonel (yavaş dondurma), ikincisi ise hızlı dondurma tekniğidir. Bu türün spermatozoası için en başarılı kriyoprezervasyon yöntemleri ilk olarak yavaş soğutma hızı (örn. 1-5 ° C/dk) ile vücut sıcaklığından oda sıcaklığına ve sonrasında donma sıcaklığına ve takiben ilk buz oluşumu ile hızlı dondurmaya (örn. 10-20 ° C/dk) alınmasıdır. Yavaş dondurma tekniği, 2-4 saatlik bir periyotta, iki veya üç kademe ile spermanın -196 ° C'ye düşürülmesi yöntemidir; elle veya otomatik olarak yarı-programlanabilir dondurucu kullanılarak yapılmaktadır. Manuel yöntemde, sperma önce oda sıcaklığına (25 ° C); daha sonra 2-4 saat içerisinde 4 ° C'ye düşürülmektedir. 4 ° C'ye kadar en iyi soğuma hızının 0.5-1 ° C/dk olduğu bildirilmektedir. Örnekler daha sonra 4 ° C'den, -80 ° C'ye 1-10 ° C/dk hızında dondurulur; sonrasında -196 ° C'de sıvı azot tankına aktarılır (Di Santo ve ark., 2012).

Hızlı dondurma metodu ilk kez Sherman (1963) tarafından geliştirilmiştir. Bu teknik, payetlerin ve sıvı azot buharı ile 8-10 dakika doğrudan teması ve sonrasında -196 ° C'de sıvı nitrojen içerisine indirilmesini kapsamaktadır. Programlanabilir dondurucuda; sıvı azot buharını, sıvı azotun hacmini ve mesafesini ayarlayan fonksiyonel bir termal derece bulunmaktadır. Sperma örneği en az 2 saat ekilibrasyon

sonrasında payetler yardımıyla paketlenir ve 10 dakika boyunca 4 ° C'de inkübasyona bırakılır. Payetler daha sonra 15 dakika süreyle sıvı azot seviyesinden (-80 ° C) 15-20 cm uzaklığa yerleştirilir; bu aşamadan sonra payetler sıvı nitrojene indirilir. Soğutma sırasında, iki uç arasındaki sıcaklık farkını en aza indirmek için payetler yatay konumda tutulur (Tongdee ve ark, 2015). En uygun soğutma hızı; boğada 76 ve 140 ° C/dk, domuzda 30 ° C/dk, farede 27 ila 130 ° C/dk arasında ve insanda 10 ° C/dk olarak belirlenmiştir (Varışlı ve ark., 2013).

Boğalarda dondurulmuş sperma ile suni tohumlama ve takibinde elde edilen başarı oranları, çoğunlukla, yeterli düzeydedir. Bu nedenle, bazı istisnalar dışında, kriyoprezervasyon işlemini takiben canlı kalma oranını belirleyen temel kriyobiyolojik özellikler gözardı edilmiştir. Düşük motilite ve canlılık kaybı, ejakulat hacmi ve sperm konsantrasyonlarının normal olduğu durumlarda önemsiz sayılabilmekte; ancak bir hastalık, idiyopatik veya iatrojenik komplikasyonlar nedeniyle oligozoospermik olan değerli hayvanlar için bu kayıplar büyük önem taşıyabilmektedir.

Bu iki temel tekniğin dışında liyofilizasyon (Krokida ve ark., 1998) ve vitrifikasyon da (Isachenko ve ark., 2002) spermatozoa dondurmada (Isachenko ve ark., 2011) kullanılmaktadır. Günümüzde vitrifikasyon ve liyofilizasyon yönteminin pratik kullanımı yavaş veya hızlı dondurmaya göre düşüktür. Ancak vitrifiye edilmiş sperma ile IVF/ICSI ve intrauterin tohumlama gerçekleştirilerek gebeliklerin elde edilmesi, bu metodun pratik kullanımına dikkat çekmektedir. Bununla birlikte, bazı sperma merkezlerinin vitrifikasyon ile uzun süreli sperma saklanabildiğini rapor etmesi ve uygulama pratikliği sayesinde birkaç yıl içerisinde bu yöntemin kullanımının yaygınlaşması beklenmektedir (Moce ve ark., 2016).

Sperm kriyoprezervasyon yöntemlerini geliştirmek için, bu işlem sırasında spermin geçirdiği fiziksel değişiklikleri göz önünde bulundurmak fayda sağlayacaktır. Çünkü bu fiziksel değişiklikleri düzenlemek için yapılan ilerlemeler, canlılık oranlarını belirgin ölçüde artıracaktır (Holt, 2000). Pratik olarak, sperma kriyoprezervasyon için generalize “standart” protokol istenen bir şeydir. Ancak,

güncel sperm kriyoprezervasyon protokollerinin sınırlıdır ve başarı oranları türler arasında ve hatta aynı tür içindeki bireyler arasında dahi değişkenlik göstermektedir (Hammerstedt ve ark., 1990). Domuz gibi bazı türlerde uygun yöntemler daha tam olarak geliştirilmemiş iken, fare gibi diğer türlerde yeterli görülen yöntemler aynı türün diğer ırklarında bile işe yaramamaktadır. Bu sonuçlar; uygun kriyoprezervasyon protokollerinin belirlenmesi için, tür spesifik bir şekilde sperm kriyo-hasarının incelenmesinin yanı sıra spermanın ve kullanılan sulandırıcıların temel kriyobiyolojik özelliklerinin de incelenmesi gerektiğini göstermektedir (Woods ve ark., 2004).

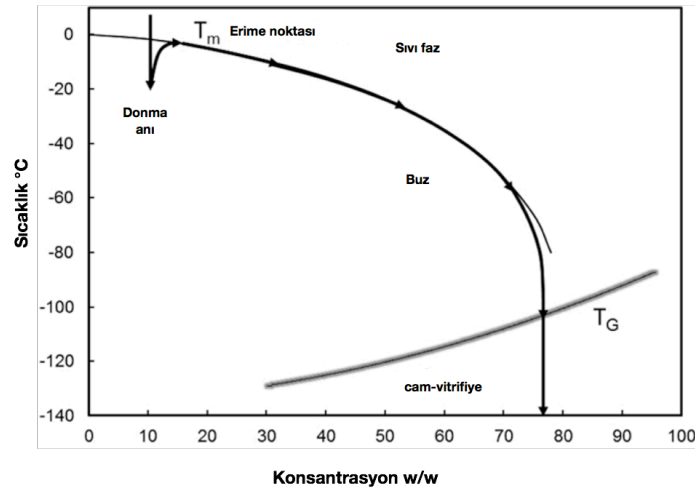
1.3.1.2. Oosit Dondurulması

Dişi gamet hücresi olan oositlerinin kriyoprezervasyonunda önemli problemler ile karşılaşilmektedir. Bunlar; oositlerin bireysel olarak depolanan geniş hücreler olması, suya karşı düşük membran geçirgenliğine sahip olması ve bu durumdan kaynaklanan hücre içi buz kristalleri oluşumu (yüksek su retensiyonu nedeniyle) ve çözündürme sırasında buz kristallerinin membran içerisinde büyümesidir (Seki ve Mazur, 2008). Oosit kriyoprezervasyon yöntemi 40 yıl öncesinde farelerde (Tervit ve ark., 1972) ve bunu takiben tavşanda (Chang, 1959), inekte (Brackett ve ark., 1980), kısırakta (Squires ve Cook, 1996), ve insanlarda (Chen, 1986) uzun süredir kullanılmasına rağmen, yukarıda bahsi geçen bu problemler kriyoprezerve oositlerden elde edilen canlı doğum oranlarını %5 ile 23 arası gibi çok düşük düzeyde gerçekleştirilmiştir (Gallia ve ark., 2014).

Memeli oositlerinin saklanması için iki farklı yaklaşım kullanılmaktadır. Yavaş dondurma stratejisinde oositler (2°C /dakika) yüksek konsantrasyonda propan -1,2 diol (membran geçebilen) ve süktroz (membran geçemeyen) kullanılarak, (sıcaklık - 150°C 'nin altına kadar soğumadan önce buz çekirdeklenmesini (nükleasyon) sağlamak amacıyla), -7°C 'de 10 dakika bekletilerek dondurulmaktadır. Hızlı çözündürme stratejisi; gerektiğinde kontrollü ve kademeli bir şekilde hem propan-1,2-diöl hem de sonrasında süktrozun uzaklaştırılması ile sağlanmaktadır (Özkavukçu ve Erdemli, 2002).

İkinci teknik ise vitrifikasyondur. Bu metodda hızlı soğutma ile bir vitrifikasyon aşaması elde ederek, dimetil sülfoksit (DMSO) ve poli etilen glikol (PEG) kombinasyonu kullanılmaktadır. Vitrifikasyon, bir sıvının amorf yapıda cam benzeri (buz kristalizasyonu olmadan) katılaştırılmasıdır (Goldstein ve Simha, 1976). Bu cam formuna geçiş sıcaklığı “thermal gap” (T_g) olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.2). T_g sıvı benzeri bir durumdan camsı hale geçişin donma üzerine gerçekleştiği sıcaklıktır. T_g noktası, bir çözeltinin donmamış sıvı bölümü ile erime noktasının cam formuna geçiş sıcaklığına eşit olana kadar konsantre edebildiğinde ulaşılan teorik sıcaklıktır (Fahy ve Wowk, 2015).

Ancak yüksek konsantrasyonlardaki DMSO, fizyolojik sıcaklıklarda (37 ° C) fertilizasyon oranlarını önemli ölçüde düşürmektedir (Boldt, 2011). Chaves ve ark. (2016) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada sığır oositlerinin antifiriz proteinleri (AFP) tip III ile mature edilmesinin, 5. günde blastosist aşamasına ulaşan embriyo sayısını artırdığını ancak sonrasındaki oranlarda bir farklılık yaratmadığını göstermiştir.



Şekil 1.2. Vitrifikasyon T_g Sıcaklık Grafiği (Fahy ve Wowk, 2015).

1.3.1.3. Embriyo Dondurulması

Embriyo kriyoprezervasyonunda, gelişim aşamasına göre (blastosist veya fertilize olmuş (pre-implantasyon) tercih edilen farklı kriyoprezervasyon yöntemleri bulunmaktadır. Yine oosit kriyoprezervasyonundakine benzer şekilde gerçekleştirilen iki yaklaşım da, yavaş dondurma ya da vitrifikasyondur. Yavaş dondurma stratejisinde, embriyonun erken aşamalarında (maksimum 8 hücre) KKA olarak propan-1,2-diol ve süktroz tercih edilmektedir (Bryd, 2002). Embriyonun ileriki gelişim aşamalarında ise propan-1,2-diol yerine gliserol kullanılmaktadır.

Ancak ilk başarılı sığır embriyosu kriyoprezervasyonu ve canlı doğum eldesi, KKA olarak DMSO ve yavaş çözündürme stratejisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tervit ve ark., 1972). DMSO bazlı kriyoprezervasyon, *in vitro* manipülasyonda sağlanan paralel gelişmeler yardımı ile insan dahil birçok türde de tekrarlanmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda birçok farklı katkı maddesi ile vitrifikasyon yaklaşımları da başarı ile uygulanmıştır (Gallia ve ark., 2014).

1.3.2. Reprodüktif Organ Kriyoprezervasyon Stratejileri

Günümüzde, testiküler dokuların kriyoprezervasyonuna yönelik araştırmalar artmaktadır. Testiküler doku DMSO kullanılarak kademeli yavaş dondurma ile saklanmaktadır (Baert ve ark., 2013). Ancak bu teknik fertilitenin korunabilmesi için deneysel bir strateji olarak kalmıştır (Geens ve ark., 2008). Mekanik ekstraksiyon veya enzimatik sindirim gibi yöntemler ile gelişmiş aşamadaki (örn. spermatidler, spermatozoa) germ hücrelerinden testiküler doku başarılı bir şekilde kriyoprezerve edilebilmektedir. Ayrıca bu hücreleri *in vivo* maturasyon yardımıyla devamlılığı sağlanarak daha erken evrelerinde (örn. spermatogonia) toplamak da mümkün olmaktadır (Woods ve ark., 2004). Gerçekten de, dondurulmuş-çözdürülmüş testiküler dokudan gelişmiş aşamalardaki erkek germ hücrelerinin (örn. spermatid, spermatozoa) alınması, ICSI gibi yardımcı üreme teknikleriyle fertilitenin geri kazandırılmasında yararlı olmuştur (Gallia ve ark., 2014). Bu yaklaşımlar seksüel olarak olgun insanlarda fertilitenin geri kazandırılmasında başarıyla kullanılmış ve kriyoprezerve testiküler

biyopsilerden alınan olgun spermatozoa kullanılarak canlı doğumlar gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Woods ve ark., 2004).

Erkek germ hücresinin aksine, primordiyal folikül; primer, sekonder ve tersiyer aşamalara ilerledikçe; oosit boyut olarak büyümekte (80-120 µm) ve böylece bol miktarda su toplamaktadır. Dahası, kortikal granüller ve metafaz iplikçikleri gibi daha hassas altyapısal elemanlar da oosit olgunlaştıkça oluşmaktadır. Bu nedenle, bu ileri aşamalardaki dişi germ hücreleri kriyoprezervasyon sırasında soğutma veya iskemik reperfüzyon hasarına bağlı olarak ölümcül hücre içi buz oluşumu ve hücre içi hasar sonucunda ciddi anlamda zarar görmektedir (Woods ve ark., 2004). Tüm bu çalışmalar, günümüzdeki protokollerin kriyoprezerve materyalin rutinde kullanımı için henüz yeterli olmadığını öne sürmekte ve çok çeşitli hücre ihtiva eden dokular açısından daha detaylı araştırmalar yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

1.4. Kriyobiyojolojiye Yönelik “Tabiattan Ne Öğrenebiliriz?”

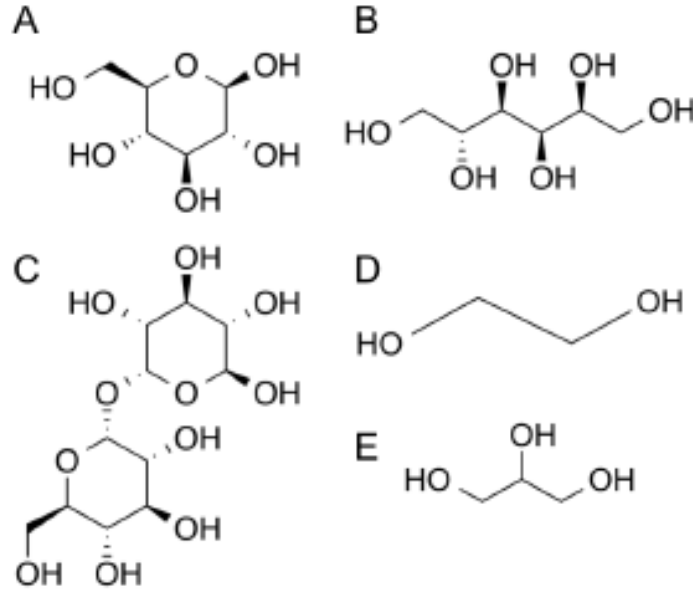
Kriyobiyojolojide buz oluşumu önemli bir role sahiptir. Tarihsel olarak organizmaların dünyadaki yaşanabilir alanlara yerleşmeye başlamasında buzun evrimi oldukça etkili olmuştur. Paleoklimatoloji, buzul çağlarının etkisini ve iklime bağlı yokoluş sürecini başlatmış ve güçlü bir doğal seleksiyon kriteri uygulayarak geride kalan genetik mirası şekillendirmiştir. Bu dramatik değişimlerin temel nedeni ise, canlılığın devamı için organizmaların suya ihtiyaç duyduğu kadar, biyolojik sistemlerde bulunan buz oluşumunun da oldukça yıkıcı etkiye sahip olmasıdır (Olofsson ve Hickler, 2008).

Ekstratermofil organizmaların, olağanüstü çevre koşullarına adaptasyon sağlamak için, moleküler hücre mekanizmaları bulunmaktadır. Bu adaptatif direnç mekanizmalarına rağmen kendi sıcaklıklarını ayarlayamamaktadırlar. Bu nedenle, bu organizmaların hayatta kalmalarına izin veren moleküler mekanizmalar, izolasyon yöntemleri ve manipülasyonları konusunda çok sayıda genomik araştırma

gerçekleştirilmiştir (Dassanayake ve ark., 2011). Ancak bu çalışmalar reproduktif kriyobioloji içerisinde aynı düzeyde yer bulmamıştır.

Ekstratermofillerin aksine, kriyofilik organizmaların moleküler mekanizmaları üzerine nispeten daha sınırlı ilerleme kaydedilmiştir. Özellikle kriyobiyolojide, soğuk iklime adapte olmuş türlerin moleküler mekanizmaları ve adaptasyon stratejileri konusu oldukça ilgi çekmiştir. Çok hücreli organizmalardan antifriz glikoproteinleri (AF(G)P) (Bouvet ve Ben, 2003) ve antifriz proteinlerinin (AFP) (Davies ve ark., 2002) izolasyonu ile kriyobiyolojide yeni bir araştırma alanı açılmıştır. Karada yaşayan organizmalarda, böcekler ve amfibiyenlerde gözlemlenen, protein bazlı olmayan donma stratejileri de araştırma konusu olmuştur (Portner, 2002 ve Rothschild ve Mancinelli, 2001).

Bu stratejiler, AFP ve AF(G)P kullanılarak hem donma önleme hem de dondurma toleransını değiştirme prensibine dayanmaktadır (Kukal ve ark., 1988). Bu adaptatif özellikleri sayesinde organizmalar -60°C kadar düşük sıcaklıklarda dahi hayatta kalabilmektedir (Worland ve ark., 2000). Protein bazlı olmayan stratejiler ise, küçük metabolik değişimler ve çok yüksek konsantrasyonlarda poliyollerden gliserol, sorbitol, glikoz, trehaloz ve etilen glikol yardımıyla donma ve çekirdeklenmenin engellenmesidir (Şekil 1.3) (Duman, 2002). Bu çok yoğun enerjili bir işlemdir ve bu poliyoller kuru ağırlığın % 10'u kadar kısmını oluşturabilmekte ve bu nedenle bu işlem organizmalar tarafından sadece mevsim değişikliklerine göre yılda bir kez yapılmaktadır (Worland ve ark, 1998).



Şekil 1.3. Protein Bazlı Olmayan Düşük Moleküler Ağırlıklı Kriyoprotektanlar (A) Glikoz, (B) Sorbitol, (C) Trehaloz, (D) Etilen Glikol ve (E) Gliserol (Deller, 2013).

Buna ek olarak, bu tür organizmalar sıklıkla metabolik işlevlerini baskı altına alabilmekte (diapause'a uğrarlar) ve geniş oranlarda dehidrasyona maruz kalabilmektedirler. Bu nedenle hücre içerisinde su içeriğinin çözünen konsantrasyonu artmakta ve “hızlı soğutma/supercooling” noktasının düşmesine neden olmaktadır. Ancak bu durum tüm vakalarda gözlenmemiştir (Hugh, 2004). Buzun canlı organizmalarda oluşum hızı çok yavaştır ve bu durum saatler hatta günler süresince meydana gelmektedir. Çoğu buz oluşumu hücre dışıdır, genelde daha zararlı olan geniş hücre içi buz oluşumu bildirilse dahi hücreler tarafından iyi bir şekilde tolere edilebildiği gözlenmiştir (Worland ve ark., 2004). Sonuç olarak bu organizmaların, sıklıkla toplam vücut sıvısının % 65'i oranında bir buz içeriğine sahip oldukları bildirilmiştir (Hugh, 2004).

Ancak en ilgi çekici örnek Tardigirada, “su ayısı” olarak bilinen türdür. Tardigrada’lar suda yaşayan, mikroskopik boyutta bir canlı türüdür. Spallanzani tarafından “yavaş yürüyen” anlamındaki Tardigrada adı verilmiştir. Tardigirada’yı özel kılan birçok özellik tanımlanmıştır. Örneğin, 151°C ile -272°C arasında, atmosferik basıncın 6000 katına (okyanusun en derin çukuru “Mariana Çukuru” atmosferik basıncın sadece 6 katıdır); 10 yıl süresince mutlak kuru ortamda,

uzaydaki radyasyona dahi dayanabilmektedir. Ancak Tardigrada'yı reproduktif kriyobioloji için özel kılan özellik ise çok düşük sıcaklıklara adaptasyon yöntemidir. Bu yöntem "kriyobiyozis" yada "anhidrobiyozis" olarak tanımlanmaktadır. Kriyobioloji için buradaki en belirgin özellik programlı su kaybıdır. Aşırı düşük sıcaklıklarda Tardigrada'lar vücutlarındaki su oranını kriyoprotektan olarak bilinen trehaloz yardımıyla % 85'ten % 3'e kadar azaltmaktadır. Bu şekilde donma sırasında gerçekleşen hücre içi kristalizasyonu engelleyebilmektedir (Wright, 2001). Doğanın adaptasyon için evrimleşerek çeşitli çözümler sunması, klinik olarak çok sayıda potansiyel kullanım alanına ilham vermektedir.

Özellikle düşük konsantrasyonlarda bulunan AFP ve AF(G)P'nin donma mekanizmaları ve hücresel aktivitelerinin tam olarak anlaşılması; hücrelerin, dokuların ve organların kriyoprezervasyonu için geliştirilmiş bazı stratejileri aydınatabilecektir.

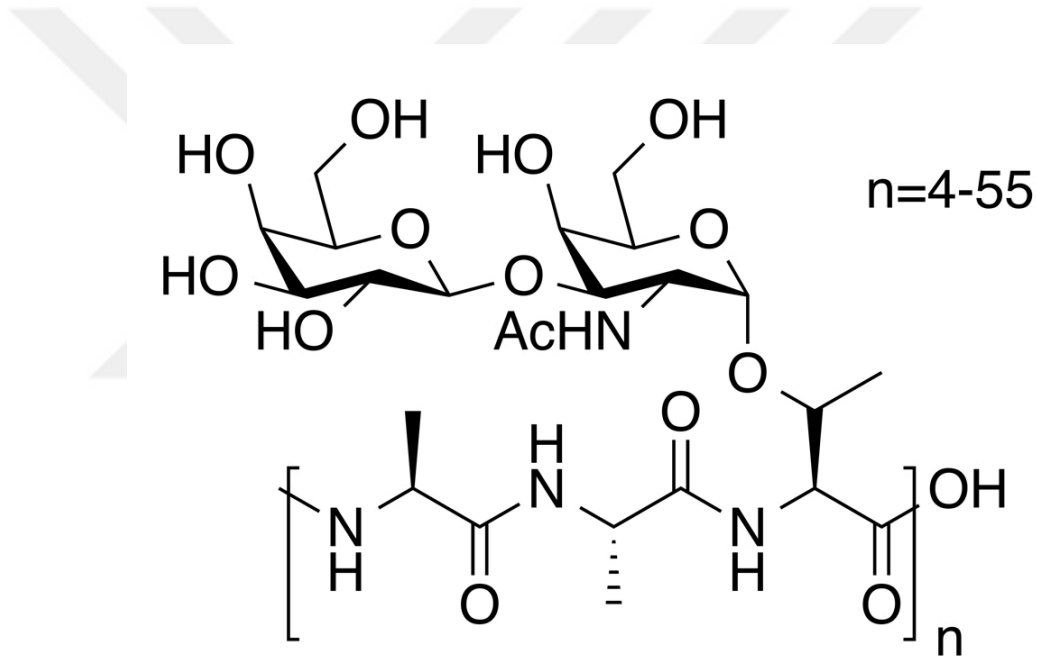
1.5. Antifriz Protein ve Glikoproteinleri (AFP ve AFGP)

1.5.1. Antifriz Glikoproteinleri (AFGP)

Antifriz glikoproteinlerinin keşfi, 40 yıl öncesinde antartik (Carpenter ve Hansen, 1992) ve arktik balık türlerinin sıradışı donma toleransına sahip olmaları ve anormal vücut sıvısı karakteristikleri barındırmalarının bulunmasıyla başlamıştır (Deller, 2013). Bu konuda dönüm noktası, DeVries ve Wohlschlag (1969) tarafından gerçekleştirilen araştırmadan sonra, üç farklı antartik balık türünün kan serumundan izole edilen glikoprotein karışımlarının belirlenmesidir (Osuga ve Feeney, 1978). Bu proteinlerin (Şekil 1.4) donma noktasının baskılanmasında, yaklaşık olarak % 30 oranında sorumlu olduğu ve AF(G)P'nin, bu balık türlerinin -2 ° C'deki deniz suyunda dahi yaşamalarını mümkün kılması ile ortaya çıkarılmıştır (Devries ve ark., 1970). AF(G)P'nin donma noktasının baskılanmasındaki etkileri, çözeltideki parçacıklara göre beklenenin üstünde olmuştur (bağlaışık etki). Bağlaışık etki, "ideal bir çözeltideki donma noktasının baskılanmasının, bu çözeltideki maddenin ve toplam çözeltinin

molaritesine bağlı olması” durumudur (Hammerstedt ve ark., 1990). Bu bağlamda anormal derecede yüksek donma noktası baskılanmasının hesaba katılması için aktif (ör. gliserol, DMSO, süktroz, trehaloz vb.) özellikte bir madde var olmalıdır.

Daha fazla çalışma, farklı moleküler ağırlıklardaki AF(G)P’nin, arktik balıkların kan serumundaki varlığı onaylanmıştır. Bu düşük moleküler ağırlıktaki elementler sayesinde, balıkların vücutlarında bulunan kanı dolaşımda donmadan sirküle edebildiği ortaya çıkarılmıştır. Bu da, doğanın herhangi bir yerinde sıklıkla karşılaşılmayan bu spesifik proteinlerin disakkarit (ör. süktroz, trehaloz vb) yapısının önemini vurgulamaktadır (Harding ve ark., 2003).

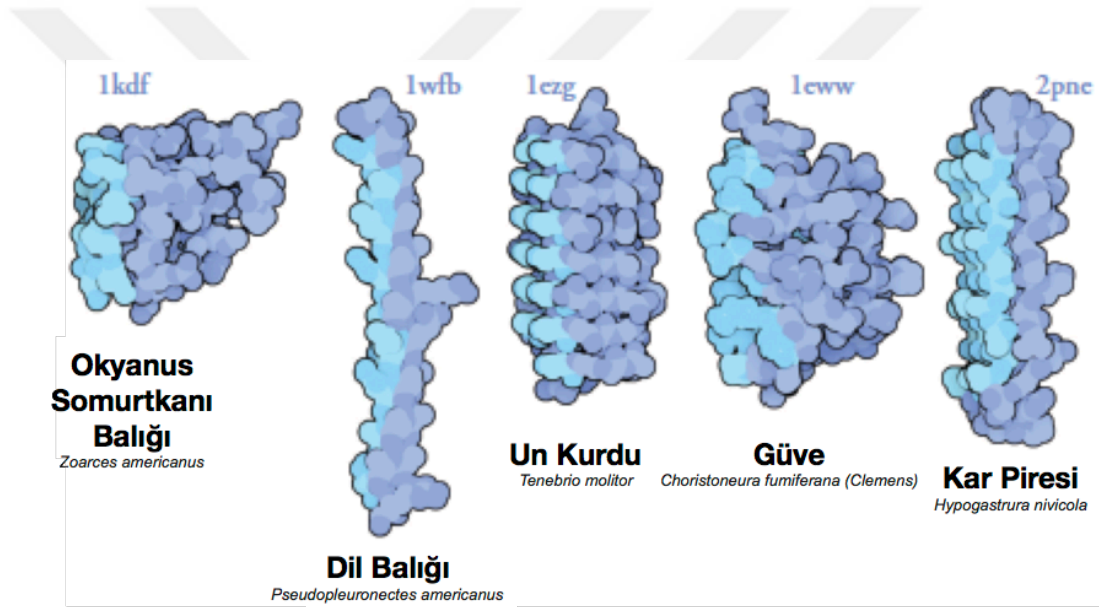


Şekil 1.4. Tipik bir AF(G)P’nin Yapısal Gösterimi (Trant ve ark., 2013).

AF(G)P’nin kutup balık türlerinde bulunmaları, bu türlerin evrimsel kökenlerinin (Gourlie ve ark., 1984) ve tarihteki iklim değişikliklerinin bu olaya nasıl etki ettiğinin (Near ve ark., 2012) araştırılmasına öncülük etmiştir. Günümüzde çok sayıda AF(G)P tanımlanmış ve moleküler ağırlıklarına göre farklı gruplara ayrılmıştır.

1.5.2. Antifriz Proteinleri (AFP)

AF(G)P'nin keşfinden sonra, donma noktası baskılanmasını indüklemeye yeteneğine sahip, benzer özellikteki serum proteinleri, arktik balık türlerinde (Murray ve ark., 2003) keşfedilmiş; ancak herhangi bir karbonhidrat içeriği saptanmamıştır. Bu yüzden keşfedilen proteinlere antifriz proteinleri ismi verilmiştir. Bu noktadan günümüze kadar pek çok AFP (Şekil 1.5); geniş yelpazedeki bir dizi organizmada tanımlanmıştır. AFP birçok balık türünün yanı sıra; böceklerden, (Ewart ve ark., 1999 ve Graether ve ark., 2000), bitkilerden (Bravo ve Griffith, 2005), mantar ve bakterilerden de (Barret, 2001) izole edilmiştir.



Şekil 1.5. Farklı Moleküler Ağırlık ve Tipteki Antifriz Proteinlerinin 3 Boyutlu Modelleri (Goodsell, 2009).

AFP ve AF(G)P'nin uygun bir saflığa ulaştırılıp rafine edilememesi ve numunelerin elde edilmesindeki lojistik problemler nedeniyle kullanımı hep sınırlı kalmıştır. Bununla birlikte günümüzde pek çok grup rekombinant sistemlerden çeşitli AFP'nin ekspresyonunu gerçekleştirebilmektedir (Deluca ve ark., 1996). Bu gelişmelere rağmen, AFP ve AF(G)P'nin kriyoprezervasyonda *in vitro* modellerde sitotoksik etkilere sahip olduklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Liu ve ark., 2007). Daha da önemlisi, AFP ve AF(G)P'nin, biyolojik materyallerin kriyoprezervasyonunu geliştirmek için çeşitli yöntemlerle *in vitro* ve *in vivo* olarak kullanımı başarısız olmuştur (Congdon ve ark., 2013).

1.6. Polivinil Alkol

Şimdiye kadar araştırılan, buz kristalizasyon inhibisyon (BKİ) yeteneği sergileyen bileşiklerin tamamı; peptit veya glikopeptit esaslı moleküllerdir. Bu moleküllerin bazıları kristalizasyon inhibitörü olarak birçok uygulama alanına sahip olsa da en önemli dezavantajı, bu bileşiklerin *in vitro* veya *in vivo* uygulamalar için büyük ölçekli hazırlanmasının zorluğudur. Böylece, küçük moleküllere ve buzla yeniden kristalleşmeyi engelleyebilen sentetik polimerlere ilgi doğmaktadır (Congdon ve ark., 2013). Bu tür bileşikler daha verimli bir şekilde sentezlenebilmektedir. İlk kez, Knight ve ark. (1995) tarafından, sentetik polimerlerin buzla yeniden kristalleşmeyi engelleyebileceğini ilk kez ortaya konulmuştur. Bu çalışmada; poli-L-histidin, poli-hidroksiprolin ve polivinil alkolün (PVA) saf suda 1 mg/mL'den daha düşük konsantrasyonlarda BKİ aktivitesi sergilediği gözlenmiştir. Bu çalışmayı takiben, PVA'nın aktivitesi daha fazla araştırılmış ve çeşitli sentetik polimerler, buzla yeniden kristalleşmeyi engelleme yetenekleri açısından incelenmiştir.

Inada ve Lu (2003) PVA'nın BKİ aktivitesi hakkında kapsamlı moleküler bir çalışma bildirmiştir. Polivinil alkolün aktivitesinin molekül kütlesine bağlı olduğu belirlenmiştir. Yaklaşık 90 000 g/mol ortalama molekül ağırlığına sahip olan polimerlerin, benzer konsantrasyonlarda AFP-I tipine kıyaslanabilir bir aktivite sergilediği görülmüştür. Bununla birlikte, PVA ve AFP'nin molekül ağırlıkları arasındaki büyük farklılık nedeniyle, bu aktiviteyi göstermek için gereken PVA miktarı, AFP'ninkinden önemli derecede yüksek bulunmuştur. Gibson ve ark. (2009), PVA'nın moleküler ağırlık bağımlılığını tekrar incelemiş ve ortalama molekül ağırlığı 11 500 olan PVA'nın 5 mg/mL'lik konsantrasyonda güçlü BKİ aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. Polivinil alkolün buzla yeniden kristalleşmeyi engelleme kabiliyetinin, buz kristali örgüsüyle etkileşime girme yeteneğine bağlı olduğunu öne sürmüştür. PVA'nın dinamik buz şekillendirme (DBŞ) kabiliyetlerini uyardığını ve bunun PVA hidroksil gruplarının buzun prizma düzlemlerinin aralığı ile yakından eşleştiği için sağlandığını belirtmiştir (Budke ve Koop, 2006). Bununla birlikte, Inada ve Lu (2003), PVA'nın, 50 mg/mL'de 0.037 ° C'lik küçük bir Termal Histerezis (TH)

boşluğu sergilediğini göstermiştir ki; bu, buza bir adsorpsiyon¹ meydana geldiğini düşündürmektedir.

1.7. Polivinil Alkolün Kriyoprotektif Etkileri

1.7.1. Buz Kristalizasyonunun Kinetik İnhibisyonu

PVA, AFP ve AF(G)P'nin BKİ olarak adlandırılan bir özelliği bulunmaktadır. Buz kristalizasyon inhibisyonu, çözme sırasında oluşan buz kristallerinin kinetik büyümesini veya olgunlaşmasını engelleme ya da durdurma yeteneğidir. Önemli bir şekilde, donma noktasını veya çekirdeklenme olasılığını (buz kristallerinin oluşumu) değiştirmemektedir (Budke ve Koop, 2006; Capicciotti ve ark., 2013; Deller ve ark., 2014 ve Gibson ve ark., 2009).

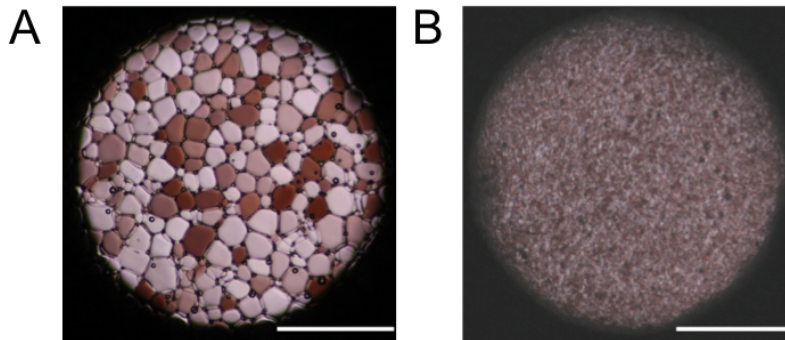
Sabit sıcaklıkta bir çözeltide bulunan buz kristalleri kademeli olarak boyutlarını değiştirmektedir (küçük buz kristalleri diğer kristaller ile birleşerek büyür yada çözünerek kaybolur). Su molekülünün kristalizasyonu sırasında toplam yüzey enerjisini en aza indirmek için; büyük buz kristalleri, küçük komşu buz kristalleri ile birleşerek büyümektedir (Capicciotti ve ark., 2013 ve Kraska, 2008). Bu durum donma sırasında gerçekleşir ve oluşan daha büyük buz kristalleri, kararsız hale geçen hidrojen atomlarının kovalent bağlarındaki zayıflama nedeniyle diğer H₂O moleküllerine bağlanma eğilimindedir. Serbest H molekülleri, O ile yeniden bağ yaparak daha büyük amorf, bipiramidal ve hegzagonal buz kristallerini oluşturup büyüme eğilimine geçerler (Magalhaes ve ark., 2008). Bu durum ise spermatozoon membranında hasara neden olan temel mekanizmalardan bir tanesidir. AF(G)P ve

¹ **Adsorpsiyon** ise bir maddedeki (gaz veya sıvı da olabilir) atom, iyon veya moleküllerin emici maddenin yüzeyine yapışması ve tutunması işlemidir.

AFP, bu işlemi, makul bir süre boyunca, konsantrasyona bağlı bir şekilde neredeyse fark edilemeyecek hale getirecek kadar azaltabilirler (Carpenter ve Hansen, 1992).

Bu olgu, buz kristalizasyonu ya da rekristalizasyon olarak adlandırılmaktadır. Bu durum, kararsız olan su moleküllerinin ve yüzey eğriliğinin farklılıklarından (Kelvin etkisi) kaynaklanmaktadır (Davies and Sykes, 1997; Griffith ve Ewart, 1995 ve Zachariassen ve Kristiansen, 2000). Buzun yeniden kristalleştirilmesi, dokulara ve hücrelere fiziksel hasar verme olasılığını artırmaktadır. Yeniden kristalleştirme, donma noktasının hemen altındaki sıcaklıklarda ve camsı halde ısınma sırasında en hızlı şekilde gerçekleşmektedir. Ortam sıcaklıkları, sıfırın altındaki aralıkta dalgalanmaya başladığında buz da yeniden kristalleşmektedir.

Knight ve ark. (1995) sıfırın altındaki sıcaklıklarda buz tanelerinin çevresinde, buzla yeniden kristalleşmeye izin veren; toplam yüzey alanının azalması ve enerjik olarak olumlu bir duruma neden olan bir miktar sıvı varlığını görüntülemiştir. AFP'nin konsantrasyonu (100 μg), buzla yeniden kristalleşmeyi inhibe etmekte etkilidir (Knight ve ark., 1988 ve Yeh ve Feeney, 1996). Yeniden kristalleştirme inhibisyonu, AFP'nin ve buz kristallerinin etkileşiminden kaynaklansa da, AFP'nin çok düşük konsantrasyonunda dahi yeniden kristalleştirme inhibisyonunu (Şekil 1.6) gerçekleştiren mekanizma anlaşılamamıştır.

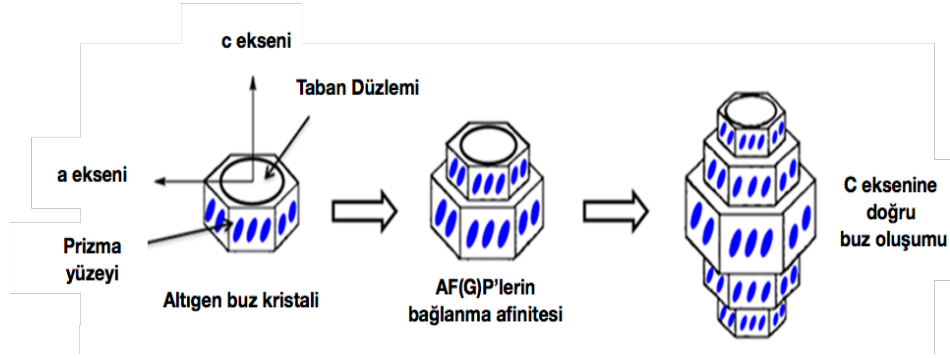


Şekil 1.6. BKİ. (A) -6 ° C'de 30 dakikalık bir süre boyunca buz rekristalizasyonu örnekleyen pozitif kontrol (PBS) ve (B) aynı deney koşulları altında bir BKİ aktif bileşiği PVA varlığında buz rekristalizasyonu (Ölçek = 400 μm) (Deller, 2013).

1.7.2. Termal Histerezis

Hızlı dondurma, sulu solüsyonların çözünme sıcaklığının altındaki derecelere soğutulduğu zaman sıvı halde kaldığı bir olgudur . Bu durumda, sistemin metastabil denge içinde olduğu söylenmektedir. Kendiliğinden çekirdeklenmenin aşırı soğutulmuş bir çözeltide meydana geldiği sıcaklık, çözeltinin hızlı donma noktası (HDN) olarak adlandırılır. Hızlı donma noktası, çekirdeklenme noktası (ÇN) ve HDN arasındaki farktır. ÇN ile buz büyümesinin gerçekleştiği sıcaklık arasındaki fark, termal histerezis (TH); spontan buz büyümesinin gerçekleştiği sıcaklık ise gecikmeli donma noktası (GDN) olarak adlandırılır. ÇN ile HDN arasındaki fark "histerez" veya "histerezis aktivitesi"dir (Zachariassen ve Kristiansen, 2000).

PVA, AFP ve AF(G)P'nin sergilediği ikinci özellik, termal histerezis veya termal gecikmedir. Termal histerezis, çözeltilerin donma noktaları ile erime noktaları arasında bir gecikme yada boşluk yaratmaktadır. Bu boşluk içinde izotermal olarak tutulan herhangi bir buz kristali, ne küçülecek ne de büyüyecektir. Bu yüzden, termal histerezis (gecikme) olarak adlandırılmıştır. AF(G)P'nin tespit edilen ilk özelliklerinden biri TH'dir (Deller ve ark., 2015 ve Kristiansen ve Zachariassen, 2005). TH boşluğunun boyutu, farklı AFP, AF(G)P ve farklı değerler veren türevlerine göre değişmekte; ancak gözlemlenen en yüksek TH boşlukları 1,5 ° C'den daha büyük olmamakla beraber çoğunlukla 0,5 ° C'den düşüktür (Duman, 2002 ve Zachariassen ve Kristiansen, 2000). Ancak, 2 ° C'nin üzerinde TH boşluğu oluşturan birkaç istisnai "hiperaktif" AFP izole edilmiştir (Zachariassen ve Kristiansen, 2000). TH, genellikle, buz kristali boyutundaki üst ve alt TH boşluk sınırlarını gösteren değişiklikleri doğru bir şekilde izlemek için bir nanolitre-ozmometre kullanarak belirli sıcaklık aralıklarında ölçülmektedir (Capicciotti ve ark., 2013). TH aktivitesi, PVA, AFP ve AF(G)P'nin son özelliği olan buz kristali morfolojisini (Şekil 1.7) değiştirme kabiliyeti ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir.



Şekil 1.7. Adsorpsiyon Nedeniyle Altıgen Bipiramidal Buz Kristallerinin Oluşumu (Venketesh ve Dayananda, 2008).

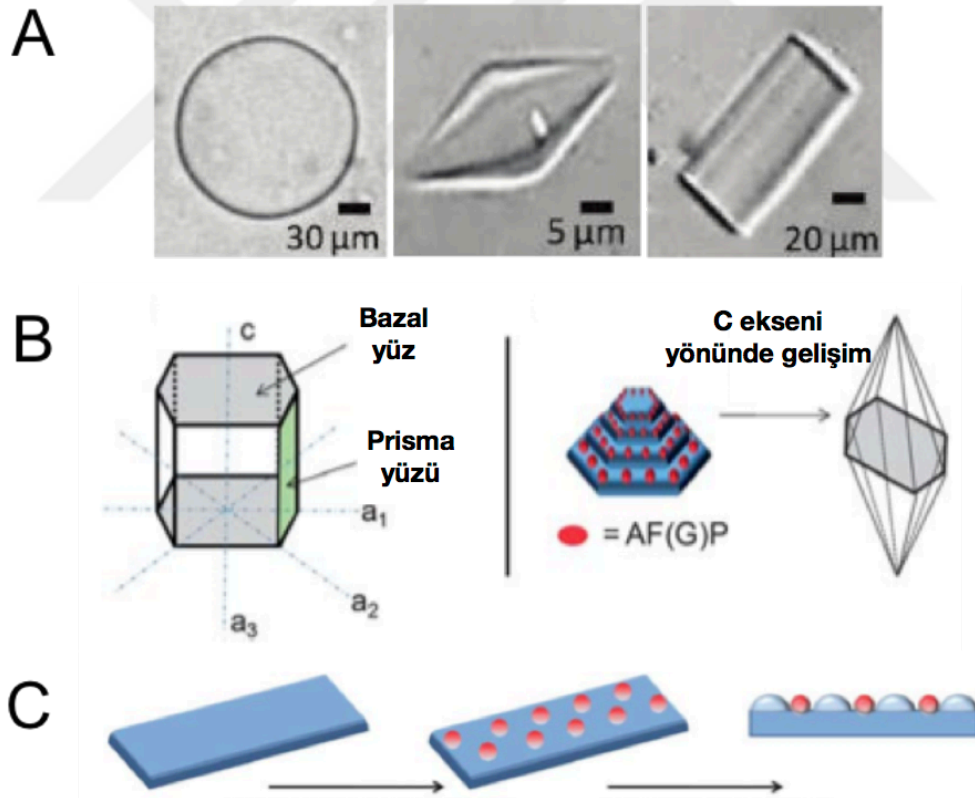
1.7.3. Dinamik Buz Şekillendirme

PVA, AFP ve AF(G)P'nin donma ve çözme işleminde sergilediği üçüncü ve son özelliği de dinamik buz şekillendirmesidir (DBŞ). Antifriz proteinlerinin buz yüzeyine bağlanması ile lokal olarak donma noktasında baskılama gerçekleşir ve buz kristali oluşumunda bir değişikliğe neden olur. Buz kristali oluşumundaki bu değişim dinamik buz şekillendirme (DBŞ) olarak adlandırılır ve Şekil 1.8'de gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Dinamik buz şekillendirme (DBŞ) ve buz kristalizasyon inhibisyonu (BKİ) aktivitesini gösteren fotoğraflar. A) Altıgen bipiramidal (veya iğne) buz kristali. B) Buz kristalinin inhibide edilememesi. C) Buz kristali inhibisyonu (Capicciotti ve ark., 2013).

DBŞ, buz kristali büyüme ortamının değiştirilmesi ve altıgen bipiramidal "iğne benzeri" bir morfoloji ile buz kristali oluşumuyla sonuçlanan bir olgudur (Şekil 1.9 A). Dinamik buz şekillendirme başlangıcı, aşağıdaki mekanik anlayışla derinlemesine incelenmiştir. Başlangıç noktası olarak değerlendirilen Raymond ve Devries (1977) tarafından öncelikle AF(G)P'nin buzla bağlanması ve etkileşimi için bir absorpsiyon inhibisyon modeli tanımlanmış ve TH aktivitesini absorpsiyona bağlayarak, absorpsiyonun DBŞ'ye nasıl yol açtığı tartışılmıştır. Daha sonra Knight ve ark. (1995) tarafından, (A-sarmal) AFP'nin, prizma yüzeyleri (Şekil 1.9. B) (A-ekseni) olarak adlandırılan, sadece spesifik tek bir buz düzlemi ile etkileşime girerek bağlandığı gözlenmiştir. Prizmanın yüzlerine bağlanma, yalnızca bu dikey (Şekil 1.9. B) temel düzlemlerin (Şekil 1.9. C) bağlanmamış bir şekilde kalmasını ve genişleyebilmesini sağlamaktadır.



Şekil 1.9. DBŞ'nin Mekanizması ve Sonuçları. (A) Hiç buz şekillendirmeme (B) AF(G)P'nin prizma bağlanarak bir altıgen bipiramidal yapı oluşturmaya (C) Buz kristali örgüsüne bağlanan AFP/AF(G)P'ni (kırmızı) gösteren step pinning modeli tasviri ve her bağlanma bölgesi arasında oluşan kavisli yüzeyin (Kelvin etkisi) oluşumu (Capicciotti ve ark., 2013).

Bu absorpsiyon inhibisyon süreci; enerji açısından elverişsiz (Kelvin etkisi) prizma yüzlerindeki büyüme, yüksek ölçüde dışbükey kavisli bir yüzey (Şekil 1.5.C) oluşturdukça donma noktasının baskılanması, bunun da TH'e yol açması ile daha derin bir şekilde açıklanabilmektedir (Deller ve ark., 2014). Nükleer manyetik rezonans spektrometre çalışmaları, AF(G)P'nin buz kristali örgüsüne tamamlayıcı olarak uyum gösteren adsorpsiyon inhibisyon modelini daha da desteklemiştir (Cao, 2004). Adsorpsiyon inhibisyon sürecini daha derinlemesine araştırılmış ve tip I α -sarmal bir AFP'den türetilen bir oligopeptit modifikasyonunun, BKİ aktivitesinde bir azalmaya neden olarak buz kristali morfolojisinde hafif bir değişikliğe nasıl neden olduğu gösterilmiştir. Bu da, buz kristali örgüsüne bağlanmanın değişken (binding on/off) bir davranış olmadığını belirtmektedir (Deller ve ark., 2014 ve Carvajal-Rondanelli ve ark., 2011). Bir dizi AFP, AF(G)P ve türevleri (PVA 8, 9, 18 ve 100 kDa) ile oluşan buz şekillendirme olaylarının (Deller, 2013), o zamandan beri konsantrasyona bağlı bir şekilde gerçekleştiği gösterilmekte olup; bu özelliğin, doğal AFP ve AF(G)P'nin kriyoprezervatif olarak uygulanmasında engelleyici bir etki yarattığı düşünülmektedir. AFP ve AF(G)P türevlerinin, BKİ'nin yararlı etkisini korurken; baskılamaya çalıştıkları bir özellik olan altıgen bipiramidal "iğne benzeri" yapıların oluşumunun, mekanik hasarı artırdığı gösterilmiştir.

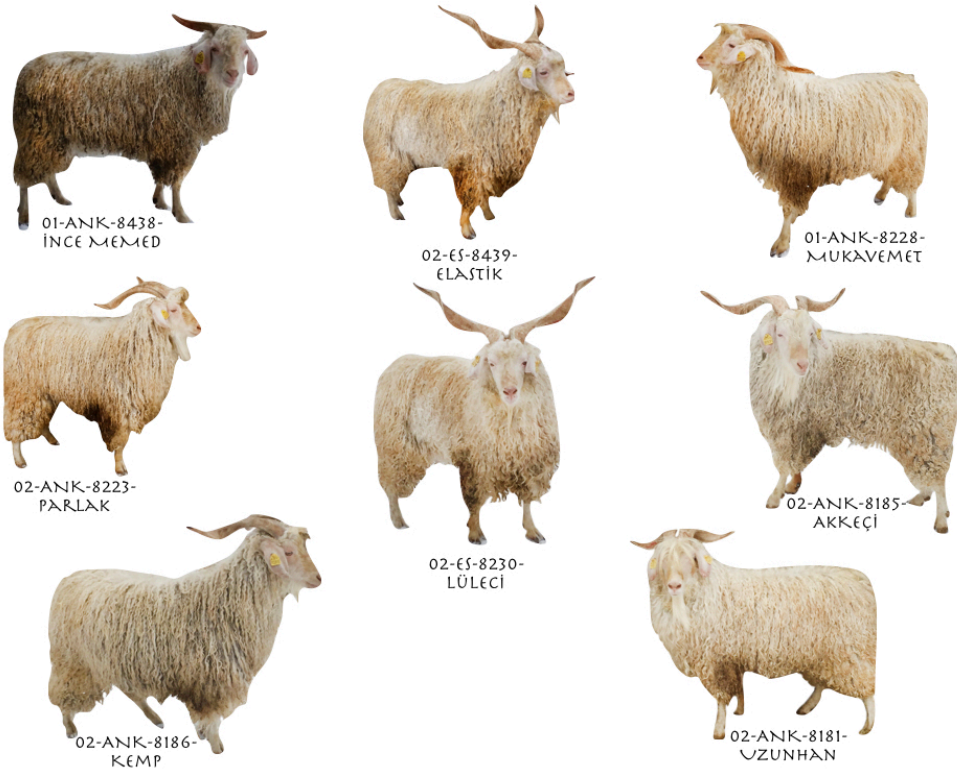
Bu araştırmanın amacı, 3 farklı moleküler ağırlığa sahip PVA'ün (9 kDa, 18 kDa ve 100 kDa) azalan gliserol konsantrasyonlarına karşı eklenen dozlarının spermatozoa fonksiyonları ve canlılığı üzerine etkilerinin incelenmesidir. PVA'ün kriyoprotektif olarak tanımlanmış BKİ, TH ve DBŞ özelliğinden yararlanılarak, Tris-yumurta sarısı sulandırıcısındaki gliserol konsantrasyonlarının kademeli olarak düşürülmesidir.

Kullanılan farklı moleküler ağırlıkta PVA'lerin, sulandırıcı çekirdeklenme sıcaklığını değiştirmeden (DBŞ, TH ve BKİ özellikleri ile) gliserole ek kriyoprotektan olarak kullanılabilirliği, tez çalışmasının hipotezini oluşturmaktadır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Araştırma Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne bağlı Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi'nde bulunan 24 adet Ankara tekesine, Bütünleştirilmiş Androlojik Muayene Sistematiği (BAMS) uygulanarak seçilen 7 adet birey sezon içerisinde (Ekim-Ocak) kullanılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Çalışmada Kullanılan Ankara Tekeleri

2.2. Hayvanların Bakım ve Beslemesi

Araştırmada kullanılan hayvanlar, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi'nin koyunculuk biriminde barındırılmıştır. Tekelerin günlük ihtiyaç duyacağı kuru madde miktarı 2,5 kg olarak belirlenmiştir. Hazırlanan total mix rasyon (TMR); % 40 kaba ve % 60 konsantre yem olarak belirlenmiştir. Kaba yem olarak yonca ve saman kullanılmıştır. Kullanılan TMR'nin 1 kg'ında toplam metabolik enerji 2.250 kcal/kg'dır ve 115 g ham protein içermektedir. Kullanılan yem rasyonunun bileşim ve kompozisyonu Çizelge 2.1'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Kullanılan Yem Rasyonunun Bileşim ve Kompozisyonu

Ham madde	%
Arpa Miktarı	62
Kepek Buğday	12
Küspe (28 HP-Ayçiçek)	23,4
Kireç taşı	2
Tuz	0,5
Vitamin-Mineral *	0,1
(Rovimix 302 Fm/30)	
Toplam	100
Kimyasal İçerik	
% Kuru Madde (KM),	86,88
% Ham Protein,	14,52
% Ham Yağ,	2,00
% Nişasta,	34,74
NDF, %	25,96
Ca, g/kg	8,11
P, g/kg	5,66
ME, kcal/kg	2,750

* Her 1 Kg Rovimix 302 - FM/30: 15 000 000 IU Vit A, 3 000 000 IU Vitamin D₃, 30 000 mg Vitamin E, 50 000 mg Manganez, 50 000 mg Demir, 50 000 mg Çinko, 10 000 mg Bakır, 150 mg Kobalt, 800 mg İyot, 150 mg Selenyum.

2.3. Damızlık Hayvan Seçimi

2.3.1. Bütünleştirilmiş Androlojik Muayene Sistematığı (BAMS)

Bütünleştirilmiş Androlojik Muayene Sistematığı (BAMS), İyi (İ), Şüpheli (Ş) ve Yetersiz (Y) erkekleri tanımlamak için yapılan bir uygulamadır. Bu prosedür esas olarak, klasik ve modern yöntemleri içerir. Klasik yaklaşım lineer tip özellikler ve reproduktif muayeneyi içermektedir. Yenilikçi yaklaşım; testiküler ve eklenti bezlerin ultrasonografi bulguları, testiküler ultrason skoru (TUS), piksel intensity skor (PİS), skrotal termografi, GnRH challenge test, CASA sperma analizi (Bilgisayar destekli sperma analizi), floresan boyama, seminal plazma biyokimyasına dayanan rutin değerlendirme sistemi ile fiziksel ve üreme kontrollerini içermektedir. (Daşkın ve ark., 2015).

Bütünleştirilmiş Androlojik Muayene Sistematığı iki temel aşamadan oluşmaktadır.

A. Genel Fiziksel ve Reproduktif Muayene (Klasik Yaklaşım)

1. Sahip ve hayvana ait genel bilgiler
2. Vücut kondisyon skoru
3. Fiziksel muayene
 - Göz
 - Ağız/Çene Yapısı
 - Ayak/Bacak Yapısı
 - Prepusyum
 - Penis
 - Skrotum
4. Skrotal çevre

B. Görüntüleme (Yenilikçi Yaklaşım)

1. Testiküler Ultrason
2. Eklenti Bezleri Ultrason
3. GnRH Challenge Test (Termal Kamera)
4. Transrektal Masaj
5. Suni Vajina Uyum Testi
6. Spermatolojik Parametreler
7. Spermanın Biyokimyasal Kompozisyonu

Sperma istasyonlarında optimal reproduktif üretkenlik için, koç ya da tekeler BAMS ile seçilmelidir. Klasik muayene sistematığı fiziksel ölçümler ve palpasyonu içermektedir. BAMS, reproduktif yapıların (testis ve eklenti bezleri) ultrason görüntülemelerini de içermektedir. Optimal üretkenlik, sperma üretimi, libido, aşım kapasitesi gibi androlojik özelliklerin belirlenmesi ve reproduktif sağlık muayeneleri BAMS aracılığı ile gerçekleştirilebilmektedir. Koç ve tekelerin % 10 ila 15'i yetersiz reproduktif kapasiteye sahiptir. BAMS ile verimli erkeklerin saptanması ve verimsiz erkeklerin elimine edilmesi; bir sürü veya sperma istasyonu için ekonomik getiriye artırabilmektedir. Maksimum üreme verimliliğini sağlamak için her yıl üreyen her erkek, veteriner hekim veya eğitimli bir kişi tarafından BAMS programına alınmalıdır. BAMS temel olarak 1) Fiziksel muayene, 2) Üreme organlarının incelenmesi ve görüntülenmesi, 3) Transrektal sperma toplanması, 4) Spermanın CASA ile değerlendirilmesi ve seminal plazmanın biyokimyasal kompozisyonunun incelenmesinden oluşmaktadır (Daşkın ve ark, 2015).

2.3.1.1. Fiziksel Muayene

Hayvanların genel fiziksel muayeneleri inspeksiyon ve palpasyon ile Şekil 2.3.'de yer alan muayene formuna göre gerçekleştirilmiştir. Bu muayene sistematığına göre değerlendirilen bireyler iyi (İ), yeterli (Y) ve şüpheli (Ş) olarak aldıkları skorlara göre sınıflandırılmıştır. Vücut kondisyon skoru için 0-5 değerlendirme skalası kullanılmıştır. Genel fiziksel özellikleri açısından bu bireylere ait; testis yüksekliği,

çapı ve genişliği ölçümleri elektronik kumpas (Watan, Türkiye) aracılığıyla ve skrotal çevre ölçümü mezüro (Mesitaş, Türkiye) yardımıyla (Şekil 2.2.) yapılmıştır.



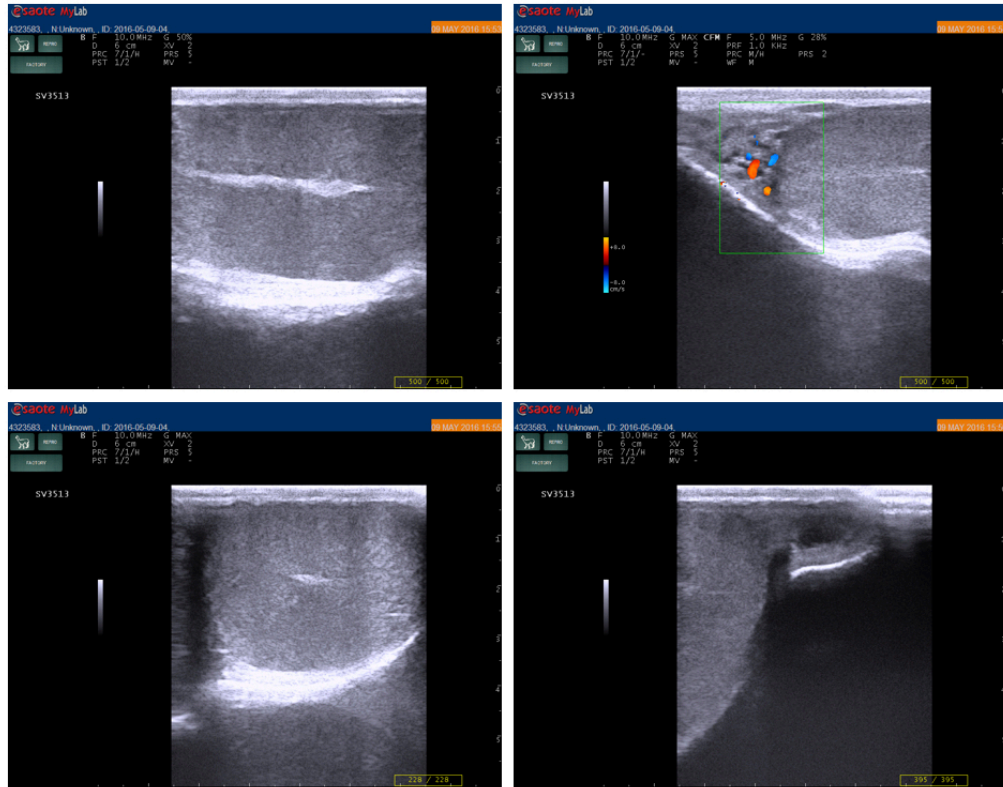
Şekil 2.2. Hayvanların Genel Fiziksel Muayeneleri ve Ölçümler

Sahip	Veteriner Fakültesi	Tarih	05/12/2014
Adres	Lalahan	Yaş	2
Kulak Numarası	TR061225206	İrk	Ankara
PARAMETRE			
Vücut Kondisyon Skoru	2,75	1 to 2 3 to 4 5	İyi Şüpheli Yetersiz
Fiziksel Muayene			
Göz	Normal Abnormal Hereditaire defect	1	İyi Şüpheli Yetersiz
Ağız/Çene	Normal Abnormal Hereditaire defect	1	İyi Şüpheli Yetersiz
Ayak/Bacak	Normal Abnormal Hereditaire defect	1 Hoof	İyi Şüpheli Yetersiz
Prepusyum	Normal Mild Pizzle rot Severe Pizzle rot Frostbite	1	İyi Şüpheli Yetersiz Yetersiz
Penis	Normal Adhesions Deviations	1	İyi Şüpheli Yetersiz
Skrotum	Normal Dermatitis Frostbite Mange Cryptorchidism Hernias Epididymitis Abscesses Granulomas Varicocele Testicular Atrophy		İyi Şüpheli Yetersiz Yetersiz Yetersiz Yetersiz Yetersiz Yetersiz Şüpheli Şüpheli
Scrotal Circumference	Cm 5 to 14 Ay 30 to 36 cm > 14 Ay 32-40 cm >40	<30 30 to 36 cm >36 cm <32 cm 32-40 cm >40	Şüpheli İyi İstisnai Şüpheli İyi İstisnai
Testiküler US	Skor Echo 0 1 2 3	1	İyi İyi Şüpheli Yetersiz
GnRH challeng test	T0 T60 Süre Süre Delta Süre		TEST0 TEST60 Delta Test
Sperm Motillite	0% 10-30% 31-70% 71-100%		Yetersiz Şüpheli İyi İstisnai
Sperm Morfoloji	<30% 30-50% 51-80% >80%		Yetersiz Şüpheli İyi İstisnai

Şekil 2.3. BAMS ait Genel ve Reprodüktif Muayene Formu

2.3.1.2. Üreme Organlarının Görüntülenmesi

Testis, epididimis, spermatik kord ve eklenti bezlerinin ultrasonografisi (US) gerçekleştirilmiştir. Her bir hayvanın mediastinum testisi içeren testis parankimi (Echo-TTP), kauda epididimis (Echo-CEP) ve vasküler kordun renkli doppleri (EchoDop-VK) eko-tekstürün değerlendirilmesi için longitudinal ve transversal kesitler ile (Şekil 2.4) görüntülenmiştir. Eklenti bezlerinin görüntülenmesi, endokaviter lineer prob (MyLabVet™, ESAOTE S.p.A., Genova, 10 MhZ prob frekansı) kullanılarak hayvan ayakta iken gerçekleştirilmiştir. Vezikula seminalis (Echo-VS) ve bulboüretal bez (Echo-BB) idrar kesesinin referansı ile görüntülenip, testiküler paranzim dokusu ekojeniteye göre skorlanmıştır (0-3). Kauda epididimis, testis parankim dokusunun ekojenitesi ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir. Vasküler kord, renkli doppler US kullanılarak kan akım hızına göre görüntülenmiştir (Tekin ve ark., 2016).



Şekil 2.4. Testiküler Yapıların B-mode ve Renkli Doppler Ultrason Görüntüsü

2.3.1.3. Transrektal Digital Masaj

Suni vajen (SV) yardımıyla sperma alma ve elektrojekülatör'ün (EE) kullanılmadığı durumlarda (impotensiya coeundi veya suni vajene uyumsuz), ampulla masajı ile sperma alma, ruminantlarda (boğa, koç) kullanılan bir tekniktir. Ancak tekelerde digital manipulasyon yoluyla sperma alımı ile ilgili bildirilmiş bir literatür bulunmamaktadır. Bununla birlikte, EE kullanımı hayvanda strese neden olarak serum kortizol konsantrasyonlarında, rektal sıcaklık, nabız, solunum ve kalp atım sayısında artışa neden olmaktadır. Genel anestezi altında bile EE işleminin ağrı verici olduğu düşünülmektedir. Yukarıda bahsi geçen bu olaylar EE'ün hayvan refahını olumsuz etkilediğini göstermektedir. Bu yöntemlere alternatif olarak tez çalışmasında transrektal (Şekil 2.5) olarak tekelere digital manipulasyon uygulanmıştır (Tekin ve ark., 2016).



Şekil 2.5. Transrektal Digital Masaj ile Sperma Alımı ve Ampulla Üzerinde Gösterimi

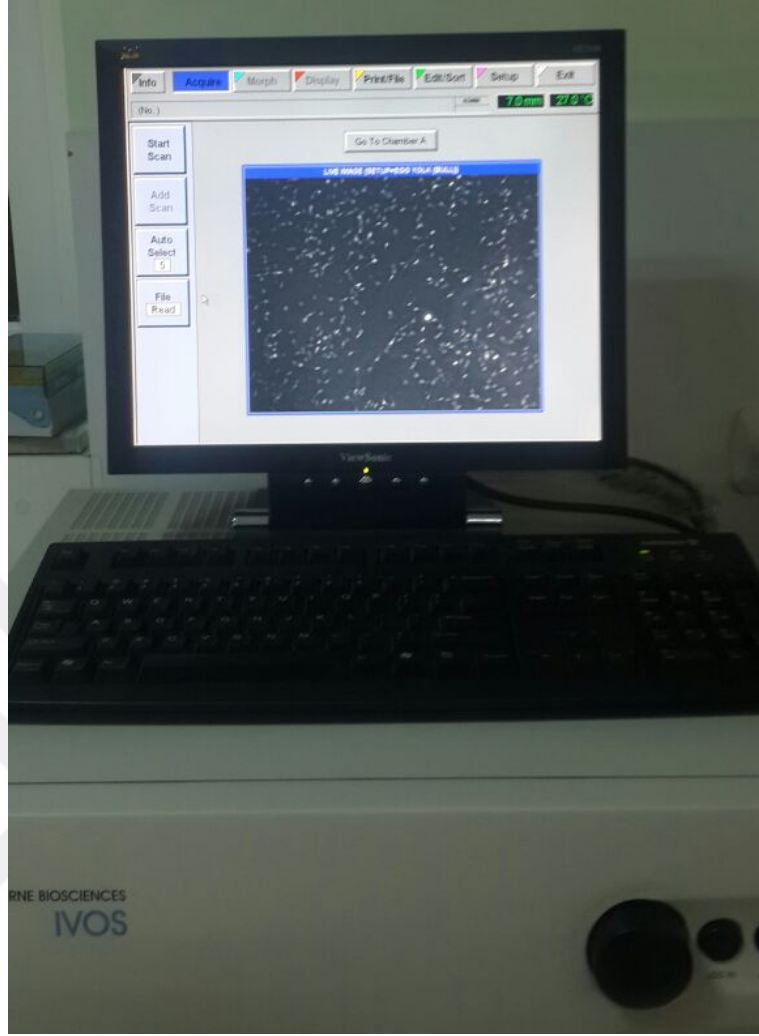
Doktora çalışması sırasında geliştirilen, küçük ruminantlarda sperm toplamak için alternatif bir yöntem “Transrektal Digital Masaj” (TDM) olarak isimlendirilmiştir. Yöntem ampulla ve eklenti bezlerinin digital manipulasyon yoluyla uyarılmasını içermektedir. Transrektal masaj yöntemi aşağıda sırasıyla açıklanan aşamaları içermektedir:

1. Uygun bir şekilde ayakta zapturapt sağlanır ve hayvan nazikçe sakinleştirilir,
2. Prepusyum üzerindeki kıllar makas yardımıyla uzaklaştırılır, diğer yabancı partiküller, antibiyotikli (Gentamisin) ılık fizyolojik tuzlu su ile yıkanır, kurulanır ve bölgenin dezenfeksiyonu sağlanır,
3. Dezenfeksiyon sırasında ürinasyon indüklenerek sperm alma işlemi sırasında kontaminasyon engellenir,
4. Paraklor jel yardımıyla kayganlaştırılan işaret ve orta parmak yardımıyla dışkı rektumdan uzaklaştırılır
5. Rektumdan işaret parmağı yardımıyla seminal veziküller tespit edilerek pelvik çatı içerisine alınır,
6. Seminal veziküllerin önünde yer alan ampullanın hemen kraniyalindeki noktaya masaj yapılarak üretral ve kas kontraksiyonu başlatılır,
7. Kontraksiyon sağlandıktan sonra dinamik bir şekilde seminal veziküller ve ampulla üzerinde ileri ve geriye hareketlerle spermanın ampulladan pelvik üretraya aktarımı sağlanır.
8. Ejakülat diğer bir yardımcı tarafından sperma kadehine toplanır (Tekin ve ark., 2016).

2.3.1.4. Spermanın CASA ile Değerlendirilmesi

Tekelerden TDM ile alınan sperma örneklerinde; taze makroskopik (miktar, renk, kıvam) ve mikroskopik spermatolojik (kitle, yoğunluk, ölü-canlı spermatozoa, anormal spermatozoa, CASA motilite ve kinetik parametreleri) özellikler değerlendirilmiştir.

Spermanın miktarı, ejakülat kadehinin dereceli skalasından ml olarak kaydedilmiştir. Spermaya ait renk, koku ve kıvam için (0-3) skalası kullanılmış, buna göre; renk: 1: açık krem, 2: krem 3: koyu krem-sarı olarak makroskopik; kıvam: 0-5 sn: 1, 5-10 sn: 2 ve 10 sn > 3 olmak üzere Pastör pipeti yardımıyla damlama süreleri üzerinden değerlendirilmiştir.



Şekil 2.6. Spermanın Ivos Sistemi ile Değerlendirilmesi

Spermanın CASA ile değerlendirilmesi (Şekil 2.6), Ankara tekesi için optimize edilmiş bir seçim protokolü geliştirmek ve eşzamanlı olarak iatrojenik sebeplerle (reproduktif organ patolojisi, oligozoospermi vb) yetersiz olan erkeklerin sürüden çıkarılması için geliştirilmiştir. Bu muayene sezon girişinden en az 1 ay önce gerçekleştirilmeli ve sezon başlangıcında tekrarlanmalıdır (Daşkın ve ark., 2015).

2.3.2. Spermanın Alınması ve Uyum Testi

Suni vajene alıştırma işlemi için tekeler çalışma öncesinde (Eylül-Aralık) uyum testine (Çizelge 2.2) alınmıştır.

Çizelge 2.2. Suni Vajen Uyum Testi

Parametre	Skorlama
Seksüel Deaktivite	Gün
Suni Vajene uyum	1-5
Suni Vajen Sıcaklığı	Derece ° C
Libido	1-5
Hazırlanma Süresi	Saniye
Sperma Miktarı	ml
Sperma pH	Merck® pH indikatör skalası
Renk	1-3 (1=Açık krem, 2=Sarı, 3=Koyu krem)
Viskozite	1-3 (1=0-5sn 1 damla) (2=5-10sn 1 damla) (3= 10sn > 1 damla)
Kitle Hareketi	0-5
Subjektif motilite	% motil spermatozoon
CASA Motilite	Ivos® (Keçi sperma muayene) %
CASA Progresivite	Ivos® (Keçi sperma muayene) %
Yoğunluk Accucell ®	Dilüsyon = 1/ 400 formül: a = 0, b = +287,6 ; c = +6814 ; d = -488,5
Anormal Spermatozoa	Hancock dilüsyon = 1/500 200 spermatozoon (normal/anaormal %)
Ölü Spermatozoa	Eozin smear 100 spermatozoon (Ölü/Toplam Spermatozoa %)

Tekelerden 8 hafta süresince haftanın farklı günlerinde 2 kez suni vajen yardımıyla sperma alınmıştır (Şekil 2.7). Tekeler sperma alma işlemi için suni vajene uyum (1-5), seksüel deaktivite (gün), libido, hazırlanma süresi (sn), suni vajen sıcaklığı (derece °C) yönünden incelenmiştir. Makroskobik spematolojik özellikler sperma miktarı (ml), renk (1-3), viskozite (1-3); ve mikroskobik olarak kitle hareketi (0-5), subjektif motilite, CASA motilite ve progresivite (%), yoğunluk (10^9 /ml), anormal spermatozoa oranı (%), ölü spermatozoa oranı (%) ve pH yönünden muayene

edilmiştir. Her bir teke skortlama sistematüğinden aldığı total skor üzerinden sınıflandırılmıştır.



Şekil 2.7. Suni Vajen ile Sperma Alma

2.4. Sulandırıcı

Kriyoprotektana ek olarak kullanılan PVA türevleri 9 kDa PVA (ortalama Mw 1/4 9 000 – 10 000, % 80 hidrolize), 18 kDa PVA (ortalama Mw 1/4 18 000 – 30 000, % 98 – 99 hidrolize) ve 100 kDa PVA (ortalama Mw 1/4 100 000) Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir (Çizelge 2.3). Her bir sulandırıcı grubu için gerekli miktar 100 ml Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Sigma Aldrich®) solüsyonu içerisinde çözdürölmüş ve sulandırıcılar hazırlandıktan sonra filtre (22 mikron) edilerek bir gün boyunca +4 ° C'de muhafaza edilmiştir. Sulandırıcıların hazırlanması laminar flow kabinde gerçekleştirilerek bakteriyel kontaminasyon riski minimize edilmiştir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Sulandırıcıların Laminar Kabinde Hazırlanması

Standart Tris Sulandırıcısı (Kontrol)

- 3,63 gr Tris²
- 1,82 gr Sitrik Asit³,
- 0,5 gr Glikoz⁴,
- Distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- % 10 yumurta sarısı ve % 5 gliserol⁵
- PVA 9 kDa⁶
- PVA 31 kDa⁷
- PVA 100 kDa⁸

² Sigma T1503

³ Sigma C0759

⁴ Sigma G7528

⁵ Bioshop GLY 002

⁶ Sigma 363073-25G

⁷ Sigma 363073-25G

⁸ Sigma 341584-25G

Çizelge 2.3. Sulandırıcı Grupları

Gruplar	Sulandırıcı İçerikleri
K	Tris
A2 Pva 9 kDa	Tris + % 0,001 Pva 9 kDa + % 5 G
A3 Pva 9 kDa	Tris + % 0,01 Pva 9 kDa + %5 G
A4 Pva 9 kDa	Tris + % 0,1 Pva 9 kDa + %5 G
A5 Pva 9 kDa	Tris + % 1 Pva 9 kDa + %5 G
A6 Pva 9 kDa	Tris + % 2 Pva 9 kDa + %2 G
B2 Pva 18 kDa	Tris + % 0,001 Pva 18 kDa + %5 G
B3 Pva 18 kDa	Tris + % 0,01 Pva 18 kDa + %5 G
B4 Pva 18 kDa	Tris + % 0,1 Pva 18 kDa + %5 G
B5 Pva 18 kDa	Tris + % 1 Pva 18 kDa + %5 G
B6 Pva 18 kDa	Tris + % 2 Pva 18 kDa + %2 G
C2 Pva 100 kDa	Tris + % 0,001 Pva 100 kDa + %5 G
C3 Pva 100 kDa	Tris + % 0,01 Pva 100 kDa + %5 G
C4 Pva 100 kDa	Tris + % 0,1 Pva 100 kDa + %5 G
C5 Pva 100 kDa	Tris + % 1 Pva 100 kDa + %5 G
C6 Pva 100 kDa	Tris + % 2 Pva 100 kDa + %2 G

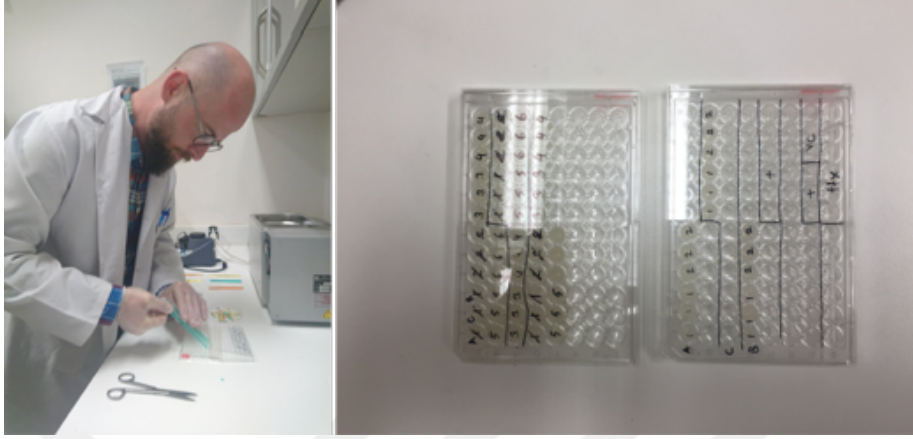
2.4.1. PVA Dozunun Belirlenmesi ve Sitotoksosite

Sperma için uygun PVA konsantrasyonunun belirlenmesi, sitotoksosite ve MTT ile gerçekleştirilmiştir. Taze sperm hücreleri ile hücre canlılık denemelerinden MTT ve nötral red testleri yapılmıştır. Uygulanan doz aralığı 0,098 - 200 µg/L olarak belirlenmiş ve half dilüsyon oranlarında MTT testi uygulanmıştır.

2.4.1.1. Metiltiazol Difenil Tetrazolyum Testi (MTT)

MTT testi için; 100 µl 96 well plate'e aktarıldı ve 3×10^6 sperm/ml olacak şekilde kullanıldı, bunun üzerine hazırlanan seri dilüsyonlarda (en az 12 konsantrasyonda ve her konsantrasyon üç tekrar olacak şekilde) 20 µl PVA ilave edildi. Numunelerin uygulanmasından 24 saat sonra 15 µl MTT çalışma solüsyonu eklendi. İki saatlik inkübasyondan sonra mikroskopik inceleme yapıldı. Işığa duyarlı bir yöntem olması nedeniyle çalışmanın tamamı karanlık ortamda gerçekleştirildi. Platelere, horizontal karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra (100 rpm, 10 dakika), optik

dansiteleri mikropilaka okuyucuda 540 nm dalga boyunda okundu (Şekil 2.9), (Mosmann, 1983).



Şekil 2.9. MTT için Örneklerin Hazırlanması

2.4.1.2. Sitotoksosite Değerlendirmesi

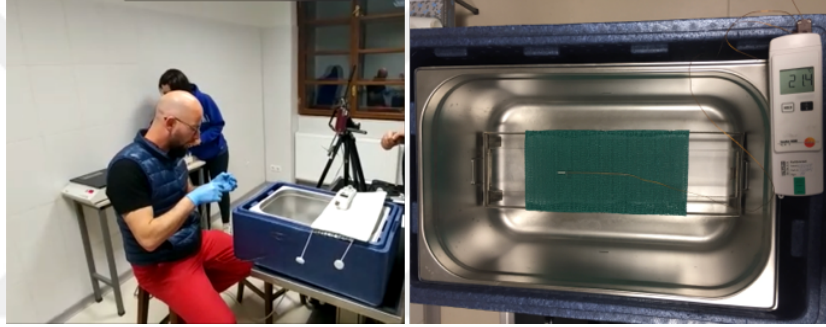
Numune uygulanan hücrelerdeki sitotoksosite % olarak ifade edilerek ve uygulanmayan, % 100 canlı kabul edilen pozitif kontrol grubu (Maksimal Viabilite, Max V) ile % 0 canlı kabul edilen, Triton-X uygulanan negatif kontrol grubuna (Minimal Viabilite, Min V) göre aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplandı: (Ulukaya ve ark., 2008).

- Sitotoksosite (%) = $[1 - (\text{test} - \text{MinV}) / (\text{MaxV} - \text{MinV})] \times 100$.

Seçilen veriler arasındaki yüzde sitotoksosite değerlendirme ve ilgili ortalamanın standart hatası (SEM: Standart Error of Mean) MS Excel (MS Office 2007) ve NCSS (2007) kullanılarak hesaplandı. Doz ve yüzde sitotoksosite değerleri ile regresyon eğrisi analizi SPSS 17.00 programı ve Graph Pad® Prism 4.0 programı kullanılarak yapıldı ve en yüksek belirtme katsayısı (r^2) değerlendirmeye alınarak IC_{50} hesaplanmasında kullanılacak olan eğrinin formülü belirlendi.

2.4.2. Sulandırıcının Çekirdeklenme ve Donma Noktasının Belirlenmesi

Donma işlemi sırasında en önemli olay hücre içi suyun kaderidir. Hücrenin donma mekanizmalarını daha iyi anlamak için "hızlı dondurma" terimini iyi bilmek gereklidir. Hızlı dondurma, herhangi bir çözeltinin donma noktasına ulaştığında fiziksel durumunun normal donma değiştirilmeden sıvıdan katıya (buz) hal değiştirmesidir. Bu durumdaki çözeltiler, kristal veya bir metal nesne ile temas ederse, kristalleşme oluşacak ve sıcaklık derhal donma noktasına dönecektir. Bu işleme "çekirdeklenme" denmekte olup, dondurma işleminin manuel kontrolü için kullanılmaktadır (Özkavukçu ve Erdemli, 2002).



Şekil 2.10. Çekirdeklenmenin Görüntülenmesi

Çalışmada çekirdeklenme aşamasının görüntülenmesi için -75°C sıcaklığa erişim kapasiteli termometre kullanılmıştır. Görüntülemeler için dondurma düzeneği üzerine kamera (JVC, everio HD-AVC) ve termometre (Testo 926, Germany) adapte edilmiştir. Payetlerin daha net görüntülenmesi için payet taşıma ızgarasına koyu renk aparat ve payetle temas etmeyecek şekilde metal levhalar yerleştirilmiştir (Şekil 2.10).

35°C 'de bulunan payetlerin içerisine termometre probu yerleştirilerek, dondurma düzeneğinin üzerinde metal plakalar vasıtasıyla sabitlenmiştir. Başlangıç ve çekirdeklenme başlangıç sıcaklığı, latent ısı artışı, çekirdeklenme bitiş süresi ile toplam süre (sn) olarak kaydedilmiştir. Deney sonrasında görüntüler üzerinden değerler incelenerek çekirdeklenme çizelgesi oluşturulmuştur.

2.5. Sperma Dondurulabilirliğinin Belirlenmesi

Sperm kriyobiyolojisinde yeni bir terim olarak kullanılmaya başlanılan “Sperma dondurulabilirliği”, taze ve çözüm sonu spermatolojik delta fark değerini tanımlamaktadır.

Zayıf ve güçlü dondurma kapasitesinin belirlenmesi için tekelere özgü metod geliştirilmiştir. Bu amaçla; suni vajen yardımıyla alınan spermaların taze ve çözüm sonu motilite ve kinetik parametreleri arasındaki delta farklar kaydedilmiştir. Bunun için; alınan sperm örneklerinden sulandırma gerçeştirilerek (1×10^6 spermatozoa/ml) Leja 20 μ l odacıklı lam sistemine 3 μ l örnek yüklenmiştir. IVOS sisteminde analiz için önceden belirlenen teke spesifik ayarlar girilmiştir. Aydınlanma yoğunluğu 2185, fotometre 63, büyütme 1.89 ve video alanı koyu olarak seçilmiştir. Motilite analizi 37 °C’ de 10 x büyütmede Hamilton Thorne Version 12 Ivos yazılımı ile gerçeştirilmiştir. Minimum ortalama yol 50, progresif motilite % 50 olarak kabul edilmiş ayrıca motilite değerdirmesinde statik, yavaş > 40 μ m/s, orta > 70 μ m/s, hızlı > 100 μ m/s olarak ayarlanmıştır. Her bir örnek 3 μ l olarak Leja motilite analiz lamlarında değerdendirilmiştir. Motilite tayininde her bir örnek için 5 farklı alanda en az 100, en fazla 500 adet spermatozoa analiz edilmiştir.

Bu çalışmada dondurulabilirliğin incelenmesinin temel amacı, kriyoprotektana ek olarak kullanılan PVA konsantrasyonlarına göre çekirdeklenme ve donma sıcaklığının görüntülenmesidir. Buna göre sulandırıcı gruplarında yer alan gliserol konsantrasyonları kademeli olarak 3 deney yardımıyla düşürölerek çekirdeklenme, latent ısı yükseliş fazı ve donma süreleri kaydedilmiştir.

Çalışmanın bir diğder amacı Ankara tekesi için optimize edilmiş bir kriyoprezervasyon protokolü ve eşzamanlı olarak yetersiz sperma dondurma yeteneğdi olan erkekler için daha iyi bir protokol geliştirmektir. Bu çalışma, optimizasyon işlemi için sistematik yaklaşımımızın bir parçasını oluşturmaktadır. Özellikle, dondurma öncesi seksüel deaktivite, testiküler ve eklenti bezleri US, CASA motilite, kinetik parametreler, konsantrasyon, ölü canlı spermatozoa, anormal spermatozoa, sperm

yıkama, ekilibrasyon süresi gibi donma öncesi ve sonrası koşullarla ilgili faktörler birlikte değerlendirilmiştir.

2.6. Spermanın Dondurulması

Farklı sperma sulandırıcılarına ait 0,25 ml'lik payetler üzerine üretim yeri, tarihi, tekenin adı, ırkı, kulak numarası ve her bir sulandırıcının isim kısaltması [PVA 9 kDa (moleküler ağırlık), 0,001 (%), Grup A2 (grup numarası)] olacak şekilde basılmıştır. Payetler paketleme işlemi öncesinde UV sterilizatörde 30 dk sterilize edilmiştir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Payetlerin Basılması ve Sterilizasyonu

Ankara tekelerinden alınan sperma örnekleri 6 eşit hacme bölünmüş ve 6 farklı sulandırıcı grubu ile sulandırılmıştır. Spermatozoa yoğunluğu Accucell fotometri cihazı ile belirlenmiş (Şekil 2.12), 0,25 ml hacimdeki payetlere yaklaşık 100 milyon spermatozoa olacak şekilde dozlanmıştır (Şekil 2.13).



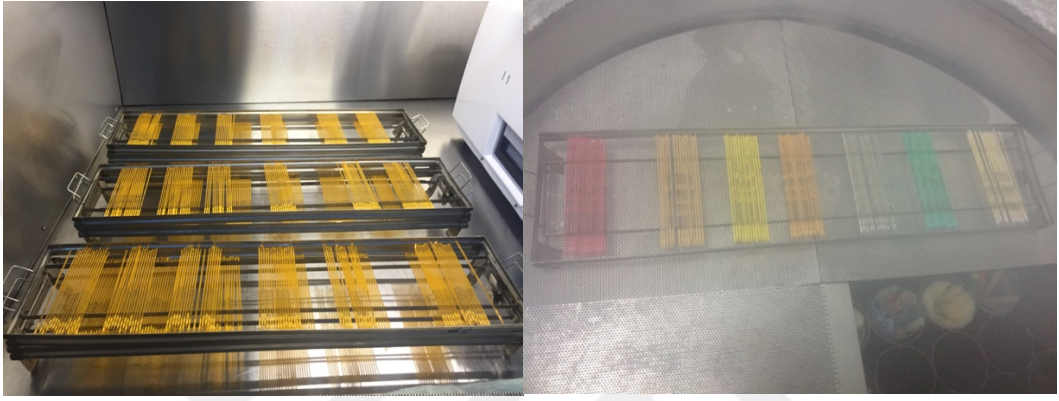
Şekil 2.12. Spermanın Sulandırılması ve Yoğunluğunun Belirlenmesi

Otomatik doldurma cihazı ile soğutmalı kabinde her bir sulandırıcı için belirlenmiş payetlere çekilen sperma, sıcaklık ayarlı bilgisayarlı dondurma cihazına yerleştirilmiştir.



Şekil 2.13. Spermanın Payetlenmesi ve Kapatılması

Üç saat ekilibrasyon süresi tamamlandıktan sonra, sperma 0,25 ml'lik payetlere otomatik doldurma cihazı ile yerleştirilerek paketlenmiştir. Dondurma işlemi programlanabilir sperma dondurma (Digitcool 5300 ZB 250, IMV, Fransa) cihazında 3 safhada; 4 °C/-10 ° C (-3 ° C/dk), -10 ° C/-100 ° C (40 ° C/dk) ve -100 ° C /-140 ° C (20 ° C/dk) toplam 7 dakika içinde gerçekleştirilmiştir. Her teke ve gruplara ait payetler -196 ° C'de sıvı azot içinde depolanmıştır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması

2.7. Taze Spermatolojik Parametreler

2.7.1. Motilite

İleri yönde ve güçlü hareket eden spermatozoanın, diğer hareket biçimi gösteren spermatozoaya oranı olarak ifade edilen motilite; taze, sulandırma sonrası ve ekilibrasyon sonrasında; lam üzerine bir damla alınıp üzerine lamel kapatılarak, faz-kontrast ısıtma tablalı mikroskopta 10 x büyütme ile üç değişik mikroskop sahasında belirlenerek, % olarak ifade edilmiştir (Şekil 2.15), (Tekin ve Daşkın, 2016).



Şekil 2.15. Sperma Motilitesinin Faz Kontrast Mikroskop ile Belirlenmesi

2.7.2. Konsantrasyon

Spermatozoa konsantrasyonunun hesaplanmasında fotometrik yöntem kullanılmıştır. 40 µl nativ spermadan alınan numune 3960 µl NaCl solüsyonu ile 1/100 oranında sulandırılarak fotometreye (IMV-Accucell) yerleştirilmiş (Şekil 2.16) ve sonuçlar $10^9/\text{ml}$ olarak saptanmış ve kaydedilmiştir.



Şekil 2.16. Sperma Konsantrasyonunun Accucell ile Belirlenmesi

2.7.3. Canlı Spermatozoa Oranı

Spermadan alınan numuneler % 3'lük sodyum sitrat solusyonu içinde % 2'lik olarak hazırlanmış eosin boyası ile temiz bir lam üzerine froti çekilerek ışık mikroskopunda 400 x büyütmede incelenmiştir. Değişik mikroskop alanlarında en az 100 spermatozoon sayılarak, ölü olanların oranı % olarak ifade edilmiştir (Tekin ve Daşkın, 2016).

2.7.4. Anormal Spermatozoa Oranı

Hancock tespit solusyonunda tespit edilen spermatozoa 100 x büyütme ile sedir yağı damlatılarak en az 200 spermatozoa sayılmış ve % olarak anormal spermatozoa oranı belirlenmiştir. Anormal spermatozoa oranı belirlenirken akrozom, baş, orta kısım ve kuyruk anomalileri total olarak değerlendirilmiştir (Tekin ve Daşkın, 2016).

2.8. Spermanın Çözdürülmesi

Çözüm sonrası muayeneler için, payetler içinde dondurulan sperma 37 °C'deki su banyosunda 30 saniyede çözdürülerek (Şekil 2.17), çözüm sonu CASA motilite, dondurulabilirlik, kinetik parametreler, ölü-canlı spermatozoa (SYBR-PI), akrozom bütünlüğü (FITC-PNA) ve mitokondriyel aktivite (JC-I) oranı yönünden muayene edilmiştir.



Şekil 2.17. Spermanın Çözdürülmesi

2.9. Çözüm Sonu Parametrelerin Değerlendirilmesi

Çözüm sonu spermatolojik parametrelerden motilite ve kinetik parametreler CASA ile (SCA, Sperm Class Analyser, Microptics®, İspanya); ölü-canlı spermatozoa (SYBR-PI) oranı, akrozom bütünlüğü (FITC-PNA) ve MTT (JC-1) Mikroplaka okuyucu (SpectraMax® MiniMax™ 300 Imaging Cytometer, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Çözüm Sonu Spermatolojik Parametrelerin Belirlenmesinde Kullanılan Spectra Max i3 ve Sca Microptics

2.9.1. CASA Motilite ve Kinetik Parametreler

Çözüm sonu motilite ve diğer kinetik parametrelerin değerlendirilmesinde CASA, Sperm Class Analyzer (SCA® v.4.2, Barcelona, Spain) ve IVOS (Hamilton Thorne Bioscience, Beverly, MA, ABD) kullanılmıştır. Sperma analizi için SCA sistemindeki mevcut teke spesifik değerlendirme parametreleri, IVOS sisteminde ise teke spesifik ayarlar eklenerek kullanılmıştır.

SCA; motilite ve kinetik parametre analizi için Basler kamera (60 frame/sn) kullanılmıştır. Kinetik parametrelerde yörünge bağımlı varyasyonu engellemek için parlaklık 60, kontrast 750 ve ışıkla 1000 olarak kaydedilmiştir. Motilite analizi 37 ° C'de 10 x büyütmede S.C.A. v 3.2.0, güncel yazılım ile gerçekleştirilmiştir. Minimum ortalama yol 50, progresif motilite % 50 kabul edilmiş ayrıca motilte

değerlendirilmesinde statik, yavaş $> 40 \mu\text{m/s}$, orta $> 70 \mu\text{m/s}$, hızlı $> 100 \mu\text{m/s}$ olarak ayarlanmıştır. Her bir örnek 3 μL olarak Leja motilite analiz lamalarında değerlendirilmiştir. Motilite tayininde her bir örnek için 5 farklı alanda en az 100 en fazla 300 adet spermatozoa analiz edilmiştir.

IVOS; CASA; motilite ve kinetik parametre analizi için CCD kamera (30 frame/sn, 60 Hz) kullanılmıştır. Aydınlanma yoğunluğu 2185, fotometre 63, büyütme 1.89 ve video alanı koyu olarak seçilmiştir. Motilite analizi 37°C ' de 10 x büyütmede Hamilton Thorne Version 12 Ivos yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Minimum ortalama yol 50, progresif motilite % 50 kabul edilmiş olup, motilite değerlendirmesinde statik, yavaş $> 40\mu\text{m/s}$, orta $> 70\mu\text{m/s}$, hızlı $> 100 \mu\text{m/s}$ olarak ayarlanmıştır. Her bir örnek 3 μL olarak Leja motilite analiz lamalarında değerlendirilmiştir. Motilite tayininde her bir örnek için 5 farklı alanda en az 296 en fazla 896 adet spermatozoa analiz edilmiştir.

Analizde sırasıyla; motilite (%), progresivite, eğrisel hız (VCL, $\mu\text{m/s}$), doğrusal hız (VSL, $\mu\text{m/s}$), ortalama yol hızı (VAP, $\mu\text{m/s}$), çizgisellik ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}$), doğrusallık ($\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP}$), çapraz geçiş frekans ritmi (BCF, Hz), dalgalanma ($\text{WOB} = \text{VAP}/\text{VCL}$), sperm başının ortalama yoldan laterale sapma uzaklığı (ALH, μm), hiperaktivite parametreleri kaydedilmiştir.

Sperma analizinde objektif bilgisayar destekli analiz sistemine geçiş, kullanılan bazı parametrelerin spermatoloji literature girişine neden olmuştur. Bu parametrelerin daha iyi anlaşılması adına sıklıkla kullanılan terimlerin açıklanması gereklidir.

CASA ile yapılan analizde kullanılan kinetik parametreler aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.

1. VCL (Curvilinear Velocity): Eğrisel hız ($\mu\text{m/s}$). Spermatozoon iki boyutlu ortamda eğrisel yolda sahip olduğu hız.
2. VSL (Velocity straight line): Doğrusal hız ($\mu\text{m/s}$). Spermatozoonun hareketine başladığı ilk nokta ile hareketini tamamladığı son nokta arasındaki hızı.

3. VAP (Velocity average path): ortalama yörünge hızı ($\mu\text{m/s}$). Spermatozoonun yörünge üzerinde ki ortalama hızıdır. Bu yolak eğrisel yolun CASA sistemindeki algoritmalarla göre düzleştirilmesi ile hesaplanır.
4. STR (Straightness): Doğrusallık (μm) ($\text{STR} = (\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100$). Spermatozoonun yörüngesi üzerindeki ortalama doğrusal yol.
5. LIN (Linearity): Lineerlik/Çizgisellik (%) ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$. Spermatozoonun 2-boyutlu alanda gösterdiği lineer çizginin 3-boyutlu ortam algoritması ile hesaplanmasıdır. Dairesel hareketi yüksek olan spermatozoanın linearitesi de düşüktür. Yüksek lineariteye sahip spermatozoon ise düşük ALH'ye sahiptir (Mortimer, 1997).
6. ALH (Lateral Head Displacement): Spermatozoon başının ortalama yoldan laterale sapma uzaklığı (μm). Spermatozoon kuyruğunu yaşlaşıp baştan sapma mesafesinin göstergesidir. Baş ve sentriol halkası arasındaki yüzme açısını tanımlamak için kullanılır.
7. BCF (Beat Cross Frequency): Spermatozoon kuyruğunun ritim frekansını tanımlamak için kullanılır.
8. WOB (Wobble): Dalgalanma. $\text{WOB} = (\text{VAP}/\text{VCL}) \times 100$ Spermatozoon yörüngesi üzerinde ilerlerken yaptığı dalgalanma hareketinin ölçüsüdür. Eğrisel gerçekleşen hızın progresivite oranının ölçüsüdür.
9. Hiperaktivite (Hyperactivity): Kapasitasyon öncesinde gözlemlenen kuyruk hareketini tanımlamak için kullanılır ($\text{Hiperaktivite} = \text{VCL} \times \text{ALHX}$). Yüksek ALH ve VCL, düşük LIN ve WOB parametreleri ile ilişkilendirilmiştir. cAMP konsantrasyonu artışı ve Ca^{+} bağımlı bir olaydır.

2.9.2. Ölü-Canlı Spermatozoa SYBR-PI

Sperm örnekleri ölü-canlı kiti (SYBR-14/PI Moleküler Probe: L7011 Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) plazma membran bütünlüğünün analizi için kullanılmıştır. Kit, membrana nüfuz eden nükleik asit boyası SYBR®14 ve geleneksel ölü hücre işaretçisi propidyum iyodür (PI) içermektedir. SYBR-14 çalışma solüsyonu 1:10 oranında DMSO (Applichem A3006) ile sulandırılmıştır. 0,22- μm 'lik Millipore

Millex-GV filtre ile filtre edildikten sonra 30 µl'lik parçalara ayrılarak -20 ° C'de saklanmıştır. PI ml'de 2 mg olacak şekilde distile suda çözündürülerek, 0,22 µm'lik Millipore Millex-GV filtre ile filtre edildikten sonra 30 µl'lik parçalara ayrılarak -20 ° C'de saklanmıştır. Çözdürülen spermalar, 1:2 oranında fosfat buffer saline (PBS) ile sulandırıldıktan sonra 30 µl alınan sperma 6 µl SYBR-14 ve 2.5 µl PI ile karıştırılmıştır (İnanç, 2016).

Nihai sperm okuma konsantrasyonu için örnekler 10×10^5 sperm/ml olarak sulandırılmıştır. Okuma gruplarındaki SYBR-14, PI, PBS, Kontrol (nihai dilüsyonlar) ile toplam 48.5 µl olarak takviye edilmiştir. Kuyucuklu plakalar karıştırma ve karanlıkta 37 ° C'de 10 dakika inkübasyondan sonra 10 µl Hancock solüsyonu fiksasyon için eklenmiştir. Ön görüntüleme yardımıyla hücresel debris, spermatozoa olmayan okumalar çıkartılmıştır. Boyamadan sonra, sağlam hücre zarları olan canlı sperm hücreleri parlak yeşil renkte; buna karşın hasar gören hücre membranları olan hücreler kırmızı renkte işaretlenmiştir. Okumalar numune başına üç replikasyon ile gerçekleştirilmiştir. Canlı (yeşil), ölü (kırmızı) ve moribund (çift boyanmış) spermatozoa FL-1 / FL-3 nokta üzerinde üç adet sperm popülasyonu tespit edilmiştir. 96 kuyucuklu plakalara aktarılacak plaka kapağı kapalı bir şekilde çift yönlü okuma gerçekleştirilmiştir (Gliozzi ve ark., 2017).

2.9.3. Akrozom Bütünlüğü FITC/PNA-PI

Yumurta sarısı içeren sulandırıcılarla yapılan florasen boyamalarında karşılaşılan temel problem, yumurta sarısı parçacıklarının sperm hücrelerine benzer özelliklere sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, intakt akrozoma sahip spermatozoada reaksiyon tetiklenmeden yumurta sarısı partiküllerinin uzaklaştırılması gereklidir. Bu nedenle, bu çalışmanın protokolü, yumurta sarısı partiküllerini tanımlamak için nükleik asit boyası (NAb) acridine orange florasen boya ve sperm olmayan debris (NAb negatif) işaretlenmiş ve okuma prosedüründen çıkarılmıştır (Gliozzi ve ark., 2017).

Sperma akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi için Floresan isosiyanat *Arachis Hypogaea* (peanut) (L7381 FITC-PNA, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, ABD) ve PI boyası Gliozzi ve ark. (2017) protokolünün modifiye edilmesi ile kullanılmıştır. 120 µl FITC-PNA 1 ml PBS'e eklenerek boyama solüsyonu hazırlanmış ve daha sonra filtre edilerek 100 µl'ik bölümlere ayrılarak -20 ° C'de saklanmıştır. Çözdürülen sperma 1:2 oranında PBS ile sulandırılarak, daha sonra 60 µl sulandırılmış spermaya 10 µl FITC-PNA, 2.5 µl PI eklenmiştir (İnanç, 2016).

Nihai sperm okuma konsantrasyonu için örnekler 10×10^5 sperm/ml olarak sulandırılmıştır. Okuma gruplarındaki FITC-PNA, PI, PBS, Kontrol (nihai dilüsyonlar) ile toplam 72.5 µl olarak takviye edilmiştir. Hazırlanan preparat iyice karıştırıldıktan sonra 37 ° C'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Kuyucuklu plakalar karıştırma ve karanlıkta 37 ° C'de 10 dakika inkübasyondan sonra 10 µl Hancock solüsyonu fizyasyon için eklenmiştir. Ön görüntüleme yardımıyla hücresel debris, spermatozoa olmayan okumalar çıkartılmıştır. Boyamadan sonra, FITC-PNA, intact akrozom işaretli (yeşil), PI işaretli ölü sperm hücreleri (kırmızı) olarak okutulmuştur. Okumalar numune başına üç replikasyon ile gerçekleştirilmiştir. DNA içermeyen parçacıkların okumadan çıkarıldıktan sonra, FL-1/FL-3 filtreler yardımıyla dört sperm popülasyonu; ölü-canlı spermatozoa ve intact ve hasarlı akrozom olarak tespit edilmiştir (Gliozzi ve ark., 2017).

2.9.4. Mitokondriyel Aktivite JC-1

Mitokondri, spermatozoonun oosite ulaşması ve penetre etmesi için gereken enerjiyi sağlamaktadır. Yüksek membran potansiyeline (YMP) fonksiyonel bir mitokondriyum lipofilik özelliğe sahip membran bağımlı 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3' tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine iodide bağımlı mitokondride bir birikim sergilemektedir. Stok solüsyon, 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3' tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine iodide (1.53 mM) (T3168 JC-1, Invitrogen) DMSO solüsyonu ile hazırlanmış ve filtre edildikten sonra 100 µl'lik bölümlere ayrılarak -20 ° C'de saklanmıştır. Çözdürülen sperma 1:5 oranında Phosphate buffered saline

(PBS) ile sulandırıldıktan sonra 300 µl sperma 2.5 µl JC-1 ve 2.5 µl PI ile karıştırılmıştır. Hazırlanan preparat iyice karıştırıldıktan sonra, 37 ° C’de 30 dakika inkübe edilmiş ve daha sonra fizyasyon için 10 µl Hancock solüsyonu (İnanç, 2016) ile karıştırılmıştır. Nihai sperm okuma konsantrasyonu için örnekler 10×10^5 sperm/ml olarak sulandırılmıştır. Okuma gruplarındaki JC-1, PI, PBS, Kontrol (nihai dilüsyonlar) ile toplam 315 µl olarak takviye edilmiştir. Ön görüntüleme yardımıyla hücresel debris, spermatozoa olmayan okumalar çıkartılmıştır. YMP (~ 590 nm emisyon, turuncu), DMP (~ 525 nm emisyon, yeşil) olarak işaretlenmiştir. Boyamadan sonra, mitokondrinin olduğu orta kısımda sarı/turuncu florasanın fazla olması YMP, yeşil rengin fazla olması mitokondriyel membran potansiyelinin (MMP) düşük olarak, ölü spermatozoon ise (kırmızı) olarak okutulmuştur. Okumalar numune başına iki replikasyon ile gerçekleştirilmiştir (Gliozzi ve ark., 2017).

2.10. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada ölçümü yapılan tüm değişkenler için tanımlayıcı istatistikler yapılarak Aritmetik Ortalama $\pm$ Standart Hata şeklinde gösterildi. Elde edilen değişkenlerine ait ölçülerin PVA ve doz grupları arası farklılıklarının incelenmesinde, genel doğrusal modelleme tekniğinden yararlanılmıştır. Modelde Grup (PVA 9, PVA 18, PVA 100), Altgrup (0,001; 0,01; 0,1; 1; 2 dozları) temel etkileri ile Grup*Altgrup etkileşim terimlerine yer verilmiştir. Etkileşim terimlerinin anlamlı bulunmadığı durumlarda temel etkilerin çözümlenmesi için ileri aşama testi olarak kontrastlardan ve Tukey testinden yararlanılmıştır. Etkileşim terimlerinin anlamlı bulunduğu durumlar için ise Bonferroni düzeltmesi uygulanarak basit etkiler (simple effects) analizi yapılmıştır. Seksüel deaktivite ile spermatolojik parametreler arasındaki ilişkinin incelenmesinde ise Spearman korelasyon analizinden yararlanılmıştır. Verilerin analizi için SPSS 14.01 (Lisans No: 9869264) paket programından yararlanılmıştır. Tüm istatistiksel kararlarda $P < 0,05$ kriteri dikkate alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. PVA Sitotoksisite ve Nötral Red

Çalışma öncesinde gerçekleştirilen sitotoksisite deneylerinde hücre başına düşen doz 12 kat artırıldığında en yüksek toksisite 1,88 IC 50 değeri ile PVA 100 grubunda izlenmiştir. En düşük toksisite ise PVA 12,3 IC 50 değeri ile PVA 18 grubunda elde edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. PVA Dozları için MTT testi IC 50 Değerleri

MTT	IC 50
PVA 9	2,56
PVA 31	12,3
PVA 100	1,88

Bu oran nötral red canlılık testleri ile de sırasıyla PVA 9, 18 ve 100 grublarında elde edilen 79,51; 56,11; 50,15 değerler ile korelasyon göstermektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak PVA 100'ün hücrede mitokondri ve lizozom etkinliklerinde daha toksik etki gösterdiği söylenebilir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. PVA Dozları için Nötral Red testi değerleri

Neutral red	IC 50
PVA 9	79,51
PVA 31	56,11
PVA 100	50,15

3.2. Bütünleştirilmiş Androlojik Muayene Sistematığı

Çalışmada yer alan 7 birey bütünleştirilmiş androlojik muayene sistematığına göre seçilmiştir. Bu sistematik içerisinde yer alan klasik ve yenilikçi yöntemlere göre elde edilen bulgular sırasıyla; fiziksel muayene, üreme organlarının görüntülenmesi, transrektal digital masaj ve spermanın CASA değerlendirmesidir. Her bir değerlendirme yöntemi sonrasında elde edilen veriler değerlendirilmiş ve bireyler skorlanmıştır.

Uygulanan sistematik skorlama sonuçlarına göre değerlendirilen 24 bireyden 7 teke çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen bireyler (*), sürüden çıkartılan bireyler çizelge 3.6'da (**) farklı kodlama ile işaretlenmiştir.

3.2.1. Fiziksel Muayene ve Ölçümler

Çalışmada kullanılan hayvanların seçiminde BAMS metodu kullanılmıştır. Fiziksel muayene değerleri ve aşım kabiliyeti için ihtiyaç duyulan yapıların skorlaması 24 birey için gerçekleştirilmiştir. Vücut kondisyon skoru (VKS) 2,5-4'ün dışında kalan; fiziksel olarak göz, ayak, bacak ve tırnak yapısında problem olan; eksternal reproduktif yapılardan prepusyum, penis ve skrotumda anormalite bulunan bireyler çalışmadan çıkarılmıştır.

Hayvanlara uygulanan genel muayene değerlerine göre bireylere farklı skorlar verilmiştir. VKS için 0-5 skalası kullanılarak skorlanmıştır. Bu değer bireyler içerisinde en yüksek 3,5, en düşük 1 ve ortalama $2,67 \pm 0,5$ olarak kaydedilmiştir. Skrotal çevre en yüksek 28,8 en düşük 17,3 ve ortalama $23,6 \pm 0,8$ cm olarak ölçülmüştür. Anlık US bulgularına göre testiküler paransimde anormal bir yapı (kalsifikasyon, fibrotik odak ve dejenerasyon) varlığı kontrol edilmiş ve buna göre skorlanmıştır (0-yüksek hiperekoik; 1-Hafif hiperekoik; 2-Normal; 3-Hipoekoik). Testiküler paransim skorlarına göre 3 yüksek, 1 hafif, 2 normal ve 2 hipoekoik birey

görüntülenmiştir. Bütünleştirilmiş androlojik muayene sistematğinde yer alan genel muayene değerlerine ait bulgular Çizelge 3.3’de sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Fiziksel Muayene Değerleri

N	Parametre	X ± Sx
24	Total testiküler hacim mm ³	3459,76 ± 1116,3
24	VKS (0-5)	0,54 ± 0,72
24	Skrotal çevre cm	165,68 ± 21,8
24	USS (0-3)	0,71 ± 0,69

3.2.2. Üreme Organlarının Görüntülenmesi

Testiküler görüntülemelerde elde edilen en yüksek hacim 6794,61 en düşük 2025,27 ve ortalama $3459,76 \pm 1116,3 \text{ mm}^3$ olarak elde edilmiştir (Çizelge 3.4). Total hacim gri indeksi en yüksek 200,2; en düşük 131,29 ve ortalama $165,68 \pm 21,8^{\text{OD}}$ olarak ölçülmüştür. Epididimal hacim ise en yüksek 31285, minimum 12261 ve $13517 \pm 4868,8^{\text{OD}}$ olarak tespit edilmiştir. Ölçülen bu değerlere göre standart sapma hesaplanmış ve ortalama değerden çıkarılarak her bir ölçüm için skor atanmıştır. Sırasıyla ortalama testiküler ve epididimal skorlar ise; $0,71 \pm 0,69$ ve $2 \pm 0,8$ olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.4. Testiküler US Ölçümleri ve Skor Çizelgesi

N	Parametre	X ± Sx
24	Total piksel alanı	$3459,76 \pm 1116,3^{\text{OD}}$
24	Hacim Skoru	$0,54 \pm 0,72$
24	Gri piksel yoğunluğu	$165,68 \pm 21,8^{\text{OD}}$
24	Testiküler Skor	$0,71 \pm 0,69$
24	Epididimal piksel alanı	$13517 \pm 4868,8^{\text{OD}}$
24	Epididimal Skor	$2 \pm 0,8$

Eklenti bezlerinin görüntülenmesinde veziküler ve bulboüretal bezin hacimleri hesaplanmıştır. Buna göre en yüksek veziküler hacim 45668, en düşük 11742 ve ortalama $25758,79 \pm 9802,4$ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.5).

Bulboüretal bez için ise en yüksek 16968, en düşük 6420 ve ortalama $12397,16 \pm 2861,6^{OD}$ olarak belirlenmiştir. Veziküler bez için total hacim gri indeksi en yüksek 191,648, en düşük 138,91 ve ortalama $173,43 \pm 15,1^{OD}$ olarak ölçülmüştür. Bulboüretal bez için ise bu değerler sırasıyla en yüksek 191,19, en düşük 98,72 ve ortalama $148,43 \pm 20,8^{OD}$ olarak bulunmuştur. Ölçülen bu değerlere göre standart sapma hesaplanmış ve ortalama değerden çıkarılarak her bir ölçüm için skor atanmıştır. Sırasıyla ortalama veziküler ve bulboüretal skorlar ise; $0,71 \pm 0,69$ ve $2 \pm 0,8$ olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.5. Eklenti Bezleri US Ölçümleri ve Skor Çizelgesi

N	Parametre	X $\pm$ Sx
24	Veziküler piksel alanı	$25758,79 \pm 9802,4^{OD}$
24	Veziküler Gri Yoğunlukluk	$173,43 \pm 15,1^{OD}$
24	Veziküler Skor	$0,87 \pm 0,6$
24	Bulboüretal piksel alanı	$12397,16 \pm 2861,6^{OD}$
24	Bulboüretal Gri alanı	$148,43 \pm 20,8^{OD}$
24	Bulboüretal Skor	$0,82 \pm 0,7$

Total seçim skoru yukarıdaki çizelge 3.1, 3.2 ve 3.3'den elde edilen total skorların toplamına göre belirlenmiştir. Image-J programında her bir yapı için değerlendirilen 3 alanın ortalamaları, standart sapma değerlerinden çıkartılarak (-3/+3) skalasında skor atanmıştır. Buna göre 24 birey içerisinde 10 birey aday olarak seçilmiştir. Çizelge 3.6'da "3507, 3527, 3574, ve 3543" kulak numaraları ile verilen ve ** kodu ile işaretlenen bireyler sürüden ayrılmalrı nedeniyle çalışmadan çıkarılmıştır.

Çizelge 3.6. Toplam Skor Çizelgesi

N	Kulak No	Toplam Skor
1	3428	3
2	1843	4
3	1866	4
4**	3507*	5
5**	3527*	7
6**	3543	5
7	9980	4
8**	3574	7
9*	8185*	6

Çizelge 3.6. Toplam Skor Çizelgesi Devamı

10*	8181*	6
11	8193	3
12	8218	4
13	3948	4
14*	8186*	7
15*	8228*	2
16*	8230*	4
17	3943	2
18	3583	2
19	5653	2
20	8200	1
21	3896	1
22*	8223*	4
23	3925	3
24	8798	1

3.2.3. Transrektal Digital Masaj (TDM)

TDM uygulanan 16 bireyin 14'ünden başarılı bir şekilde sperma örnekleri alınmıştır. Elde edilen spermatolojik değerler Çizelge 3.7'de özetlenmiştir. Uygulamada (14/16) % 87.5 başarı ile sperma toplanmıştır. Sırasıyla hacim, kitle hareketi, toplam motilite, ejakülasyon süresi ve konsantrasyon $0,64 \pm 0,45$ ml $2,7 \pm 1,4$, % $58,18 \pm 18,73$, $3,4 \pm 1,26$ dk. ve $3,6 \times 10^9 \pm 0,46$ spermatozoa / ml olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.7. Transrektal Digital Masaj ile Alınan Örneklerle ait Spermatolojik Özellikler

N	Parametre	X $\pm$ Sx
16	Uyarım süresi (dk)	$3,4 \pm 1,26$
14	Sperma miktarı (ml)	$0,64 \pm 0,45$
14	Kitle Hareketi (0-5)	$2,7 \pm 1,4$
14	Spermatozoa Yoğunluğu $\times 10^9$	$3,6 \times 10^9 \pm 0,46$
14	Motilite %	$58,18 \pm 18,73$

3.3. Çekirdeklenme

Çekirdeklenme, latent ısı artışı ve toplam donma süre değerleri kaydedilen görüntüler üzerinden incelenmiş ve elde edilen şema Çizelge 3.8’de sunulmuştur. Buna göre; en yüksek çekirdeklenme başlangıç sıcaklıklar A3, B3 ve C3 gruplarında kaydedilmiştir. Çekirdeklenme bitiş sıcakları arasında büyük bir farklılık gözlemlenmemiştir. Buna bağlı olarak latent ısı artış süreleri de en yüksek A3, B3 ve C3 gruplarında sırasıyla; 7, 8 ve 7 sn olarak tespit edilmiştir.

Çekirdeklenme gerçekleşen sıcaklıklara göre sulandırıcı içeriğindeki gliserol konsantrasyonları kademeli olarak düşülmüştür.

Çizelge 3.8. Azalan Gliserol Konsantrasyonlarında Çekirdeklenme, Latent Isı ve Toplam Donma Süre Şeması

GRUP	Doz	Donma ° C	Çekirdeklenme °C	Latent °C	Latent Süre (Sn)
Kontrol	% 5G	-8,7	-3,7	5	4
9 PVA % 0,001	%5 G	-8,7	-3,6	5,1	6
9 PVA %0,01	%5 G	-12,6	-3,9	8,7	7
9 PVA %0,1	% 4 G	-6,8	-3,7	3,1	6
9 PVA %1	% 3 G	-12,3	-3,9	8,4	6
9 PVA %2	%2 G	-10,7	-3,7	7	5
18 PVA %0,001	%5 G	-11,6	-3,5	8,1	6
18 PVA %0,01	%5 G	-12,2	-3,3	8,9	8
18 PVA %0,1	% 4 G	-11,5	-3	8,5	3
18 PVA %1	% 3 G	-12	-3,4	8,6	4
18 PVA %2	% 2 G	-8,5	-3,3	5,2	4
100 PVA % 0,001	% 5 G	-9,8	-3,8	6	5
100 PVA % 0,01	% 5 G	-12	-3,9	8,1	8
100 PVA % 0,1	% 4 G	-9	-3,6	5,4	4
100 PVA % 1	% 3 G	-10,8	-3,7	7,1	6
100 PVA % 2	%2 G	-8,5	-3,4	5,1	6
A9kDa	% 0 G	-9,5	-3,2	6,3	4
B18kDa	% 0 G	-10,5	-2,7	7,8	6
C100kDa	% 0 G	-15,4	-3,5	11,9	5

3.4. Sperma Dondurulabilirliği

Taze ve çözüm sonrası IVOS ile elde edilen veriler Çizelge 3.9’da sunulmuştur. Buna göre çözüm öncesi ve sonrası sırasıyla 9 kDa, 18 kDa ve 100 kDa gruplarına ait ortalama Δ motilite farkları -26,57, -25,66 ve -9,55 ve Δ progressive motilite yüzdeleri sırasıyla -24,71, -21 ve -8,90 olarak bulundu. En düşük ortalama Δ VAP, Δ VSL, Δ VCL değerleri grup PVA 100 kDa ile elde edilmiştir.

Çizelge 3.9. Spermanın Taze (T) ve Çözüm (Ç) Sonrasında IVOS Parametreleri

	N	PVA 9	N	PVA 18	N	PVA 100	$\Delta X \pm Sx$
Motilite ÇS	7	49,86 $\pm$ 3,79	12	57,17 $\pm$ 4,24	11	58 $\pm$ 4,53	-20,59 ^{abc}
Motilite T	7	76,43 $\pm$ 3,68	12	82,83 $\pm$ 2,97	11	67,55 $\pm$ 7,17	
Prog ÇS	7	26,86 $\pm$ 1,96	12	28,83 $\pm$ 2,26	11	31,27 $\pm$ 3,61	-18,2 ^{abc}
Prog T	7	51,57 $\pm$ 5,16	12	49,83 $\pm$ 3,13	11	40,18 $\pm$ 5,94	
VSL Ç	7	97,5 $\pm$ 4,45	12	99 $\pm$ 3,97	11	96,47 $\pm$ 2,5	-2,14
VSL T	7	100,43 $\pm$ 9,98	12	105,58 $\pm$ 3,99	11	93,4 $\pm$ 6,03	
VCL Ç	7	210,47 $\pm$ 2,71	12	218,98 $\pm$ 10,15	11	222,8 $\pm$ 5,55	-10,83
VCL T	7	213,5 $\pm$ 16,46	12	256,03 $\pm$ 12	11	215,22 $\pm$ 10,8	
ALH Ç	7	8,09 $\pm$ 0,31	12	8,71 $\pm$ 0,2	11	8,68 $\pm$ 0,16	0,08 ^{ab}
ALH T	7	7,7 $\pm$ 0,28	12	9,21 $\pm$ 0,33	11	8,32 $\pm$ 0,21	
Beat Ç	7	34,7 $\pm$ 1,4	12	34,37 $\pm$ 1,29	11	32,96 $\pm$ 0,78	2,24
Beat T	7	34,14 $\pm$ 2,46	12	30,63 $\pm$ 1,27	11	30,51 $\pm$ 2,17	
STR Ç	7	80,14 $\pm$ 2,16	12	78,33 $\pm$ 1,53	11	77,36 $\pm$ 0,82	0,84
STR T	7	80,86 $\pm$ 1,4	12	74,92 $\pm$ 1,65	11	77,55 $\pm$ 1,44	
LİN Ç	7	46,43 $\pm$ 1,99	12	44,08 $\pm$ 1,14	11	44,09 $\pm$ 0,67	0,26
LİN T	7	47,57 $\pm$ 1,67	12	42,42 $\pm$ 1,12	11	43,82 $\pm$ 1,25	
Hızlı Ç	7	41 $\pm$ 3,27	12	47,33 $\pm$ 3,7	11	49,82 $\pm$ 4,58	-29,71 ^{abc}
Hızlı T	7	70,71 $\pm$ 4,12	12	79,08 $\pm$ 3,47	11	61,73 $\pm$ 7,39	
Orta Ç	7	7,71 $\pm$ 0,87	12	9,92 $\pm$ 1,08	11	8,36 $\pm$ 0,7	-3,43 ^{abc}
Orta T	7	5,86 $\pm$ 0,77	12	3,92 $\pm$ 0,6	11	5,91 $\pm$ 0,76	
Yavaş Ç	7	10,86 $\pm$ 0,91	12	12 $\pm$ 1,17	11	10,27 $\pm$ 0,98	-4,04 ^{abc}
Yavaş T	7	7,29 $\pm$ 1,21	12	6,08 $\pm$ 1,41	11	7,64 $\pm$ 1,27	

Motilite: Grup: P=0,301; Δ : P<0,001; Grup x Δ : P=0,91

Prog: Grup: P=0,603 Δ : P<0,001 Grup x Δ : P=0,123

ALH: Grup: $P<0,05$ Δ : $P=0,618$ Grup x Δ : $P<0,05$

Hızlı: Grup: $P=0,261$ Δ : $P=<0,001$ Grup x Δ : $P=0,055$

Orta: Grup: $P=0,886$ Δ : $P<0,001$ Grup x Δ : $P=0,076$

Yavaş: Grup: $P=0,995$ Δ : $P<0,001$ Grup x Δ : $0,402$

^{a,b,c}: Aynı sütun ve satırlar arasında farklı harfleri taşıyan ortalama değerler arası fark istatistiksel açıdan önemlidir ($P<0,001$).

3.5. Taze Spermatolojik Parametreler

Çalışma süresince kaydedilen fonksiyonel aşım parametreleri Çizelge 3.10 ve taze spermatolojik özellikler Çizelge 3.11’de sunulmuştur.

Yedi bireyden alınan toplam 75 ejakülate ait ortalama değerler Çizelge 3.10’da sunulmuştur. Libido değeri (Çizelge 2.2’ye göre) en düşük 2, en yüksek 5 ve ortalama olarak $4,18 \pm 0,97$ kaydedilmiştir. Sperma alma süresi açısından maksimum 14, minimum 1 ve ortalama $2,97 \pm 3,22$ gün olarak saptanmıştır. Suni vajene uyumlar (Çizelge 2.2’ye göre) arasında 3-5 aralığında gözlemlenirken, ortalama $4,22 \pm 0,74$ olarak gözlemlenmiştir. Sperma alma sırasındaki suni vajen sıcaklığı maksimum 46, minimum 39 ve ortalama olarak $42,82 \pm 1,13$ ° C olarak ölçülmüştür. Hazırlanma süreleri arasında geniş varyasyonlar kaydedilmiştir. Buna göre en yüksek 212 sn, en düşük 5 sn olarak ölçülmüştür.

Çizelge 3.10. Suni Vajen Uyum Parametrelerinin Ortalamaları

N	Parametre	X $\pm$ Sx
75	Libido (0-5)	$4,18 \pm 0,97$
75	Seksüel Deaktivite (gün)	$2,97 \pm 3,22$
75	Suni Vajene Uyum (1-5)	$4,22 \pm 0,74$
75	Suni Vajen Sıcaklığı (° C)	$42,82 \pm 1,13$
75	Hazırlanma Süresi (sn)	$75,90 \pm 54,75$

Araştırmada kullanılan 7 bireye ait 75 ejakülatın spermatolojik özellikleri Çizelge 3.11’de sunulmuştur. Dereceli sperma kadehine alınan ejakülate ait hacim

değerleri arasında geniş varyasyonlar gözlemlenmiştir. Buna göre en yüksek 2,8 ml, en düşük 0,4 ml ve ortalama $1,13 \pm 0,41$ olarak ölçüldü. Alınan ejakülatların renk skorları kaydedilmiştir. Alınan 75 ejakülate ait $2,08 \pm 0,89$ ortalama değeri krem renk ejakülatı temsil etmiştir. Kıvam için uygulanan skalaya göre spermalar en yüksek 14 sn, en düşük 1 sn ve ortalama $2,14 \pm 0,81$ olarak ölçülmüştür. Kitle hareketi en düşük 1 değerini alırken, en yüksek 5 ve ortalama $3,97 \pm 0,97$ olarak tespit edilmiştir. Subjektif motilite değeri en yüksek 95, en az 40 ve ortalama $82,74 \pm 8,97$ olarak belirlenmiştir. Faz contrast mikroskop yardımıyla spermatozoon progresivitesi de gözlemlenmiştir. Buna göre en yüksek 70, en düşük 10 ve ortalama $82,74 \pm 8,97$ olarak tespit edildi. Accucell fotometre yardımıyla belirlenen en yüksek yoğunluk 10248×10^6 , en düşük 2219×10^6 , ve ortalama $4846,37 \pm 1852,94$ spermatozoon/ml olarak ölçülmüştür. Toplam anormal spermatozoa oranı en yüksek 22, en düşük 3 ve ortalama $7,24 \pm 4,16$ olarak belirlenmiştir. Canlı spermatozoa ise en yüksek 96, en az 60 ve ortalama $88,93 \pm 6,09$ olarak tespit edilmiştir. Casa motilite ve progresivite değerleri ise sırasıyla ortalama $77,86 \pm 12,19$ ve $44,71 \pm 14,33$ olarak, en yüksek 95, en düşük 38 objektif motilite, en yüksek 72, en düşük 14 olarak ölçülmüştür.

Çizelge 3.11. Taze Spermatolojik Özellikler

N	Parametre	X $\pm$ Sx
75	Sperma Miktarı (ml)	$1,13 \pm 0,41$
75	Renk (1-3)	$2,08 \pm 0,89$
75	Kıvam (1-3)	$2,14 \pm 0,81$
75	Kitle (0-5)	$3,97 \pm 0,97$
75	% Subjektif Motilite	$82,74 \pm 8,97$
75	% Progresivite	$40,70 \pm 15,97$
75	Yoğunluk	$4846,37 \pm 1852,94$
75	% Anormal Spermatozoa	$7,24 \pm 4,16$
75	% Canlı Spermatozoa	$88,93 \pm 6,09$
75	% CASA motilite	$77,86 \pm 12,19$
75	% CASA Progresivite	$44,71 \pm 14,33$

Suni vajen uyum testi ve taze spermatolojik özelliklerin çalışma gruplarına göre marjinal dağılımları Çizelge 3.12’de sunulmuştur. Buna göre en yüksek ortalama libido grup A’da $4,27 \pm 1,01$ olarak kaydedilirken, en düşük $4,05 \pm 0,95$ ortalama ile grup B’de gözlemlenmiştir. Seksüel deaktivite süresinin dağılım açısından en yüksek

ortalama $4,43 \pm 4,27$ gün ile grup C’de kaydedilmiştir. Grup A ve C suni vajene benzer uyum gösterirken en düşük ortalama uyum $4,09 \pm 0,68$ ile grup B’de gözlenmiştir. Ortalama suni vajen sıcaklıkları 42-43 derece aralığında ölçülürken, hazırlanma süreleri arasında ise benzer süreler kaydedilmiştir. Sperma miktarlarına bakıldığında grup C’de kullanılan örnekler $1,06 \pm 0,47$ ile düşük ortalama sahip olmuştur. Renk ve kıvam açısından büyük farklılar gözlenmemiş ancak kitle hareketi en yüksek grup A’da izlenmiştir. Bu oran diğer parametreler açısından sırasıyla ortalama subjektif ve casa motilite ve progresivite; $84,53 \pm 6,19$; $42,27 \pm 16,21$; $79,1 \pm 8,66$; $48,47 \pm 13,82$ değerlerinde en yüksek A grubunda elde edilmiştir. En yüksek canlı ve en düşük anormal spermatozoa oranında mikroskopik değerlerle aynı korelasyonu göstermiş ve sırasıyla en yüksek $89,8 \pm 4,85$; ve en düşük $6,63 \pm 3,64$ ortalama ile grup A’da gözlenmiştir.

Çizelge 3.12. Suni Vajen Uyum Testi ve Gruplara göre Taze Spermatolojik Marjinal Dağılım

Parametre	A	X ± Sx	B	X ± Sx	C	X ± Sx
Libido (1-5)	30	$4,27 \pm 1,01$	22	$4,05 \pm 0,95$	23	$4,22 \pm 1$
Seksüel Deaktivite (gün)	30	$2,27 \pm 2,66$	22	$2,41 \pm 2,46$	23	$4,43 \pm 4,27$
Suni Vajene Uyum (1-5)	30	$4,3 \pm 0,79$	22	$4,09 \pm 0,68$	23	$4,26 \pm 0,81$
Suni Vajen Sıcaklığı (° C)	30	$42,73 \pm 1,26$	22	$42,77 \pm 1,07$	23	$43 \pm 1,09$
Hazırlanma Süresi (sn)	30	$75,13 \pm 52,7$	22	$77,91 \pm 66,94$	23	$75 \pm 52,15$
Sperma Miktarı (ml)	30	$1,17 \pm 0,4$	22	$1,16 \pm 0,42$	23	$1,06 \pm 0,47$
Renk (1-3)	30	$2,1 \pm 0,92$	22	$1,95 \pm 0,84$	23	$2,17 \pm 0,94$
Kıvam (1-3)	30	$2,17 \pm 0,83$	22	$2,18 \pm 0,8$	23	$2,09 \pm 0,85$
Kitle (0-5)	29	$4,21 \pm 0,77$	22	$3,73 \pm 1,08$	23	$3,91 \pm 1,16$
% Subjektif Motilite	30	$84,53 \pm 6,19$	22	$82,73 \pm 7,83$	23	$80,43 \pm 12,33$
% Subjektif Progresivite	30	$42,27 \pm 16,21$	22	$41,14 \pm 14,95$	23	$38,26 \pm 17,03$
Yoğunluk x 10 ⁹	30	$4,7 \pm 1719,35$	22	$4,5 \pm 1894,18$	23	$5,14 \pm 1972,61$
% Anormal Spermatozoa	30	$6,63 \pm 3,64$	22	$7,18 \pm 4,23$	23	$8,09 \pm 4,75$
% Canlı Spermatozoa	30	$89,8 \pm 4,85$	22	$89,41 \pm 5$	23	$87,35 \pm 8,13$
% CASA motilite	30	$79,1 \pm 8,66$	22	$78,5 \pm 11,31$	22	$74,73 \pm 16,96$
% CASA Progresivite	30	$48,47 \pm 13,82$	22	$44,68 \pm 13,26$	22	$39,64 \pm 15,94$

Çalışmada suni vajen ile sperma alma süreleri ve taze spermatolojik özellikler kaydedilmiştir. Buna göre sperm alma sıklığının spermatolojik parametreler üzerine olan etkisi Çizelge 3.13’de özetlenmiştir. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde sperma alma sıklığının spermatozoa yoğunluğu ile direk ilişkili olduğu ($P<0,001$), motilite ve diğer spermatolojik değerler açısından ise orta derece önem arz ettiğini ($P<0,05$), anormal ve canlı spermatozoa bakımından ise önemsiz olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.13. Seksüel Deaktivitenin Spermatolojik Parametreler Etkisi

Parametre	Gün	Motilite	Progresif Subjektif	Yoğunluk	Anormal	Canlı	CASA	CASA prog
Gün	1							
Motil	-0,023**	1						
Progresif	-0,034*	-,572***	1					
Yoğunluk	,385***	-0,059**	0,058	1				
Anormal	0,135 ^{OD}	-0,630***	-,474***	-0,004 ^{OD}	1			
Canlı	-0,08 ^{OD}	0,771**	,414**	-0,025 ^{OD}	-,609**	1		
CASA	-361**	0,102 ^{OD}	,261*	-0,167 ^{OD}	-,277*	0,195 ^{OD}	1	
CASApog	-382**	0,202 ^{OD}	,332**	-0,219 ^{OD}	-,299**	0,169 ^{OD}	,776**	1
	0,001	0,084	0,004	0,06	0,01	0,15	0	

*** 0,001 seviyesinde korelasyonu temsil etmektedir.

** 0,01 seviyesinde korelasyonu temsil etmektedir.

* 0,05 seviyesinde korelasyonu temsil etmektedir.

^{OD} önemsiz değer.

3.6. Çözüm Sonrası Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Çalışma süresince 3 farklı PVA grubu A, B ve C olmak üzere, 6 alt gruba ait dondurulmuş sperm örneklerinden (A= PVA 9 kDa; B= PVA 18 kDa; C= PVA 100 kDa) motilite için 1 adet olmak üzere toplam 466 payet çözdürülmüştür. Spermatozoa motilitesi ve kinetik parametreleri (spermatozoa motilitesi %, progresif motilite %, VCL $\mu\text{m/s}$, VSL $\mu\text{m/s}$, VAP $\mu\text{m/s}$, % LIN, % STR, ALH, BCF, % WOB, % hiperaktivite) olarak kaydedilmiştir. Ölü-Canlı spermatozoa oranı (%), akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi (%), mitokondriyel aktivasyonun değerlendirilmesi (%) için sperma tankı içerisinde örnekler randomize olarak seçilmiştir. Herbir parametrenin değerlendirilmesi için her bir ana grup için ortalama 20, toplamda 60 payet kullanılmıştır.

3.6.1. CASA Motilite ve Progresivite Değerleri

PVA'ün 3 ana çalışma grubu PVA 9 kDa, 18 kDa ve 100 kDa ve biri kontrol olmak üzere 6 alt çalışma grubuna ait dondurulan payetlerden elde edilen çözüm sonu SCA motilite ve progresif spermatozoa yüzdeleri sonuçları Çizelge 3.14 ve 3.15'de verilmiştir.

Çalışmada kullanılan farklı PVA konsantrasyonlarının çözündürme sonrası motilite sonuçlarının kontrole göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan farklı PVA 9, 18 ve 100 türevlerine göre $61,097 \pm 0,99$; $64,183 \pm 1,36$; $61,718 \pm 1,37$ olarak elde edilmiştir. Bu değerler kontrole göre ($60,91 \pm 1,75$) istatistiksel olarak daha anlamlı tespit edilmiştir ($P < 0,001$). En yüksek çözüm sonu motilite PVA 18'de bulunmuştur ($P < 0,001$). PVA gruplarının farklı dozlarından elde edilen çözüm sonu motiliteler sonucunda kontrole göre $60,39 \pm 2,06$; $64,96 \pm 2,59$; $57,4 \pm 4,08$ sırasıyla % 0,001; 0,01 ve % 0,1 (PVA 100 % 0,1 hariç) fark istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir ($P < 0,001$). PVA'ün alt gruplarından bağımsız olarak en yüksek motilite değeri PVA 18 kDa ile elde edilmiştir ($P < 0,001$). Alt gruplar arasında değerlendirildiğinde ise en yüksek değer PVA 18 kDa % 0,1'de $67,72 \pm 3,06$ olarak tespit edilmiştir. Doz grup ilişkisine göre ise en yüksek PVA 18 kDa 0,01 grubunda $66,68 \pm 1,75$ olarak bulunmuştur ($P < 0,001$).

Çizelge 3.14. SCA ile Analiz Edilen Örneklerle Ait Çözüm Sonu Motilite Sonuçları

Alt Grup	N	PVA 9	N	PVA 18	N	PVA 100	X $\pm$ Sx
K	38	$60,39 \pm 2,06$	21	$64,96 \pm 2,59$	20	$57,4 \pm 4,08$	$60,91 \pm 1,75^{ab}$
% 0,001	38	$64,42 \pm 2,72$	20	$66,5 \pm 3,72$	19	$65,92 \pm 3,41$	$65,61 \pm 1,79^a$
% 0,01	38	$65,15 \pm 2,26$	20	$67,22 \pm 3,43$	21	$67,69 \pm 2,7$	$66,68 \pm 1,75^a$
% 0,1	37	$61,32 \pm 1,9$	20	$67,72 \pm 3,06$	19	$56,96 \pm 3,24$	$62 \pm 1,79^{ab}$
% 1	37	$58,99 \pm 2,46$	20	$61,67 \pm 3,58$	20	$61,77 \pm 2,95$	$60,81 \pm 1,77^{ab}$
% 2	37	$56,32 \pm 2,72$	19	$57,02 \pm 4,3$	20	$60,57 \pm 3,97$	$57,96 \pm 1,79^b$

X ± Sx	61,09 ± 0,99 ^a	64,18 ± 1,36 ^b	61,71 ± 1,37 ^a
--------	---------------------------	---------------------------	---------------------------

Grup: P=0,183; Alt Grup: P=0,005; Grup x Altgrup: P=0,738

^{a,b,c}: Aynı sütun ve satırlar arasında farklı harfleri taşıyan ortalama değerler arası fark istatistiksel açıdan önemlidir (P<0,001).

Çizelge 3.15. SCA ile Analiz Edilen Örneklere Ait Çözüm Sonu Progresivite Sonuçları (Progresivite Değerleri x 100)

Alt Grup	N	PVA 9	N	PVA 18	N	PVA 100	X ± Sx
K	38	0,14 ± 0,01	21	0,14 ± 0,02	20	0,13 ± 0,03	0,13 ± 0,009
% 0,001	38	0,14 ± 0,01	20	0,12 ± 0,01	19	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,01
% 0,01	38	0,16 ± 0,01	20	0,12 ± 0,01	21	0,17 ± 0,03	0,14 ± 0,009
% 0,1	37	0,16 ± 0,02	20	0,14 ± 0,02	19	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,01
% 1	37	0,14 ± 0,01	20	0,11 ± 0,01	20	0,16 ± 0,02	0,13 ± 0,01
% 2	37	0,13 ± 0,01	19	0,11 ± 0,01	20	0,15 ± 0,03	0,13 ± 0,01
X ± Sx		0,144 ± 0,005 ^a		0,122 ± 0,007 ^b		0,143 ± 0,007 ^a	

Grup: P=0,039; Alt Grup: P=0,816; Grup x Altgrup: P=0,6

^{a,b,c}: Aynı sütun ve satırlar arasında farklı harfleri taşıyan ortalama değerler arası fark istatistiksel açıdan önemlidir (P<0,001).

3.6.2. CASA Kinetik Parametreler

Çözüm sonu spermatozoa kinetik değerleri Çizelge 3.16’da “Kinetik parameter ortalamalarının gruplara ve farklı dozlara göre marjinal dağılımları”, Çizelge 3.17’de “Alt gruplara ait dozların çözüm sonu kinetik parameter ortalamaları” ve çizelge 3.18’de “Dozlardan bağımsız olarak PVA grupları arası motilite ve kinetik parametre ortalamalarının karşılaştırılması” olarak özetlenmiştir.

Çizelge 3.16. Kinetik Parametre Ortalamalarının Gruplara ve Farklı Dozlara göre Marjinal Dağılımları

Parametre	Alt Grup	N	PVA 9	N	PVA 18	N	PVA 100
	K	38	117,93 ± 1,79	21	108,83 ± 3,46	20	111,18 ± 2,73
	% 0,001	38	117,63 ± 1,69	20	115,59 ± 4,17	19	116,14 ± 2,64
	%0,01	38	115,71 ± 1,68	20	112,47 ± 3,66	21	108,49 ± 3,92
VCL	% 0,1	37	110,69 ± 2,66	20	115,29 ± 3,92	19	112,83 ± 2,27
	% 1	37	112,3 ± 2,27	20	109,68 ± 3,53	20	111,28 ± 2,28
	% 2	37	108,7 ± 1,81	19	104,61 ± 5,49	20	113,63 ± 2,72
VSL	K	38	64,35 ± 2,36	21	59,38 ± 3,46	20	52,45 ± 3,42

% 0,001	38	67,55 ± 1,68	20	61,27 ± 2,68	19	55,25 ± 2,43
---------	----	--------------	----	--------------	----	--------------

Çizelge 3.16. Kinetik Parametre Ortalamalarının Gruplara ve Farklı Dozlara göre Marjinal Dağılımları Devamı

	%0,01	38	67,4 ± 2,22	20	60,36 ± 2,9	21	56,08 ± 3,04
	% 0,1	37	68,41 ± 2,38	20	64,5 ± 3,26	19	60,46 ± 3,65
	% 1	37	66,47 ± 2,41	20	61,25 ± 3,17	20	59,84 ± 2,36
	% 2	37	62,87 ± 2,51	19	57,06 ± 3,2	20	57,65 ± 3,4
	K	38	95,51 ± 2,69	21	88,07 ± 4,14	20	80,58 ± 3,52
VAP	% 0,001	38	99,41 ± 2,16	20	92,66 ± 3,76	19	86,09 ± 2,44
	%0,01	38	97,59 ± 2,46	20	90,37 ± 3,85	21	82,49 ± 3,88
	% 0,1	37	96,05 ± 2,89	20	94,75 ± 3,82	19	88,1 ± 3,62
	% 1	37	96,25 ± 2,97	20	90,83 ± 4,24	20	84,63 ± 2,65
	% 2	37	92,01 ± 2,57	19	85,56 ± 4	20	83,55 ± 3,37
	K	38	54,53 ± 1,78	21	54,41 ± 2,6	20	46,99 ± 2,69
LİN	% 0,001	38	57,59 ± 1,33	20	53,12 ± 1,77	19	47,86 ± 2,16
	%0,01	38	58,06 ± 1,58	20	53,54 ± 1,81	21	51,42 ± 1,64
	% 0,1	37	61,56 ± 1,49	20	55,87 ± 2,15	19	53,38 ± 2,9
	% 1	37	58,92 ± 1,61	20	55,53 ± 2,04	20	53,8 ± 1,83
	% 2	37	57,68 ± 1,99	19	55,64 ± 2,29	20	50,29 ± 2,3
	K	38	67,13 ± 1,24	21	66,83 ± 1,2	20	64,29 ± 2,36
STR	% 0,001	38	67,94 ± 0,78	20	65,98 ± 0,85	19	63,99 ± 1,86
	%0,01	38	68,65 ± 0,94	20	66,53 ± 0,86	21	67,74 ± 1,51
	% 0,1	37	71 ± 0,97	20	67,69 ± 1,3	19	67,77 ± 2,25
	% 1	37	68,77 ± 0,95	20	67,15 ± 0,94	20	70,7 ± 1,8
	% 2	37	67,63 ± 1,29	19	66,61 ± 1,6	20	68,34 ± 2,45
	K	38	80,7 ± 1,67	21	80,64 ± 2,62	20	72,2 ± 2,14
WOB	% 0,001	38	84,6 ± 1,49	20	80,16 ± 1,82	19	74,3 ± 1,63
	%0,01	38	84,23 ± 1,64	20	80,1 ± 1,86	21	75,76 ± 1,5
	% 0,1	37	86,58 ± 1,67	20	82,15 ± 2,13	19	77,84 ± 2,45
	% 1	37	85,33 ± 1,64	20	82,29 ± 2,17	20	76,09 ± 1,85
	% 2	37	84,5 ± 1,78	19	83 ± 1,94	20	73,21 ± 1,82
	K	38	7,14 ± 0,27	21	7,56 ± 0,29	20	7,87 ± 0,26
BCF	% 0,001	38	6,84 ± 0,26	20	8,05 ± 0,36	19	7,56 ± 0,24
	%0,01	38	6,91 ± 0,23	20	7,6 ± 0,29	21	7,82 ± 0,27
	% 0,1	37	7,08 ± 0,28	20	7,54 ± 0,28	19	8,45 ± 0,24
	% 1	37	6,77 ± 0,24	20	7,5 ± 0,26	20	8,15 ± 0,23
	% 2	37	7,01 ± 0,21	19	6,63 ± 0,4	20	7,66 ± 0,32
	K	38	5,17 ± 0,14	21	5,15 ± 0,16	20	5,12 ± 0,13
ALH	% 0,001	38	5,16 ± 0,1	20	5,37 ± 0,12	19	5,51 ± 0,11
	%0,01	38	5,21 ± 0,11	20	5,55 ± 0,1	21	5,14 ± 0,14
	% 0,1	37	4,96 ± 0,1	20	5,33 ± 0,11	19	5,23 ± 0,11
	% 1	37	5,09 ± 0,12	20	5,34 ± 0,09	20	5,29 ± 0,12
	% 2	37	4,97 ± 0,11	19	4,97 ± 0,31	20	5,52 ± 0,13
	K	38	9,4 ± 0,94	21	11,18 ± 1,08	20	11,69 ± 1,86
Hiper	% 0,001	38	12,76 ± 1,31	20	12,38 ± 1,49	19	11,95 ± 1,75
	%0,01	38	11,6 ± 0,79	20	10,59 ± 1,06	21	16,21 ± 2,62
	% 0,1	37	11,08 ± 1,12	20	11,61 ± 1,41	19	9,94 ± 0,93
	% 1	37	9,88 ± 1,1	20	9,22 ± 0,96	20	12,95 ± 2,15
	% 2	37	9,4 ± 1,06	19	8,74 ± 0,89	20	12,02 ± 2,48

Alt grup etkileşimleri: VCL: P=0,063; VSL: P=0,148; VAP: P=0,179; LİN: P=0,03; STR: P=0,04; WOB: P=0,135; ALH: P=0,352; BCF: P=0,256 Hiper: P=0,109.

^{a,b,c}: Aynı sütun ve satırlar arasında farklı harfleri taşıyan ortalama değerler arası fark istatistiksel açıdan önemlidir (P<0,05).

Çizelge 3.17. Alt Gruplara Ait Dozların Çözüm Sonu Kinetik Parametre Ortalamaları

Parametre	Alt Grup	N	X ± Sx
VCL	K	79	112,64 ± 1,65
	% 0,001	79	116,45 ± 1,69
	%0,01	79	112,22 ± 1,65
	% 0,1	79	112,93 ± 1,69
	% 1	79	111,08 ± 1,67
	% 2	79	108,98 ± 1,69
VSL	K	79	58,73 ± 1,63
	% 0,001	79	61,35 ± 1,66
	%0,01	79	61,27 ± 1,63
	% 0,1	79	64,45 ± 1,66
	% 1	79	62,51 ± 1,65
	% 2	79	59,19 ± 1,66
VAP	K	79	88,05 ± 1,90
	% 0,001	79	92,72 ± 1,94
	%0,01	79	90,14 ± 1,90
	% 0,1	79	92,96 ± 1,94
	% 1	79	90,57 ± 1,92
	% 2	79	87,04 ± 1,94
LİN	K	79	51,97 ± 1,16 ^b
	% 0,001	79	52,85 ± 1,19 ^{ab}
	%0,01	79	54,34 ± 1,16 ^{ab}
	% 0,1	79	56,93 ± 1,19 ^a
	% 1	79	56,08 ± 1,18 ^{ab}
	% 2	79	54,53 ± 1,19 ^{ab}
STR	K	79	66,08 ± 0,81 ^b
	% 0,001	79	65,97 ± 0,83 ^b
	%0,01	79	67,63 ± 0,81 ^{ab}
	% 0,1	79	68,82 ± 0,83 ^a
	% 1	79	68,87 ± 0,82 ^a
	% 2	79	67,52 ± 0,83 ^{ab}
WOB	K	79	77,84 ± 1,12
	% 0,001	79	79,68 ± 1,14
	%0,01	79	80,02 ± 1,12
	% 0,1	79	82,19 ± 1,14
	% 1	79	81,23 ± 1,13
	% 2	79	80,23 ± 1,14
BCF	K	79	7,52 ± 0,16
	% 0,001	79	7,48 ± 0,16
	%0,01	79	7,44 ± 0,16
	% 0,1	79	7,69 ± 0,17
	% 1	79	7,47 ± 0,16
	% 2	79	7,09 ± 0,17
ALH	K	79	5,14 ± 0,07
	% 0,001	79	5,34 ± 0,08
	%0,01	79	5,29 ± 0,07
	% 0,1	79	5,17 ± 0,08
	% 1	79	5,24 ± 0,07
	% 2	79	5,15 ± 0,08
Hiper	K	79	10,75 ± 0,82
	% 0,001	79	12,36 ± 0,84
	%0,01	79	12,8 ± 0,82
	% 0,1	79	10,87 ± 0,84
	% 1	79	10,68 ± 0,83
	% 2	79	10,05 ± 0,84

Grup etkileşimleri: LİN: P=0,001; STR: P=0,05

^{a,b,c}: Aynı sütun arasında farklı harfleri taşıyan ortalama değerler arası fark istatistiksel açıdan önemlidir (P<0,001).

Çizelge 3.18. Dozlardan Bağımsız olarak PVA Grupları Arası Motilite ve Kinetik Parametre Ortalamalarının ($\bar{X} \pm S_x$) Karşılaştırılması

Parametre	N	PVA 9	N	PVA 18	N	PVA 100
Motilite	225	61,09 $\pm$ 0,99 ^a	120	64,18 $\pm$ 1,36 ^b	119	61,71 $\pm$ 1,37 ^a
Progresivite	225	0,14 $\pm$ 0,005 ^a	120	0,12 $\pm$ 0,007 ^b	119	0,14 $\pm$ 0,007 ^a
VCL	225	113,82 $\pm$ 0,94	120	111,07 $\pm$ 1,28	119	112,25 $\pm$ 1,29
VSL	225	66,17 $\pm$ 0,926 ^a	120	60,63 $\pm$ 1,269 ^b	119	60,63 $\pm$ 1,269 ^b
VAP	225	96,13 $\pm$ 1,082 ^a	120	90,37 $\pm$ 1,482 ^b	119	84,24 $\pm$ 1,488 ^c
LİN	225	58,05 $\pm$ 0,6 ^a	120	54,68 $\pm$ 0,9 ^b	119	50,62 $\pm$ 0,9 ^c
STR	225	68,52 $\pm$ 0,46	120	66,79 $\pm$ 0,63	119	67,14 $\pm$ 0,63
WOB	225	84,32 $\pm$ 0,63 ^a	120	81,39 $\pm$ 0,87 ^b	119	74,89 $\pm$ 0,87 ^c
BCF	225	6,95 $\pm$ 0,09 ^c	120	7,48 $\pm$ 0,12 ^b	119	7,92 $\pm$ 0,13 ^a
ALH	225	5,09 $\pm$ 0,04 ^b	120	5,28 $\pm$ 0,06 ^a	119	5,30 $\pm$ 0,06 ^a
Hiper	225	10,68 $\pm$ 0,46 ^b	120	10,61 $\pm$ 0,64 ^b	119	12,45 $\pm$ 0,64 ^a

^{a,b,c}: Aynı sütun ve satırlar arasında farklı harfleri taşıyan ortalama değerler arası fark istatistiksel açıdan önemlidir (P<0,001).

3.6.3. Canlı Spermatozoa Oranı (SYBR-PI)

Canlı Spermatozoa (SYBR-PI) oranlarına ait sonuçlar Çizelge 3,19'da verilmiştir. Buna göre PVA'ün grup (P=0,964) ve alt grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir (P=0,953). Bunun yanında grup doz etkileşimi açısından da herhangi bir farklılık saptanmamıştır (P=0,998).

Çizelge 3.19. Çözüm Sonu Gruplara göre Canlı Spermatozoa Değerleri

	N	PVA 9	N	PVA 18	N	PVA 100	$\bar{X} \pm S_x$
K	23	82,51 $\pm$ 2,36	17	85,58 $\pm$ 2,29	20	82,86 $\pm$ 2,34	83,65 $\pm$ 1,54
% 0,001	23	83,82 $\pm$ 1,63	17	82,74 $\pm$ 3,65	20	83,36 $\pm$ 2,27	83,30 $\pm$ 1,54
% 0,01	23	83,34 $\pm$ 2,32	17	83,59 $\pm$ 2,65	20	82,03 $\pm$ 2,46	82,98 $\pm$ 1,54
% 0,1	23	80,45 $\pm$ 3,3	17	82,97 $\pm$ 2,72	20	83,03 $\pm$ 2,38	82,14 $\pm$ 1,54
% 1	23	80,61 $\pm$ 2,75	17	83,32 $\pm$ 2,77	20	82,27 $\pm$ 2,73	82,06 $\pm$ 1,54
% 2	23	82,31 $\pm$ 2,51	17	82,51 $\pm$ 3,12	20	81 $\pm$ 3,15	81,93 $\pm$ 1,54
$\bar{X} \pm S_x$		82,175 $\pm$ 1,01		83,453 $\pm$ 1,175		82,424 $\pm$ 1,083	

Grup: P=0,694; Alt Grup: P=0,953; Grup x Altgrup: P=0,998

^{a,b,c}: Aynı sütun ve satırlar arasında farklı harfleri taşıyan ortalama değerler arası fark istatistiksel açıdan önemlidir (P<0,001).

3.6.4. Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi (FITC-PNA)

İntakt akrozom bütünlüğü açısından değerlendirildiğinde; en yüksek akrozom bütünlüğü PVA'ın 9 kDa % 0,001 grubunda $87,18 \pm 1,11$ olarak elde edilmiştir (Çizelge 3.20). Gruplar arasında gerçekleştirilen değerlendirmeye göre de en yüksek oran diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (P<0,001). Grup doz ilişkisi bakımından ise en yüksek oran daha düşük konsantrasyonda kullanılan % 0,001 grubunda $85,76 \pm 0,83$ olarak tespit edilmiştir (P<0,002).

Çizelge 3.20. Gruplar Arası Çözüm Sonu İntakt Akrozom Değerleri.

	N	PVA 9	N	PVA 18	N	PVA 100	X $\pm$ Sx
K	22	$82,2 \pm 1,05$	19	$76,64 \pm 2,27$	19	$78,5 \pm 1,06$	$79,11 \pm 0,83^{bc}$
% 0,001	22	$87,18 \pm 1,11$	19	$84,22 \pm 0,86$	19	$85,89 \pm 1,12$	$85,76 \pm 0,83^a$
% 0,01	22	$84,66 \pm 1,1$	19	$80,76 \pm 1,21$	19	$82,02 \pm 0,73$	$82,47 \pm 0,83^{ab}$
% 0,1	22	$81,21 \pm 1,31$	19	$80,99 \pm 1,18$	19	$81,03 \pm 1,19$	$81,07 \pm 0,83^b$
% 1	22	$77,51 \pm 1,58$	19	$77,49 \pm 1,66$	19	$75,04 \pm 2,22$	$76,68 \pm 0,83^c$
% 2	22	$78,59 \pm 1,77$	19	$75,73 \pm 1,82$	19	$74,77 \pm 1,61$	$76,36 \pm 0,83^c$
X $\pm$ Sx		$81,891 \pm 0,56^a$		$79,304 \pm 0,60^b$		$79,544 \pm 0,60^b$	

Grup: P=0,002; Alt Grup: P=0,001; Grup x Altgrup: P=0,665

^{a,b,c}: Aynı sütun ve satırlar arasında farklı harfleri taşıyan ortalama değerler arası fark istatistiksel açıdan önemlidir (P<0,001).

3.6.5. Mitokondriyel Aktivite Oranı (JC-1)

Mitokondriyel aktiviteler incelendiğinde, en yüksek çözüm sonu mitokondriyel aktivite $73,09 \pm 21,8$ ile PVA 9 kDa % 0,001 grubunda (Çizelge 3.21) elde edilmiş ve diğer tüm alt gruplara oranla istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur (P<0,001).

Gruplar arası değerler bakıldığında ise en yüksek aktivite $56,15 \pm 9,78$ ile % 0,001 gruplarında elde edilmiştir ($P<0,05$).

Çizelge 3.21. Gruplar Arası Çözüm Sonu Mitokondriyel Aktivasyon Değerleri.

	N	PVA 9	N	PVA 18	N	PVA 100	X $\pm$ Sx
K	10	100 $\pm$ 0	10	100 $\pm$ 0	9	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 9,78 ^a
0,001	10	73,09 $\pm$ 21,8	10	43,15 $\pm$ 10,67	9	52,22 $\pm$ 15,84	56,15 $\pm$ 9,78 ^b
0,01	10	32,82 $\pm$ 21,68	10	28,13 $\pm$ 11,98	9	27,45 $\pm$ 19,59	29,46 $\pm$ 9,78 ^{bc}
0,1	10	29,14 $\pm$ 21,42	10	20,73 $\pm$ 13,7	9	13,96 $\pm$ 24,82	21,27 $\pm$ 9,78 ^{bc}
1	10	22,17 $\pm$ 19,48	10	15,12 $\pm$ 17,29	9	15,41 $\pm$ 18,37	17,56 $\pm$ 9,78 ^{bc}
2	10	15,43 $\pm$ 22,55	10	8,94 $\pm$ 16,29	9	5,7 $\pm$ 16,9	10,02 $\pm$ 9,78 ^c
X $\pm$ Sx		45,44 $\pm$ 6,79 ^a		36,01 $\pm$ 6,79 ^b		35,79 $\pm$ 7,16 ^b	

Grup: $P=0,526$; Alt Grup: $P=0,001$; Grup x Altgrup: $P=0,998$

^{a,b,c}: Aynı sütun ve satırlar arasında farklı harfleri taşıyan ortalama değerler arası fark istatistiksel açıdan önemlidir ($P<0,001$).

4. TARTIŞMA

Keçilerde dondurma protokollerinin iyileştirilmesi amacıyla birçok araştırmacı tarafından çeşitli sulandırıcı (Leboeuf ve ark., 2000; Mara ve ark., 2007 ve Kulaksız, 2014), farklı türlerin yumurta sarısı (Chauhan ve Anand, 1990 ve Kulaksız ve ark., 2010), kriyoprotektan (Tırpan ve Tekin, 2015), lipitler, antioksidanlar (İnanç ve Uysal, 2016, Uysal ve Bucak, 2007 ve Ateşşahin ve ark., 2008), kriyoprotektan ekleme-çıkarma (Memon ve ark., 1985), dondurma hızları (Salamon ve Ritar, 1982) ve yöntemi (Gacitua ve Arav, 2005) çekirdeklenme sıcaklığı (Ritar, 1990) çalışması gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında reproduksiyon alanında sperma alma yöntemleri, androlojik muayene sistematikleri, damızlık hayvan seçim kriterleri, yardımcı üreme teknikleri, bilgisayar destekli sperma muayene yöntemleri ve farklı cihazlar yardımıyla spermatolojik parametrelerin değerlendirilmesi konuları ilgi görmüştür.

Kriyoprezervasyon işlemi, spermatozoonun ejakülasyon sonrası olgunlaşma ve fertilizasyona doğru ilerleme sürecindeki yapay bir kesintiye uğramasını temsil etmektedir. Bugüne kadarki en iyi koruma teknikleriyle bile, kriyoprezervasyon işlemi, spermatozoada hasarlara neden olmaktadır. Bu yapay kesintiyi bireylerin sahip olduğu sperm kalitesi de önemli bir şekilde etkilemektedir. Bu yüzden sperması dondurulacak bireylerin dondurma işlemi öncesinde, spermatolojik testlerine de önem verilmelidir. Yukarıda belirtilen çalışmalarda kriyoprezervasyon, fertilite üzerindeki etkilerini sperm membranları, hücre iskeleti, flagellar hareket aparatı ve DNA ile hücre metabolizmasını etkileyerek gösterdiği bildirilmektedir. Ayrıca, dondurma ve takibindeki çözündürme işlemleri, geriye kalan canlı spermatozoayı, kriyoprezervasyon öncesi spermatozoadan fizyolojik olarak daha farklı kılmaktadır. Spermatozoa, *in vivo* ve *in vitro* ortamındaki her türlü strese karşı çok hassas hale gelmektedir. Bunun sonucu olarak, dondurulmuş spermadan elde edilen fertilite, taze spermadan elde edilene göre daha düşüktür. Bu nedenle, spermatozoanın çözüm sonu kalitesinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi için, dondurma öncesi koşulların da objektif bir muayenesi gerekmektedir. Suni tohumlama endüstrisinin, dondurulmuş spermanın

fertilizasyon kapasitesi hakkında bilgi edinebilmesi açısından bu konu büyük önem taşımaktadır.

Spermanın ortam sıcaklığında depolanması tek başına spermatozoanın fertilitasını önemli ölçüde düşürmemekte, ancak depolamanın potansiyel süresini sınırlamakta, bu nedenle uzun vadeli saklama için sıvı azotta -196 ° C'de kriyoprezervasyon gerekmektedir. Kritik sıcaklık aralığındaki dondurma hızları, kriyoprezervasyon işlemi sırasında çok önemlidir. Çünkü bu durum, spermatozoanın kendi hücre dışı ortamlarıyla dengede kalabileceğini veya gittikçe aşırı soğuyarak hücre içi buz oluşumu ihtimalinin artmasını belirlemektedir (Kumar ve ark., 2003). Yavaş soğutma sırasında, spermatozoa dehidrasyonu en fazla, intraselüler ve ekstraselüler boşluk arasındaki ozmotik denge noktasına kadar ve sıklıkla da zararlı olan hücresel dehidrasyona kadar ilerleyebilmektedir. Ancak, soğutma oranının çok fazla yükseltilmesi, yavaş dehidrasyondan ötürü hücre içi buz oluşumunu engellememektedir. Bu nedenle, spermatozoanın canlı kalabilmesi optimum soğuma oranına bağlıdır. Optimal soğutma oranı ile hücre içi çözünenlerin konsantrasyonunun aşırı artışı ve hücre içi dehidrasyon azaltılmakta ve böylece sperm hücrelerinin aşırı büzülmesinin önüne geçilmektedir. Bununla birlikte, optimum soğutma oranlarında dahi, spermatozoa, kısa bir süre boyunca olumsuz koşullara karşı savunmasız kalmaktadır (Woelders, 1997).

Dondurma sırasında oluşan donma hasarına karşı koruma sağlamak için KKA kullanılmaktadır. KAA'ların kücre membranlarından makul derecede hızlı bir şekilde geçebilmek için düşük moleküler ağırlıkta "Hücre içi" KKA'lar (hiKKA'lar) ve daha yüksek moleküler ağırlıktaki "Hücre dışı" KKA'lar (hdKKA'lar) olarak sınıflandırılmaktadırlar. En yaygın kullanılan hiKKA'lar dimetil sülfoksit, etilen glikol, gliserol ve propilen glikoldür. Ancak bunların dışında farklı hiKKA'lar da tanımlanmıştır (Fahy, 2015)

Nispeten yeni bir kriyoprotektan tipi, buz veya buzla çekirdekleştirici ajanlar ile spesifik etkileşime girme yeteneğine sahip bir AFP ve AF(G)P ve sentetik türevi PVA tanımlanmıştır (Deller ve ark., 2014). Bu moleküller, buz kristallerinin yüzeyine

adsorbe edebilen ve sıcaklık, buzun termodinamik erime noktasının altına düştüğü zaman bile bu buz kristallerinin büyümelerini önleyen proteinlerdir (Carpenter ve Hansen, 2002 ve Devries ve Wohlschlag, 1969). Yukarıda bahsi geçen gliserol ve diğer türevleri gibi yüksek hidrofilik özelliğe sahip, düşük moleküler ağırlıkta, BKİ'ni, DBŞ ve TH özelliği tespit edilen bir PVA sentetik polimerin kan hücresi dondurmada yüksek etkinliği keşfedilmiştir (Deller ve ark., 2014).

Kullanılan farklı moleküler ağırlıkta PVA'lerin, sulandırıcı çekirdeklenme sıcaklığını değiştirmeden (DBŞ, TH ve BKİ özellikleri ile) gliserole ek kriyoprotektif olarak kullanılabilirliği, tez çalışmasının hipotezini oluşturmaktadır.

Araştırmada farklı konsantrasyonlarda gliserole ek olarak kullanılan PVA 9, 18 ve 100 kDa konsantrasyonlarının çözüm sonu motilite ve diğer spermatolojik özellikler bakımından yakın bulunması; PVA'nın BKİ, TH ve DBŞ özellikleri açısından etkilediğini göstermektedir. Ancak bu etkiyi ağırlıklı olarak TH ve BKİ özelliği ile gösterdiği düşünülmektedir. Çekirdeklenme görüntülenmesi sırasında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde en iyi çözüm sonu motilite kontrol grubuna göre ($60,91 \pm 1,75$) sırasıyla PVA % 0,001; 0,01; 0,1; 1 ve 2 için $65,61 \pm 1,79$; $66,68 \pm 1,75$; $62 \pm 1,79$; $60,81 \pm 1,77$; $57,96 \pm 1,79$ olarak tespit edilmiştir ($P < 0,001$). Gruplar içerisinde PVA 9 kDa, 18 kDa ve 100 kDa'nın % 0,01'lik konsantrasyonunun kullanımının çekirdeklenme sıcaklığını değiştirmeden latent ısı artış süresini uzattığı gözlemlenmiştir. Ancak çalışmanın 2 temel çıkarımı ise; % 3 gliserol ve % 2 PVA kullanımının % 5 gliserol içeren kontrol grubuna yakın ($60,91 \pm 1,75 \approx 57,96 \pm 1,79$) çözüm sonu motilite değerine sahip olması ve kullanılan farklı PVA gruplarında STR ve LİN değerlerinin yüksek çıkması olarak gösterilebilir. Canlı spermatozoa (SYBR-PI) oranlarına ait sonuçlar Çizelge 3,19'da verilmiştir. Buna göre PVA'nın grup ($P=0,964$) ve alt grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($P=0,953$). Araştırmada kullanılan farklı PVA konsantrasyonlarının spermatozoa canlılığı üzerine olumsuz bir etki göstermezken, çözüm sonu spontan akrozom reaksiyonunu da herhangi bir grupta indüklememiştir ($P > 0,001$). Mitokondriyel aktiviteler incelendiğinde ise, çözüm sonu en yüksek aktivite $56,15 \pm 9,78$ ile % 0,001 gruplarında elde edilmiştir ($P < 0,001$). PVA

gruplarında ise bu oran en yüksek PVA 9 kDa grubunda $73,09 \pm 21,8$ olarak gözlemlenmiştir ($P<0,05$). Motilite değerlerinin ana grup sonuçlarında kontrole oranla yüksek olması ($\sim \% 1-2$) ve PVA 18 ve 100 % 0,01 grubunda ($\sim \% 7$), kinetik parametrelerden STR ve LIN yüksek olması ile progresivite sağlaması, bununla birlikte canlı spermatozoa ve intakt akrozom değerlerinde görülen yüksek membran koruma özelliği nedeniyle kriyoprotektanlara PVA eklenmemesinin sperma sulandırıcı kompozisyonuna bir alternatif sunabileceği kanaatine varılmıştır.

Çalışmada kullanılan farklı sperma alma yöntemleri açısından TDM yönteminin, Suni Vajen (SV) yöntemine önemli bir alternatif olacağı tespit edilmiştir. TDM yönteminin etkinliğinin gösterilmesi amacıyla 16 bireyden alınan sperma örneklerine ait spermatolojik özellikler Çizelge 3.7’de verilmiştir. Çalışmada, TDM uygulanan 16 bireyden 14’ünde (14/16) % 87.5 oranında başarılı bir şekilde sperma elde edilebilmiştir. Sırasıyla hacim, kitle hareketi, toplam motilite, ejakülasyon süresi ve konsantrasyon $0,64 \pm 0,45$ ml; $2,71 \pm 0,4$; $58,18 \pm 18,73$ $3,41 \pm 1,26$ dk ve $3,68 \pm 0,46 \times 10^9$ / ml olarak belirlenmiştir. Abril-Sanchez ve ark. (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışma ile karşılaştırıldığında sperma hacmi benzer, kitle hareketi ve motilite düşük, konsantrasyon ise yüksek bulunmuştur.

TDM yöntemi ile tekelerde (Abril-Sanchez ve ark., 2017) ve farklı hayvan türlerinde gerçekleştirilmiş bazı çalışmalar bulunmaktadır (Schmitt ve Hildebrandt, 1998; Palmer ve ark., 2005; Sylla ve ark., 2015 ve Ibrahim ve ark., 2016). Ancak yukarıda bahsi geçen çalışmaların hiçbiri bu araştırmada kullanılan yöntemle örtüşmemektedir. Bu çalışmalarda kullanılan yöntem farklılıkları ve değişik türlerde gerçekleştirilmesi nedeniyle karşılaştırmalar subjektif değerlendirilmiştir. Kurulan metodolojiye en yakın çalışma, Abril-Sanchez ve ark. (2017) tarafından gerçekleştirilen tekelerin eklenti bezleri US yardımıyla görüntülenmesi ve prob yardımıyla ampullaya masaj yöntemidir. Elde edilen sonuçlar EE yöntemiyle karşılaştırılmıştır ve bu yönteminin, EE yöntemine göre daha etkin olduğu bildirilmiştir. EE ile ejakülasyon için ihtiyaç duyulan elektiriksel stimülasyonun daha yüksek ($P<0,00001$) ve kortizol seviyesinde artışa neden olduğu ($P<0,04$), ancak spermatolojik özellikler bakımından bir farklılık gözlemlenmediği bildirilmiştir.

Tekelerden sperma almak için pratikte kullanılan 2 yöntem tanımlanmıştır. Bunlardan ilki ve sıklıkla kullanılanı SV yöntemidir (Palmer ve ark., 2005). Diğer yöntem ise EE yöntemidir. EE ile spermanın alınması hayvan refahı nedeniyle tartışma konusu haline gelmiştir (Palmer ve ark., 2005). SV ile sperma alımı, EE ile karşılaştırıldığında daha fazla tercih edilen bir yöntemdir. Bununla birlikte, SV'yi kullanmak belirli bir alıştırma süresi gerektirir ve androlojik muayenede anlık uygulaması sınırlıdır. Bunun yanında, EE ile alınan sperma kalitesi SV alınan spermden farklıdır (Giuliano ve ark., 2008 ve Marco-Jimenez ve ark., 2005); spermatolojik kalitesi düşük (Santiago-Moreno ve ark., 2011) ve pH'sı yüksek (Griboni ve ark., 2017 ve Ungerfeld ve ark., 2016) ve daha fazla miktarda seminal plazma içermektedir. Dondurma-çözdürme sonrasında da spermatolojik kalitesi daha düşüktür (Ungerfeld ve ark., 2016 ve Freitas-De-Melo ve ark., 2017). Bunların yanında görülen diğer bir problem de EE uygulaması sırasında ürinasyon ile spermanın kontamine olmasıdır (Palmer ve ark., 2005). Bu çalışmada, Ankara keçilerinden TDM kullanılarak daha iyi kalitede, ürinasyon indüklenmeden ve diğer çalışmalara oranla daha yüksek konsantrasyonda sperma alınmıştır. Bu prosedür düşük libido, ayak hastalıkları ve ereksiyon yeteneği olmayan durumlarda tercih edilebilir. Bununla birlikte, TDM ile ilgili Ankara keçilerinde herhangi bir çalışma rapor edilmemiştir. TDM yöntemi, SV, EE ve testiküler aspirasyona gerek kalmadan, Ankara keçilerinde TDM ile sperma alma, bu çalışma ile bildirilen ilk orjinal yöntemdir.

Çalışma süresince SV yardımıyla alınan spermaların spermatolojik örneklerine bakıldığında 7 bireye ait 75 ejakülatın hacim değerleri arasında geniş varyasyonlar gözlemlenmiştir. Buna göre en yüksek 2,8 ml, en düşük 0,4 ml ve ortalama $1,13 \pm 0,41$ ml olarak ölçülmüştür. Alınan ejakülatların renk skorları kaydedilmiştir. Alınan 75 ejakülate ait $2,08 \pm 0,89$ ortalama değeri krem renk ejakülatı temsil etmiştir. Kıvam için uygulanan skalaya göre spermalar en yüksek 14 sn, en düşük 1 sn ve ortalama $2,14 \pm 0,81$ olarak ölçülmüştür. Kitle hareketi en düşük 1 değerini alırken, en yüksek 5 ve ortalama $3,97 \pm 0,97$ olarak tespit edilirken, subjektif motilite değeri en yüksek 95, en az 40 ve ortalama $82,74 \pm 8,97$ olarak belirlenmiştir. Faz kontrast mikroskop yardımıyla spermatozoon progresivitesi de değerlendirilmiştir. Buna göre en yüksek 70, en düşük 10 ve ortalama $82,74 \pm 8,97$ olarak tespit edilmiştir. Accucell fotometre

yardımıyla belirlenen en yüksek yoğunluk 10248×10^6 , en düşük 2219×10^6 , ve ortalama $4846,37 \pm 1852,94$ spermatozoon/ml olarak ölçülmüştür. Toplam anormal spermatozoa oranı en yüksek 22, en düşük 3 ve ortalama $7,24 \pm 4,16$ olarak belirlenmiştir. Canlı spermatozoa ise en yüksek 96, en az 60 ve ortalama $\% 88,93 \pm 6,09$ olarak tespit edilmiştir. Casa motilite ve progresivite değerleri ise sırasıyla ortalama $77,86 \pm 12,19$ ve $44,71 \pm 14,33$ olarak, en yüksek 95, en düşük 38 objektif motilite, en yüksek 72, en düşük 14 olarak ölçülmüştür. Genellikle bu ölçekte gerçekleştirilen çalışmalarda bireysel farklılıkların göz ardı edilebilmesi için sperm örnekleri birleştirilir (Ateşşahin ve ark., 2008). Birçok araştırmacı “pooling” sonrasında herhangi bir negative etki gözlemlememiştir (Ateşşahin ve ark., İnanc, 2016 ve Kulaksız ve ark., 2011). Ancak çalışmada bireysel olarak sperm dondurulabilirliğinin ortaya konulabilmesi için örnekler bireysel olarak dondurulmuştur. Ankara keçilerinde gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen bazı spermatolojik değerler benzerlik göstermektedir (Salamon ve Ritar, 1982; Ritar ve Salamon, 1983; Ritar ve ark., 1992; Daşkın ve Tekin, 1996; Ateşşahin ve ark., 2008 ve Bucak ve ark., 2009). Ancak Accucell fotometre ile ölçümü gerçekleştirilen spermatozoa yoğunluğu diğer araştırmacıların hemasitometrik yöntem ile ölçülen değerlerin yüksek bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar arasındaki geniş varyasyon, sulandırıcıda kullanılan PVA partiküllerinden etkilenmiş olabilir. Bu yüzden, spermatozoa yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla teke spesifik formülün yeniden değerlendirilmesi ve farklı sulandırıcılar ile elde edilen sonuçlara göre kalibrasyonun gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Sperma dondurulabilirliği ile ilgili çözüm öncesi ve sonrası delta (Δ) farklar ortaya konulmuştur. Buna göre çözüm öncesi ve sonrası sırasıyla 9 kDa, 18 kDa ve 100 kDa gruplarına ait ortalama Δ motilite farkları -26,57, -25,66 ve -9,55 ve Δ progresif motilite yüzdeleri sırasıyla -24,71, -21 ve -8,90 olarak bulunmuştur. En düşük ortalama Δ VAP, Δ VSL, Δ VCL değerleri grup PVA 100 kDa ile elde edilmiştir. Üreme sistemi organlarının (Testis-TEST, Epididimis-EPY, Veziküler-VG ve Bulbüretral-BUB bez) US tarafından görüntülenmesi ve Image-J programı ile piksel yoğunluğunun değerlendirilmesi ile sperma kalitesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Regresyon testine göre sağ ve sol testis arasında testiküler dejenerasyon

indeksi (TDİ) açısından sırasıyla $1.6 \pm 0,5$ ve 2 ± 1 olan genel bir anlamlı fark ($P < 0,05$) vardır. Dondurma prosedürüne bağlı olarak en yüksek hareket kaybı (% 30,9) ve canlılık spermatozoa kaybı (% 26), TDİ yüksek olan bireyler üzerinde tespit edilmiştir. Testiküler paraneşime ait hacim, PGY ve alan arasında yüksek ilişki düzeyi ($P < 0,05$) tespit edilmiştir. Ayrıca, testiküler ve EPY alanları, ejakülat hacmi ve EPY-Piksel gri yoğunluğu (PGY), BUB PGY arasında yüksek ilişki saptanmıştır ($P < 0,05$). Yüksek PGY düzeyleri motilite açısından kötü sperm kalitesiyle ilişkili görünmektedir.

Sperm parametreleri ile PGY arasındaki korelasyon düşük ve genellikle farklı çalışmalarda çelişkili olduğundan, bu sonuçların yorumlanması zor olmuştur (Kastelic ve Brito, 2012 ve Tomlinson ve ark., 2017). Bununla birlikte, cinsel olarak aktif, aşım kabiliyetindeki hayvanların TDİ'sindeki değişimi açıklamak zordur. Daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak, TDİ herhangi bir anda sperma parametreleriyle korelasyona sahiptir. Buna rağmen, Tomlinson ve ark. (2017)'ye göre, bu uygulama herhangi bir zamanda alınan sperma örnekleri ile testiküler parankimin birkaç hafta sonrasında alınan ejakülasyon değerleri ile korelasyon göstermemesi nedeniyle sperma kalitesiyle ilişkilendirilemeyeceği görüşünü belirtmiştir.

Ancak, US ile üreme organlarının görüntülenmesi BAMS'ın küçük geviş getiren hayvanlarda uygulanmasına yönelik yüksek etki yaratacak yenilikçi bir teknolojiyi temsil etmektedir. TDİ ve PGY skorumlama yöntemleri, pratik kullanıma adapte edilerek sperm kalitesi değerlendirmesi ve sperma dondurulabilirliği için faydalı tanı araçları olarak geliştirilebilir. Spermanın dondurulması bir dizi ardışık basamak içerir ve bu basamaklardan her biri sperma çözüm sonu kaliteyi etkilemektedir. Buna rağmen, çalışmalar sıklıkla kriyoprotektan seçimi ve soğutma hızı gibi birkaç ana aşamaya odaklanırlar. Dondurma öncesi koşullar, çeşitli faktörler arasındaki etkileşimler, çözünme sonrası kriyoprotektanların uzaklaştırılması ve ekilibasyon gibi diğer faktörler nadiren incelenmiştir. Buna ek olarak, erkek/bireysel varyasyon literatürde yaygın olarak bilinmektedir (Leibo ve Bradley, 1999 ve Holt, 2000); Kötü dondurabilirliğe sahip bireylerin çözündürme sonrasındaki sperma kalitesi mevcut sperm kriyoprezervasyon teknikleri için en büyük sorunu teşkil etmektedir.

Dong ve ark. (2005) bir sperm tolerans modeli önermiş ve kriyoprezervasyona dar toleranslı (zayıf dondurucular) bireylerin protokoller arasında daha dar bir aralık barındırabileceğini ve sistematik prosedür optimizasyonundan en çok fayda sağlayacağını önermiştir. Bu durumdan bağımsız olarak, spermelerin zayıf dondurulabilirliğe sahip olduğu ejakülatlarda, kriyoprezervasyon koşullarının iyileştirilmesinin spermatozoa'nın dondurulabilirliğini geliştirdiği, domuz sperm kriyoprezervasyonu ile ilgili son araştırmalarla bağımsız olarak doğrulanmıştır (Hernandez ve ark., 2007).

Sperm kriyoprezervasyonu en hızlı ilerlemeyi boğa alanında elde etmiştir. Bu türlerin spermatozoasının dondurulmasında uzun yıllardır seleksiyon uygulanmaktadır. Boğalar projeny test ve genomik seleksiyon yöntemleri ile sperma istasyonlarına aday olarak seçilmektedir. Ancak burada en dikkat çekici olan; bireylerin uzun yıllardır uygulanan, son seçim kriteri olarak spermasının yüksek dondurulabilirliğe sahip olmasıdır (Vishwanath, 2003). Uzun yıllardır spermanın dondurulmasında farklı kriyoprezervasyon yöntemleri uygulanmış ve pratik olarak suni tohumlama uygulaması için gereken çözüm sonu motilite oranlarına ulaşılmıştır. Bu türlerde, suni tohumlama veya IVF'i takiben elde edilen başarı oranları, çoğunlukla, yeterli düzeydedir. Bu nedenle, bazı istisnalar dışında, kriyoprezervasyon işlemini takiben canlı kalma oranını belirleyen temel kriyobiyolojik özellikler gözardı edilmiştir. Ancak, teke spermasının pratik uygulamasında çözüm sonu fonksiyonel spermatozoa oranları hala relatif olarak düşüktür (Holt, 1997).

Artık suni tohumlama merkezlerine alınacak aday seçiminde sperma kalitesini gösteren ultrason, termal görüntüleme (Arteaga ve ark., 2005; Vencato ve ark., 2014 ve Daşkın ve ark., 2015) ve genomik seleksiyon (a-actinins, ACTN1 and ACTN4, and c-actin, ACTG2) yöntemleri geliştirilmiştir (Wimmers ve ark., 2005). Tomlinson ve ark. (2017) yılında yaptıkları çalışmada testiküler paranzim piksel yoğunluğu ile sperma kalitesini karşılaştırmış ve yüksek miktarda testiküler fibrozis ve dejenerasyona sahip bireylerin sperma kalitesinin düşük olduğunu bildirmiştir ($P < 0,001$). Bunun yanında uygulanan muayene sistematığı ile oligozoospermik olan

bireylerde erken tanı olasılığını artırdığı bildirilmiştir (Arteaga ve ark., 2005; Kastelic, 2014 ve Tomlinson ve ark., 2017).

Sperma dondurmada kullanılan sulandırıcıların donma noktaları ve çekirdeklenme sıcaklıklarının çözüm sonu parametrelere etkileri araştırmacılar tarafından genellikle önemsiz kabul edilmiştir. Dışarıdan çekirdeklenme gerçekleştirilmediği sürece % 5-7 gliserol varlığında sperma sulandırıcıları -15 ° C'ye (yani donma noktasının çok altına) hızlı bir şekilde soğumaktadır. Çalışmada farklı PVA konsantrasyonlarının çekirdeklenme sıcaklığını değiştirmedeği gözlemlenmiştir. Ancak donma sıcaklığını düşürdüğü ve buna bağlı olarak latent ısı artışını minimize ettiği gözlemlenmiştir. Aynı zamanda toplam donma süreleri de buna bağlı olarak göreceli bir şekilde azalma göstermiştir.

Çalışmada en yüksek çekirdeklenme başlangıç sıcaklıkları A3, B3 ve C3 gruplarında kaydedilmiştir. Çekirdeklenme bitiş sıcaklıkları arasında büyük bir farklılık gözlemlenmemiştir. Buna bağlı olarak latent ısı artış süreleri en yüksek A3, B3 ve C3 gruplarında sırasıyla; 7, 8 ve 7 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen verilere paralel olarak, Watson (1995), gerçekleştirdiği çalışmada donma sırasında oluşan yüksek ısı artışının spermaya zararlı olabileceği görüşünü ortaya koymuştur. Dondurulan numunenin sıcaklığının, latent kristalleşme geliştikçe donma noktasına yakın bir hızda hızla sıcaklık yükselir. Örnekler, kontrollü bir dondurucuda, numune soğutma 'rampası' sıcaklığına döndüğünde, latent ısı dağılmasının hemen ardından çok hızlı bir soğutma fazı verir. Bu noktada, hücresel buz çekirdeği oluşumu spermatozoa canlılığı açısından tehlike oluşturmaktadır (Watson, 1995). Bununla birlikte, bazı araştırmacılar çekirdeklenme sıcaklığının dışarıdan indüklenmesinin göreceli bir avantaj sağladığını bildirmiş (Critser ve ark., 1987 ve Critser ve ark., 1988), diğerleri ise herhangi bir avantajı olmadığını öne sürmüştür (Watson ve Martin 1975 ve Fiser ve ark., 1991). Ritar ve ark. (1990), ise önceden soğutulmuş tel ızgaraların yada delikli plakaların kullanımında, payete sadece 2 noktada metal ile temas ettiklerinde çözüm sonu değerlerinin daha yüksek olduğunu bildirmiştir.

Soğuk şoku sonucu spermatozoondaki hasarının derecesi, sadece sıcaklıktaki düşüşe bağlı değil, aynı zamanda bu düşüşün hızına da bağlıdır. Daha sonra yapılan motilite değerlendirmesi ile sıcaklık düşüş hızı için 0-5 ° C aralığının en kritik aralık olduğu bulunmuştur. Dikkatle kontrol edilen bir dizi deneyde, -9 ° C'nin altında çekirdeklendirilmiş numunelerde daha düşük canlılık elde edilmiştir. Bu durumu doğrular şekilde -5 ° C ile -7.5 ° C arasındaki daha yüksek sıfırın altındaki sıcaklıklarda çekirdeklenme sağlanması daha yüksek canlılık ile sonuçlanmıştır (Özkavukçu ve Erdemli, 2002). Genel olarak, soğutma hızı ne kadar hızlıysa, hasar o kadar ağır olmaktadır (Kayser, 1990). Sıcaklık düşüş oranının, spermatozoanın sonraki aktif ömrünü de belirlediğini gösteren daha ileri kanıtlar mevcuttur (Andrabi, 2007). Dondurulmuş spermatozoa, çözündürme işlemi sırasında ultra-mikroskopik buz kristallerinin daha büyük buz kristallerini oluşturmak için yeniden kristalleştirilmesine bağlı olarak daha ileri derecede hasar almaktadır (Watson, 1995 ve Woelders, 1997). Farklı PVA dozlarına alınan cevaplar bakımından PVA kullanımının sperma dondurma sırasında oluşan hasarı, latent ısı artışındaki süreyi uzatarak gösterdiği kanaatine varılmıştır.

Çalışmada kullanılan farklı PVA konsantrasyonlarının çözüm sonrası motilite sonuçlarının kontrole göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan farklı PVA 9, 18 ve 100 kDa türevlerine göre $61,097 \pm 0,99$; $64,183 \pm 1,36$; $61,718 \pm 1,37$ olarak elde edilmiştir. Bu değerler kontrole göre ($60,91 \pm 1,75$) istatistiksel olarak daha yüksek tespit edilmiştir ($P < 0,001$). En yüksek çözüm sonu motilite PVA 18'de bulunmuştur ($P < 0,001$). PVA gruplarının farklı dozlarından elde edilen çözüm sonu motiliteler kontrole göre $60,39 \pm 2,06$; $64,96 \pm 2,59$; $57,4 \pm 4,08$ sırasıyla % 0,001; 0,01 ve % 0,1 (PVA 100 % 0,1 hariç) istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Doz gruplarında daha yüksek çözüm sonu motilite sonuçları elde edilmiştir ($P < 0,001$). PVA'nın sperma dondurulması üzerine etkisini çalışan çok az sayıda araştırmacı bulunmaktadır. Schmehl ve ark. (1986), koç spermasının dondurulmasında gliserole ek olarak 17 farklı maddenin çözüm sonu spermatolojik etkileri üzerine gerçekleştirdikleri çalışmada; gliserol ve yumurta sarısına ek olarak PVA kullanımının çözüm sonu motilite oranlarını artırdığı bildirilmiştir ($P < 0,05$). Buna benzer şekilde, Asada ve ark. (2002) in vitro mature edilmiş sığır oositlerinin vitrifikasyonunda %

0,05, 0,1, 0,5, ve 1 PVA kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada; vitrifikasyon sonrası en yüksek morulaya ulaşan embriyo oranını % 0,1 (% 18,8) PVA takviyeli vitrifikasyon solüsyonunda elde etmiştir. Buna ek olarak % 0,1 PVA ile takviye edilmiş vitrifikasyon solüsyonunda, oosit morula gelişim evresi oranının (% 7,7), % 0,05 ve % 1 PVA'ye göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuştur ($P<0,05$). Bununla birlikte, PVA ilavesinin olumlu etkisi blastosist gelişim aşamasında gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak, % 0,1 PVA eklenmesinin, normal vitrifikasyon solüsyonlarından daha yüksek oranda morula evresine ulaşan embriyolar elde edilebileceğini ve *in vitro* vitrifikasyon için medyumlar içerisinde fetal buzağı serumunun yerini alabileceğini önermiştir.

Risopatron ve ark. (2002) köpek spermasının *in vitro* inkübasyonu için hücre kültürü medyum (TCM-199), sperm kültür medyum (Sp-TALP) ve insan tübüler sıvısına, % 1, 4 ve 6 sığır serum albumin (BSA) veya % 0,8 PVA ilavesinin spermatozoa akrozom membranı, motilite ve canlılığı üzerine etkisini incelemişlerdir. Albumin ve PVA kullanımının spermatolojik parametreler üzerinde olumlu etkiler gösterdiğini ($P<0,05$), kontrol grubunda $52,5 \pm 0,8$ ve % 3 PVA'de $64,5 \pm 1,0$ motilite sonuçları elde ederek göstermiştir. Bununla birlikte spermatozoa canlılığında kontrole oranla % 22,2 daha yüksek canlı spermatozoa ve % 18 daha yüksek akrozomal bütünlük elde etmiştir. Çalışma bulguları ile karşılaştırıldığında benzer bulgular elde edilmiştir. Buna göre spermanın *in vitro* manipulasyonlar için kısa süreli saklanması da dış ortam medyum olarak kullanılabileceği önerilebilir.

AFP ve AF(G)P'nin sentetik bir polimeri kabul edilen PVA'ye örnek olarak çok az sayıda çalışma da AFP ve AF(G)P'nin spermatozoanın dondurma üzerine etkisini araştırmıştır. Özellikle koç sperması üzerinde Payne ve ark. (1994), hem AFP I hem de AF(G)P 1-8'in, AFP-1'in 10 µg/mL test edilen yüksek konsantrasyonda kullanımı hariç dondurma öncesi motiliteyi düşürdüğünü, 0,1 µg/mL kadar konsantrasyonlarda bile sitotoksik etki göstererek çözüm sonrası motiliteyi azalttığını bildirmiştir. Bununla birlikte sitotoksositeye bağlı olarak 10 µg/ml konsantrasyonda sadece AFP, hareketli spermelerin motilitesini kontrole göre önemli derecede arttırmıştır ($P < 0,05$). Araştırmacı bu proteinlerin dondurma ve çözündürme sonrası spermatozoa hareketleri

üzerindeki etkisini açıklayan mekanizmalar önermiştir. Bu bağlamda, PVA'nın % 0,01 ve % 0,001 gruplarında kontrole göre çözüm sonu spermatozoa mitokondriyel etkinliği ve hiperaktivite artışı ($P<0,001$) bazı sitotoksik etkileride tartışmaya açmaktadır.

Çalışma öncesinde gerçekleştirilen sitotoksikite deneylerinde hücre başına düşen doz 12 kat artırıldığında en yüksek toksisite 1,88 IC 50 değeri ile PVA 100 grubunda izlenmiştir. En düşük toksisite ise PVA 12,3 IC 50 değeri ile PVA 18 grubunda elde edilmiştir. Bu oran nötral red canlılık testleri ile de sırasıyla PVA 9, 18 ve 100 gruplarında elde edilen 79,51; 56,11; 50,15 değerleri ile korelasyon göstermektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak PVA 100'nün hücrede mitokondri ve lizozom etkinliklerinde daha toksik etki gösterdiği söylenebilir. Ancak çözüm sonu kinetik parametreler ile karşılaştırıldığında toksik etki varlığını düşündürecek parametrelerden hiperaktivite kontrole (0,057) göre düşük, STR ($P<0001$) ve LİN ($P<0,05$) değerleri ise istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($P<0001$). Bu durum % 2 G içeren sulandırıcı grubu ile de korelasyon göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar belkide azalan gliserol konsantrasyonunun toksik etkisinin azalması veya vizkozitedeki düşüşten kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Prathalingam ve ark (2006) tarafından boğa spermatozoası dondurmada sulandırıcıya ek olarak AFP-I, AFP-III ve AF(G)P'nin kullanılan konsantrasyonlardan bağımsız olarak (0,1 $\mu\text{g/mL}$ –100 $\mu\text{g/mL}$) her bir kriyoprotektan ilavesinden orta çapta bir fayda sağlandığı gözlemlenmiştir. Beirao ve ark. (2012) balık spermatozoasında da AFP-I ve AFP-III ilavesi ile pozitif bir etki sağlandığını bildirilmiştir.

Araştırmada PVA'nın % 0,01 ve 0,001 gruplarının kontrole göre çözüm sonu motilite ve progresivite parametreleri daha yüksek bulunmuştur ($P<0,001$). Bu sonuçlar, Schmehl ve ark. (1989), Payne ve ark. (1994) koç ve Prathalingam ve ark. (2006) tarafından boğa spermatozoasında elde edilen relatif olumlu sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Ancak Payne ve ark. (1994) tarafından önerildiği üzere, elde edilen çözüm sonu mitokondriyel aktivite ve hiperaktivitede (% 0,01 hariç) ki artışın sitotoksik bir membran hasarına bağlı olabileceği düşünülebilir. ATP, cAMP ve membran bağlayıcı lipid proteinlerinin fosforilasyonu sonucunda membran

permeabilitesinin iki katına çıkarılabildiği bildirilmiş ve buna bağlı olarak Ca çıkışı gerçekleşmekte ve hiperaktivasyon indüklenmektedir (Yurdakök ve ark., 2017). Bu hipotezin aksi, çalışmamızda; çözüm sonu farklı PVA konsantrasyonları arasında STR ve LİN değerlerinin kontrole oranla daha yüksek bulunması olarak gösterilebilir. Farklı PVA konsantrasyonlarında % 0,001; 0,01; 0,1; 1 ve 2 sırasıyla; $52,85 \pm 1,19$; $54,34 \pm 1,16$; $56,93 \pm 1,19$; $56,08 \pm 1,18$; $54,53 \pm 1,19$ olarak kontrole göre $51,97 \pm 1,16$ daha yüksek LİN elde edilmiştir ($P < 0,001$). Bunun yanında STR değerleri de (% 0,01 benzer) aynı pozitif korelasyonu göstermiştir ($P < 0,001$).

Nükleus, akrozom, flagellum, mitokondri ve plazma membranı, spermatozanın en önemli bölgeleridir ve çözüm sonu sperma muayenesinde değerlendirilmelidir. Bu çeşitli bölümleri değerlendirmek için geliştirilen bir dizi laboratuvar testi, spermatozoal disfonksiyonun nedeninin daha iyi tespit edilmesine yardımcı olur ve böylece laboratuvara dayalı sperma değerlendirmesi tahmini değerlere nispeten daha doğru seviyeye yükseltilmektedir. Mitokondriyel fonksiyon, flagellar yapı, plazma membran bütünlüğünü ve akrozom bütünlüğünün test edilmesi halihazırda rutin muayene yöntemleri arasına girmiştir (Graham ve Moce, 2005; Gravance ve ark, 2001 ve Thomas ve ark., 1998).

Çalışmada elde edilen canlı spermatozoa açısından farklı PVA türevleri ve doz grupları arasında bir istatistiksel bir farklılık gözlemlenmiştir ($P > 0,694$; 0,953). Canlı spermatozoa oranları PVA 9, 18 ve 100 kDa için sırasıyla $82,17 \pm 1,01$; $83,453 \pm 1,175$; $82,424 \pm 1,083$ olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar motilite sonuçları ile pozitif korelasyon göstermesine karşın, elde edilen CASA değerlerine göre nispeten yüksek bulunmuştur. Ancak bu veriler Risopatron ve ark. (2002) tarafından köpek spermatozoasının kısa süreli inkübasyonu için gerçekleştirilen çalışmanın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Araştırmada PVA konsantrasyonun spermatozoa canlılığı üzerine negatif etki gözlemlenmemiştir. Bu özelliği bakımından, PVA kullanımının membran stabilizasyonunu sağlayarak çözüm sonu daha yüksek membran koruma özelliğine sahip olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca kullanılan farklı PVA konsantrasyonları

bakımından benzer sonuçlar elde edilmesi, spermatozoa için yüksek toksisiteye sahip olmadığını ve sperm canlılığının korunması için sulandırıcı bileşeni olarak azalan gliserol konsantrasyonlarına karşı PVA kullanımının esansiyel olması gerektiğini, bu ve diğer araştırmacıların sonuçları ışığında önerebiliriz (Bavister, 1981; Uto ve Yamahama, 1996 ve Risopatron ve ark., 2002).

Hamsterlarda Bavister (1981) tarafından yapılan in vitro çalışmada PVA'nın akrozom bütünlüğünü koruduğu belirtilmektedir. Araştırmamızda farklı PVA gruplarında çözüm sonu spontan akrozom reaksiyonunu indüklememiştir ($P>0,001$) tekrar. Grup ve doz etkisinden bağımsız olarak intakt akrozom oranları PVA 9, 18 ve 100 kDa için sırasıyla; $10,83 \pm 0,92$; $12 \pm 1,02$; $10,97 \pm 0,97$ olarak tespit edilmiştir ($P>0,659$; $0,975$). Yapılan çalışma sonrasında PVA kullanımının çözüm sonrası intakt akrozom oranını koruduğu ve hamster spermatozoasının in vitro etkilerinin incelendiği çalışma ile paralellik göstermiştir.

Çalışmada elde edilen mitokondriyel aktivite değerleri açısından farklı PVA türevleri ve doz grupları arasında istatistiksel bir farklılık gözlemlenmiştir ($P<0,001$). Buna göre en yüksek çözüm sonu mitokondriyel aktivite $73,09 \pm 21,8$ ile PVA 9 kDa % 0,001 grubunda elde edilmiş ve diğer tüm alt gruplara oranla istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($P<0,001$). Gruplar arası değerler bakıldığında ise en yüksek aktivite $56,15 \pm 9,78$ ile % 0,001 gruplarında elde edilmiştir ($P<0,05$). Bu veriler Bavister (1981) tarafından spermanın 4 saat inkübasyonu sonrası spermatozoa'nın hiperaktif özellik göstermesi ve % 80 oranında fertilizasyon sağlaması ile paralel ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, PVA ile gerçekleştirilen diğer çalışmalarda mitokondriyel aktivite analiz edilmemesine rağmen, kısa süreli inkübasyon sonrasında sperm motilitesini uzun süre koruduğu bildirilmiştir. Bu araştırma sonuçlarına göre, çalışmamızda elde edilen değerlerin paralellik gösterdiğini söyleyebiliriz (Uto ve Yamahama, 1996 ve Risopatron ve ark., 2002). Bunun yanında, Yurdakök ve ark., (2017) teke sperması üzerine farklı pestisitlerin etkilerini mitokondriyel aktivite ve kinetik parametrelere ilişkin gerçekleştirdikleri çalışmada ile de paralellik göstermektedir. Ancak elde edilen sonuçlar motilite sonuçları ile pozitif korelasyon göstermemiş ve gruplar arasında geniş varyasyon

gözlemlenmiştir. Analizin gerçekleştirildiği yöntem ve metodolojinin gözden geçirilmesi ve optimizasyon sağlanması kanaatine varılmıştır.

Hayvansal üretimde, sperma kalitesi ve fertilite arasındaki ilişkisi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, spermanın in vitro kalitesini belirlemeye yönelik testler, hem suni tohumlama hem de diğer biyoteknoloji prosedürlerinde dondurulmuş spermanın pratik kullanımına izin verilmesi ve kullanılabilmesi için sıklıkla uygulanmaktadır. Sperma kalitesinin değerlendirilmesi için konvansiyonel laboratuvar testleri arasında, spermatozoa morfolojisinin ışık mikroskobu ile değerlendirilmesi ve spermatozoanın motil, progresif motil yüzdelerini ve kinetik hareket özelliklerini kapsayan CASA cihazı; ve spermanın diğer kalite özellikleri; konsantrasyon, hacim, idrar, kan veya potansiyel olarak patojen bakterilerin varlığının tespiti ve fonksiyonel florasan; canlı spermatozoa (SYBR-PI), akrozom bütünlüğü (FITC-PNA) testlerini içermektedir. Yenelenebilir, hızlı ve hassas yöntemlerle gerekli parametrelerin seçimi artan bir ilgi kaynağıdır. Bunun nedeni, standart spermatolojik parametrelerin tahmini değerlerinin, subfertil bireylerin tanımlanmasında sınırlı veya yetersiz olmasıdır (Mortimer, 1997; Love ve ark., 2000; Clement ve ark., 2001; Amann ve Waberski, 2014; Elsayed ve ark., 2015 ve Tekin ve Daşkın, 2016).

Günümüzde plazma membranının bütünlüğünün değerlendirilmesinde kullanılan çeşitli laboratuvar prosedürleri çözüm sonu sperma değerlendirmesinin önemli bileşenleri arasındadır. Bunlar arasında, spermatozoanın, membranı hasarsız olduğu zaman, eozin gibi ekstraselüler boyaları hücre içine almama yeteneğinin değerlendirilmesi bulunmaktadır. Membranı geçebilen ve geçemeyen boyalar, membran bütünlüğünün daha doğru bir yansımasını sağlayabilmek amacıyla, spermatozoaya maruz kalmadan önce bir çözelti içerisinde birleştirilebilmektedir. Örneğin, floresan plazma membranı boyaları, analiz edilecek fonksiyonel bölgelerin daha kapsamlı bir şekilde kapsanmasını sağlamak için mitokondriyel boyalar veya akrozomal boyalar ile kombine edilebilmektedir (Garner ve ark., 1994; Kavak ve ark., 2003 ve Love ve ark., 2003). Daha yakın zamanlarda CASA kullanım alanı bulmuş ve bireysel sperm hücrelerinin ölçümlerine dayalı olarak ejakülatın kinetik özelliği

hakkında geniş bilgi vermektedir. CASA kullanarak değerlendirilen, spermatozoa motilite ve hareket karakteristikleri *in vivo* fertilite ile ilişkilendirilmiştir.

Spermatozoanın dondurma sonrası biyokimyasal belirteçlerinin tanımlanabilmesi için araştırmalar halen devam etmektedir (Manjunath, 2012). Spesifik hücresel bileşenleri hedefleyerek dondurma-çözdürme işlemi ile indüklenen infertilitenin laboratuvara dayalı tespitinin etkinliğini artırılmaya çalışılmaktadır. Ancak bu muayene teknikleri kalibrasyona ve insan kaynaklı hatalara açık yöntemlerdir. Bu yüzden, spermatolojik muayeneler için, CASA gibi detaylı testlerin dahil edilmesi, konvansiyonel motilite veya morfoloji testlerinin yerini almamalı veya değerini azaltmamalıdır. Son zamanlarda, fertilizasyonun doğrudan işaretçisi olarak, spermatozoa kinetik parametreleri, akrozom bütünlüğü, mitokondriyel aktivite ve kapasitasyon testine büyük önem verilmektedir (Gadea, 2005; Gillan ve ark., 2005 ve Virro ve ark., 2004).

Çözüm sonu değerlendirilmesi gerçekleştirilen 3 ana parametreye göre; PVA kullanımının spermatozoa motilitesini ve kinetik parametreleri (STR ve LİN), canlılık ve akrozom bütünlüğünü koruduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre; Ankara tekesi spermasının dondurulmasında azalan kriyoprotektan konsantrasyonlarına ek olarak PVA kullanımının etkili olduğu gözlemlenmiştir. PVA spermatozoanın bulunduğu kimyasal ortam için uygun bir ortam yarattığı kanaatine varılmıştır. PVA kullanımının *in vitro* etkinliğinin daha iyi anlaşılması için IVF protokollerinde kullanılmalı ve *in vivo* etkinliği için suni tohumlama uygulamaları gerçekleştirilmelidir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Pratik olarak, sperma kriyoprezervasyonu için genel bir “standart” protokol oluşturulması hedeflenmektedir. Ancak, güncel sperm kriyoprezervasyon protokollerinin sınırları vardır ve başarı oranları türler arasında ve hatta aynı tür içindeki bireyler arasında bile değişkenlik göstermektedir. Çalışma süresince elde edilen sonuçlar; uygun kriyoprezervasyon protokollerinin belirlenmesi için, tür spesifik bir şekilde sperm kriyo-haşarının incelenmesinin yanı sıra spermanın ve kullanılan sulandırıcıların temel kriyobiyolojik özelliklerinin de incelenmesi gerektiğini göstermektedir.

Maksimum üreme verimliliğini ve sperma dondurulabilirliği artırmak için bireylerin genetik olarak dondurulabilirlik ilişkili genom boyu araştırması yapılmalıdır. Çalışma süresince 24 bireyden BAMS ile elde edilen veriler ile kullanılan yöntemin etkinliği ortaya konulmuştur. Sperma istasyonlarında optimal reproduktif üretkenlik için, tekeler veya diğer damızlık hayyvanlar BAMS ile seçmelidir. Optimal üretkenlik, sperma üretimi, libido, aşım kapasitesi gibi androlojik özelliklerin belirlenmesi ve reproduktif sağlık muayeneleri BAMS aracılığı ile gerçekleştirilebilir ve verimli erkeklerin saptanması veya daha düşük erkeklerin elimine edilmesi, bir sürü veya sperma istasyonu için ekonomik getiriye artırabilir. Ayrıca sperması dondurulacak olan bireylerin seçiminde yardımcı üreme tekniklerinin kullanımının yaygınlaştırılması ve androlojik klinik uygulamaların güncelleştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada sperma sulandırıcısına ek olarak farklı dozlarda ve moleküler ağırlıkta PVA 9, 18 ve 100 kDa’nın çözüm sonu spermatolojik parametrelere etkinliği CASA (IVOS ve SCA) ve Spectramax İ3 hücre okuyucu yöntemleri ile araştırıldı.

Araştırmada kullanılan PVA’ün doz gruplarından bağımsız olarak çözüm sonu spermatolojik özelliklere negatif bir etkisi olmadığı gözlemlendi. PVA türevlerinin kullanıldığı bu çalışmada motilite değerleri açısından kontrole göre çok üstün bir bir yanıt oluşturmadığı ancak kinetik parametreler açısından STR ve LIN özelliklerinin daha yüksek değerlere sahip olduğu bulunmuştur. Çalışmada kullanılan PVA konsantrasyonlarından hiçbirisi spermatozoa canlılığı üzerinde olumsuz bir etki göstermemiştir. Bu özelliği bakımından PVA kullanımının membran stabilizasyonunu çözüm sonu örnekler için koruduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca kullanılan farklı PVA konsantrasyonları bakımından benzer sonuçlar göstermesi spermatozoa için yüksek toksisiteye sahip olmadığını ve spermanın canlılığının korunması için sulandırıcı komponenti olarak azalan gliserol konsantrasyonlarına karşı PVA kullanımının esansiyel olması gerektiğini önerebiliriz.

ÖNERİLER

Elde edilen verilere göre;

1- “Bütünleştirilmiş Androlojik Muayene Sistematiği” içerisinde yer alan Transrektal Digital Masaj, Suni Vajen Uyum Testi, ve Yardımcı üreme tekniklerinin kullanımı (US ve Termografi) ile oluşturulan protokol sezondan bağımsız olarak Ankara keçilerinin istenilen zaman diliminde muayenesine imkan tanıyacaktır. Bu protokolün kullanımı ile klinik androloji alanı geliştirilmelidir.

2- Sperma dondurulabilirliğinin kullanılması ise, sperma istasyonlarına seçilecek bireylerin belirlenmesinde yol gösterici olacaktır. Spermanın taze ve çözüm sonu muayenelerinin CASA sistemi ile gerçekleştirilmesi dondurulmaya karşı zayıf/güçlü bireylerin objektif bir şekilde seçilmesini sağlayacaktır. Ayrıca sperma dondurulabilirliğine ilişkin “Single Nükleotid Polimorfizm” tanımlanmalı ve genom boyu ilişkilendirme çalışmaları yapılmalıdır.

3- Spesifik hücresel bileşenleri hedefleyerek dondurma-çözdürme işlemi ile indüklenen infertilitenin laboratuvara dayalı tespitinin etkinliğini artırılmalıdır. Ancak, sperma değerlendirmesi için CASA gibi detaylı testlerin dahil edilmesi, konvansiyonel motilite veya morfoloji testlerinin yerini almamalı veya değerini azaltmamalıdır.

4- Farklı CASA cihazlarına ait kalibrasyonların “Ring Test” ile belirli periyotlarda gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, sperma muayenesinde bir örnekliklik oluşturulması için “Sperma Muayene Rehberi” oluşturulmalı ve spematolojik muayenelerin güvenilirliği artırılmalıdır.

5- Spermanın dondurulması ve çözödürölmesi sırasında gerçekleşen hasarların güncel görüntölleme sistemleri ile incelenmesi ve moleköler belirteçleri tanımlanmalıdır. Teke sperması, kriyoprotektana ek olarak PVA ilavesi ile ve gliserol konsantrasyonları kademeli olarak azaltılarak dondurulabilir.

ÖZET

Ankara Tekesi sperması dondurulmasında polivinil alkolün spermatozoa canlılığı ve fonksiyonu üzerine etkisi

Sentetik polimer polivinil alkolün (PVA) küçük konsantrasyonlarının kriyoprotektan solüsyonlarında buz oluşumunu inhibe ettiği bulunmuştur. Bu araştırmada, 3 farklı moleküler ağırlıktaki polivinil alkol (PVA) ile farklı konsantrasyonlarının Ankara tekesi spermasının dondurulabilirliğini değerlendiren bir metodoloji tanımlamayı amaçlanmıştır. Çalışma öncesinde PVA'nın sperma üzerinde sitotoksiste incelemesi MTT ve Neutral Red testi ile yapıldı. Sperma sulandırıcısının çekirdeklenme sıcaklığı HD kamera (JVC, everio HD-AVC) ve testo termometresi (Testo 926, Almanya) ile kaydedildi. Çalışmada kullanılan hayvanların seçimi bütünlleştirilmiş androlojik muayene sistemine (BAMS) göre yapıldı. Erkek üreme organlarının ölçümleri, elektronik kumpas (Watan, Türkiye), skrotal çevre mezüro ile (Mesitaş, Türkiye) ve görüntülemeler ultrason (MyLabVet™ One, ESAOTE S.p.A.) ile gerçekleştirildi. Spermatolojik parametrelerin belirlenmesi için spermalar transrektal dijital masaj ile alındı. Toplamda 24 hayvana uygulanan BAMS sonrasında, yedi adet olgun Ankara ($2,75 \pm 1,42$ yaş) tekesinden 75 ejakülat suni vajen yardımıyla hafta iki kez toplandı. Sperma alınmasından hemen sonra, taze spermatolojik parametreler kaydedildi. Sperm üç farklı PVA kopolimer 9, 18 ve 100 kDa ile sulandırıldı; Tris yumurta sarısı sulandırıcısına % 0,001, 0,01, 0,1, 1 ve 2 PVA eklenmiştir. Sulandırma sonrası, örnekler 3 saat + 4 ° C ekilibrasyona bırakıldı. Soğutulmuş örnekler otomatik sperma doldurma ve kapatma cihazı ile paketlenildi ve programlanabilir dondurma makinesi (Digitcool 5300, IMV, Fransa) ile donduruldu. Çözüm sonrasında aşağıdaki parametreler değerlendirildi: Motilite, progresivite ve kinetik parametreler SCA (Sperm class analyser, Microoptics, Spain) ile, canlı spermatozoa, intakt akrozom ile mitokondriyel aktivite plaka okuyucu (SpectraMax® MiniMax™ 300 Görüntüleme Sitometresi, ABD) ile değerlendirildi.

Çözüm sonu en yüksek motilite, doz gruplarından bağımsız olarak en yüksek PVA (18kDa) $67,72 \pm 3,06$; doza göre ise PVA (18kDa) %0,1 $64,18 \pm 1,36$; gruplarında elde edildi ($P<0,001$). Tüm PVA türevlerinin diğer doz gruplarında PVA % 0,001; 0,01; 0,1 ise (PVA 100, % 0,1 hariç) kontrole göre daha yüksek çözüm sonu değerler elde edildi ($P<0,001$). Çalışmada elde edilen canlı spermatozoa açısından farklı PVA türevleri ve doz grupları arasında bir istatistiksel bir farklılık gözlemlenmiştir ($P>0,694$; 0,953). Canlı spermatozoa oranları PVA 9, 18 ve 100 için sırasıyla $82,17 \pm 1,01$; $83,453 \pm 1,175$; $82,424 \pm 1,083$ olarak tespit edildi. Kullanılan üç PVA konsantrasyonunun hiçbiri, çözüm sonu spontan AR'nunu indüklememiştir ($P>0,001$). Grup ve doz etkisinden bağımsız olarak intakt akrozom oranları PVA 9, 18 ve 100 için sırasıyla; $10,83 \pm 0,92$; $12 \pm 1,02$; $10,97 \pm 0,97$ olarak bulundu ($P>0,659$; 0,975).

Sentetik PVA polimerleri buz bloke edici maddeler olarak antifriz proteinlerinden çok daha ucuza üretilir ve sperm kriyoprezervasyonunu iyileştirmek için yeni fırsatlar sunabilirler. PVA 100 kDa eklenmesi sperm kinetik parametreler için yararlı iken, PVA 18 kDa grubu ile daha uygun hareket özellikleri elde edilmiştir. % 0,001, 0,01, 0,1 ve 1 w/w'lik (FTS: PVA) PVA kopolimer konsantrasyonları, 100 ml'lik bir hacimde spermanın dondurulması için gereken gliserol konsantrasyonunu sırasıyla % 0, 1, 1 ve 2 w/w düşürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Ankara keçisi, CASA, kryoprezervasyon, polivinil alkol, viabilite

SUMMARY

Effects of polyvinyl alcohol on Angora buck spermatozoa survival and function during cryopreservation

Small concentrations of the synthetic polymer polyvinyl alcohol (PVA) were found to inhibit the formation of ice in cryoprotectant solutions. In this research, we aim to define a methodology to evaluate the freezability of Angora goat semen diluted with 3 different molecular weighted polyvinyl alcohol (PVA). Sperm diluent seeding temperature was recorded with by HD camera (JVC, everio HD-AVC) and testo thermometer (Testo 926, Germany). Selection of animals was done according to the integrated andrological evaluation system. Monitoring of the male reproductive organs measurement was done with a caliper (Watan, Turkey), SCC with tape (Mesitaş, Turkey) monitoring with ultrasound (US) (MyLabVet™ One, ESAOTE S.p.A.). Initial sperm collected through TDM. In total, 75 ejaculates from seven mature Angora bucks (2 years old) were collected twice a week by the artificial vagina. Immediately after collection, sperm samples were diluted with three different PVA co-polymers 9, 18 and 100 kDa; 0,001 %, 0,01; 0,1; 1 and 2 added to Tris-egg yolk diluent respectively. After dilution semen was loaded into 0,25 ml French straws and cooled down to + 4 C° in three hours, frozen in a programmable freezing machine (Digitcool 5300, IMV, France). After post-thaw, following parameters were evaluated; Motility, progressivity and kinetic parameters with computer assisted sperm analysis system (CASA), live spermatozoa, intact acrosome and mitochondrial activity with a plate reader (SpectraMax® MiniMax™ 300 Imaging Cytometer, ABD).

Highest motility was found in PVA 18 group with $67,72 \pm 3,06$ % regardless of the dosage, and was also highest in PVA 100 0,1 % with $64,18 \pm 1,36$ % ($P < 0,001$). PVA copolymers dependently in all other dosage groups was 0,001 %; 0,01; 0,1 (PVA 100, except 0,1%) gained higher motility than control ($p < 0,001$). A statistical difference was not observed among the different PVA derivatives and dose groups in terms of live spermatozoa rate ($P > 0,694,0,953$). The live spermatozoa ratios for PVA 9, 18 and 100 were $82,17 \pm 1,01$; $83,453 \pm 1,175$; $82,424 \pm 1,083$, respectively. None of the three PVA concentrations used induced spontaneous AR ($P > 0,001$). Independent of group and dose effect, intact acrosomal ratios for PVA 9, 18 and 100 were; $10,83 \pm 0,92$; $12 \pm 1,02$; Was found to be $10,97 \pm 0,97$ ($P > 0,659, 0,975$).

Synthetic PVA-derived ice blocking agents can be produced much less expensively than antifreeze proteins, offering new opportunities for improving sperm cryopreservation. While addition of PVA 100 kDa was beneficial for sperm kinetic parameters, with PVA 18 kDa group, more proper motion characteristics were obtained. PVA copolymer concentrations of 0,001, 0,01, 0,1, and 1 % w/w (FTS: PVA) decreased the concentration of glycerol required to freezing seeding temperature in a 100ml volume by 0, 1, 1, and 2 % w/w, respectively.

Keywords: Angora goat, CASA, cryopreservation, polyvinyl alcohol, viability,

KAYNAKLAR

- ABOAGLA EM, TERADA T (2004). Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, **62**: 1160-1172.
- ABRIL-SANCHEZ S, FREITAS-DE-MELO A, BERACOCHEA F, DAMIAN JD, GIRIBONI J, SANTIAGO-MORENO J, UNGERFELD R (2017). Sperm collection by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands is less stressful than electroejaculation without altering sperm characteristics in conscious goat bucks. *Theriogenology*, **98**: 82-87.
- AĞCA Y, LIU J, MCGRATH JJ, PETER AT, CRITSER ES, CRITSER JK (1998). Membrane permeability characteristics of metaphase ii mouse oocytes at various temperatures in the presence of Me2SO. *Cryobiology*, **36**: 287-300.
- AKÇAY E, KULAKSIZ R, ÇEBİ ŞÇ, DASKIN A, TEKİN K (2012). The Effect of different dilution rate on post-thaw quality of ram semen frozen in two different egg-yolk free extenders. *Slovenian Veterinary Research*, **49**: 97-102.
- AMANN RP, WABERSKI D (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, **81**: 5-17.
- ANDRABI SMH (2007). Fundamental principles of cryopreservation of Bos taurus and Bos indicus bull spermatozoa. Mini review. *Int. J. Agri. and Biol*, **9**: 367-369.
- ANONİM (2008). Türkiye Yerli Evcil Hayvan Genetik Kaynaklarından Bazılarının *In Vitro* Korunması ve Ön Moleküler Tanımlanması-I. Erişim Adresi: <http://www.turkhaygen.gov.tr/data/ozet.asp> Erişim Tarihi: 20.07.2017.
- ANONİM (2014). Ankara Keçisi Nasıl British Angora Goat Oldu. Tarih ve Arkeoloji Erişim Adresi: <https://tarihvearkeoloji.blogspot.com.tr/2014/08/ankara-tiftik-kecisi-nasil-british.html>. Erişim Tarihi: 20.07.2017.
- ANONİM (2016). Hayvancılık istatistikleri. Erişim Adresi: <https://biruni.tuik.gov.tr/hayvancilikapp/hayvancilik.zul> Erişim Tarihi: 20.07.2017.
- ARTEAGA AA, ALBERT DB, BRITO LFC (2005). Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. *Theriogenology* **64**: 408-415.
- ASADA M, ISHIBASHI S, IKUMI S, FUKUI Y (2002). Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology* **58**: 1199-1208.

- ATEŞŞAHİN A, BUCAK MN, TUNCER PB, KIZIL M (2008). Effect of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. *Small Rum Res.*, **77**: 38-44.
- AURIEMMA F, DE ROSA C, TRIOLO R (2006). Slow crystallization kinetics of poly (vinyl alcohol) in confined environment during cryotropic gelation of aqueous solutions. *Macromolecules* **39**: 9429-9434.
- BAERT Y, VAN SAEN D, HAENTJENS P, INT' VELD P, TOURNAYE EH, GOOSSENS E (2013). What is the best cryopreservation protocol for human testicular tissue banking?. *Hum Reprod.*, **28**: 1816-1826.
- BARRETT J (2001). Thermal hysteresis proteins. *Int J Biochem Cell Biol.*, **33**: 105-117.
- BATELLIER F, MAGISTRINI M, FAUQUANT J, PALMER E (1997). Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*, **48**: 391-417.
- BAVISTER BD, (1981) Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. *J Exp Zool.*, **217**: 45-51.
- BEIRAO J, ZILLI L, VILELLA S, CABRITA E, SCHIAVONE R, HERRAEZ MP (2012). Improving sperm cryopreservation with antifreeze proteins: effect on gilthead seabream (*Sparus aurata*) plasma membrane lipids. *Biology of reproduction*, **86**: 1-9.
- BOLDT J (2011). Current results with slow freezing and vitrification of the human oocyte. *Reprod BioMed Online*, **23**: 314-322.
- BOUVET V, BEN RN (2003). Antifreeze glycoproteins: structure, conformation, and biological applications. *Cell Biochem Biophys.*, **39**: 133-144.
- BRACKETT BG, OH YK, EVANS JF, DONAWICK WJ. (1980) Fertilization and early development of cow ova. *Biol Reprod.* **23**:189-205.
- BRAVO LA, GRIFFITH M (2005). Characterization of antifreeze activity in Antarctic plants. *J Exp Bot.*, **56**: 1189-1196.
- BUCAK MN, SARIÖZKAN S, TUNCER PB, ULUTAŞ PA, AKÇADAĞ HI (2009). Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Res.*, **81**: 90-95.
- BUDKE C, KOOP T (2006). Ice recrystallization inhibition and molecular recognition of ice faces by poly (vinyl alcohol). *Chem Phys Chem.*, **7**: 2601-2606.
- BÜYÜKLEBLEBİCİ O, BÜYÜKLEBLEBİCİ S, TAŞDEMİR U, TUNCER BP (2016). The effects of different antioxidants on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters in the cryopreservation of brown-swiss bull semen. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, **22**: 101-107.

- BYRD W (2002). Cryopreservation, thawing, and transfer of human embryos. In *Seminars in reproductive medicine*, **20**: 037-044.
- CAO T (2004). An overview and synopsis of techniques for directing stem cell differentiation in vitro. *Cell Tissue Res* **315**: 291-303.
- CAPICCIOTTI JD, DOSHI M, ROBERT NB (2013). Ice Recrystallization Inhibitors: From Biological Antifreezes to Small Molecules, *Intech open sf*: **108**.
- CARPENTER JF, HANSEN TN (1992). Antifreeze protein modulates cell survival during cryopreservation: mediation through influence on ice crystal growth. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **89**: 8953-8957.
- CARVAJAL-RONDANELLI PA, MARSHALL SH, GUZMAN F (2011). Antifreeze glycoprotein agents: structural requirements for activity. *J Sci Food Agric.*, **91**: 2507–2510.
- CHANG MC (1959). Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*, **184**: 466-7.
- CHAPSKY L, RUBINSKY B (1997). Kinetics of antifreeze protein-induced ice growth inhibition. *FEBS Lett.*, **412**: 241-244.
- CHAUHAN MS, ANAND SR (1990). Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology*, **34**: 1003-1013.
- CHAVES DF, CAMPELO IS, SILVA MIRELLY MAS, MAAJID HB, TEIXEIRA DIA, MELO LM, SOUZA-FABJAN JMG, MERMILLOD J, FREITAS VJF (2016). The use of antifreeze protein type III for vitrification of in vitro matured bovine oocytes. *Cryobiology* **73**: 324-328.
- CHEN C (1986). PREGNANCY AFTER HUMAN OOCYTE CRYOPRESERVATION. *Lancet* **327**:884-886.
- CLEMENT F, LADONNET Y, MAGISTRINI M (2001). Sperm morphology and fertility. *Anim. Reprod. Sci.* **68**: 362-363.
- COCHRAN JD, AMANN RP, FROMAN DP, PICKETT BW (1984). Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 50C, freezing rate and thawing rate on the post thaw motility of equine spermatozoa. *Theriogenol.*, **22**: 25-38.
- CONGDON T, NOTMAN R, GIBSON MI (2013). Antifreeze (glyco)protein mimetic behavior of poly (vinyl alcohol): detailed structure ice recrystallization inhibition activity study. *Biomacromolecules*, **14**:1578-1586.
- CRITSER JK, AMESON BW, AAKER DV, BALL GD (1987). Cryopreservation of human spermatozoa II. Post-thawed chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil Steril* **47**: 980-984.

- CRITSER JK, HUSE-BENDA AR, AAKER DV, ARNESON BW, BALL GD (1988). Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril* **50**: 314-20.
- CURRY MR, MILLAR JD, WATSON PF (1994). Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations. *Biol Reprod.*, **51**: 1014-1021.
- DASSANAYAKE M, OH DH, HAAS JS, HERNANDEZ A, HONG H, ALI S, YUN DJ, BRESSAN RA, ZHU JK, BOHNERT HJ, CHEESEMAN JM (2011). The genome of the extremophile crucifer *Thellungiella parvula*. *Nat Genet.*, **43**: 913-918.
- DAŞKIN A, STELLETTA C, PASCALE L, OZTUTAR F, ALEMDAR H, TURRI F, TIRPAN B, VENCATO J, **TEKIN K**, PIZZI F (2015) Integrated andrological evaluation in Angora goat. *Animal reproduction*; **12**: 792.
- DAŞKIN, A., TEKIN, N. (1996). The effect of egg-yolk on the quality of frozen Angora Buck semen. *Turk J Vet Anim Sci.*, **20**: 395-398.
- DAVIES PL, BAARDSNES J, KUIPER MJ, WALKER VK (2002). Structure and function of antifreeze proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, **357**: 927-935.
- DAVIES PL, SYKES BD (1997). Antifreeze proteins. *Curr Opin Struct Biol* **7**: 828-834.
- DELLER RC (2013). The investigation and application of ice recrystallization inhibitors as cryoprotectants. Doktora tezi. Molecular Organization and Assembly of Cells Doctoral Training Centre, University of Warwick. **Sf**: 31.
- DELLER RC, VATISH M, MITCHELL DA, GIBSON MI (2014). Synthetic polymers enable non-vitreous cellular cryopreservation by reducing ice crystal growth during thawing. *Nat Commun.*, DOI: 10.1038/ncomms4244.
- DELUCA CI, CHAO H, SONNICHSEN FD, SYKES BD, DAVIES PL (1996). Effect of type III antifreeze protein dilution and mutation on the growth inhibition of ice. *Biophys J.*, **71**: 2346-2355.
- DEVRIES AL, KOMATSU SK, FEENEY RE (1970). Chemical and physical properties of freezing point-depressing from Antarctic Fishes. *J Biol Chem.*, **245**: 2901-2908.
- DEVRIES AL, WOHLSCHLAG DE (1969). Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*, **163**: 1073-1075.
- DI SANTO M, TAROZZI N, NADALINI M, BORINI A (2012). Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv Urol.*, **12**: 854-837.

- DONG Q, HUANG C, EUDELIN B, TIERSCH TR (2005). Systematic factor optimization for cryopreservation of shipped sperm samples of diploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas*. *Cryobiology*, **51**: 176-197.
- DUMAN JG (2002) The inhibition of ice nucleators by insect antifreeze proteins is enhanced by glycerol and citrate. *J Comp Physiol B*, **172**: 163-168.
- ELSAYED M, TAYMOUR ME, ABDELGAHAWAD M (2015). Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J. *Theriogenology* **84**: 1367-1377.
- EWART KV, LIN Q, HEW CL (1999). Structure, function and evolution of antifreeze proteins. *Cell Mol Life Sci.*, **55**: 271-283.
- FAHY GM (2015). Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Third Edition Harriette Oldenhof Willem F. Wolters (Ed: ISSN 1940-6029, electronic) Institute of Multiphase Processes, Leibniz Universität Hannover, Hannover, Germany.
- FAHY GM, WONG B, WU J, PAYNTER S (2004a). Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology*, **48**: 22-35.
- FAHY GM, WONG B, WU J, PHAN J, RASCH C, CHANG A, ZENDEJAS E (2004b). Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology*, **48**: 157-178.
- FAHY GM, WONG B. (2015). Principles of cryopreservation by vitrification. *Methods Mol Biol*. 1257: 21-82.
- FISER PS, HANSEN C, UNDERHILL KL, SHRESTHA JNB (1991). The effect of induced ice nucleation (seeding) on the post thaw motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* **24**: 293-304.
- FOWLER A, TONER M (2005). Cryo-injury and biopreservation. *Ann N Y Acad Sci.*, **1066**: 119-135.
- FREITAS-DE-MELO A, UNGERFELD R, HÖTZEL MJ, ORIHUELA A, PEREZ-CLARIGET R (2017). Low pasture allowance until late gestation in ewes: behavioural and physiological changes in ewes and lambs from lambing to weaning. *Animal*, **11**: 285-294.
- FULLER B, PAYNTER S (2004). Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod BioMed Online.*, **9**: 680-691.
- GACITUA H, ARAV A (2005). Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. *Theriogenology*, **63**: 931-938.
- GADEA J (2005). Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* **63**: 431- 444.

- GALLIA C, DUCHIA R, COLLEONIA S, LAGUTINAA I, LAZZARI I (2014). Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* **81**: 138-151
- GARNER DL, JOHNSON LA, YUE ST, ROTH BL, HAUGLAND RP (1994). Dual DNA Staining Assessment of Bovine Sperm Viability Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *J Androl.* **15**: 620-629.
- GEENS M, GOOSSENS E, DE BLOCK G, NING L, VAN SAEN D, TOURNAYE H. (2008). Autologous spermatogonial stem cell transplantation in man: current obstacles for a future clinical application, *Hum Reprod Update.*, **14**: 121-130.
- GIBSON MI, BARKER CA, SPAIN SG, ALBERTIN L, CAMERON NR (2009). Inhibition of Ice Crystal Growth by Synthetic Glycopolymers: Implications for the Rational Design of Antifreeze Glycoprotein Mimics. *Biomacromolecules.* **10**: 328-333.
- GILLAN L, EVANS G, MAXWELL WMC (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* **63**: 445-457.
- GIRIBONI J, LACUESTA L, UNGERFELD R (2017). Continuous contact with females in estrus throughout the year enhances testicular activity and improves seminal traits of male goats. *Theriogenology* **87**: 284-289.
- GIULIANO S, DIRECTOR A, GAMBAROTTA M, TRASORRAS V, MIRAGAYA M. (2008) Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci.*, **104**: 359-369.
- GLIOZZI TM, TURRI F, MANES S, CASSINELLI C, PIZZI F. (2017). The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*, **11**: 1-8.
- GOLDSTEIN M, SIMHA R (1976). The glass transition and the nature of the glassy state, vol 279, Ann N Y Acad Sci. New York Academy of Sciences, New York, NY.
- GOODSELL D (2009). Antifreeze Proteins. Molecule of the month. Erişim Adresi: <http://pdb101.rcsb.org/motm/120> Erişim Tarihi: 20.07.2017.
- GOURLIE B, LIN Y, PRICE J, DEVRIES AL, POWERS D, HUANG RC (1984). Winter flounder antifreeze proteins: a multigene family. *J Biol Chem.*, **259**: 14960-14965.
- GRAETHER SP, KUIPER MJ, GAGNE SM, WALKER VK, JIA Z, SYKES BD, DAVIES PL (2000). Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. *Nature*, **406**: 325-328.
- GRAHAM JK, MOCE E (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, **64**: 492-504

- GRAVANCE CG, GARNER DL, MILLER MG, BERGER T (2001). Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod.Toxicol.* **15**: 5-10
- GRIFITH M, EWART KV (1995). Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnol. Advances*, **13**: 375-402.
- HAMMERSTEDT RH, GRAHAM JK, NOLAN JP (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl.*, **11**: 73-88.
- HARDING MM, ANDERBERG PI, HAYMET AD (2003). ‘Antifreeze’ glycoproteins from polar fish. *Eur J Biochem.*, **270**: 1381-1392.
- HERNANDEZ M, ROCA J, GIL MA, VAZQUEZ JM, MARTINEZ EA (2007). Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology*, **67**:1436-1445.
- HOLT WV (1997). Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reproduction, fertility and development*, **9**: 309-320.
- HOLT WV (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, **53**: 47-58.
- HUGH VD (2004). Seasonal adaptations in arctic insects. *Integr Comp Biol.*, **44**: 85-94.
- IBRAHIM E, BRACKETT NL, LYNNE CM (2016). Advances in the management of infertility in men with spinal cord injury. *Asian J Androl.*, **18**: 382-390.
- İNADA T, LU SS (2003). Inhibition of Recrystallization of Ice Grains by Adsorption of Poly (Vinyl Alcohol) onto Ice Surfaces. *Cryst Growth Des.*, **3**: 747-752.
- İNANÇ ME (2016). Akkaraman Koçlarda Spermanin Kolesterol ve 7-Dehidrokolesterol ile Dondurulması ve Değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi Ankara.
- İNANÇ ME, TEKİN K, OLĞAÇ KT, ÖZEN D, STELLETTA C, UYSAL O, DAŞKIN A (2017). Effect of 7-dehydrocholesterol and cholesterol-loaded cyclodextrins on bull sperm motility during short term storage. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, **23**: 661-664.
- ISACHENKO E, GOHAR R, PETER M, RAUL S, ISACHENKO V (2002). Novel approaches to the cryopreservation of human spermatozoa: History and development of the spermatozoa vitrification technology. *J Reprod Stem Cell Biotechnol* **2**:128-145.
- ISACHENKO E, RAHIMI G, MALLMANN P, SANCHEZ R, ISACHENKO V (2011). Novel approaches to the cryopreservation of human spermatozoa: history and development of the spermatozoa vitrification technology. *J Reprod Biotechnol Fertil.*, **2**:128-145.

- KASTELIC JP (2014). Understanding and evaluating bovine testes. *Theriogenology* **81**: 18-23.
- KASTELIC JP, BRITO LFC (2012). Ultrasonography for monitoring reproductive function in the bull. *Reprod Dom Anim.*, **47**: 45-51.
- KATILA T (2001). In Vitro Evaluation of Frozen-Thawed Stallion Semen: A Review *Acta Veterinaria Scandinavica* **42**: 199.
- KAVAK A, JOHANNISSON A, LUNDEHEIM N, RODRIGUEZ-MARTINEZ H, AIDNIK M, EINARSSON S (2003). Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* **76**: 205-216.
- KAYSER JPR (1990). Effects of linear cooling rates on motion characteristics of stallion spermatozoa. MSc Thesis, Colorado State University.
- KNIGHT CA, HALLETT J, DEVRIES AL (1988). Solute effects on ice recrystallization: an assessment technique. *Cryobiology* **25**: 55-60.
- KNIGHT CA, WEN D, LAURSEN RA (1995). Nonequilibrium Antifreeze Peptides and the Recrystallization of Ice. *Cryobiology* **32**: 23-34.
- KRASKA T (2008). Direct Observation of Single Ostwald Ripening Processes by Molecular Dynamics Simulation. *J Phys Chem B* **112**: 12408-12413.
- KRISTIANSEN E, ZACHARIASSEN KE (2005). The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis. *Cryobiology* **51**: 262-280.
- KROKIDA MK, TSAMI E, MAROULIS ZB (1998). Kinetics on color changes during drying of some fruits and vegetables. *Drying Technol.* **16**: 667-685.
- KUKAL O, HEINRICH B, DUMAN JG (1988). Behavioural thermoregulation in the freeze-tolerant Arctic caterpillar, *Gynaephora groenlandica*. *J Exp Biol.*, **138**: 181-193.
- KULAKSIZ R, BUCAK MN, AKÇAY E, SAKİN F, DAŞKIN A, ATESSAHİN A (2011). The effects of different extenders and myo-inositol on post-thaw quality of ram semen. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, **17**: 217-222.
- KULAKSIZ R, ÇEBİ Ç, AKÇAY E (2014). Effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4 °C. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **36**: 177-182.
- KULAKSIZ R, ÇEBİ Ç, AKÇAY E, DAŞKIN A (2010). The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Rum Res.*, **88**: 12-15.

- KUMAR S, MILLAR JD, WATSON PF (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, **46**: 246-253.
- LEBOEUF B, RESTALL B, SALAMON S (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci.*, **62**: 113-141.
- LEIBO SP, BRADLEY L (1999). Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Gagnon, C. (ed.) The male gamete. Cache River Press, p. 501-516.
- LIU S, WANG W, VON MOOS E, JACKMAN J, MEALING G, MONETTE R, BEN RN (2007). In vitro studies of antifreeze glycoprotein (AFGP) and a C-linked AFGP analogue. *Biomacromolecules*, **8**: 1456-1462.
- LOVE CC, THOMPSON JA, BRINSKO SP, RIGBY SL, BLANCHARD TL, LOWRY VK, VARNER DD (2003). Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology*. **60**: 1127-1138.
- LOVE CC, VARNER DD, THOMPSON JA (2000). Intra- and interstallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **56**: 93-100.
- LOVELOCK JE, BISHOP MW (1959). Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide, *Nature*, **183**: 1394-1395.
- LOVELOCK JE, WITHFIELD M (1982). Life span of biosphere. *Nature* **296**: 561-563.
- MAGALHÃES MLB, VETTING MW, GAO F, FREIBURGER L, AUCLAIR K, BLANCHARD JS (2008). Kinetic and structural analysis of bisubstrate inhibition of the *Salmonella enterica* aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase. *Biochemistry*, **47**: 579-584.
- MANJUNATH P (2012). New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim Reprod.*, **9**: 809-815.
- MARA L, DATTENA M, PÌLÌCHÌ S, SANNA D, BRANCA A, CAPPAI P (2007). Effect of different diluents on goat semen fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, **102**: 152-157.
- MARCO-JIMENEZ F, PUCHADES S, GADEA J, VICENTE JS, VIUDES-DE-CASTRO MP (2005). Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*, **64**: 1756-1765.
- MAZUR P (1966). Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing. In: *Cryobiology*, Ed.: Meryman H. T., London: Academic, chapt. 6, p. 213-315.

- MAZUR P (1970). Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, **168**: 939-949.
- MAZUR P (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol.*, **247**: 125-142.
- MEDEIROS CM, FORELL F, OLIVEIRA AT, RODRIGUES JL (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, **57**: 327-344.
- MEMON MA, BRETZLAFF KN, OTT RS (1985). Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*, **46**: 473-475.
- MOCE E, FAJARDO AJ, GRAHAM JK (2016). Human sperm cryopreservation. *Eur Med J.*, **1**: 86-91.
- MORTIMER ST (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update* **3**: 403-439.
- MOSMANN T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**: 55-63.
- MURRAY HM, HEW CL, FLETCHER GL (2003). Spatial expression patterns of skin-type antifreeze protein in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) epidermis following metamorphosis. *J Morphol.*, **257**: 78-86.
- NEAR TJ, DORNBURG A, KUHN KL, EASTMAN JT, PENNINGTON JN, PATARNELLO T, ZANE L, FERNANDEZ DA, JONES CD (2012). Ancient climate change, antifreeze, and the evolutionary diversification of Antarctic fishes. *PNAS*, **109**: 3434-3439.
- OLOFSSON J, HICKLER T (2008). Effects of human land-use on the global carbon cycle during the last 6,000 years. *Veg Hist Archaeobot.*, **17**: 605-615.
- OSUGA DT, FEENEY RE (1978). Antifreeze Glycoproteins from Arctic Fish. *J Biol Chem.*, **253**: 5338-5343.
- ÖZKAVUKÇU S, ERDEMLİ E (2002). Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. *Journal of Ankara Medical School*, **24**: 187-196.
- PALMER CW, BRITO LF, ARTEAGA AA, SODERGUIST L, PERSSON Y, BARTH AD (2005). Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. *Anim Reprod Sci.*, **87**: 25-31.
- PAYNE SR, OLIVER JE, UPRETI GC (1994). Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, **31(2)**: 180-184.

- PEGG DE (2002). The current status of tissue cryopreservation. *Cryo Lett.*, **22**: 105-114.
- PETRUNKINA AM (2007). Fundamental aspects of gamete cryobiology. *J Reprodmed Endokrinol.*, **4**:78-91.
- POLGE C, SMITH AU, PARKES AS (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, **164**: 666-676.
- PORTNER HO (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol Amol Integr Physiol.*, **132**: 739-761.
- PRATHALINGAM NS, HOLT WV, REVELL SG, MIRCUK S, FLECK RA, WATSON PF (2006). Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology*, **66**: 1894-1900.
- PURDY PH (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rum. Res.*, **63**: 215-225.
- RAYMOND JA, DEVRIES AL (1977). Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 2589-2593.
- RISOPATRON J, CATALAN S, MISKA W, SCHILL WB, SANCHEZ R (2002). Effect of albumin and polyvinyl alcohol on the vitality, motility and acrosomal integrity of canine spermatozoa incubated in vitro. *Reprod Domest Anim.*, **37**: 347-351.
- RITAR AJ, BALL PD, O'MAY PJ (1990). Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reproduction, Fertility and Development*, **2**: 27-34.
- RITAR AJ, SALAMON S (1983). Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. *Aust J Biol Sci.*, **36**: 49-59.
- RITAR, A.J., MENDOZA, G., SALAMON, S., WHITE I.G. (1992). Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). *J Reprod Fertil.*, **95**: 97-102.
- ROTHSCHILD LJ, MANCINELLI RL (2001). Life in extreme environments. *Nature*, **409**: 1092-1101.
- SALAMON S, RITAR AJ (1982). Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust J Biol Sci.*, **35**: 295-303.
- SANCHEZ SA, FREITAS DM, BERACOCHEA F, JUAN PD, JULIA G, MORENO JS, UNGERFELD R (2017). Sperm collection by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands is less stressful than electroejaculation

without altering sperm characteristics in conscious goat bucks. *Theriogenology* **98**: 82-87.

SANTIAGO-MORENO J, TOLEDANO-DÍAZ A, SOOKHTHEZARY A, GOMEZ-GUILLAMON F, SALAS DE LA VEGA R, PULIDO-PASTOR A, LOPEZ-SEBASTIAN A (2011). Effects of anesthetic protocols on electroejaculation variables of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Res Vet Sci.*, **90**:150-155.

SCHMEHL MK, VAZQUEZ IA, GRAHAM EF (1986) The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to TEST-yolk-glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, **23**: 512-517.

SCHMITT DL, HILDEBRANDT TB (1998). Manual collection and characterization of semen from Asian elephants (*Elephas maximus*). *Anim Reprod Sci.*, **53**: 309-314.

SEKI S, MAZUR P (2008). Kinetics and activation energy of recrystallization of intracellular ice in mouse oocytes subjected to interrupted rapid cooling. *Cryobiology*, **56**: 171-180.

SHERMAN JK (1963). Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze- drying. *Fertil. Steril.* **14**: 49-64.

SI W, BENSON JD, MEN H, CRITSER JK (2006). Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology*, **53**: 336-348.

SQUIRES EL, COOK NL (1996). Transvaginal Aspiration. Veterinary Clinics of North America: *Equine Practice*. **12**: 13-29.

STEINMANN H (1996). Use of trehalose as a cryoprotectant in the freezing of stallion semen. A laboratory study. Doktora Tezi, Tierrztliche Hochschule Hannover, Almany.

SYLLA L, PALOMBI C, STRADAIOLI G, VAGNILUCA A, MONACI M (2015). Effect of semen collection by transrectal massage of accessory sexual glands or artificial vagina on the outcome of breeding soundness examinations of Italian yearling beef bulls. *Theriogenology*, **83**: 779-785.

TEKİN K, DAŞKIN A (2016). Effect of different extenders on motility and some sperm kinematics parameters in Norduz goat semen. *Turk J Vet Anim Sci.*, **40**: 490-495.

TEKİN K, STELLETTA C, SAHIN D, BASTAN I, PARILDAR OO, DASKIN A (2016). Ultrasound Monitoring of reproductive organs in Angora bucks. *Anim Reprod.*, **13**: 711-720.

TEKİN N, UYSAL O, AKÇAY E, YAVAŞ İ (2006). Farklı taurin dozlarının ve dondurma hızının koç spermasının dondurulması üzerine etkileri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*, **53**: 179-184.

- TERVIT HR, WHITTINGHAM DG, ROWSON LE (1972). Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*, **30**: 493-7.
- THOMAS CA, GARNER DL, DEJARNETTE JM, MARSHALL CE (1998). Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod* **58**: 786-793.
- TIRPAN MB, TEKİN N (2015). Effects of boron (sodium pentaborate), added instead of Tris components, on freezing and post-thaw quality of Angora buck semen (2015). *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*, **62**: 295-302.
- TOMLINSON M, JENNINGS A, MACRAE A, TRUYERS I (2017). The value of trans-scrotal ultrasonography at bull breeding soundness evaluation (BBSE): the relationship between testicular parenchymal pixel intensity and semen quality. *Theriogenology*, **89**: 169-177.
- TONGDEE P, SUKPRASERT M, SATIRAPOD C, WONGKULARB A, CHOKTANASIRI W (2015). Comparison of cryopreserved human sperm between ultra rapid freezing and slow programmable freezing: effect on motility, morphology and dna integrity. *J Med Assoc Thai.*, **98 Suppl 4**: 33-42.
- TRANT JF, BIGGS RA, CAPICCIOTTI CJ, BEN RN (2013). Developing highly active small molecule ice recrystallization inhibitors based upon C-linked antifreeze glycoprotein analogues. *RSC Adv.*, **3**: 26005-26009.
- ULUKAYA E, ÖZDEKİCİGOĞLU F, YILDIZTEPE ORAL A, DEMİRAĞ M (2008). The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in Vitro*. **22**: 232-239.
- UNGERFELD R, ABRIL-SANCHEZ S, TOLEDANO-DÍAZ A, BERACOCHEA F, CASTANO C, GIRIBONI J, SANTIAGO-MORENO J (2016). Oxytocin administration before sperm collection by transrectal ultrasonic-guided massage of the accessory sex glands in mouflons and bucks. *Anim Reprod Sci.*, **173**: 13-17.
- UTO N, YAMAHAMA Y (1996). The motility and fertility of golden hamster sperm cultured in BSA-free medium. *Biol Cell* **88**: 23-28.
- UYSAL O, BUCAK MN (2007). Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Vet Brno.*, **76**: 383-390.
- VARISLI O, SCOTT H, AGCA C, AGCA Y (2013). The effects of cooling rates and type of freezing extenders on cryosurvival of rat sperm. *Cryobiology*, **67**: 109-116.
- VARNER DD, BLANCHARD TL, MEYERS PJ, MEYERS SA (1989). Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. *Theriogenology* **32**: 515-525.

- VENCATO J, CESTARO L, VAZZANA I, CARRER G, CARLO E, DARA S, STELLETTA C (2014). Integrated evaluation of scrotal temperature and testosteroneemia after GnRH administration in young bulls with low semen production. *Reprod Dom Anim.*, **49**: 481-486.
- VENKETESH S, DAYANANDA C, (2008). Properties, potentials, and prospects of antifreeze proteins. *Crit Rev Biotechnol.*, **28**: 57-82.
- VIRRO MR, KJERSTEN LLC, EVENSON DE (2004). Sperm chromatin structure assay (scca®) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles *Fertility and Sterility*. **81**: 1289-1295.
- VISHWANATH R (2003). Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* **59**: 571-584.
- WATSON PF (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev.*, **7**: 871-891.
- WATSON PF, MARTIN ICA (1975). Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* **28**: 153-9.
- WIMMERS K, LIN CL, THOLEN E, JENNEN DGJ, SCHELLANDER K, PONSUKSILI S (2005). Polymorphisms in candidate genes as markers for sperm quality and boar fertility. *Anim Genet.*, **36**: 152-155.
- WOELDERS H (1997). Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet. Quart.* **19**:135-138.
- WOODS EJ, BENSON JD, AGCA Y, CRITSER JK (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, **48**: 146-156.
- WORLAND MR, BLOCK WII, GRUBOR-LAJISIC G (2000). Survival of *Heleomyza borealis* (Diptera, Heleomyzidae) larvae down to - 60°C. *Physiol Entomol.*, **25**: 1-5.
- WORLAND MR, GRUBOR-LASSIC G, MONTIEL PO (1998). Partial desiccation induced by sub-zero temperatures as a component of the survival strategy of the Arctic collembolan *Onychiurus arcticus* (Tullberg). *J Insect Physiol.*, **44**: 211-219.
- WORLAND MR, WHARTON DA, BYARS SG (2004) Intracellular freezing and survival in the freeze tolerant alpine cockroach *Celatoblatta quinque maculata*. *J Insect Physiol.*, **50**: 225-232.
- World Health Organization (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Fifth edition. Erişim Adresi:

http://www.cnrha.msssi.gob.es/bioetica/pdf/semen_humano.pdf. Erişim tarihi: 15.06.2017.

WRIGHT JC (2001). Cryptobiosis 300 Years on from van Leuwenhoek: what have we learned about tardigrades? *Zool Anz.*, **240**: 563-582.

YEH Y, FEENEY RE (1996). Antifreeze Proteins: Structures and Mechanisms of Function. *Chem Rev* 96: 601-618.

YURDAKÖK DB, TEKİN K, TIRPAN MB, DAŞKIN A, FİLAZİ A (2017). In Vitro Toxicity of Some Pesticides on Goat and Dog Spermatozoa. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **23**: 297-303.

ZACHARIASSEN KE, KRISTIANSEN E (2000). Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology*, **41**: 257-279.



EKLER

Ek-1: Etik Kurul Belgesi



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

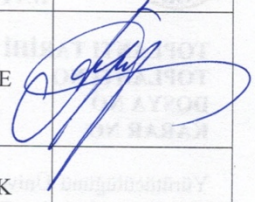
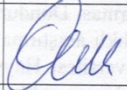
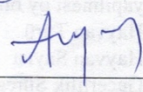
TOPLANTI TARİHİ : 14/10/2015
TOPLANTI NO : 2015-17
DOSYA NO : 2015-136
KARAR NO : 2015-17-187

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Ali Daşkın ve Araş.Gör.Koray Tekin'in, katıldığı "Ankara Tekesi Sperması Dondurulmasında Polinil Alkolün Spermatozoa Canlılığı ve Fonksiyonu Üzerine Etkisi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılması oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Keçi(Teke)
Hayvan Sayısı : 7
Geçerlilik Süresi : 01/11/2015-01/11/2016

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünler Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve	Veteriner Fakültesi	E	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 / 2064 Faks: 0 (312) 212 60 49

	Deontoloji Anabilim Dalı			
Uzm.Vet.Hek.Attıla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Fatma Aysun ÇOSKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Koray
Soyadı : TEKİN
Doğum yeri ve tarihi : Kayseri /06.08.1985
Uyruğu : T.C
Medeni durumu : bekar
Askerlik durumu : yaptı
İletişim adresi ve telefonu : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
Ankara 0312 317 0315/4407

II- Eğitimi

2011- 2017 : Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
Doktora Programı/Ankara
2009 – 2011 : Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans Programı/Ankara
2003 – 2008 : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi/Ankara
1999 – 2003 : Karatay Süper Lisesi (YDA)/Antalya
1997 –1999 : Avni Çöllü Ortaokulu/Antalya
1992 – 1997 : Mehmet Kemal Dedeman İlkokulu / Antalya
Yabancı dil : İngilizce

III- Ünvanları

2008 : Veteriner Hekim

2011 : Uzman (Tezli Yüksek Lisans)

TEKİN K İki farklı sulandırıcı ile dondurulan Norduz tekesi spermasının Motilite, VAP, VCL, VSL parametleri üzerinden değerlendirilmesi. Tez Danışmanı:(ALI DASKIN) Ankara 2011.

IV- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

1. Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Bilim Derneği, Genel Sekreter, 2009
2. Ankara Veteriner Hekimler Odası, Üye, 2010
3. Veteriner Hekimler Derneği, Yönetim (Yedek), 2010
4. ESDAR, Üye, 2013
5. AETE, Üye, 2014

V- Bilimsel İlgi Alanları

Makaleler

1. YURDAKÖK DIKMEN BEGÜM, TEKİN KORAY, DASKIN ALI, FILAZI AYHAN (2015). Effects of PCB 28, 30 and 118 on Bovine Spermatozoa in Vitro. Reproduction and domestic animals, 50, 47-7.
2. AKÇAY ERGÜN, KULAKSIZ RECAI, ÇEBİ ŞEN ÇİĞDEM, DASKIN ALI, TEKİN KORAY (2012). The Effect of different dilution rate on post-thaw quality of ram semen frozen in two different egg-yolk free extenders. Slovenian Veterinary Research, 49, 97-102.,
3. ÇEBİ SEN ÇİĞDEM, TEKİN KORAY, AKÇAY ERGÜN (2015). Effect of Egg Yolk and Removal of Seminal Fluid on Semen Cryopreservation in Norduz Goat. Harran University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, 4(2), 64-67.

4. SONAT ALİ, TEKİN KORAY, AKÇAY ERGUN (2014). G6G/Ovysnch Protokolü ile Senkronize Edilen Ineklerde B-Karoten Enjeksiyonun Döl verimi Üzerine Etkisi. Veteriner hekimler derneği (Kontrol No:1362955)
5. OLGAC KEMAL TUNA, TEKİN KORAY, İNANÇ MUHAMMED ENES, TIRPAN MEHMET BORGA, DASKIN ALI, AKÇAY ERGÜN (2014). Ala Geyiklerde (Dama dama dama) baslıca Androlojik degerlendirmeler. Veteriner Hekimler Dernegi
6. UYSAL ONGUN, ÇEBİ SEN ÇIGDEM, TIRPAN MEHMET BORGA, TEKİN KORAY, İNANÇ MUHAMMED ENES (2014). Saf Hat Horoz Spermalarında in vitro ve in vivo Dölveriminin Degerlendirilmesi.
7. MUSTAFA AVCI, M. BORGA TIRPAN, KORAY TEKİN, ERGUN AKÇAY (2016) The influence of insemination time, age and semen dose on fertility of mares inseminated with frozen semen. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 63, 359-363, 2016
8. KORAY TEKİN, ALİ DAŞKIN (2016). Effect of different extenders on motility and some sperm kinematics parameters in Norduz goat semen. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 40(4): 490-495: 61-62
9. K. TEKİN, A. DAŞKIN (2016). The Reproductive Parameters Affecting Fertility In Cattle Livestock Enterprises. Kocatepe Vet J (2016) 9(1): 43-50
10. Begum YURDAKOK DIKMEN, Koray TEKİN, Mehmet Borgia TIRPAN, Ali DASKIN, Ayhan FILAZI In vitro toxicity of some pesticides on goat and dog spermatozoa. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, January 2016
11. İNANÇ MUHAMMED ENES, TEKİN KORAY, OZEN DOGUKAN, OLGAC KEMAL TUNA, Calogero Stelletta, TIRPAN MEHMET BORGA, DASKIN ALI, Ongun UYSAL. (2017). 7-dehidrokolesterol ve Kolesterol İle Doyurulmuş Siklodekstrinlerin Kısa Süreli Saklama Süresince Boğa Spermasının Motilitesine Etkisi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi
12. Muhammed Enes İNANÇ, Koray TEKİN, Kemal Tuna OLGAC, Mehmet Borgia TIRPAN, Havva ALEMDAR, Beste ÇİL, Ufuk KAYA, Calogero STELLETTA, Ali DAŞKIN.Effects of region and invidualism traits on sperm freezeability of Angora Goats. Vet Hekim Der Derg 88(1): 31-39,2017

Sözlü Bildiriler

1. Kulaksız R, Çebi Ç, **Tekin, K**, Akçay E. The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4 °C. 6 Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi (Uluslararası katılımlı) 18-22 Mayıs Belek Antalya 2011
2. **TEKİN, K.**, TIRPAN, M.B., İNANÇ, M.E, OLĞAÇ, K.T., AKÇAY, E. (2013). Ala Geyiklerde (Dama Dama) bazı androlojik ve spermatolojik parametreler. 7. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama kongresi. 1-4 Temmuz 2013. Kars.
3. **Tekin, K**, Daşkın A, Alemdar H, Stelletta C, Pizzi, F3, Testicular Ultrasonographic Monitoring and Sperm Freezability In Angora Bucks. 12th International Conference on Goats "ICG 2016", September 25-30th, 2016, Antalya, Turkey.
4. **Tekin K**, Alemdar H, Stelletta C, DASKIN A. Effect of estrus behavioral pattern on pregnancy rates in synchronized Angora goats. 12th International Conference on Goats "ICG 2016", September 25-30th, 2016, Antalya, Turkey.
5. **Tekin K**, Daşkın A. Effect of different extenders on motility and sperm kinematics parameters in Norduz goat semen. 12th International Conference on Goats "ICG 2016", September 25-30th, 2016, Antalya, Turkey.

Poster Sunumları

1. Tırpan MB, Bayraktar E, Selehipour N, Çebi Ç, **Tekin K**, Akçay E, Uysal O, Daşkın A, Tekin N: Yumurta sarısı katılarak bekletilen Tris sulandırıcısı ile dondurulan Ankara tekesi spermasının Casa yöntemi ile değerlendirilmesi 6 Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi (Uluslararası katılımlı) 18-22 Mayıs Belek Antalya, 2011.
2. Çebi Ç, **Tekin K**, Tırpan MB, Daşkın A, Akçay E, Uysal O, Tekin N: Dondurulmuş teke sperması üzerine seminal plazmanın uzaklaştırılmasının ve yumurta sarısı ilavesinin etkisi 6 Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi (Uluslararası katılımlı) 18-22 Mayıs Belek Antalya 2011.
3. Evaluation of in Vitro and In Vivo Fertility in Semen in Pure Lines of Cocks. Ongun UYSAL, Zuhale DEMİR, Çiğdem ÇEBİ, Sahnur ERDOĞAN DEMİRTAŞ, Mehmet

- Borga TIRPAN, Muhammet TUNCA, **Koray TEKİN**, Serdar KAMANLI, Muhammed Enes İNANÇ 6. International Balkan Animal Conference; 10/2013.
4. Computer-assisted sperm analysis in deslorelin implanted Turkish Kangal dogs. Halit Kanca, Koray Tekin, Borga Tırpan, Seçkin Salar, İdil Baştan. 17th Annual Conference of the European-Society-of-Domestic- Animal-Reproduction (ESDAR), Univ Bologna, Bologna, ITALY; 09/2013.
5. **K. TEKİN**, M.B. TIRPAN, M.E. İNANÇ, K.T. OLĞAÇ, E, AKÇAY, Ala geyiklerde (Dama dama) bazı androlojik ve Spermatolojik parametreler, 7. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi (Uluslararası katılımlı) 1-4 Temmuz Kars 2013.
6. Ö. Küçükaslan, N, Yerlikaya, K. Tekin. Prof. Dr. Afif Sevinç: Hayatı ve Çalışmaları, 7. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi (Uluslararası katılımlı) 1-4 Temmuz Kars 2013.
7. **Koray TEKİN**, Muhammed Enes İNANÇ, Kemal TUNA OLĞAÇ, Mustafa Yenil AKKURT, Mehmet Cevat TEMİZKAN, Ufuk KAYA, Pürhan Barbaros TUNCER, Umut TAŞDEMİR, Serhat BÜYÜKLEBLEBİCİ, Bengi ÇINAR KUL, Emre DURMAZ, Ogun UYSAL, Okan ERTUĞRUL. Effect of Age on Semen Freezability of Aksaray Malakli Shepherd Dog Breed (Turkish Mastiff). 5.International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine 2014; 07/2014.
8. Muhammed Enes Inanc, **Koray TEKİN**, Kemal TUNA OLĞAÇ, Doğukan ÖZEN, Ogun UYSAL. Cholesterol and 7-Dehydrocholesterol Loaded Cyclodextrin Effect on Motility of Simmental Bull Semen Stored at +4° C 5. International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine 2014; 07/2014.
9. Effect of Different Glycerol Levels on Cryopreservation of Bull Semen Loaded with Cholesterol or 7- Dehydrocholesterol Muhammed Enes Inanc, Kemal Tuna OLĞAÇ, **Koray TEKİN**, Doğukan Özen, Ogun UYSAL. 5.International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine; 07/2014.
10. Tekin K, Yurdakok B, Daşkın A, Filazi A: Effects of polychlorinated biphenyls 28, 30 and 118 on bovine spermatozoa in vitro. Reprod Dom Anim 50, 41-47 (2015) ISSN 0936-6768, 2015.

11. INANC M.E., **TEKIN K.**, DASKIN A. Relationship between CASA motility and kinetic parameters on bull fertility. Annual Meeting of Society for Cryobiology, 2015, The 52. 26-29 July 2015 Ostrava, Czech Republic,
12. DASKIN Ali, INANC Muhammed Enes, **TEKIN Koray**, OLGAC Kemal Tuna, TIRPAN Mehmet Borga, ALEMDAR Havva, CIL Beste, KAYA Ufuk. Effects of region and individualism on sperm freezability of Angora Goat. 32. World Veterinary Congress, 13-17 September 2015, İstanbul, Turkey.
13. Begum YURDAKOK DIKMEN, **Koray TEKIN**, Mehmet Borga TIRPAN, Ali DASKIN, Ayhan FILAZI. In vitro toxicity of some pesticides on goat and dog spermatozoa. 13th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, 19-22 July 2015, Nantes Events Centre, Nantes, France.
14. Daskin A., Stelletta C., Pascale L. Oztutar F. Alemdar H. Turri F. Tirpan B. Vencato J. **Tekin K.** Pizzi F. (2015) Integrated andrological evaluation in Angora goat. Animal reproduction 09/2015; 12(3):792. Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE), Gent, Belgium.
15. Olgac K. T, **Tekin K.**, Inanc M. E, Yilmaz B., Ozen D, Tuncer P.B., Tasdemir U., Buyukleblebici S., Uysal O. Effect of Cholesterol Loaded Cyclodextrin on Semen Cryopreservation of Aksaray Malaklı shepherd dog. 3. International Congress Vetistanbul Group Hotel "Terme" Ilidža, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina 17 - 20. May 2016.
16. INANC M. E., **TEKIN K.**, OLGAC K.T., YILMAZ B., AKKURT Y., TEMIZKAN C., KAYA U., TASDEMIR U., TUNCER P.B., BUYUKLEBLEBICI S., KUL B., UYSAL O., ERTUGRUL O, TEKIN N. Spermatological Characteristics of Aksaray Malaklı Dog (Turkish Mastiff) 18. EVSSAR Congress, Hannover, Almanyaya, 2015.
17. **K. Tekin**, M.E İnanc, A, Daşkın. Relationship between casa motility and kinetic parameters on bull fertility. Conference Paper Cryobiology 71(3 September 2015). Conference: 32nd WORLD VETERINARY CONGRESS, İSTANBUL – 2015.
18. EFFECTS OF REGION AND INVIDUALISM ON SPERM FREEZEABILITY OF ANGORA GOAT. DASKIN Ali, INANC Muhammed Enes, **TEKIN Koray**,

- OLGAC Kemal Tuna, TIRPAN Mehmet Borga, Alemdar Havva, CIL Beste, KAYA Ufuk. Conference: 32nd WORLD VETERINARY CONGRESS, İSTANBUL – 2015.
19. **TEKİN K**, STELLETTA C, SAHİN D, BASTAN I, PARILDAR O.O, DASKIN A. Ultrasound Monitoring reproductive organs in Angora bucks. Proceedings of the 30th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); FozdoIguaçu, PR, Brazil, August 25th to 27th, 2016, and 32nd Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE); Barcelona, Spain, September 9th and 10th, 2016.
20. STELLETTA C, STELLETTA F, CİL B, OLĞAÇ K.T, **TEKİN K**, DASKIN A. Thermographic study of synchronization protocols in Angora goat. Conference: 18TH International Congress on Animal Reproduction, Tours, France, 2016.
21. **Tekin K**, Inanc M.E., Olgaç K.T, Yılmaz B, Özen D, Daskin A, Stelletta C, Uysal O. The Integration of Infrared Thermography Use for Reproductive Parameters in Malakli (Anatolian Mastiff) dog. Conference: 18TH International Congress on Animal Reproduction, June, 2016, Tours, France.
22. STELLETTA C, STELLETTA F, **Tekin K**, C Milani, S, Romagnoli (2016) Frequency of pathological conditions of reproductive tract diagnosed by ultrasound in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). 18TH International Congress on Animal Reproduction June, 2016, Tours, France.
23. **Tekin K**, STELLETTA C, STELLETTA F, DASKIN A. Comparative morphological analysis and optimization of CASA parameters in bull, ram, buck and dog. AAAA Congress, June 2016 DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.03.056 June, 2016, Tours, France.
24. **Tekin K**, DASKIN A. (2016). Effect of different extenders on motility and some sperm kinematics parameters in Norduz goat semen. 12th International Conference on Goats "ICG 2016", September 25-30th, 2016, Antalya, Turkey.
25. **Tekin K.**, Olga KT., Tırpan, B., Cil B., Inanc M.E., Daskin A. Different length of progestagen treatments for TAI protocol in Angora goat. 18TH International Congress on Animal Reproduction June, 2016, Tours, France.
26. Tirpan B., **Tekin K.**, Inanc M.E., Cil B., Alemdar H., Daskin A. Different doses of PMSG during TAI Protocol in Angora goat. 18TH International Congress on Animal Reproduction June, 2016, Tours, France.

27. A. Daskin, **K. Tekin**, M.B. Tirpan, M.E. Inanc, B. Cil, H. Alemdar. The effect of different insemination techniques and cervical conformation index on fertility rates in Angora goat. 18TH International Congress on Animal Reproduction June, 2016, Tours, France.
28. Havva ALEMDAR, Kemal Tuna OLĞAÇ, **Koray TEKİN**, Beste ÇİL, Mehmet Borga TIRPAN, Calogero STELLETTA, Ali DAŞKIN. THE USE OF THERMOGRAPHY IN DETERMINING THE MOST APPROPRIATE TIME FOR INSEMINATION DURING THE TRANSITION PERIOD IN ANGORA GOATS. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi 5-9 Ekim, Antalya 2016.
29. Muhammed Enes İNANÇ, **Koray TEKİN**, Kemal Tuna OLĞAÇ, Burak YILMAZ, Havva ALEMDAR, Şükrü GÜNGÖR, Umut TAŞDEMİR, Pürhan Barbaros TUNCER, Serhat BÜYÜKLEBLEBİCİ, Ogun UYSAL. AKSARAY MALAKLISI ÇOBAN KÖPEĞİNDE (TÜRK MASTİFİ) ANDROLOJİK DEĞERLENDİRMELER. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi 5-9 Ekim, Antalya 2016.
30. Beste ÇİL, **Koray TEKİN**, K. Tuna OLĞAÇ, Calogero STELLETTA. ULTRASONOGRAPHY IN ANDROLOGICAL EXAMINATION OF THE DOG. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi 5-9 Ekim, Antalya 2016.
31. **TEKİN Koray**, Calogero Stelletta, Alemdar Havva, OLGAC Kemal Tuna, CIL Beste, TIRPAN Mehmet Borga, DASKIN Ali SEMEN COLLECTION BY TRANSRECTAL MASSAGE AND INSEMINATION CAMPAIGN IN ANGORA GOAT. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi 5-9 Ekim, Antalya 2016 (En iyi Poster ödülü).
32. İlktan BAŞTAN, Derya ŞAHİN, **Koray TEKİN**, Calogero STELLETTA, Hüseyin KİNET, Ergun AKÇAY, Ali DAŞKIN. Treatment assisted autoimmune therapy of travmatic penis injury in a Bull. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi 5-9 Ekim, Antalya 2016.
33. Derya ŞAHİN, İlktan BAŞTAN, **Koray TEKİN**, Calogero STELLETTA, Hüseyin KİNET, Ergun AKÇAY, Ali DAŞKIN. THE NUMBER OF FALSE MOUNTING EFFECT ON SPERM QUALITY AND FREEZEABILITY IN BULLS. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi 5-9 Ekim, Antalya 2016.

34. Havva ALEMDAR, Kemal Tuna OLĞAÇ, Beste ÇİL, Calogero STELLETTA, Koray TEKİN, Mehmet Borge TIRPAN, Ali DAŞKIN. OUT OF SEASON SYNCHRONISATION AND REPEATED ARTIFICIAL INSEMINATION PRACTICES IN ANGORA GOATS. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi 5-9 Ekim, Antalya 2016.
35. Beste ÇİL, Koray TEKİN, K. Tuna OLĞAÇ, Calogero STELLETTA. ULTRASONOGRAPHY IN ANDROLOGICAL EXAMINATION OF THE DOG. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi 5-9 Ekim, Antalya 2016.
36. KANCA HALİT, SALGIRLI DEMİRBAŞ YASEMİN, Tez Gizem, TIRPAN MEHMET BORGA, TEKİN KORAY (2016). Behavioral effects of deslorelin implantation in livestock guardian male Turkish Kangal dogs. 20th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR).
37. YURDAKÖK DIKMEN BEGÜM, Calogero STELLETTA, **TEKİN KORAY**, ÖZGÜR KUZUKIRAN, DASKIN ALI, FILAZI AYHAN Effects of Phthalates on Bovine Primary Testicular and Epididimal Cells in Vitro. Conference: Society of Toxicology 56th Annual Meeting and ToxExpo., At Baltimora, 2017.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeler:

1. Türkiye Yerli Evcil Hayvan Genetik Kaynaklarından Bazılarının İn Vitro Korunması ve Ön Moleküler Tanımlanması-1 TÜRKHAYGEN-1 2007-2012 TÜBİTAK BÜTÇE: 8.000.000 TL Araştırmacı-bursiyer.
2. Ankara keçileri temelinde keçi işletmelerinde yönetim sisteminin yardımcı üreme teknikleri ile bütünleştirilmiş bir modelinin geliştirilmesi TUBITAK-CNR (İtalya) 2014-2016 Araştırmacı.
3. Ankara Keçilerinde donmuş sperma ile laparoskopik, transservikal-intrauterin ve intraservikal tohumlama yöntemlerinin gebelik şansına etkileri. BAP Büt.e: 160.000 14A0239002, Araştırmacı.

4. Aksaray Malaklısı Çoban Köpeği Irkında (Türk Mastifi) Androlojik ve Spermatolojik Özelliklerin SNP İle Genom Boyu İlişkilendirilmesi. TÜBİTAK BÜTÇE: 360.000 TL Araştırmacı.

Verdiği Seminerler:

1. Keçilerde reproduktif biyoteknolojiler, Y. Lisans Semineri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 2010.
2. Sığırcılık İşletmelerinde Dölverimini etkileyen reproduktif parametreler, Doktora Semineri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 2013.
3. Keçi in vitro embriyo üretiminde güncel yaklaşımlar, Doktora Semineri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 2013.
4. Sığırlarda yardımcı üreme teknikleri, AVBAT Eğitim semineri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 25-27 Mayıs 2010.
5. Reproductive Biotechnologies in farm Animals, IVSA Eğitim semineri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Haziran, 2013.
6. Fertilization, IVSA eğitim semineri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2014.

Katıldığı Çalıştaylar:

1. Çiftlik hayvanlarında embriyo üretimi ve Klonlama (2011, Tubitak-MAM/Gebze).
2. Koyunlarda Laparoskopik Suni Tohumlama (2013, Kars).
3. Embryo transfer in interspecies (Alpaca to Lama), 2015, Padova İtaly.
4. The Specificity of estrus cycle in mare and determination of the ovulation time (Dr. Agata Zagajczuk).
4. IMV satellite meeting on “Spermatology” ICAR, 2016, Tours, France.
5. International Goat Congress Co-Chairman for spermatology session.
6. 8. Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama bilim kongresi “Androloji paneli”

VIII- Diğer Bilgiler

A. DANIŞMANLIKLAR

1. Comparative morphological analysis and optimization of CASA parameters in bull, ram, buck and dog. Student Master Thesis, Emma Toffanin, Padova University, Danışman.

2. Integrated andrological evaluation in Angora goat. Student Master Thesis, Luca PASCALE, Padova University, Danışman.

B. Aldığı Kurslar:

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası: Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi 26 Aralık 2011/06 Ocak 2012, Ankara (Kursiyer).

Küçük Ruminantlarda Laporoskopik İntrauterin Suni Tohumlama Workshop (1-4 Temmuz 2013, Kars (kursiyer).

İngilizce Akademik Yayın Hazırlama Eğitimi, Tübitak 14 Mart 2014, Ankara (Kursiyer).

Sığırlarda Recto-Vaginal Metotla Suni Tohumlama Kursu 24-28 Mart 2014, Ankara (Kursiyer).

Çiftlik hayvanlarında embriyo üretimi ve Klonlama (2011, Tubitak-MAM/Gebze)

Embryo transfer in interspecies (Alpaca to Lama), 2015, Padova Italy.

The Specificity of estrus cycle in mare and determination of the ovulation time (Dr. Agata Zagrajczuk).

IMV satellite meeting on “Spermatology” ICAR, 2016, Tours, France.

C. Üniversite Dışı Deneyim

1. 2013-2013 Uzman Genotek, Uzman veteriner hekim, (Ticari (Özel))

2. 2008-2009 Proje Koordinat.rü Pi2, Organizasyon, (Ticari (Özel))

3. 2008-2009 Veteriner Asistan PDSA (people dispensary for very Sick Animals, Veteriner asistan, (Sivil Toplum Kuruluşu)

4. 2007-2007 Staj Hellenic Wild Life Hospital, Staj, (Sivil Toplum Kuruluşu)

5. 2006-2006 Antalya Hayvan Hastanesi, Veteriner Öğrenci, (Ticari (Özel))

6. 2005-2005 Ümitköy Hayvan Hastanesi, Veteriner Öğrenci, (Ticari (Özel))