



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI**

**HÜCRE İÇİNE GİREBİLEN BAZI KRİYOPROTEKTANLARLA DONDURULAN
KOÇ SPERMASININ *İN VİTRO* EMBRİYONİK GELİŞİM ÜZERİNE ETKİSİ**

Selim ALÇAY

(DOKTORA TEZİ)

BURSA – 2015



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

HÜCRE İÇİNE GİREBİLEN BAZI KRİYOPROTEKTANLARLA DONDURULAN KOÇ
SPERMASININ *İN VİTRO* EMBRİYONİK GELİŞİM ÜZERİNE ETKİSİ

Selim ALÇAY

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Zekariya NUR

BURSA – 2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü' ne,

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Selim ALÇAY tarafından hazırlanan “Hücre İçine Girebilen Bazı Kriyoprotektanlarla Dondurulan Koç Spermasının *İn Vitro* Embriyonik Gelişim Üzerine Etkisi” konulu doktora tezi 27/03/2015 günü, 10:00-12:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınav Jürisi

	<u>Ünvanı, Adı ve Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Zekariya NUR	
Üye	Prof. Dr. M.Kemal SOYLU	
Üye	Prof. Dr. Serhat PABUCCUOĞLU	
Üye	Prof. Dr. Sema BİRLER	
Üye	Prof. Dr. Seran TEMELLİ	

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun tarih, sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Metin PETEK
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	III
İNGİLİZCE ÖZET.....	IV
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
Sperma alma yöntemleri.....	3
Taze koç spermasının değerlendirilmesi.....	5
Spermatolojik muayene ve önemi	8
Makroskobik muayeneler.....	9
Mikroskobik muayeneler.....	10
Morfolojik muayene.....	12
Koç spermasının dondurulması.....	14
Soğuk şokunun sperma üzerine etkileri.....	20
Kriyoprotektanlar.....	21
Non-Permeable (eksternal) kriyoprotektanlar.....	23
Permeable (internal) kriyoprotektanlar.....	24
Spermanın potansiyel fertilesinin belirlenmesi.....	26
<i>İn vitro</i> embriyo üretimi.....	29
Oosit elde etme yöntemleri.....	30
<i>İn vitro</i> maturasyon.....	32
<i>İn vitro</i> fertilizasyon.....	33
<i>İn vitro</i> kültür.....	35
GEREÇ ve YÖNTEM.....	36
Koçlardan sperma alınması ve spermatolojik özelliklerin değerlendirilmesi.....	36
Plazma membran fonksiyonel bütünlük testi (HOST).....	38
Spermanın sulandırılması.....	38
Spermanın dondurulması.....	39
Eritme sonrası spermatolojik muayeneler.....	40
FITC-Pisum sativum agglutinin (FITC-PSA) ile akrozomal yapının ortaya konması	40
<i>İn vitro</i> çalışmalar.....	40
Ovaryumların temin edilmesi.....	40
Oositlerin elde edilmesi.....	41
<i>İn vitro</i> maturasyon.....	41
Spermanın fertilizasyon için yıkanması ve hazırlanması.....	41

<i>İn vitro</i> fertilizasyon.....	42
Koyun serumunun (SS) hazırlanması.....	42
<i>İn vitro</i> kültür.....	42
Sonuçların istatistiksel açıdan değerlendirilmesi.....	43
Çalışmada kullanılan stok solüsyonlar.....	44
Çalışmada kullanılan medyumlar.....	46
BULGULAR.....	52
Taze spermada, sulandırma sonrasında ve 5°C' ta saptanan spermatolojik bulgular.....	52
Ekilibrasyon sonrası saptanan spermatolojik bulgular.....	53
Eritme sonrası saptanan spermatolojik bulgular.....	53
<i>İn vitro</i> fertilizasyon bulguları.....	55
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	64
KAYNAKLAR.....	73
TEŞEKKÜR.....	84
ÖZGEÇMİŞ.....	85

ÖZET

Bu araştırma, gliserol, DMSO, 1,2 propanediol ve etilen glikol içeren sulandırıcılarla dondurulan koç spermasının değerlendirilmesi ve koyun embriyonik gelişimi üzerine etkilerinin karşılaştırılması amacıyla planlanmıştır.

Araştırmada koçlardan sperma elektroejakülasyon yöntemi ile alınmıştır. Sperma alma işlemi aşım mevsimi içinde 5 kez tekrarlanmıştır. Sperma örneklerinin spermatolojik özellikleri incelendikten sonra örnekler bir tüpte toplanmıştır (pooling).

Pooling yapılan sperma 1:1 oranında sulandırıcı A ile sulandırıldıktan sonra 4 eşit hacme bölünmüştür ve sulandırıcı B ile 1:1 oranında sulandırılmıştır.

Eritme sonrası; motilite, HOST, akrozomal bozukluk (FITC-PSA), akrozomal bozukluk (Gimza) ve DMB oranlarına ait ortalama spermatolojik değerler %6 gliserol içeren grupta sırasıyla 53.3 ± 0.9 , 68.3 ± 0.8 , 55.3 ± 0.9 , 50.5 ± 1.3 ve 3.6 ± 0.3 ; %6 DMSO içeren grupta sırasıyla 15.3 ± 0.9 , 30.4 ± 0.8 , 55.6 ± 1.0 , 51.7 ± 1.6 ve 3.6 ± 0.2 ; %6 1,2 propanediol içeren grupta sırasıyla 40.6 ± 0.8 , 52.2 ± 0.8 , 49.7 ± 0.9 , 44.6 ± 1.3 ve 3.8 ± 0.2 ; %6 etilen glikol içeren grupta sırasıyla 43.3 ± 0.9 , 56.7 ± 0.71 , 51.3 ± 0.5 , 47.5 ± 0.8 ve 3.9 ± 0.2 olarak tespit edilmiştir.

Gruplar arasında motilite, HOST ve akrozomal bozukluk oranları yönünden istatistiksel farklılık önemli bulunmuş ($P < 0.05$), DMB oranlarında ise farklılık bulunamamıştır ($P > 0.05$).

%6 Gliserol içeren sulandırıcılarla dondurulmuş koç spermasıyla yapılan IVF'de, 2-4 hücre, 8-16 hücre, morula ve blastosist oranları sırasıyla %79.25, %65.87, %41.27 ve %25.40 bulunmuştur. %6 DMSO grubunda sırasıyla, %38.16, %24.14, %6.90 ve %0, %6 1,2 propanediol grubunda sırasıyla %72.19, %57.80, %25.69 ve %15.60 ve etilen glikol grubunda ise sırasıyla, %61.94, %56.25, %21.89 ve %11.46 saptanmıştır.

%6 Gliserol grubu diğer gruplara göre eritme sonrası motilite ve plazma membran fonksiyonel bütünlüğü daha iyi korumuştur. %40 ve üzerinde motiliteye sahip sperma kullanılarak yapılan IVF sonrası taze spermaya benzer düzeyde bölünme oranı elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Koç, sperma, kriyoprotektan, *in vitro* fertilizasyon, embriyo

SUMMARY

This study was planned with the aim of evaluating the ram sperm that were cryopreserved with extenders which include glycerol, DMSO, 1,2 propanediol and ethylene glycol and comparing the affects on sheep embriyonic development.

Sperm was collected from rams by means of electroejaculator. A total of 5 sperm collection was done during breeding season. After determining the spermatological characteristics of each sperm samples, all samples were collected in one tube (pooled). After pooling, sperm was divided into 4 groups after diluted 1:1 ratio with extender A and diluted 1:1 ratio with extender B.

After thawing; general mean rates of motility, HOST, defected acrosome (FITC-PSA), defected acrosome (Giemsa) and DMB in 6% glycerol group were 53.3 ± 0.9 , 68.3 ± 0.8 , 55.3 ± 0.9 , 50.5 ± 1.3 ve 3.6 ± 0.3 ; in 6% DMSO group were 15.3 ± 0.9 , 30.4 ± 0.8 , 55.6 ± 1.0 , 51.7 ± 1.6 ve 3.6 ± 0.2 ; in 6% 1,2 propanediol were 40.6 ± 0.8 , 52.2 ± 0.8 , 49.7 ± 0.9 , 44.6 ± 1.3 ve 3.8 ± 0.2 ; in 6% ethylene glycol group were 43.3 ± 0.9 , 56.7 ± 0.71 , 51.3 ± 0.5 , 47.5 ± 0.8 ve 3.9 ± 0.2 respectively.

Between these groups, the statistical differences were significant in terms of motility, HOST and defected acrosome ($P < 0.05$) while DMSO group were not significant ($P > 0.05$)

In IVF; 2-4 cell, 8-16 cell, morula and blastosist values in 6% glycerol group were 79.25%, 65.87%, 41.27% and 25.40% respectively. In 6% DMSO group were 38.16%, 24.14%, 6.90% and 0%; in 6% 1,2 propanediol group were 72.19%, 57.80%, 25.69% and 15.60%; in 6% ethylene glycol group were 61.94%, 56.25%, 21.89% and 11.46% respectively.

The use of 6% glycerol showed better results in motility and plasma membrane functional integrity on post-thaw. Sperm has 40% and above motility showed same cleavage rates as fresh sperm in IVF.

Key Words: Ram, sperm, cryoprotectant, *in vitro* fertilization, embryo

1. GİRİŞ

Koyun popülasyonu bakımından dünyanın sayılı ülkeleri arasında yer alan Türkiye, kültür ırkı ve melezlerinin düşük oranda olması ve yerli ırk koyunların verim düzeylerinin düşüklüğü nedeni ile hayvansal üretim açısından istenilen düzeyde değildir (1-3). Türkiye’de son verilere göre 25.031.565 baş koyun bulunmaktadır. Bu koyun varlığının %97’sini yerli koyun ırkları, %3’ünü ise kültür ırkları oluşturmaktadır. Türkiye’de toplam kırmızı et üretiminin %12’si, toplam süt üretiminin ise %5.93’ü koyunculuk sektöründen sağlanmaktadır. Ayrıca yine koyunlardan 46.586 ton yapağı ve 4.492.625 adet deri sağlanmaktadır (4).

Koyun yetiştiriciliğinde üretimin artırılması, hayvan başına elde edilen verimlerin yükseltilmesiyle gerçekleştirilebilir. Türkiye’de koyunların birçoğu genetik kapasiteleri dar, düşük verimli yerli ırklardan oluşmaktadır. Ülkemizde koyun bakımı bilimsel ve modern uygulamalardan yoksun, daha çok geleneklere bağlı olarak yapılmaktadır. Türkiye’de koyunlardan elde edilen toplam et, süt ve yapağı miktarı genetik yapının ve çevrenin iyileştirilmesiyle çok önemli miktarda artırılabilir. Bu durum, koyunculüğün ülke ekonomisinde yerinin, gelecekte de önemini sürdüreceğinin bir göstergesidir (5, 6).

Günümüzde biyoteknolojik yöntemler kullanarak hayvan ıslahını hızlandırmak ve hayvanların verim düzeylerini artırmak olasıdır. İstenilen özelliklerde, doğal üremeye göre daha fazla sayıda yavru elde edilebilen suni tohumlama, embriyo transferi, klonlama ve *in vitro* fertilizasyon (IVF) teknikleri bu uygulamalardan bazılarıdır. Bu tekniklerin, nesilleri tükenmek üzere olan hayvanların korunmasında ve yeniden canlandırılmasında da önemli bir yeri vardır (1, 2). Hayvancılık üreme biyoteknolojisinde, donmuş sperma kullanılarak suni tohumlama yoluyla dişi hayvanların gebe bırakılması önemli bir yer tutmaktadır (7).

Koyun ıslahında hızlı genetik ilerlemenin sağlanması için genetik özellikleri bilinen, bu genetik özelliklerini başarılı bir şekilde yavrularına aktarabilen koçların donmuş spermasının kullanılması zorunludur. Spermanın dondurulması yaklaşık 60 yıldır uygulanan önemli bir biyoteknolojidir (8).

Koyunlarda ilk suni tohumlama çalışmaları Rusya’da veteriner hekim E.I.Ivanoff tarafından başlatılmıştır. Türkiye’de ise 1926 yılında, Türk hekimleri tarafından Macaristan ve Almanya’dan getirilen Merinos koçları kullanılarak suni tohumlama ile melezleme çalışmaları başlatılmıştır (9). Türkiye’de sınırlı olarak yapılan koyun suni tohumlaması; Fransa ve İspanya gibi özellikle koyun sütünden yoğun olarak peynir üreten ülkeler yanında

Avustralya, Yeni Zelanda gibi büyük çapta koyun yetiştiriciliği yapan ülkelerde de büyük önem kazanmıştır (10, 11).

Sperma sulandırıcılarına katılan kriyoprotektanların koç spermasının özellikleri üzerine olan etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir (12-15). Bu çalışmalarda, genellikle tek bir kriyoprotektif maddeye veya bu maddenin farklı oranlarına odaklanılarak eritme sonrası spermatolojik bulgular ortaya konulmuştur. Ancak, farklı kriyoprotektanların koyun embriyonik gelişimi üzerine etkileriyle ilgili kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır (16).

Sunulan çalışma; gliserol, DMSO, 1,2 propanediol ve etilen glikol içeren sulandırıcılarla dondurulan koç spermasının değerlendirilmesi ve bu kriyoprotektanların koyun embriyonik gelişimi üzerine etkilerinin karşılaştırılması amacıyla planlanmıştır.

Bu ve benzeri çalışmalardan kazanılacak bilgi ve deneyimler ile suni tohumlama ve embriyo transferi uygulamalarının yaygınlaşmasında, genetik ilerlemenin hızlandırılmasında, damızlık değeri yüksek koçlardan daha fazla yararlanılmasında, yetiştirmeye bağlı gereksiz uğraş ve masrafların azaltılmasında, çiftleşme ile bulaşabilecek reproduktif hastalıkların kontrolünde ve dölveriminin artırılabilmesinde büyük yararlar sağlanabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

Evcil koyun (*Ovis aries*) Bovidae ailesine ait bir türdür. Yünü ve eti için ilk evcilleştirilen hayvanlar arasında yer alır. Mevsime bağlı poliöstrik hayvanlardan olan koyunların seksüel siklusu gün uzunluğu, beslenme ve ırka bağlı olarak değişmektedir. Ilıman bölgelerde yaşayan çoğu koyun ırkları ilkbahar ve yaz mevsimi süresince anöstrusta olup, sonbahar mevsimi döneminde gün ışığının azalmasına bağlı olarak östrus gösterir. Gün ışığındaki değişimin az olduğu tropikal bölgelerde, yerli ırk koyunlar yıl boyunca seksüel bakımdan aktiftirler. Ilıman iklim ırkları tropikal bölgelere götürülürse, zamanla reproduktif aktivitelerindeki mevsimsel farklılık kaybolarak yeni ortama uyum gösterirler. Yüksek çevre sıcaklığı ve beslenmenin yetersiz olması tropikal bölgelerde yılın bazı aylarında seksüel aktiviteyi kısıtlayabilmekte, yağmurların başladığı mevsimlerde mera şartlarının iyileşmesi, uygun çevre sıcaklığının oluşması seksüel faaliyetlerde artışa yol açabilmektedir (17).

Koçların seksüel faaliyetlerinin sınırları kesin bir şekilde betimlenebilecek mevsimsel özellik göstermezler. Her ne kadar koçlar sonbaharda yüksek bir seksüel aktivite gösterebilirler de kışın son dönemleri, bahar ve yaz aylarında da aktiftirler. Gün uzunluğunun azalması koçlarda FSH, LH ve testosteronun salgılanmasını uyarırken uzayan günler bu hormonları inhibe eder. Ergin koçların gün uzunluğundaki değişimlere yanıt olarak serum gonadotropin ve testosteron sekresyonlarının salınım miktarı birey ve ırklar arasında farklılık gösterir. Bu farklılıklar hipotalamus-hipofiz-testis aksisinin en aktif olduğu kısa günlerde belirgindir (17).

2.1. Sperma Alma Yöntemleri

Koçlarda puberte, testosteron sekresyonu, spermatogenesis ve çiftleşme davranışlarındaki belirgin bir artışla karakterize bir süreçtir. Koçlar 8-10 haftalık yaşta ve yaklaşık 16 -20 kg ağırlığa ulaştıkları zaman testis ölçülerinde artış gözlenir. Bu durum, primer spermatositlerin görülmesi ve seminifer tubullerin genişlemesi ile aynı zamana denk gelmektedir. Kopulasyon ile oluşan ejakülasyondaki canlı spermatozoonlar 4-6 aylık yaşta olgun beden ağırlığının %40-60'ına ulaştığı zaman şekillenir (17). Diğer çiftlik hayvanlarında olduğu gibi koçlardan suni vajina, elektroejakülatör, doğal aşım sonrası vajinaya bırakılan spermanın alınması vb farklı yöntemler kullanılarak sperma alınabilmektedir (17). Sperma koçlardan en uygun şekilde suni vajina ya da elektroejakülatör kullanılarak alınabilmektedir. Bu yöntemlerin birbirine göre üstünlüğü veya olumsuz yönleri olsa da suni vajina yöntemi ile alınan sperma kalite bakımından diğer yöntemlere göre daha üstündür. Suni vajina ile sperma alınacağı zaman, koçun seksüel olarak dışarıdan uyarılmasına gerek duyulması nedeniyle ortamda

kızgın koyun veya fantom bulunması gerekir. Ayrıca koçun suni vajina ile sperma vermeye alıştırılması için sürece gereksinim olması, bazı durumlarda suni vajinayı reddetmesi ve deneyimsizlikten ileri gelen nedenlerden dolayı spermanın alınmaması gibi suni vajina yönteminin olumsuz yönleri bulunmaktadır. Bunun yanında, suni vajina koşulları, çevre ve uygulayıcıdan kaynaklanan farklılıklar da sperma kalitesini etkilemektedir. Sperma alınırken kızgın dişinin kullanılması nedeniyle istenmeyen çiftleşmelere neden olarak sperma kayıplarına yol açmakta, sperma alan kişi veya dişi hayvanın güvenliğini de tehlikeye sokmaktadır. Sperma vermeye alışan koçlardan östrustaki dişinin varlığında günde bir veya iki kez sperma alınabilmektedir (18). Elektroejakülasyon yönteminde suni vajina ile elde edilen sperma kalitesine yakın özellikte sperma alınabilmektedir. Bu yöntem, kızgın dişi veya fantoma gereksinim duyulmaması nedeniyle suni vajina yöntemine göre üstündür. Sperma alınırken daha fazla personele gereksinim duyulması, uzmanlık gerektirmesi, hayvanın yatırılması gibi bazı olumsuzlukları bulunmaktadır (9).

Elektroejakülatörle sperma alma yönteminde, elektroejakülatörün üç elektrotlu rektal probu (19x3,5 cm; uzunlukxçap) kayganlaştırılarak rektuma yerleştirildikten sonra aralıklı olarak 2-3 saniyede bir verilen elektriksel uyarımlarla sperma alınmaktadır. Alınan spermanın direkt güneş ışığından veya soğuk şokundan korunması ve en fazla 10 dakika içerisinde motilite değerlendirilmesinin yapılması gerektiği bildirilmektedir (9).

Elektroejakülasyon yöntemi ile sperma alınırken rektal prob; koçun rektumuna zarar vermeden yerleştirilmeli, ilk uyarımdan sonra 30 saniye masaj yapılmalı ardından voltaj aşamalı olarak artırılarak işlem yinelenmelidir. Her uyarımın ardından voltaj düşürülmeli ve masaj uygulanmalıdır. Bu işlem sperma alınıncaya kadar (3-5 kez) sürdürülmelidir.

Elektroejakülatör ile sperma vermeye alışmış koçlar genelde bir iki uyarım sonrası sperma verebilmektedir. Deneyimsiz koçlar için biraz daha fazla uyarım gereklidir (19).

Suni vajina ve elektroejakülatörle sperma alma tekniklerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda (19, 20), elektroejakülatörle alınan spermanın hacminin suni vajina ile alınanlara göre daha fazla olduğu, sperma yoğunluğunun ise daha düşük bulunduğu belirtilmektedir. Bunun nedeninin elektriksel uyarımla eklenti bezlerinin salgılarının normalden daha fazla salınması olduğu ileri sürülmektedir (21, 22).

2.2. Taze Koç Spermasının Değerlendirilmesi

Spermatozoonlar baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluşur. Baş kısım nükleus ve oosite penetrasyonu sağlayan akrozomu içerir. Kuyruk ise bağlantı kısmı, orta kısım ve son kısımdan (asıl kuyruk) oluşur. Bağlantı parçası, erkek ve dişi gamet nükleuslarını zigotta bir araya getirmede önemli bir rolü olan sentrozomu içerir. Orta kısımda sperma motilitesinde gerekli olan enerji kaynağını sağlayan mitokondria bulunur. Kuyruk, spermanın uterus ve ovidukta ilerleyerek oosite karşılaşip penetre olmasını sağlar (23). Spermatogenezisin son aşamasında bölünme yeteneğini yitiren spermatozoon, hareket özelliği kazanarak özel bir yapıya bürünür. Memeli spermatozoon yapısı genellikle akrozomun ve başın şekli ile toplam uzunluğu bakımından türler arasında farklılık gösterir. Memeli spermatozoon uzunluğu 28.3 µm ile 356.3 µm arasında değişiklik gösterir. Rodent spermasının uzunluğu 150- 250 µm iken insan ve evcil hayvan sperması ortalama 50 µm uzunluğundadır. Koç spermasının baş, orta kısım ve toplam uzunluğu sırasıyla 8.2 µm, 14 µm ve 65 µm olarak belirtilmiştir (24). Memeliler arasında en uzun spermatozooya sahip hayvan ise 350 µm ile Avustralya keselisidir (23).

2.2.1. Baş

Baş kısmı hücre membranı, nükleus, apikal vakuol, akrozomal kap, post-nükleer kap, bazal yumru ve implantasyon çukurluğundan oluşur (9). Temel fonksiyonu; oosite penetre olmak, haploid genomu vermek ve fertilizasyon sonrası embriyonik gelişimi başlatmaktır (23).

2.2.2. Nükleus

Baş kısmın merkezinde bulunan nükleus haploid kromozomlar içerir. Nükleusun şekli kaba olarak başın şekli ile aynıdır (9). Spermanın kromatin yapısı, metafaz aşamasındaki somatik hücrelerin kromozomlarından 6-10 kat daha kompakt görünümde ve transkripsiyonel olarak inaktif durumdadır. Histokimyasal boyamada primatların dışında memeli spermatozoasının kromatin yapısı genellikle homojen bir şekilde boyanır (23). Primatlara ait spermatozoa nükleusu ise vakuollü görülür. Bazı nükleer vakuoller, spermatidlere ait sitoplazma kalıntıları içerir. Nükleusta vakuollerin bulunması birçok memeli türünde bozukluk olarak nitelendirilir. İnfertil ruminantların bazılarında nükleus yıkımına yol açan, perinükleer sitoplazma ve mikrotübüllerin invaginasyonu görülmektedir (23).

Genetik kusurlar, nükleusta bulunan kromozomlar diğere bir değişle DNA tarafından yavruya aktarıldığı için, sperm DNA hasarlarının belirlenmesi spermatolojik muayene sistematığında ayrı bir önem kazanmaya başlamıştır. İnfertil bireylerin sperma DNA kırıkları oranının, fertil bireylere göre daha yüksek olduğu ve bu nedenle, bireyin fertilitite yeteneğini ortaya koymak için, spermanın DNA bütünlüğünün önemli olduğu vurgulanmaktadır. Günümüzde, genetik hastalıkların önüne geçmek ve yardımcı üreme tekniklerinde başarı şansını artırmak için, gametlerin kromatin yapısının bütünlüğünün ortaya koyulmasına yönelik çalışmalar önem kazanmaya başlamıştır (25).

2.2.3. Akrozom

Nükleusun frontal ve lateralinde, plazma membranı ve perinükleer teka arasında bulunan veziküler yapıya verilen addır. Spermiyogenezisin golgi aşamasında oluşur. Yapısal ve işlevsel olarak ön ve arka olmak üzere iki bölüme ayrılabilir (9). Ön kısım spermanın kumulus hücrelerini geçmesi veya zona pellusidaya (ZP) bağlanmasında önemli role sahiptir. Bu kısım kumulus hücreleri geçilirken akrozomal ekzositozun olduğu bölgedir. Arka bölüm diye adlandırılan ekvatoryal veya posterior akrozomal kısım ise akrozomal ekzositoz ve fertilizasyon sonrası oositle birleşir (23).

Akrozom spermatozoanın ön kısmını kaplayan yapıdır. Bu yapı fertilizasyon sırasında spermatozoanın oosit katmanlarını geçerken gerekli olan çok sayıda farklı hidrolitik enzimleri içerir (17). Bu parçalayıcı enzimler akrozom reaksiyonu sonucu ortaya çıkarak penetrasyon öncesi spermatozoondan ayrılırlar. Fertilizasyonda önemli rol oynadığından, morfolojik incelemelerde, akrozomun ayrı bir önemi vardır. Spermatozoonun yaşlanması veya zararlı etkilere bağlı olarak apikal bölgede bulunan akrozomal enzimleri içeren yapıların bozulması nedeniyle fertilitite kaybı oluşabilmektedir (9). Arzu edilen oranda gebelik elde etmek için fertilizasyonda etkin rol oynayan enzimleri içeren akrozomal yapının bütünlüğünün bozulmamış olması gerekmektedir. Akrozom Hyaluronidaz, Corona Penetrating Enzyme (CPE), Neuraminidaz ve Tripsin gibi fertilizasyonda etkin rol oynayan enzimleri içerir (17). Hyaluronidaz ve CPE, oosit çevresindeki kumulus hücrelerine bağlı olan hyaluronik asidi hidrolize eder (9). Spermatozoa, hyaluronidaz enzimini salgılayarak hyaluronik asit bağlarını yıkımlayarak kumulus hücrelerini dağıtır ve kumulus ooforusa penetre olur (23). Akrozomal matriks ve proteolitik enzimlerin ZP yüzeyinde serbest bırakılarak fertilizasyon yırığı (deliği) açılmasında görev aldığı ileri sürülmektedir. Fertilizasyon deliğinin şekillenmesinde spermanın mekanik gücünün yani motilitesinin de etkili olduğu bildirilmiştir (9, 17, 23).

2.2.4. Sperma Kuyruğu ve Flagellum

Sperma kuyruğu, başın arka kısmından uzanan ince uzun bir organeldir. Kuyruğun görevi kamçı tarzı hareket ile spermayı ileri götürmek ve hareket için enerji üretmektir. Eksternal morfolojide, kuyruk temel olarak bağlayıcı parça, orta parça, ana parça ve son parça olmak üzere dört bölgeye ayrılabilir.

2.2.5. Boyun Bölgesi (Bağlayıcı Parça), Orta Kısım ve Kuyruk

Memeli spermasının “boyun” kısmı baş ve kuyruğu bağlayan karmaşık ve özelleşmiş bir yapıdır. Kuyruk ve baş ara yüzü ball ve socket eklemi benzeridir. Başın konkav yüzeyi bazal yumru, kuyruğun konveks yüzeyi ise kapitulum olarak adlandırılır. Her ikisi birbirleri ile ince filamentlerle bağlanmış elektron yoğunluğunda yapılardır (23).

İçinde mitokondrialar, sentriol halkaları ve fibriller bulunan orta kısım, asıl kuyruktan daha kalındır. Boyun bölgesi arkasınca uzanan tüm yapı bölgesi sperma kuyruğu veya flagellum olarak adlandırılır. Orta kısım, ana kısım ve son kısım olarak ayrılabilir. Kuyruğun ana yapısı olan aksonema, yoğun dış lifler ve fibröz bir kılıf ile sarılmıştır. Aksonema bir çift sentral küçük mikrotübül ve onu çevreleyen büyük dokuz mikrotübül çiftinden oluşmuştur. Bu fibriller aksiyal fibril yığını olarak tanımlanır (9, 23). Aksiyal fibril yığını çevreleyen periferik halka olan fibroz zarın, sperm maturasyonu, progresif motilite, kapasitasyon ve ovidukta spermin taşınması sırasındaki hiperaktivasyon sağlayan reaksiyon zinciri sinyalinin verilmesinde rol oynayan enzim ve komponentleri içerdiği düşünülmektedir.

Mitokondrialar spermatozoonun metabolit merkezi olup orta kısmın çevresini sarar. Bu oluşuma mitokondrial heliks adı verilir. Mitokondrial heliks, 10-15°'lik bir açı ile 70-80 kez orta kısım etrafında döner (9). Sperm mitokondriyası fizyolojik olarak aktiftir ve farklı substratlarla ATP sentezleyebilir (17).

Spermatozoa, tubulus seminiferus lümenine geçtiğinde rüzidüal parçacık olarak adlandırılan sitoplazmanın kullanılmayan kısımlarını saçar. Bu parçacıklar sertoli hücrelerince fagosite edilir. Mature olmuş serbest spermatozoanın boyun kısmında kalan sitoplazma parçası ise “sitoplazmik damlacık” (SD) olarak adlandırılır. Sitoplazmik damlacık boyutları türler arasında farklılık gösterir. SD de yapılan ileri yapısal analizlerde farklı yapılarda membranlar, lipit damlacıkları, golgi yapılı kesecik ve kese, çeşitli sitoplazmik yapılar gözlenmiştir. Biyokimyasal olarak SD, lipit, lipoprotein, RNA ve birçok hidrolitik enzim içerir. Sitoplazmik damlacığın spermatogenezis ya da fertilizasyon sırasında belirli bir

etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir. Sitoplazmik damlacık spermatozoanın orta kısmında, distal uçtan proksimal uca doğru göç eder ve epididimisteki taşınma sırasında dökülür. Spermatozoanın bu yapıyı atamaması sonucu motilitenin engellendiği ve fertilizasyonda kullanılmadığı görülmüştür. Bol miktarda sitoplazmik damlacıklı sperma en çok domuz ejakülatlarında gözlenmektedir (23). Ayrıca sık sık ejakülasyon yapan hayvanlarda spermanın epididimal olgunlaşmasını tamamlamaması sonucu spermada yüksek oranda sitoplazmik damlacığa rastlandığı bildirilmiştir (26).

Canlı spermatozoa sağlam ve tamamen lipoproteinden oluşan plazma membranı ile kaplıdır. Plazma membranı, özellikle kapasitasyonda, akrozom reaksiyonunda ve oositin plazma membranını eritmede önemli role sahiptir. Sperma plazma membranı epididimise geçişte çeşitli sekretorik proteinleri absorbe eder. Bu sayede epididimal spermatozoa fertilizasyon yeteneği kazanır (23).

2.3. Spermatolojik Muayene ve Önemi

Oositin fertilizasyonu için morfolojik ve fonksiyon bakımından sağlam spermatozoaya gereksinim vardır (27, 28). Spermanın alındığı mevsim, sperma alma sıklığı, hayvanın ırkı ve sperma alma ve saklama yöntemi gibi kimi parametrelerin spermatolojik özellikler üzerine dolayısı ile fertilizasyon yeteneği üzerine etkileri bulunmaktadır (26, 29-31). Elde edilen ejakülatın kalitesini doğru bir şekilde tahmin etmek amacıyla spermatozoanın farklı fonksiyon ve bölgeleri ile ilgili çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Bu test ve yöntemlerin tümünün fertilizasyon ile değişik oranlarda korelasyonları vardır. Bu yöntemlerin hiçbiri tek başına ejakülatın fertilizasyon yeteneği üzerinde karar vermek için yeterli değildir. Hatalı pozitif ve hatalı negatif durumların önüne geçebilmek için, çok sayıda test veya yöntemin birlikte değerlendirilmesi gerekir (17).

Hacim, yoğunluk, kitle hareketi (mass aktivite), motilite ve anormal spermatozoon oranının belirlenmesi spermanın rutin analizlerindedir. Bu analizler yanında sperm membranının işlevsel bütünlüğü, zonaya bağlanma veya penetrasyon testleri, servikal mukus penetrasyon testi, termal dayanıklılık testleri, elektron ve floresan mikroskopiye dayalı analizler gibi ileri teknik alet ve beceri gerektiren analizlerde söz konusudur. Tüm bu test ve analizler spermanın potansiyel fertilitite yeteneğinin tahmini amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Spermanın kalitesi ve kantitesi yaş, mevsim, sıcaklık, ırk ve hatta aynı sürü içindeki koçlar arasındaki hiyerarşiye bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (19). Fertilizasyon ile ilişkili parametrelere bakarak fertilitite yeteneğinin belirlenmesi için, hayvanın

fiziksel muayenesi, libidosunun ve aşım yeteneğinin muayenesi, iç ve dış üreme organlarının muayenesi ve spermanın muayenesinin yapılması gerekir. Erkek damızlık materyalin fertilité yeteneğinin belirlenmesinde; ejakülattaki spermatozoon yoğunluğu, ejakülatta bulunan toplam hücre sayısı, spermatozoon motilitesi, ileriye doğru hareketin hızı, ölü-canlı oranı, akrozom ve diğer morfolojik bütünlükler değerlendirilmektedir. Bunun yanında, DNA kalitesi, enzimatik aktivite, ozmotik stres testleri, inkübasyon testleri (viabilite), artırılmış akrozom reaksiyon oranı, mukus veya jel penetrasyon testi, hamster yumurta penetrasyon testi, *in vitro* fertilizasyon testi ve heterospermik tohumlama testlerinin de uygulandığı bildirilmektedir (17).

Sperma ancak hızlı ve etkin bir biçimde incelenerek fertilité gücü hakkında gerçekçi bir fikir edinilebilir. Tek bir teste dayandırılarak damızlığın fertilité gücüne ilişkin bilimsel bir tahminde bulunabilmek olası değildir. Bunun için bir dizi test yapmak ve bu testler sonucunda potansiyel fertilitéyi belirlemek gerekmektedir. Rutinde memeli spermasını değerlendirmek amacıyla kullanılan test ve yöntemler makroskobik muayeneler, mikroskobik muayeneler, sperma fonksiyon testleri, mikrobiyel analizler olmak üzere dört ana başlık altında toplanmıştır (32).

2.4. Makroskobik Muayeneler

Hacim, renk, koku ve kıvam gibi mikroskop vb herhangi bir alete gereksinim duyulmadan görsel olarak yapılan muayeneler makroskobik muayeneler başlığı altında değerlendirilir. Koçlarda bakı ile de görülen kitle hareketi bazı araştırmacılar tarafından makroskobik muayeneler arasında da değerlendirilmektedir (9).

2.4.1. Hacim

Koçun bir ejakülasyonundan elde edilen toplam sperma hacmidir. Ejakülâtın hacmi spermanın alınmasından hemen sonra, dereceli sperma toplama kadehinden, ml cinsinden okunarak değerlendirilir. Ergin bir koçun sperma hacminin 0.7- 1.2 ml arasında olduğu, sperma hacminin sperma alma yöntemi yanında, ırk, yaş ve çevre koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterebildiği bildirilmiştir (9, 17). Ejakülâtın hacmini spermatozoa, testis ve eklenti üreme bezlerinin sıvıları oluşturur. Spermanın hacmi genellikle spermasını uterusu bırakan türlerde (aygır, domuz, köpek), vajinaya bırakan türlere göre (koç, boğa, teke) daha fazladır. Ayrıca koç, ağır ve tekede mevsime göre ejakülât miktarında önemli değişiklikler görülmektedir (32).

2.4.2. Renk

Spermanın rengi, ejakülatın kıvamına, içerdiği spermatozoon sayısına ve erkek ekleni bezlerinin salgısına bağlıdır. Ejakülatın rengi normalde açık kremden koyu kreme kadar değişkenlik gösterir. Ejakülatta sarı ya da yeşil renk boğa ve koçlarda riboflavine bağlı olarak sıkça görülür. Renginin kırmızı-kahverengi olması kanın (hemospermie), sarı-yeşilimsi renk irinin (pyospermie), sarı renk idrarın (urospermie) spermaya karışmış olabileceğini gösterir (9, 32).

2.4.3. Koku

Spermanın kendine has aromatik bir kokusu vardır. İçine herhangi bir maddenin karışmasına bağlı olarak kokusunda değişiklik olabilir (9). Fizyolojik olan aromatik kokusundaki değişiklikler patolojik olarak kabul edilir.

2.4.4. Kıvam (Viskosite)

Spermanın kıvamı diğer bir deyişle ejakülatın akışkanlığı viskometre ile ölçülür. Kıvam yoğunlukla, dolayısıyla içerdiği spermatozoon sayısı ile ilişkilidir. Örneğin, yoğunluğu yüksek olan koç sperması boğa spermasına göre daha az akışkandır. Ejakülattaki spermatozoa yoğunluğu koç ejakülatına göre daha düşük olan boğa spermasının viskozitesinin 1.7-10.5 cP arasında olduğu bildirilmiştir (9, 32). Viskosite progressif motil spermatozoa hızını etkilemektedir. Viskositenin yüksek olduğu ortamlarda spermatozoanın ilerleme hızı daha düşüktür.

2.4.5. Kitle Hareketi (Mass-Aktivite) (Makroskobik)

Spermatozoa açısından oldukça yoğun olan koç, boğa ve teke gibi ruminant sperma örneklerinde gözlenebilen kitle hareketi aygır ve köpek sperma örneklerinde gözlenmez (32). Ejakülat alınır alınmaz ışık arkadan gelecek şekilde bakıldığında, cam tüp içerisindeki spermanın kaynama ve girdap hareketleri, yani kitle hareketi belirgindir. Ancak mikroskop altında kitle hareketini incelemek daha sağlıklı sonuç vermektedir (9). Bu nedenle çoğu araştırmacı kitle hareketini mikroskobik muayene sistemiyle değerlendirmektedir.

2.5. Mikroskopik Muayeneler

2.5.1. Kitle Hareketi (Mass-Aktivite)

Lamin üzerinde taze sperma damlatıldıktan sonra zaman geçirilmeksizin x100 büyütmede kitle hareketi incelenir. Kitle hareketi spermatozoanın bireysel hareketlerinin fark edilmediği ancak binlerce hücrenin kaynama veya dalgalanması şeklinde gözlemlenir. Taze spermanın üzerine lamel kapatılmaksızın incelenen bu testte (+)'den (++++)'e kadar puanlama yapılarak değerlendirilir. En yüksek kitle hareketini (++++), kötü özellikteki spermayı ise (+) açıklar. Bazı araştırmacılar 0-5 veya 0-10 arası skalayı kullanmaktadır (9). Normal koç spermasının kitle hareketi +++ ile ++++ arasındadır. Mass aktivite bir ejakülatın motilite, yoğunluk ve fertilité yeteneği hakkında önemli bilgiler verir (17).

2.5.2. Motilite

Ejakülat içerisinde ileriye doğru düzgün doğrusal hareket eden spermatozoonların, yüzdesi motilite olarak tanımlanmaktadır. Spermatozoonun dışı genital organı içerisinde fertilizasyon bölgesine ulaşmasında, oosit yüzeyinde bulunan kumulus hücrelerini ve ZP'yi geçişinde önemli rolü bulunan motilite, spermatozoanın içinde bulunduğu sıvının içeriği, yoğunluğu, sıcaklığı ve hijyeni gibi çok sayıda iç ve dış faktörden etkilenir. Spermatozoanın motilitesi sıcak ve soğuk gibi çevresel faktörlerden etkilendiği kadar, sulandırıcının ozmotik basıncı ve sulandırıcının bileşenlerinden de etkilenir (17).

Motilite muayenesi taze, sulandırılmış ve dondurulmuş eritilmiş spermada gerçekleştirilebilir. Motilite, sperma yoğunluğuna bağlı olarak, taze veya sulandırılmış spermanın üzeri lamel ile kapatıldıktan sonra, ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskopta x400 büyütmede değerlendirilir. Koç sperması gibi yoğunluğu fazla olan ejakülat örnekleri serum fizyolojik ya da sperma sulandırıcıları ile sulandırılarak incelenir. Mikroskopun görüş alanında bulunan spermatozoanın ileriye doğru hareket edenleri dikkate alınarak motilite hakkında karar verilir ve % olarak ifade edilir. Aynı preparatta 3 değişik mikroskop alanındaki motilite ortalamasının alınması gerekir (9). Çiftlik hayvanları arasında en yüksek motilite (%85-90) taze koç spermasında gözlenir (9, 17). Sulandırılmış veya dondurulmuş eritilmiş spermada, genellikle ikinci bir sulandırmaya gerek duyulmaz. Sperma örneği doğrudan lama damlatılarak üzeri lamel ile kapatıldıktan sonra mikroskopik muayene gerçekleştirilir. Koç sperması gibi yüksek yoğunlukta dondurulan spermanın eritme sonrası motilitesi değerlendirilirken sperma tekrar sulandırılabilir (33). Sadece başı doğrultusunda ileriye doğru hareket eden spermatozoanın genital kanalları geçerek oositi dölleme yeteneği

bulduğundan, motilitenin, potansiyel fertilitiyi belirlemede büyük önemi vardır (17). Yapılan çok sayıda çalışmada motilite ile fertilitite arasında sıkı bir ilişkinin bulunduğu bildirilmiştir (9, 17, 24).

Spermatozoanın metabolit artıkları, ortamda bulunan hücre kalıntıları ve diğer kirleticilerden kaynaklanan reaktif oksijen parçacıkları hücre zarı fosfolipitlerine bağlanarak dejenere olmuş yağ asitlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Dejenere olmuş yağ asidinden türeyen peroksitler ve açığa çıkan diğer dejeneratif etkili ürünlerin spermanın motilite ve fertilitite yeteneği üzerinde olumsuz etkileri vardır (17). Motilite oranının düşmesi spermatozoonun yaşlanmasına bağlı olarak normal ve anormal spermatozoon popülasyonunda değişik zamanlarda farklı oranlarda şekillenir. Bunun sonucu spermatozoonun hareket şeklinde değişiklikler şekillenir. Spermanın göstermiş olduğu hareket şekline göre ileri doğru hareket edenler (progressif), dairesel hareket edenler (sirküler), yerinde durarak titreşenler (vibratör), geriye doğru hareket edenler (revers) diye de adlandırılır (17).

Günümüzde motilite değerlendirmeleri için geliştirilmiş semen analiz sistemleri bulunmaktadır. Bu sistemler genellikle ısıtma tabanlı faz kontrast mikroskop, kamera, ve bilgisayar ünitelerinden oluşmaktadır (24). Bu sistemle spermanın motilitesi, hızı, hareket şekli, yoğunluğu ve sulandırma oranı hakkında ayrıntılı bilgi elde edilir. Ayrıca sonuçları karşılaştırma, saklama ve grafik şeklinde alabilme özellikleri de bulunmaktadır (17).

2.5.3. Spermatozoon Yoğunluğu

Birim hacimde bulunan spermatozoon sayısına yoğunluk denir. Sperma yoğunluğu hemositometrik, fotolometrik ve elektronik sayaç yöntemi gibi değişik yöntemlerle saptanmaktadır. Koç spermasının yoğunluğu $2000-3000 \times 10^6$ /ml dir. Spermatozoon yoğunluğu spermanın kalitesi hakkında değerli bir veri olmasının yanı sıra, sulandırma oranının saptanması için de ayrı bir öneme sahiptir (17). Sperma alma yöntemi ve sıklığı, spermanın alındığı mevsim, sperma veren hayvanın yaşı ve beslenme durumu sperma yoğunluğunu etkilemektedir. Elektroejakülatör ile alınan spermanın yoğunluğu eklenti üreme bezleri salgılarının fazlalığına bağlı olarak doğal aşım ve suni vajina yöntemine göre daha düşüktür (21, 22).

2.6. Morfolojik Muayene

Mikroskobik bakıda spermatozoonların morfolojilerinin incelenmesi, spermanın potansiyel fertilitisini değerlendirmede önemli bir yer tutmaktadır. Anormal yapıdaki spermatozoonların fertilizasyon güçleri yoktur. Sağlıklı bir spermada her zaman morfolojik

bozukluğu olan hücreler bulunabilir. Fizyolojik olarak %20'den fazla morfolojik bozukluk saptanan ejakülat örnekleri kullanılamaz.

Morfolojik bozuklukların sınıflandırılmasında değişik yöntemler kullanılmaktadır. Günümüzde morfolojik bozukluğun lokalize olduğu yere göre sınıflandırma yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde göre morfolojik bozukluklar; akrozomal bozukluklar, başa ait bozukluklar, implantasyon çukurluğuna ait bozukluklar, başın orta bölüme bağlanması ile ilgili bozukluklar, orta bölüme ait bozukluklar ve kuyruk bozuklukları olarak sınıflandırılmaktadır (9).

Kimi araştırmacılar; morfolojik bozuklukları oluşum evrelerine göre anormal baş, orta kısmın şekillenmemesi, abaksiyal bağlanma, kuyruğun kuvvetli kıvrılması gibi spermatogenezis hatasından ileri gelen primer bozukluklar ve ayrılmış baş, distal damlacık, kıvrık kuyruk gibi kanal sisteminden ileri gelen sekonder bozukluklar olarak değerlendirirken, kimi araştırmacılar da infertiliteye neden olan (majör) ve olmayan (minör) bozukluklar olmak üzere iki başlık altında değerlendirmektedir (34). Spermatozoonda bulunan morfolojik bozuklukları birincil, ikincil ve üçüncül olarak sınıflandıran araştırmacılar da bulunmaktadır. Bu araştırmacılar birincil bozuklukların spermatogenezis sırasında, ikincil bozuklukların kanal sisteminden geçişte, üçüncül bozuklukların ise ejakülasyon sırasında veya sonrasında (spermanın alınması, sulandırılması, dondurulması, depolanması vb) oluşanlar olmak üzere üç farklı gruba ayırmışlardır (17).

Koç spermasının genellikle hacimce düşük olmasına karşın, yüksek yoğunlukta spermatozoa içerdii bildirilmektedir. Fizyolojik özellikleri bakımından ergin bir koçun sperma hacmi 0.5-1.0 ml, yoğunluğu $2-3 \times 10^9$ /ml, motilitesi %80-90, mass aktivitesi (++++) ve anormal spermatozoon oranı %5-15 arasındadır (35).

Sperma alma yöntemi, mevsim, hayvanın fizyolojik durumu, ortam sıcaklığı ve hayvanın ırkı spermanın özelliklerini etkilemektedir (9). Soylu (36) Karacabey Merinoslarında yaptığı bir çalışmada, ortalama sperma hacminin 1.03 ml, mass aktivitenin +++, motilitenin %83.19 ve spermatozoon yoğunluğunun 2.96×10^9 /ml olduğunu bildirmiştir. Özkoca (37) Merinos ırkı koçlardan suni vajina ile sperma olarak hacim, yoğunluk, motilite ve morfolojik bozukluk değerlerini sırasıyla; 1.9 ml, 2.49×10^9 /ml, %90 ve %14.9 olarak bulmuştur. Gökçen ve arkadaşları (38) yine Merinos ırkı koçlardan aldıkları spermada, hacim, mass aktivite, motilite, akrozomal bozukluk ve toplam morfolojik bozukluk değerlerini sırasıyla; 0,9 ml, +++++, %85, %1.0 ve %5.1 olarak saptamışlardır. Ak ve arkadaşları (39) 5 baş Kıvrıcık

koçtan elektroejakülatör yardımıyla aldıkları spermada 0.89 ml hacim, 4-5 mass aktivite, 1.87×10^9 /ml spermatozoon yoğunluğu, %87.25 motilite ve %16.5 morfolojik bozukluk saptamışlardır. Pontbriand ve arkadaşları (40) 5 baş Dorset ırkı koçtan elektroejakülatör yardımıyla aldıkları ejakülat örneklerini pooling yaparak, %83 motilite ve %1.20 anormal akrozom oranı elde etmişlerdir. Mattner ve Voglmayr (30) Merinos ırkı koçlardan elektroejakülatör ve suni vajina yardımıyla sperma alarak karşılaştırmışlar, elektroejakülatör ile alınan ejakülat örneklerinde ortalama olarak 1.4 ml hacim, 2.3 mass aktivite, 2.5×10^9 /ml spermatozoon yoğunluğu, %82 canlı spermatozoon oranı ve %87 normal spermatozoon oranı saptamışlardır. Her iki sperma alma yönteminde de hacim ve canlı spermatozoon oranının benzer olduğu, fakat mass aktivite ve yoğunluğun suni vajina yönteminde daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Mathur ve arkadaşları (41) Rambouillet ırkı koçların ejakülat örneklerinden elde ettikleri poolingde +++++ kitle hareketi, %90 motilite, 3.56×10^9 /ml yoğunluk, %90.7 canlı spermatozoon ve %20 morfolojik bozukluk oranı saptamışlardır. Tris bazlı sulandırıcı kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise gliserol içeren grupta dondurma-eritme sonrası motilite oranının %51 olduğu, akrozomal bozukluk oranının ise %60 olduğunu bildirilmiştir (13).

2.7. Koç Spermasının Dondurulması

Suni tohumlama, gamet hücrelerinin kriyoprezervasyonu, liyofilizasyonu, *in vitro* fertilizasyon, *in vitro* maturasyon, gen transferi ve klonlama gibi çok sayıda tekniği kapsayan reproduksiyon biyoteknolojisi, hayvancılık sektöründe vazgeçilmez öneme sahiptir. Değerli erkek gamet hücrelerinin dondurulması ve dişi hayvanların suni yolla tohumlanması esasına dayanan suni tohumlama biyoteknolojisi, bu teknikler arasında en etkin ve yaygın olanıdır. Bu teknik sayesinde, eldeki hayvan popülasyonunda kısa sürede istenen yönde genetik ilerleme sağlanabilmekte, yetiştirici erkek damızlık besleme külfetinden kurtulunmakta, değerli bir damızlık bireyden geniş ölçüde yararlanılabilmekte, veneral yolla bulaşan hastalıkların önüne geçilebilmekte ve elindeki sürüde bir örneklik sağlanabilmektedir (9, 17, 42).

Günümüzde gamet hücrelerinin saklanması, 5°C'ta sıvı saklama, dondurma ve liyofilizasyon yöntemi olmak üzere başlıca 3 yöntem kullanılmaktadır (43). Her üç yöntemde de spermanın eritme sonrası yaşamsal işlevlerini ve fertilitate yeteneğini, alınan spermanın başlangıç kalitesi yanında saklama sıcaklığı, soğutma ve dondurma hızı, sulandırıcının kimyasal bileşenleri ve kullanılan kriyoprotektif maddeler belirler (44-46). Eritme sonrası

başarının düşük olduğu tür ve bireylerde sıklıkla kullanılan sıvı saklama yöntemi, spermayı sulandırdıktan sonra 5°C gibi düşük sıcaklıklarda 2-3 gün boyunca saklama esasına dayanan bir yöntemdir (9, 47). Kriyotoleransı yüksek tür ve bireylerde tercih edilen dondurma yöntemi ise spermanın daha düşük sıcaklıklarda saklanması temeline dayanır. Hücreyi soğuk şokunun etkilerinden koruyan kriyoprotektif madde içeren sulandırıcılarla sulandırılan sperma, ampul (etil alkol banyosunda), pellet (-79°C kuru buzda) veya payet (-110°C sıvı azot buharında) yöntemiyle dondurularak -196°C'ta saklanır (48, 49). Uygun saklama koşullarında spermanın potansiyel fertilitesi yıllarca korunabilir (17, 47). Spermanın genetik materyaline etki etmeksizin motilitesinin kaybolmasına neden olan liyofilizasyon yöntemi ile saklama teknolojisinde ise fertilizasyon için morfoloji ve işlev bakımından sağlam spermatozoaya gereksinimin olmaması nedeniyle, ejakülasyon sonrası elde edilen spermanın yanında, düşük kaliteli ve testis ile epididimisten elde edilen olgunlaşmamış sperma da kullanılabilir (50, 51). Liyofilize edilmiş sperma, buzdolabı koşullarında risksiz bir şekilde uzun yıllar fertilizasyon yeteneğini korumaktadır. Motilite yeteneğini yitiren liyofilize spermanın *in vivo* ve *in vitro* koşullarda oositi fertilize etme yeteneği bulunmamaktadır. Bunun için spermatozoonun intrasitoplazmik enjeksiyonunun yapılması gerekmektedir (52).

Sperma dondurma teknolojisi, 1949 yılında Christopher Polge ve arkadaşlarının gliserolün spermatozoonlar üzerine kriyoprotektan etkisini tesadüfen keşfetmeleri ile büyük bir ivme kazanmıştır (53, 54). Spermanın dondurulması insan, yabani ve evcil hayvanlarda yardımcı üreme tekniklerinin yaygınlaşmasını ve uygulanabilirliğini artırmıştır. Çoğu memeli spermasının sıvı azot (-196°C) ile dondurularak saklanması başarılı sonuçlar elde edilmektedir.

Kriyopreservasyon; spermanın sulandırılması, 5°C'a soğutulması, dondurulması ve eritilmesi aşamalarını kapsamaktadır (53, 55). Spermanın bu aşamalara karşı direnç gösterebilmesi için sulandırılması zorunludur. Dondurma amacıyla gerçekleştirilen sulandırıcı geliştirme çalışmalarında, çeşitli pH tamponlayıcı maddeler (Tris-sitrik asit, Test, Heps, vb), düşük molekül ağırlığı olup hücre zarını geçebilen şekerler (früktoz, glikoz vb) ve membran-koruyucu maddelerin (gliserol ve diğer polialkoller, DMSO, amino asitler vb) kullanıldığı farklı sulandırıcılar geliştirilmiştir (56). Ayrıca, laktoz, sükroz ve dekstran gibi non-permeating şekerler, antifriz proteinleri ve membran stabilizatörleri (yumurta sarısı, süt, lipitler ve amino asitler) de sulandırıcılarda kullanılmıştır (56-60). Dondurma ve eritme işlemleri spermanın morfolojisini, biyokimyasını ve işlevini olumsuz yönde etkiler. Bu olumsuz değişiklikler, motilitenin ve viabilitesinin düşmesine, spermanın dışı genital kanalda

migrasyon yeteneğinin azalmasına ve servikal tohumlama sonrası fertilité oranının düşmesine neden olmaktadır (60).

Soğutma ve donma işlemleri sırasında çevresinde şekillenen birtakım fiziksel ve kimyasal değişikliklere maruz kalan spermatozoon, faz değişimin şekillendiği düşük sıcaklığa karşı belirli bir direnç gösterir. Sıvı haldeki suyun buz haline geçişinde buz kristalleri oluşur. Spermada spontane buz oluşumu -5°C ile -15°C arasındaki sıcaklıklarda oluşur. Küçük buz kristalleri, yüzey gerilimlerinin yüksek olmasından dolayı, termodinamik olarak stabil değildirler. Spontane olarak kinetik enerjileri daha düşük buz parçacıkları bir araya gelerek rastgele stabil olmayan buz kristallerini oluştururlar. Böylece, buz kristali hızla bütün yönlere doğru soğutulduğu dereceye göre büyür. Geriye miktarı ortamda bulunan kriyoprotektif maddelerin miktarına bağlı olan donmayan fraksiyon kalır. Bu donmayan fraksiyonda şeker, tuz ve diğer kriyoprotektanların yoğunluğu artar, dolayısıyla ortamın ozmotik basıncı da hızla artar. Ozmotik basınçta oluşan bu artış, hücre içindeki suyun hücre dışına doğru akmasına neden olur. Bu olay, hücre içi tuz ve kriyoprotektif madde yoğunluğunun ozmotik basıncı dış ortamla eşitlenene kadar sürer (61).

Taze sperma ile karşılaştırıldığında, dondurulmuş memeli sperması genelde daha düşük fertilitéye sahiptir. Bu da eritme sonrası hem canlı spermatozoa oranının düşüklüğünden, hem de canlı ama işlev yönünden kayba uğrayan hücrelerin oranındaki artıştan ileri gelmektedir (62, 63, 40). Soğuk şoku (64), donma hızı (65-68), sulandırıcı bileşenleri, ozmotik basınç gibi çok sayıda faktör spermada yaşam yeteneğinin kaybolmasına neden olurken (69, 70), membran yapısı, oksidatif zararlar, membran reseptörlerinin yapısının bozulması, nükleer yapı vb etkiler de spermada işlevsel zararlara yol açmaktadır (40, 62, 71-73). Diğer hayvancılık alanlarında olduğu gibi koyunculuk alanında da genetik materyalin korunması ve verim özelliği yüksek olan bireylerden daha fazla yararlanabilmek için, spermanın dondurulması, spermanın liyofilizasyonu, embriyo transferi, *in vitro* maturasyon, *in vitro* fertilizasyon, klonlama ve intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu gibi diğer yardımcı üreme tekniklerinden faydalanılmaktadır (1-3, 74).

2.7.1. Sperma Sulandırıcıları ve Özellikleri

Spermanın dondurulmadan önce işlem gördüğü sulandırıcının bileşenleri, sulandırma prosedürü, sulandırma oranı, kullanılan kriyoprotektan çeşidi ve yoğunluğu, paketleme yöntemi ve dondurma hızı donma işlemlerinin başarısını belirler (45, 70, 75, 76). Kaliteli bir sperma sulandırıcısı; spermatozoitler için gerekli olan enerji gereksinimini karşılamalı,

bakteriyel üremeyi kontrol etmeli, hücreyi soğuk şokuna karşı korumalı, ortamın pH değerini dengeleyebilmeli ve spermatozoa metabolitlerini kompanse edebilmelidir. Bunların yanı sıra, donma sırasında hücrelerin korunması için, sulandırıcılarda uygun bir ozmotik basınç ve elektrolit dengenin zorunlu olduğu açıklanmıştır. Sperma sulandırıcılarına enerji sağlayabilmesi için glikoz gibi basit şekerler, spermatozoayı soğuk şokuna karşı korumak için yumurta sarısı, süt ve bakteriyel üremeyi engellemek için ise penisilin, streptomisin gibi çeşitli antibiyotikler önerilmektedir (9, 17). Koç spermasının dondurulmasına ilişkin ilk çalışmanın ise, Emmens ve Blackshaw'ın 1950'de yaptığı araştırma olduğu kabul edilmektedir (36, 77). Günümüzde birçok evcil hayvanın spermasının dondurulması ve dondurulmuş spermayla elde edilen dölverimi memnuluk verici düzeye erişmiş bulunmaktadır. Birkaç hayvan türünde ise henüz arzu edilen sonuçlara erişilememiştir. Ürünleri nedeniyle ekonomik önemi büyük olan koyun, bunlar arasında yer alır (78). Koç spermasının soğutulması, dondurulması ve payetlenmesi sırasında motil spermatozoa oranı önemli ölçüde düşmektedir (79). Ancak, koç spermasının başarıyla dondurulması için yapılan araştırmalar, sağlayacağı büyük yararları nedeniyle yoğunluğunu ve güncelliğini korumaktadır (78). Koç spermasının membran yapısı kriyoproservasyona karşı oldukça duyarlıdır. Bu nedenle, koç spermasının diğer çiftlik hayvanlarının spermasına göre dondurulması daha güçtür. Bunun nedeni, koç spermasının diğer türlere göre yüksek oranda doymamış yağ asidi içermesidir. Bu durumun başlangıçta spermanın membran yapı düzensizliğine neden olabileceği ve daha sonra sperma hasarından sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bu hasar ise koç spermasında boğa spermasına göre daha şiddetlidir (80, 81).

Koç spermasının dondurulmasındaki başarı sulandırma oranına bağlıdır. Koç sperması genellikle hacim/hacim (v/v) oranında veya daha az sıklıkla tohumlama dozu dikkate alınarak sulandırılır (82). Nur ve arkadaşları (13) tris bazlı sulandırıcı kullandığı çalışmalarında 1/5 (sperma/sulandırıcı) oranında sulandırdıkları koç spermasında sulandırma sonrası %79.0±1.9 motilite ve %5.6 akrozomal bozukluk oranları elde etmişlerdir. Ritar ve Ball (83) tris-sitrik asit-glikoz-yumurta sarısı-gliserol sulandırıcısı kullanarak 1:0.5 ve 1:2 sulandırma oranlarında eritme sonrası sırasıyla, %37.9±0.81, %43.9±0.86 motilite bulmuşlardır. Ak ve arkadaşları (70) Fiser ve arkadaşlarından modifiye edilen sulandırıcılar kullanarak koç spermasını 1+1, 1+3 (sperma+sulandırıcı) oranında sulandırmışlar, eritme sonrası 1+1 sulandırma oranında %21.0±10.89 motilite, %41.8±5.22 akrozomal bozukluk, 1+3 sulandırma oranında ise %53.3±6.46 motile, %25.6±5.94 akrozomal bozukluk saptamışlardır.

Koç spermasının kriyotoleransının boğa spermasına göre daha hassas olması nedeniyle sulandırıcı geliştirme çalışmalarına odaklanılmıştır. Bu çalışmalar sonrası kabul edilebilir düzeyde motilite hedeflerine ulaşılmasına karşın akrozom ve morfolojik bütünlüğe ilişkin bulgular istenilen düzeyde değildir. Dondurma ve eritme sonrası %50 ve üzeri motilite elde edilirken (13, 69) akrozomal bozukluk oranının %25-65 olduğu bildirilmiştir (69, 80, 84). Günümüzde yapılan deneysel çalışmalar sonrası elde edilen bulgular sonucu koç spermasının dondurulmasına yönelik laboratuvar uygulamalarında kullanılan sulandırıcılar yanında, ticari sulandırıcılar da geliştirilmiştir. Bu farklı sulandırıcılar kullanılarak %50-55'in üzerinde eritme sonrası motilite elde edilebilmektedir (13, 70, 85). Donmuş sperma kullanılarak *in vitro* fertilizasyon sonrası %70'ten daha yüksek oranda bölünme elde edilirken (70, 86), *in vivo* servikal tohumlamalardan %35-50 (87, 88) ve laparoskopik tohumlamalardan %70 ve üzeri düzeylerinde (89, 90) gebelik elde edilebildiği bildirilmiştir.

2.7.2. Spermının Sulandırılması, Soğutulması ve Dondurulması

Spermının dondurulma yöntemleri arasında ampul, pellet ve payet yöntemi bulunmaktadır. Ancak günümüzde en yaygın ve pratikte uygulanabilirliği en yüksek dondurma yöntemi payet yöntemidir (9). Spermının gerek kısa süreli saklanması gerekse dondurulmadan önce sulandırılması gerekmektedir. Gerekli mineral madde ve enerji kaynağı ve spermayı soğüğün zararlarına karşı koruyucu (kriyoprotektif) madde içeren sulandırıcı, metabolik artıkları tamponlamalı ve spermının fertilizasyon yeteneğini olumsuz yönde etkilememelidir. Sulandırıcının içeriğindeki sperm metabolizmasında görev alan maddeler besin kaynağını oluştururlar. Bunun yanında plazma membranını koruyucu ve kriyoprotektif maddeleri içermesi nedeniyle spermatozoanın yaşam süreleri uzamakta ve ani ısı değişikliklerinden korunmaktadır. Ayrıca sulandırıcılar, ejakülat hacmini artırdıklarından, fazla sayıda hayvanın tohumlanmasına olanak sağlar. Sulandırıcı, spermatozoonların metabolizma artıklarının oluşturduğu toksik etkiyi tamponlayarak pH değerini uzun süre sabit tutar. Sulandırıcının içerdiği antibiyotik ise sperma ile bulaşması olası hastalıkların yayılmasını önler.

Koç spermasının sulandırılmasında farklı özellikte çok sayıda sulandırıcı kullanılmaktadır. Bu sulandırıcıların çoğu laboratuvar ortamında hazırlanmaktadır. Günümüzde Andromed, Laiciphos, Biociphos, Biladyl, Triladyl, Ovipro, Optidiyl gibi bazı firmaların sunduğu kullanıma hazır sulandırıcılar da ticari olarak satılmaktadır. Genel olarak spermının dondurulmasında kullanılan sulandırıcıların çoğu yumurta sarısı içerir. Yumurta sarısı, içerdiği lipid-protein kompleksi nedeniyle, spermatozoayı soğuk şokundan korur.

Ayrıca içerdiği lesitin nedeniyle spermatozoonların membranını daha dayanıklı duruma getirerek ekstrasellüler etkilerden korur. Spermatozoanın çevresinde oluşturduğu koloidal katman spermanın hareketini kısıtlayarak metabolizmayı yavaşlatır ve metabolik artıkların elimine edilmesini sağlar (9, 32).

Sperma sulandırılması ve soğutulması yöntemi kendi içinde sulandırma, soğutma, alıştırma (ekilibrasyon) ve paketleme aşamalarından oluşur. Soğutma, spermanın metabolizmasının yavaşlaması için gerekli olan adaptasyon periyodudur (91). Sperma alındığında beden ısısına yakındır. Sperma alınır alınmaz çevre etkilerinden korumak amacıyla hızlıca yaklaşık 28-32°C sıcaklıktaki su banyosuna konulur. Gerekli muayeneler yapıldıktan sonra kullanıma uygun olan ejakülat örnekleri sulandırılarak soğutulur. Spermanın soğuk şokuna maruz kalmaması için, sulandırılmış sperma aşamalı bir şekilde soğutulur. Bu yavaş soğutma 2-4 saat kadar sürer. Soğutma işlemi için su banyosunda bulunan sulandırılmış sperma, aynı sıcaklıkta (26-32°C) su içeren bir kaba konur ve 5°C'teki buzdolabına yerleştirilir. Soğutma süresini kısaltmak için kap içerisine ufak buz parçaları atılır. Kabin sıcaklığı 2-6 saatte 5°C'a soğutulur (9, 32). Sperma soğutulup dondurulurken değişik aşamalarda farklı hız ile soğutulması gerekir. Dondurma öncesi aşamada; 28-32°C dereceden 16°C sıcaklığa, 16°C sıcaklıktan 5°C sıcaklığa indirme hızı spermanın eritme sonrası yaşamsal aktivitesini etkilemektedir (70). Dondurma aşamasında ise özellikle spontan buz kristallerinin -5°C ile -15°C sıcaklıkta oluştuğu noktalara soğutulurken hücre hızlıca su kaybetmektedir. Ortam soğutuldukça hücre içi ve dışı denge sağlanan kadar bu olgu devam etmektedir. Hücre dışına çıkan su miktarı üzerine ozmotik basınç, ortamdaki kriyoprotektan ve soğutma hızının etkili olduğu bildirilmiştir (92).

Sperma tek veya iki aşamalı sulandırma tekniği kullanılarak sulandırılır. Tek aşamalı sulandırma tekniğinde içinde kriyoprotektan madde içeren sulandırıcı spermaya aşamalı bir şekilde 28-32°C sıcaklıkta katılarak sulandırma işlemi tamamlanır. İki aşamalı sulandırma tekniğinde ise sperma kriyoprotektan madde içermeyen sulandırıcı ile 28-32°C sıcaklıkta sulandırıldıktan sonra, 1-2 saat içinde 5°C sıcaklığa düşürülür. Bu sıcaklıkta içinde kriyoprotektan madde bulunan sulandırıcı ile aşamalı olarak ikinci kez sulandırılır (9, 17, 32).

Sulandırma ve gliserolizasyon (kriyoprotektan madde katımı) aşamalarından oluşan sulandırma işlemi iki başlık altında değerlendirilebilir. Tek aşamalı sulandırma tekniğinde gliserolizasyon işlemi 28-32°C sıcaklıkta gerçekleştirilirken, iki aşamalı sulandırma tekniğinde 5°C sıcaklıkta gerçekleştirilir (93). Gliserol miktarı ve spermaya katılma sıcaklığı, eritme sonrası spermanın işlevsel ve morfolojik bütünlüğünü etkilemektedir. Gliserolizasyonun sperma metabolizmasının yavaş olduğu düşük sıcaklıklarda

gerçekleştirilmesinin daha iyi sonuç verdiğini, dolayısıyla iki aşamalı sulandırma tekniğinin koç sperması için uygun olduğu bildirilmektedir (70).

İki aşamalı sulandırma tekniğinde yer alan gliserolizasyon evresinde, ilk sulandırılması yapılmış ve sıcaklığı 5°C'a düşürülmüş sperma ile gliserol içeren ve sıcaklığı 5°C olan ikinci sulandırıcı, 4-5 porsiyonda ve her porsiyon arası 10-15 dakika olacak şekilde yavaş yavaş sulandırılır (32). Sulandırıcıya katılan gliserolün akrozom reaksiyonunu hızlandırdığı (80, 84), akrozomal bozuklukları artırdığı (70, 80, 84) ve kromatin hasarına neden olduğu (13) bildirilmiştir. Bu etkilerinden dolayı gliserolün de fertilizasyonu olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir (13, 70). Bu zararlı etkileri minimize etme düşüncesi, araştırmacıları düşük oranlarda veya gliserolsüz sperma sulandırıcıları üzerinde çalışmalara yöneltmiştir (70, 94). Bu çalışmaların bazılarında gliserolün katılma zamanı, hızı ve sıcaklığına odaklanılmıştır (70, 94). Gliserolün düşük sıcaklıkta aşamalı bir şekilde spermaya katılmasının eritme sonrası spermatolojik özellikleri olumlu yönde etkilediğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (13, 69, 70, 95).

Ekilibrasyon (alışım) evresi, tüm sulandırma işlemleri tamamlanmış ve sıcaklığı 5°C'a düşürülmüş spermanın bu sıcaklıkta 2-10 saat bekletilmesidir (32). Ekilibrasyon, spermanın motilite ve membran bütünlüğünün korunması için önemli bir aşamadır (91). Genellikle ekilibrasyon spermanın gliserol ile muamele edilme süreci ve hücre içi ve dışı dengesinin sağlanması olarak bilinir. Ancak ekilibrasyon, yalnızca gliserol ile değil, diğer sulandırıcı komponentleri ile de dengenin sağlanması sürecidir. Koç spermasının iki aşamalı sulandırma yönteminde gliserol ile muamele 2-5°C'ta başlar ve ekilibrasyon süresi 1-3 saat sürer. (96). Tek aşamalı sulandırmada ise gliserol ile muamele 30°C'ta başlar ve 2-5°C'ta 1.5-2 saat bekletilerek gerçekleştirilir (10). Sperma genellikle ekilibrasyon sonrasında tercih edilen paketleme (payet, pellet veya ampul) yöntemlerinden biri kullanılarak dondurulur (9). Payet yönteminde, ekilibrasyon sonrasında payetlere çekilen sperma sıvı azot buharında (-80 ila -120°C sıcaklıkta) 7-10 dakika sürede dondurulur (9, 32). Pelet yönteminde sperma kuru buz üzerine damlatılarak -79°C sıcaklıkta dondurulurken, ampul yönteminde sperma ampullere alınarak -79°C sıcaklıktaki etil alkol banyosunda dondurulur (9, 17). Her üç yöntemde de sperma sıcaklığı -196°C olan sıvı azot içerisinde saklanır.

2.8. Soğuk Şokunun Sperma Üzerine Etkileri

Spermatolojik özellikleri saptanmış ve sulandırılmış spermanın 5°C'a soğutulması ayrı bir özen gerektirmektedir. 17°C'm altındaki ani sıcaklık değişikliklerinde, özellikle akrozom olmak üzere spermada irreversible bozukluklar oluşur. Oluşabilecek değişiklikler spermanın potansiyel fertilitasını düşürebilir özelliktedir. Sulandırıcıdaki kriyoprotektif maddelerin

koruyucu özellikleri sınırlıdır (9). Karagiannidis ve arkadaşları (97) soğuk şokunun, taze boğa spermasının aniden soğutulması sonucu motilitenin geri dönüşümsüz olarak kaybolması ile karakterize olduğunu bildirmiş ve bununla birlikte spermatozoitlerdeki kalsiyum yoğunluğunda belirgin bir artış ve buna bağlı olarak da seminal plazmadaki kalsiyum miktarındaki kalsiyumun azalışı olduğunu belirtmiştir. Spermatozoitler ve seminal plazma arasındaki kalsiyum dağılımının değişmesi sonucu oluşan soğuk şoku ile seminal plazmada var olan iyonize kalsiyum miktarının azalması ve aynı anda spermatozoitlerdeki kompleks ve proteine bağlı kalsiyumun miktarı artar (97).

Darin ve arkadaşları (98) spermatozoitlerdeki kolesterol miktarı ile spermatozoitlerin soğuk şokuna duyarlılığı arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında, insan ve tavşan spermatozoitlerindeki doymuş fosfolipit oranının, boğa ve koç spermatozoitlerindeki kadar fazla olduğunu, buna bağlı olarak insan ve tavşan spermatozoitlerinin soğuk şokuna karşı daha dirençli olduklarını açıklamışlardır. Araştırmacılar, plazmadaki kolesterol düzeyinin de hücrelerin soğuk şokuna karşı direncini önemli derecede etkilediğini bildirmişlerdir.

2.9. Kriyoprotektanlar

Spermanın dondurulması ve çözündürülmesi sırasında değişen sıcaklık nedeniyle, ortamda oluşan farklı ozmotik basınca ve kimyasal bileşimde oluşan değişikliklere karşı spermatozoonları koruyan maddelere kriyoprotektif maddeler (kriyoprotektanlar) denir (9). Bilimsel ve modern anlamda canlı hücre dondurma çalışmaları, 1949 yılında Polge ve arkadaşlarının gliserolün kriyoprotektan özelliğini bulmasından sonra başlamış; ilk dondurulan hücre spermatozoon olmuştur (99, 100).

Kriyoprotektanlar hücrenin dondurulmasında oluşan soğuk şoku zararına, intrasellüler kristal oluşumuna, çözüm sırasında dekrizalizasyona ve gelişen membran destabilizasyonuna karşı koruyucu amaçlı olarak kullanılmaktadır. Kriyoprotektanlar genel olarak koruyucu etkilerini ortamdaki donmamış fraksiyonu artırarak ve ortamdaki iyon miktarını azaltarak gösterirler. Düşük moleküler ağırlıkta olmaları ve toksik etkilerinin ancak belirli oranlarda katıldıklarında açığa çıkması, kriyoprotektanların diğer önemli özelliklerindendir (100).

Kriyoprotektanların koruyucu etkileri, permeabilitelerindeki farklılıkları ve toksik etkileri hayvan türüne, dondurulan hücre çeşidine göre değişebilmektedir (17). Hücre dondurulmadan önce kriyoprotektanlarla inkübe edilerek, intrasellüler yönden dengeye gelmesi sağlanmaktadır. Bu olguya alışım dönemi (ekilibrasyon) adı verilir (9). Ekilibrasyon

sonrası sperma ile sulandırıcı arasındaki madde alışverişinin tamamlanması ve ortamın dengeye ulaşması için beklenir. Ekilibrasyon sonrası sperma donma işlemine hazır hale gelmiş olur. Bu süre yaklaşık 2 saat kadardır (9).

Dondurma işleminde spermatozoonların zarar görmemesi için, sıcaklığın yavaş yavaş düşürülmesi gerekir. Çünkü sıcaklık yavaş düşürüldüğünde, hücre içerisinde bulunan su dışarı çıkabilmekte (eksozmoz), hücre içerisinde çözülen maddelerin yoğunluğu artmakta ve hücre içi ile hücre dışı su dengesi sağlanmaktadır. Sonuçta hücrede dehidrasyon şekillenmekte ve intrasellüler donma görülmektedir. Donma işlemi hızlı yapıldığında, yeterli miktarda su hücre dışına çıkamaz. Bunun nedeni ise ekstrasellüler sıvıda yoğunluğun hızlı bir şekilde artmasıdır. Hücre dışına çıkamayan su, hücre içerisinde buz kristallerinin oluşmasına neden olur (32).

Koç ve boğa spermasının docosahexaenoic asit (DHA) içeriğinin, domuz spermasına göre yüksek oranda olması, soğuk şokuna karşı direnç göstermede ve dondurmada daha iyi sonuç vermektedir (101).

Hücresinin donması sırasında, hücre dışında gelişen kar taneleri tarzındaki kristal oluşumu, beraberinde eksternal tuz bileşiklerinin donmamış kısımlarda daha da yoğun hale gelmesine neden olur. Aynı zamanda hücre su kaybeder. Ekstrasellüler ortam tuz yoğunluğu gibi, intrasellüler tuz yoğunluğu da artar. Ekstrasellüler ve intrasellüler tuz yoğunluğu kritik düzeye gelince (oda sıcaklığında 0,8 M), hücre plazma membranındaki katyon kanalları açılarak, yıkılan potasyum-klor köprüsünden potasyum hücre dışına çıkar. Ortamdaki sodyum ise yoğunluğun fazla olduğu hücre içine doğru yönelir. Çözüm sırasında da plazma membranındaki katyon kanalları kapanır, intersellüler tuz yoğunluğu düşerken, hücre içinde proteinlerle bağlı durumdaki potasyum-klor köprüleri yeniden oluşur. Bu durum hücre içine suyu geri çeker ve hücre yine hacimce şişer (102). Ekstrasellüler kristal oluşumuyla gelişen hücre yıkımı, olasılıkla kristalin morfolojisine de bağlıdır. Kristalin morfolojisi ise onun büyüme hızının denetim altına alınmasıyla düzenlenebilir. Ayrıca kriyoprotektanların, ortamdaki kristal dentritlerinin oluşumunda etkileri vardır. Donma sırasında gelişecek olası bir intrasellüler kristal oluşumundan sakınmak için, hücre yüzey bölgesinin hücre hacmine oranının düşük olması gerekmektedir (103).

Nur ve arkadaşları (13) %6 gliserol, %6 1,2 propanediol, %6 sükröz, %6 trehaloz içeren sulandırıcılarla dondurdukları koç spermasının eritme sonrası motilite oranlarını sırasıyla %51.2, %35.0, %5.1 ve %8 olarak saptamışlardır. Soylu ve arkadaşları (69) ise farklı

kriyoprotektif maddeler içeren sulandırıcıların ozmolariteleriyle ilgili yaptıkları bir çalışmada, gliserol, 1,2 propanediol, sükroz ve trehaloz içeren sulandırıcılarla dondurdukları koç spermasının eritme sonrası ortalama motilite oranlarını sırasıyla %48.7, %25.8, %18.0 ve %16.4 elde etmişlerdir.

Molinia ve arkadaşları (104) gliserol, DMSO, etilen glikol ve propanediol içeren sulandırıcılarla dondurdukları koç spermasında, eritme sonrası gliserol ve etilen glikol gruplarından elde ettikleri motilite oranlarını, DMSO ve 1,2 propanediol gruplarından daha yüksek bulmuşlardır. Silva ve arkadaşları (85) ise, %5 gliserol, %3-5 etilen glikol ve %3-5 asetamid içeren gruplarda eritme sonrası sırasıyla % 53.1, % 53.4-49.4 ve % 3.1- 3.8 motilite elde etmişlerdir. Valente ve arkadaşları (105) da, %5.3 gliserol içeren farklı iki sulandırıcı kullanarak dondurdukları koç spermasında, eritme sonrası motilite, akrozomal bütünlük ve HOST değerlerini sırasıyla %46.5- 36.9, %80.1-79.0 ve %40.6-32.1 elde etmişlerdir.

Kriyoprotektif maddelerin etkisi, soğutma hızına ve türe bağlı olarak değişmektedir (106, 107). Gliserolün kriyoprotektif etkisi, Polge ve arkadaşları (100) tarafından keşfedildikten sonra, uygun sulandırıcı geliştirme çalışmaları hız kazanmış ve farklı türler için çok sayıda sperma sulandırıcısı geliştirilmiştir. Dondurma sırasında oluşan buz kristallerini hacimce küçültmek ve spermaya karşı zararlı etkisini minimize etmek amacı ile hücre içine girebilen (permeable) ve hücre zarını geçemeyen (non-permeable) çok sayıda farklı etkiye sahip kriyoprotektif madde kullanılmıştır (13, 14, 69).

2.9.1. Non-Permeable (Eksternal) Kriyoprotektanlar

Eksternal kriyoprotektanlar, sıvı ve katyonlara karşı permeabilitesini artırarak hücre membranlarını ozmotik strese karşı esnek hale getirirler. Ayrıca, hücrede donma/çözünme sırasında gelişen lipit peroksidasyonunu azaltmaya çalışırlar. Eksternal kriyoprotektanlar, makromoleküller ve sakkaritler olarak ikiye ayrılır. Polietilen glikol, ficoll 70, BSA, dekstran, mannitol ve polivinilprolidon makromolekülleri sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle lipit peroksidasyon inhibitörü olduğu düşünülen sığır serum albumini (bovine serum albumin; BSA) çok sayıda çalışmada kullanılmıştır (108-110). Lethal etkili intrasellüler kristalleşmeyi engellemek için hücrede dehidrasyon oluşturan glikoz, sükroz, trehaloz ve rafinoz sıklıkla kullanılan sakkaritlerin arasında sayılabilir (44, 111)

Şekerli medyumların koruyucu etkileri daha çok hızlı soğutmada görülür. Hızlı soğutma sırasında hücrede yapısal deformasyonlar şekillenir. Şekerli medyumlar, soğutma sırasında şekillenen mekanik basıncı azaltarak hücreyi yapısal deformasyonlardan korurlar (92). Aynı

şekilde şekerler, donma ve çözüm sırasında oluşan membran zararına karşı, membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girip yüzey artışı sağlayarak ekstra koruma sağlamakta ve çözüm işlemi sırasında da hücrelerin ozmotik şoka girmesini önlemektedir (111, 112). Son yapılan çalışmalarda, 0,2 M sükröz veya trehalozun sıgır spermatozoitlerinin dondurma eritme sonrası yaşam süresini önemli oranda artırdığı saptanmıştır (92). Aisen ve arkadaşları (56) trehaloz içeren sulandırıcı ile sulandırıp dondurdukları koç spermasında, sulandırma ve eritme sonrası motilite değerlerini sırasıyla %85 ve %86, sağlam akrozom oranını ise yine sırasıyla %64 ve %68 bulmuşlardır.

Eksternal kriyoprotektanların diğeri bir yararı da, hücre içine giren kriyoprotektan miktarına olan gereksinimi düşürmeleridir. Non-permeable kriyoprotektanların sitotoksitesi permeable kriyoprotektanlara göre daha düşüktür. Bu özelliklerinden dolayı genellikle non-permeable kriyoprotektanlar sulandırıcıya permeable kriyoprotektanların zararlarını minimize etmek için kombine olarak kullanılırlar. Ayrıca sitotoksitesi yüksek olan permeable kriyoprotektan yoğunluğunu azaltmak için de kullanılmaktadırlar (109, 113).

2.9.2.Permeable (İnternal) Kriyoprotektanlar

Hücre sitoplazmasından geçebilme özelliğine sahip kriyoprotektanlar internal kriyoprotektan olarak adlandırılır. Koruyucu etkileri donma sırasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltmaları, dehidrasyonu düzenleyip protein yapılarını korumaları ve düşük sıcaklıkların yarattığı ozmotik büzüşmeyi azaltmaları ile oluşmaktadır (12, 114). Kriyoprotektanların bir diğeri işlevi ise, içerisine katılmış oldukları solüsyonun mekanik özelliklerini değiştirmeleridir. Viskozitesi artan solüsyon, eriyiklerin kristalizasyonunu engeller (115, 116). Başlıca internal kriyoprotektanlar gliserol, etilen gliserol, 1,2 propanediol, DMSO, metanol, asetamid, adenitol, perseitol, metil formamidedir (117).

Kimyasal adı propantiriol olan gliserol hafifçe tatlı, zehirleyici olmayan bir sıvıdır. Kimyasal yapısındaki C/OH oranının eşit olması, spermatozoon üzerine olan koruyucu etkisini artırmaktadır. Gliserol spermatozoonun membran lipitleriyle etkileşime girerek, kimyasal ve fiziksel streslere karşı plazma membranını stabilize eder (118, 119).

Sperma kriyopreservasyonundaki yararlı etkilerine karşın gliserol, spermatozoonun membran yapısını değiştirmekte, bağlayıcı protein ve glikoproteinleri etkilemektedir. Ayrıca gliserol, spermatozoonların biyoenerjik gereksinimlerini de artırmaktadır (120). Her ne kadar gliserolün sperma metabolizması üzerine olumsuz etkileri olsa da, spermanın dondurulması sırasında koruyucu etkisinin daha fazla olduğu çok sayıda araştırmada gösterilmiştir (13, 69,

93, 95, 104). Bu nedenle gliserol, koç spermasının dondurulmasında sulandırıcılara koruyucu madde olarak en sık katılan maddelerden olmuştur (96).

Gliserolün zararlı etkilerini minimize etmek için sperma sulandırıcısına katılan gliserol oranını azaltmak (94, 121, 122), başka kriyoprotektan maddelerle birlikte kullanmak (104), katma zamanı (96) ve sıcaklığı (94, 96, 123) hakkında çalışmalar da gerçekleştirilmiştir. Colas (123) gliserolün koç sperması için bir ölçüde toksik olduğunu ve 0°C'a yakın sıcaklıkta eklenmesinin zararlı etkilerini azaltabileceğini bildirmiştir. Aynı araştırmacı, koç spermasının dondurulması sırasında gliserolün eklenme sıcaklığı üzerine yaptığı bir çalışmada gliserolün 30°C'ta eklenmesinin 4°C'ta eklenmesine göre eritme sonrası motiliteyi önemli ölçüde azalttığını bildirmiştir. Salamon (93) gliserolün 30°C'ta spermaya katılmasının, iki aşamalı sulandırma ile karşılaştırıldığında, benzer etki gösterdiğini belirtirken, Bacinoğlu ve arkadaşları (94) 30°C sıcaklıkta % 2 gliserol katkısının motilite üzerine zararlı etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Molinia ve arkadaşları (104) ile Salamon (93) gliserolün tek başına kullanılmasının, etilen glikol, 1,2 propanediol ve DMSO ile kombinasyonlarına göre, eritme sonrası koç spermasının motilite ve akrozomal bütünlük üzerine olumlu etkisi olduğunu saptamışlardır. Ayrıca yine Molinia ve arkadaşları (104) gliserol veya etilen glikol içeren sulandırıcıların, DMSO veya 1,2 propanediol içeren sulandırıcılara göre motilite üzerine olumlu yönde etkisinin olduğunu bildirmişlerdir.

DMSO kimyasal olarak bir polar kök etrafında iki apolar baştan oluşan amfipatik bir bileşiktir. Bu özellik ona hem sıvı hemde organik medyumlarda çözünme olanağı sağlamaktadır. Hücre içine penetrasyonu düşük moleküler ağırlığından dolayı gliserole göre daha hızlıdır. Kriyoprotektan etkisi türler arasında farklılık göstermektedir. Bucak ve Tekin (14) kanatlı sperması için en toksik kriyoprotektanın DMSO olduğunu bildirmiş, buna karşın Alçay ve arkadaşları (124) arı spermasının dondurulmasında sulandırıcıya %6 oranında katılan DMSO'nun, aynı oranda kullanılan gliserol, 1,2 propanediol ve etilen glikole göre motilite ve HOST bakımından daha üstün olduğunu gözlemlemiştir. Tavşan ve alabalık spermasında çözüm sonu en yüksek motilite oranı, sulandırıcıya %10-15 oranında katılan DMSO'dan alınmıştır (125, 126). Taşdemir ve arkadaşları (127) boğa spermasını %6 gliserol, % 6 etilen glikol, %6 DMSO, %3 etilen glikol+%3 DMSO, %2 gliserol+%2 etilen glikol+%2 DMSO içeren sulandırıcılarla dondurmuşlar ve en yüksek membran bütünlüğünü %6 gliserol ve %6 etilen glikol gruplarında, en yüksek kromatin bozukluğunu ise %6 DMSO, %3 etilen glikol+%3 DMSO gruplarında saptadıklarını bildirmişlerdir.

Birçok türün spermasında donma-çözüm sırasında oluşan zararı minimize etmek için kullanılan etilen glikol, gliserolle eşit oranda koruyucu etki sağlamaktadır (14). Aygır spermasının dondurulmasında 2M etilen glikol kullanıldığında, gliserole göre daha az toksik etki gösterdiğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (108, 118). Koç spermasının etilen glikol ile dondurulması ve etilen glikolün başarısı hakkında yapılan çalışmalar sınırlıdır (104). Koç spermasını %3 ve %5 etilen glikol, %3 ve %5 asetamid ve %5 gliserol içeren kriyoprotektanlarla donduran Silva ve arkadaşları (85) en yüksek motiliteyi %3 etilen glikol ve %5 gliserol gruplarında bulduklarını, en yüksek akrozomal bütünlük oranını ise %5 etilen glikol grubundan elde ettiklerini bildirmişlerdir. Renksiz, kokusuz ve hafif tatlı viskoz bir sıvı olan 1,2 propanediolün, koç spermasının dondurulmasında %6 oranında kullanıldığında başarılı sonuçlar alındığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (13, 69).

2.10. Spermın Potansiyel Fertilitésinin Belirlenmesi

Fertilite, erkek hayvan ele alındığında, sağlıklı bir dişi ile doğru zamanda yapılan çiftleştirme sonrası dişiyi gebe bırakma yeteneği, dişi hayvanların ise, sağlıklı bir erkekle doğru zamanda yapılan çiftleştirme sonrası gebe kalıp canlı yavru doğurmaları olarak tanımlanır (33). Spermın dişi genital kanalda yaşam süresi ve fertilizasyon oranı arasında sıkı bir ilişki vardır. Bu ilişki taze spermada donmuş spermaya göre daha güçlüdür (128). Fertilite, kısaca bir hayvanın yavru verme yeteneği olarak da açıklanabilir.

Maksimum fertilizasyon oranı elde etmek için ovulasyon anında, oviduktta yeterli sayıda kaliteli sperma hücresinin bulunması gerekir. Fertilizasyon oranını dişi hayvanın yaşı, laktasyon sayısı, doğum sonrası geçen süre, vücut kondisyonu gibi faktörler etkilemektedir. Spermadan ileri gelen fertilite düşüklükleri de kendi içinde, spermatozoon sayısının artırılması ile karşılanabilen ve karşılanamayan nedenler olmak üzere iki ana başlık altında incelenebilir. Spermatozoon sayısının artırılması ile karşılanabilen nedenler genellikle motilite, viabilite yeteneği ve morfolojik bütünlüğün devamlılığı ile ilintili olan faktörler olup bunlar spermatozoonun dişi genital kanalda ilerleme yeteneği ve yaşama süresi ile ilgilidir. Spermatozoon sayısının artırılması ile karşılanamayan nedenler de fertilizasyondan çok erken embriyonik ölümlerle ilgili olan (morfoloji ve DNA bütünlüğü) nedenlerdir (128).

Bir ejakülâtın fertilite gücünü tahmin etmek amacıyla çok sayıda teknik geliştirilmiştir. Bu tekniklerin bazıları için konusunda eğitim almış uzman personel, gelişmiş alet ve gereçlere gereksinim duyulmaktadır. Elde edilen sonuçların geçerliliği uygulanan testin duyarlılığına bağlıdır. Spermatozoonun fertilite gücünü tahmin etmek için kullanılan analizlerin çoğu

hücrenin motor sistemi, metabolizması ve membran bütünlüğü ile ilgilidir. Sperma kalitesi hakkında bilgi veren motilite, membran bütünlüğü, metabolik aktivite, hücre içi maddelerin salınımı ve servikal mukus veya ovuma penetrasyon gibi çok sayıda farklı testler kullanılmaktadır (33).

Christensen ve arkadaşları (129) iki işletmede bulunan 117 damızlık boğanın spermasının rutin değerlendirmesine yönelik gerçekleştirdikleri çalışmada toplam 1635 adet sperma analizinden elde ettikleri verileri değerlendirmişler, tohumlama sonrası fertilité oranları ile taze alınmış ejakülat motilitesi ve eritme sonu motilite arasında yüksek korelasyon bulduklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar eritme sonrası motilite ile tohumlama sonrası fertilité arasında önemli derecede ilişki olmasına karşın, spermanın potansiyel fertilitésinin saptanmasında motilitenin tek başına yeterli olmadığını bildirmişlerdir.

Malmgren (130) rutin sperma analizlerinin fertilité hakkında önemli bilgiler vermesine karşın bazen fertilité ile çelişebildiğini, floresan boyalar, spermatozoon-oosit bağlanma testi ve hipoozotik şişme testi gibi fonksiyon testlerinin uygulanması ile sorunun büyük ölçüde çözülebileceğini bildirmiştir.

Kjæstad ve arkadaşları (131) dondurulmuş spermada eritme sonrası motilite, spermatozoon hızı ve akrozom bütünlüğü ve tohumlama sonrası fertilité oranları değişken olan 18 boğada yaptıkları çalışmada, motilite ile hız arasında önemli korelasyonlar bulunduğunu, ancak motilite ile akrozom bütünlüğü arasında bu korelasyonun olmadığını, eritme sonrası sperma özelliklerinden bu iki parametrenin boğanın potansiyel fertilitésini saptamada güvenilir olduğunu bildirmişlerdir.

Yoğunluk, morfoloji ve motilite gibi standart sperma değerlendirme testleri fertilité hakkında bir fikir vermektedir. Ancak spermatozoonun fizyolojik bütünlüğünün bir göstergesi olan hücrenin hareket şekli, spermanın dışı kanalda ilerleme gücü ve hücrenin donma yeteneği gibi testler mutlaka dikkate alınmalıdır. Spermanın potansiyel fertilitésini belirlemeye yönelik çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Ne var ki düzenli kontrollerin yapılamaması, spermanın mikrobiyal kontaminasyonunun önüne geçilememesi ve teknik olanaksızlıktan ileri gelen birçok nedenler, testlerin hatalı pozitif veya hatalı negatif sonuç vermesine neden olabilmektedir. Genelde spermanın potansiyel fertilitésinin belirlenmesi amacıyla insan hekimliğinde kullanılan spermatozoonun zonasız hamster yumurtasına penetre olma gücünün irdelendiği "Zona-Free Hamster Ova Testi" ve spermatozoon membranının fonksiyonel bütünlük testi (HOST) (17). Bedford ve Hoskins (24) insan spermasında HOST

ile hamster oosit penetrasyon testi arasında yüksek oranda korelasyon bulunduğunu, bu korelasyonun motilite ve eosin Y ile boyanan hücre arasında görülmediğini, kısmen de olsa bu testin fertilitite yeteneğinin ölçümünde etkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Hücre plazma membranının hipoozmotik ortama maruz bırakılması durumunda, ozmotik basınçlar eşitlenene kadar hücre içine su girer. Bu su girişinden dolayı hücrenin hacmi ve hücre zarı hacimce büyür ve bunun sonucunda plazma membranında şişlikler oluşur. Hücre kuyruğunun fibril kısmını kaplayan hücre zarı, baş kısmına göre daha gevşektir. Bu nedenle, kuyruk kısmı diğer bölgelere göre daha belirgin bir şekilde şişer. Kıvrılma plazma membranının şişmesinden ileri gelir. Düşük ozmotik basınca sahip ortamlarda, kimyasal ve fiziksel yönden sağlam spermatozoonun kuyruk kısmında şişmeler oluşurken, sağlam olmayan hücrelerde bu reaksiyonlar görülmez (132).

Hafez (17) HOST'un spermanın fonksiyonel bütünlüğünü ölçmek için kullanılabileceğini, ancak hatalı negatif veya hatalı pozitif sonuçların önüne geçebilmek için diğer spermatolojik testlerle bir arada değerlendirilmesi gerektiğini bildirmiştir.

Rutin olarak gerçekleştirilen spermatolojik testlerde, spermasında anormal bulgular saptanan bireylerden de gebelik elde edilebildiğini, bu hataların HOST ile ortadan kaldırılabileceğini bildiren Jeyendran ve arkadaşları (133) insan spermasının işlevini incelemek ve basit bir yöntem geliştirmek için yaptıkları çalışmada, HOST ile kapasite olan spermatozoon sayısı ve hamster testi arasında yüksek bir korelasyon olduğunu bulmuşlardır. HOST ile normal spermatozoon oranı ve ayrıca motilite ve eosin Y ile boya almayan hücre sayısı arasında sıkı ilişkinin olmadığını açıklayan çalışmacılar, HOST'un spermatozoon membranının işlev yeteneği ile sıkı bir ilişkisi olduğunu, standart sperma testlerinin de uygulanmasında yarar olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca insanlarda HOST'un infertilitenin saptanması için kullanılacağını da bildirmişlerdir (134).

Check ve arkadaşları (135), spermatozoonun akrozom reaksiyonunda, kapasitasyonunda, metabolizmasında ve ovum yüzeyine yapışmasında, morfolojik bütünlüğün ve hücre işlevlerinin önemli olduğunu bildirmişler, ancak bu faktörlere ilişkin testlerin yapılamadığını, HOST'un sorunun çözümünde etkili olabileceğini açıklamışlardır. Araştırmacılar, HOST değeri %50'den düşük olan hiçbir bireyden gebelik elde edilemediğini, rutin sperma testleri ile gebelik arasında herhangi bir korelasyon olmadığını ve infertil insanlarda HOST verilerinin sürekli düşük olduğunu saptamışlardır.

Kumi-Diaka (136), insan ve sığır sperması gibi köpek spermasının da düşük ozmotik basınçlı ortamlarda kuyruk kısmının şişerek kıvrıldığını, taze köpek sperması 60 mOsm basıncı olan medyumda 45 dakika inkübe edildiğinde motilite ve HOST sonuçları arasında yüksek korelasyon olduğunu bildirmiştir. Araştırmacı HOST verilerinin elde edilen spermanın fertilitesi ile ilgili bilgi verdiğini ve infertilite tanısında kullanılabileceğini açıklamıştır. HOS testinin basit ve uygulanabilir bir test olduğunu, rutin sperma analizleri ile birlikte kullanılmasıyla spermanın işlevsel bütünlüğü konusunda fikir edinilebileceğini bildiren Nur ve arkadaşları (137) köpek sperması ile yapmış oldukları başka bir çalışmada, HOST sonuçları ile motilite ve canlı spermatozoa oranı arasında yüksek düzeyde korelasyon olduğunu bildirmişlerdir (138). Bu korelasyonun teke spermasında da söz konusu olduğunu bildiren araştırmacılar da bulunmaktadır (139). Taze ve donmuş spermada hareket yeteneği ile HOST arasındaki ilişkiyi araştıran Lin ve arkadaşları (140) donma öncesi ve donma sonrası bulgular arasında HOST sonuçlarının pozitif korelasyon gösterdiğini, hem fertil hem de infertil gruplarda taze ejaküle edilmiş olan spermada da HOST sonuçlarının pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir.

Spermanın fertilizasyon yeteneğinin belirlenmesinde *in vitro* fertilizasyon tekniğinden de yararlanılmaktadır. *In vitro* fertilizasyon tekniğinin uygulanmasındaki temel ilke, belirli olgunluğa ve kapasitasyona ulaşmış düzgün, doğrusal hareket edebilen motil spermatozoa ile olgunluğa ulaşmış metafaz II aşamasında bekleyen oositin uygun ortam ve zaman periyodunda bir araya getirilmesidir. Tabi bu aşamada *in vivo* ortama eşdeğer *in vitro* çevre koşullarının oluşturulmasına olabildiğince özen gösterilmelidir (141).

2.11. *In Vitro* Embriyo Üretimi

Çağdaş hayvan yetiştiriciliğinin başlıca hedefleri yüksek verimli genotipleri korumak ve yaygınlaştırmak, dölverimini yüksek düzeyde tutmak ve var olan hayvan varlığından en üst düzeyde yararlanmak şeklinde özetlenebilir. Ekonomik yetiştiricilik, birim hayvan başına daha çok sağlıklı yavru elde etmek, yaşam süresince daha çok yavru yetiştirmek, yavru kayıplarını azaltmak, daha çok süt ve et elde etmek ile olasıdır. Anılan bu hedeflere ulaşabilmek için suni tohumlama, embriyo transferi, *in vitro* fertilizasyon ve klonlama gibi modern teknolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır (33). Yardımcı üreme teknolojileri diye adlandırılan bu yöntemler başta üreme sorunu olan bireylerin sağaltılması amacıyla geliştirilmiştir. Bu biyoteknoloji, zamanla sağlıklı bireylerden daha fazla yararlanma,

klonlama ve *in vitro* fertilizasyon gibi yöntemlerle verim ömrünü tamamlamış veya ölmüş hayvanlardan da yararlanma olanaklarını sağlamıştır.

In vivo koşullarda fertilitate erkek hayvan ele alındığında, sağlıklı bir dişi ile doğru zamanda yapılan çiftleştirme sonrası dişiyi gebe bırakma yeteneği, dişi hayvanlarda ise, sağlıklı bir erkekle doğru zamanda yapılan çiftleştirme sonrası gebe kalıp canlı yavru doğurması olarak tanımlanır (33). *In vitro* fertilizasyon koşullarında ise fertilitate, spermatozoanın ZP'yi geçebilme ve ovumu aktive edebilme yeteneği olarak açıklanır (9, 17).

Günümüzde, bireyin fertilitate yeteneği hakkında bilgi edinebilmek için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Ancak, doğal aşım veya suni tohumlama sonrası gebeliğin doğrulanması dışında, bu yöntemlerin hiçbiri bireyin fertilitate yeteneğini kesin bir biçimde ortaya koyamamaktadır. Geri dönmeme oranı, doğrulanmış gebelik oranı gibi doğrudan gebelik sonuçlarına bakarak bireyin fertilitate yeteneğinin tahmini, çok uzun zaman ve masraf gerektirmektedir. Spermanın makroskopik, morfolojik, mikrobiyolojik ve fonksiyonel muayenesi gibi gebelik ile ilgili parametrelere bakarak bireyin veya ejakülatın fertilitate yeteneğinin tahmini yapılabilmektedir (33). Rutin sperma analizleri fertilitate hakkında önemli bilgiler vermesine karşın, kimi zaman analiz sonuçları fertilitate ile çelişebilmektedir (17, 33). Bu sorun, floresan boyalar, spermatozoon-oozit bağlanma testi ve hipoozmotik şişme testi, IVF gibi işlev testlerinin uygulanması ile büyük ölçüde çözülebilmektedir (17, 33).

In vitro embriyo üretim (IVEP) sistemi; primer oositlerin *in vitro* maturasyonu (IVM), mature olmuş oositlerin *in vitro* fertilizasyonu (IVF) ve embriyoların *in vitro* kültürü (IVC) olmak üzere üç önemli aşamadan oluşmaktadır (142, 143).

Oosit kalitesi erken embriyonik gelişim, gebeliğin oluşması ve devamı üzerine etkilidir. Folliküler gelişim, diğer bir deyişle oositin büyüme evresi, oositin kalitesi ve gelişim yeteneğini belirler (144). *In vitro* fertilizasyonda kullanılacak primer oositler çoğunlukla mezbahada kesilen hayvanların ovaryumlarından elde edilmektedir (145). Bazı durumlarda, özellikle damızlık ve verim özelliği yüksek dişilerden ovum pick-up yöntemi ile süper follikülasyon veya normal sıklık aktiviteye karışmaksızın var olan folliküllerin aspirasyonu ile de oosit elde edilmektedir.

Genellikle memeli ovaryumlarından oldukça fazla sayıda oosit elde edilmesine karşın, bu oositlerin çok az bir kısmı IVM, IVF, IVC aşamalarına gelişebilir ve embriyo elde edilebilir.

Bu durumun en önemli nedenleri, oosit kalitesi ve embriyo kültür koşullarının embriyo gelişimi için istenilen düzeyde olmamasıdır (146).

2.11.1. Oosit Elde Etme Yöntemleri

Oosit elde etme yöntemi, *in vitro* embriyo üretimini etkileyen önemli aşamalardan biridir (147). Bu nedenle oosit toplama yönteminin amacı her ovaryumdan çok sayıda ve iyi kalitede oosit kazanmaktır (148). Folliküler gelişim, diğer bir deyişle oositin büyüme evresi, oositin kalitesi ve gelişim yeteneğini belirler. Oosit kalitesi erken embriyonik gelişim, gebeliğin oluşması ve sürmesi, dolayısı ile IVF ortamındaki gelişim yeteneği üzerine etkilidir (144).

Mezbahadan elde edilen ovaryumların kullanıldığı çalışmalarda oositin elde edilmesi; ovaryumların toplanması, laboratuara getirilmesi, ovaryumların yıkanarak fazla doku ve artıklardan arındırılması, follikülün punksiyonu veya slicing (dilimleme) ile oosit elde edilmesi, elde edilen oositlerin seçilmesi ve yıkanması aşamalarından oluşur (3,149, 150).

Oosit kaynağını oluşturan hayvan materyalinin beslenme, sağlık durumu, yaş, ergin olup olmadığı, doğum yapıp yapmadığı ve mevsim oosit kalitesi üzerine etkilidir (144, 145, 147, 150, 151). Ayrıca mezbaha materyalinden elde edilen ovaryumların alınması, saklama ve taşıma sıcaklığı yanında laboratuvara getirilene kadar geçen sürenin de oosit kalite ve gelişim yeteneği üzerine etkileri bulunmaktadır (145).

Ovaryumlar mezbahadan 30-35°C sıcaklıktaki %0.9' luk NaCl veya PBS (fosfat tamponlu tuz solüsyonu) içerisinde laboratuvar ortamına getirilir. Ovaryumların toplanması ve oositlerin elde edilmesi arasında geçen süre 4 saati aşmamalıdır (145). Mezbahadan alınan ovaryumlardan ve canlı hayvanlardan farklı yöntemlerle oosit toplanabilmektedir. Koyun ovaryumlarından genellikle punksiyon, slicing veya aspirasyon yöntemleriyle oositler elde edilebilmektedir (148).

Wani ve arkadaşları (150) koyun ovaryumlarından oosit elde etme yöntemleriyle ilgili yaptıkları çalışmada, punksiyon ve slicing yöntemlerinin, aspirasyon yöntemine göre çok sayıda ve iyi kaliteli oosit elde etmede daha başarılı olduğunu saptamışlardır. Ayrıca koyunlardan laparoskopik ovum pick up yöntemiyle de oositler toplanabilmektedir (152).

Koyun oositlerinin elde edildiği folliküllerin çapları olgunlaşma yeteneğini etkilemektedir. Mezbahadan getirilen ovaryumların üstünde farklı gelişim dönemlerinde oosit barındıran değişik boyutlarda çok sayıda follikül bulunur. Bu oositlerin gelişim dönemlerine göre

maturasyon yetenekleri farklılık göstermektedir. Wani (145) yaptığı bir çalışmada 5 mm'den büyük çapa sahip folliküllerden elde edilen oositlerin 2-5 mm çaplı folliküllerden elde edilen oositlere göre daha iyi olgunlaşabildiklerini bildirmiştir.

İmmature oositlerin *in vitro* maturasyon için seçilmesi sırasında, oositler morfolojik özelliklerine göre değerlendirilir (147). Oositlerin nükleer ve sitoplazmik maturasyona ulaşmasında önemli bir gösterge, oositleri çevreleyen kumulus hücreleridir (153). Oositlerin çevresindeki kumulus hücre tabakasının kalınlığı, oositlerin mayotik gücünü göstermektedir. Kalın kumulus oosit kompleksi (COC) tabakaları, korona radiata hücrelerinin oositlerin nükleer maturasyonunun tamamlanması için yeterli olduğunu göstermektedir. Bu hücreler, oosit kalitesinin belirlenmesinde kullanılır ve oositlerin mayoz I aşamasına kadar gelişmesi için faktörler salgılar (154). Ayrıca kumulus hücreleri spermatozoonun oosite penetrasyonunu destekler (154). Kumulus-oosit kompleksleri, stereo mikroskopta incelenerek en az 3-4 sıra kumulus hücresi tarafından sıkı bir şekilde sarılmış, uygun çapta ve vitellusları homojen görünen (vakuol, yer yer yoğunlaşma vb. farklılıklar olmayan) oositler olgunlaşma için seçilmektedir. Seçilen kaliteli oositler *in vitro* maturasyon ortamına aktarılır (3, 148, 149).

2.11.2. *In Vitro* Maturasyon

Stereo mikroskop altında en az 3- 4 sıra kumulus hücresi, sağlam zona pellusida ve homojen vitellus yapısı olan oositler maturasyon medyumunda birkaç kez yıkandıktan sonra %5 CO₂, 38-39°C sıcaklık ve yüksek nemin sağlandığı inkübatörlerde 24-36 saat süre ile inkübe edilir (155). İnkübasyon sonrası gelişme yeteneği olan primer oositler, sekonder oositler (I. polar cismi atılmış, metafaz II aşamasına gelmiş oosit) aşamasına getirilmektedirler (145).

Kumulus hücrelerinin genişlemesi, maturasyonun en belirgin göstergesidir. Kumulus hücreleri genişlemiş oosit oranı (maturasyon oranı) stereo mikroskop kullanılarak belirlenir (156). Oosit kalitesi, oositin seçilmesindeki beceri, maturasyon medyumunu, inkübasyon süresi, sıcaklık ve hava bileşenleri maturasyon oranını etkilemektedir (157). Memeli oositlerinin kültürü amacıyla oositin maturasyonunu destekleyen FSH, LH, östrojen ve çeşitli büyüme faktörleri katılan Tissue Culture Medium (TCM 199) veya Minimum Essential Medium (MEM) kullanılmaktadır (158). Koyun oositlerinin *in vitro* maturasyonu amacıyla medyum olarak TCM 199 yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu medyum, fetal buzağı serumu (FCS), sodyum piruvat, antibiyotikler, follikül stimüle edici hormon (FSH), luteinleştirici hormon

(LH), östradiol-17 β , insan koriyon gonadotropini (hCG), insan menopoz gonadotropini (HMG) ve büyüme faktörleri ile desteklenmektedir (1, 3, 145, 149). Oositin nukleer ve sitoplazmik maturasyonu, fertilizasyon sonrası gelişim potansiyelini etkilemektedir. Mezbaha materyalinden elde edilen oositlerin kaynağını oluşturan folliküllerin çapları 2-6 mm arasındadır. Özellikle çapı küçük olan folliküllerin içinde bulunan oositlerin mikro çevresi, ovulasyon aşamasındaki bir follikülün ortamında bulunan ve oositin yaşamını destekleyen faktörlerden yoksundur. Dolayısı ile oositin elde edildiği follikülün çapı, maturasyon ortamında oositin olgunlaşma yeteneğini etkilemektedir. Bu durum puberte öncesi toklulardan elde edilen oositlerin olgunlaşma yeteneği ile koyun oositlerinin maturasyon oranlarına göre daha zayıf olmasını açıklamaktadır (159, 160). Mezbaha materyalinden veya canlı hayvandan alınan oositlerin *in vitro* maturasyonundan sonra yapılan IVF'de bölünme oranı yüksek olmasına karşın az sayıda blastosist elde edilebilmektedir. Kane (146) bu durumun temel nedeninin folliküler olgunluk olduğunu ileri sürmüştür.

2.11.3. *In Vitro* Fertilizasyon

Çoğu türde ovulasyon, oosit maturasyon aşamasını tamamladıktan (I. polar cismi atıldıktan) sonra şekillenir. Mature olmuş bir oosit, 12-24 saat fertilizasyon yeteneğini korur. Daha sonra hızlıca fertilizasyon yeteneğini kaybederek ölür (17). Fertilizasyon aşamasındaki oositin yaşı, embriyonik gelişimi ve implantasyon yeteneğini etkilemektedir (17). Fertilizasyon medyumuna alınan oositler, önceden 24-36 saat süre zarfında mature edilmektedir. Fertilizasyon aşamasına maturasyona göre farklı yaşta olan oositler aktarılmaktadır. Bu nedenle bu oositlerin hepsinin fertilize olarak blastosist aşamasına ulaşma yetenekleri farklı olacaktır. *In vitro* embriyo üretiminde, oositlerin büyük çoğunluğu (yaklaşık %60'ı) blastosist aşamasına ulaşmamaktadır (147).

Doğal aşım ile birlikte milyarlarca spermatozoa dışı genital kanala bırakılır. Bu spermatozoanın bir bölümü çara akıntısı ile birlikte atılırken bir kısmı dışı genital kanalı oluşturan serviksin kör keseleri, uterus kriptleri ve ovidukta giriş bölgesinin oluşturduğu doğal bariyer tarafından engellenir. Bu durumda fertilizasyon bölgesine ancak 10-100 spermatozoa ulaşır ve polispermi olgusu engellenmiş olur. Spermanın ovumu döllemesi ile zona bloğunun oluşması, polisperminin engellenmesinde etkin rol oynamaktadır. IVF koşullarında polisperminin önlenmesi amacıyla oosit başına düşen spermatozoa sayısı düşük tutulur. Koyun IVF çalışmalarında fertilizasyon amacıyla 0.8×10^6 spermatozoa/ml hesaplanır (3, 149).

IVF amacıyla taze, dondurulmuş veya cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanılabilir. IVF çalışmalarında kullanılan spermanın kalitesi sonuçlar üzerinde etkilidir. Taze sperma ile yapılan IVF sonrası %40 (161) ile %94.4 (70); dondurulmuş sperma ile yapılanlarda ise %33.5 (105) ile %85.5 (95) arasında yarıklanma oranı elde edildiği bildirilmiştir.

Ortamda bulunan ölü spermatozoonlar, hücre artıkları, sperma sulandırıcısı ve testiküler sıvılar, spermatozoanın fertilizasyon yeteneğini etkilemektedir. Doğal aşım sonrasında spermatozoa, bu artıklarından arınarak, fertilizasyon bölgesine ulaşır. Doğal biyolojiye benzetmek ve söz konusu bu atıkların olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için, fertilizasyon amacıyla kullanılacak sperma percoll-gradient (3, 81, 149) swim up (148), swim down veya glaswool filtrasyon gibi yöntemlerden yararlanılarak motil spermatozoonlar ayrıştırılmaktadır. IVF çalışmalarında motil spermatozoonların ayrıştırılması amacıyla sıklıkla percoll-gradient veya swim-up tekniğinden yararlanılmaktadır (3, 86, 95, 149).

Genital kanal içine bırakılan spermanın, fertilizasyon yeteneğini kazanabilmesi için kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu aşamalarını geçmesi gerekir. Kapasitasyon, uterus başlıyan ve ovidukta süren membran yapısındaki değişiklik sonucu akrozom reaksiyonu ile sonuçlanan bir prosesler zinciridir (9, 17). Spermatozoonun ovumun içine geçebilmesi için kumulus ve korona radiata hücrelerini, sonra zona ve ardından da ovum membranını geçmesi gerekir (9). Fertilizasyon, fertilizasyon yeteneği olan spermanın kumulus hücreleri içindeki migrasyonu, spermanın zona pellusidaya bağlanarak içine migrasyonu ve spermanın ovuma ait plazma membranı ile füzyonu olmak üzere üç ayrı aşamadan oluşur (17).

In vitro fertilizasyonda Bovine Serum Albümin (BSA) ilaveli BO (Brackett and Oliphant) medyumu (161), bikarbonatlı SOF medyumu (3, 157) veya Tyrode medyumu (162) kullanılan başlıca medyumlardır. Fertilizasyon medyumu spermanın motilitesine ve kapasitasyonuna yarar sağlamalı ve embriyonik gelişimin başlamasına ortam oluşturmalıdır (163). Fertilizasyon medyumuna aktarılan mature olmuş oositler ve ayrıştırılmış motil sperma örnekleri %5 CO₂, 38-39°C sıcaklık ve yüksek nemin sağlandığı inkübatörlerde bırakılarak fertilizasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. *In vitro* fertilizasyon süresi, koyun oositleri için ortalama 18-20 saattir (148, 161).

Spermanın dondurulması, özellikle akrozomda, kapasitasyona benzer değişikliklere yol açmaktadır (13). Bu nedenle donmuş sperma kullanılan kimi IVF çalışmalarında, yüksek oranda bölünme elde edildiği bildirilmiştir (164). Heparin koyun spermatozoidinin kapasitasyonu amacıyla IVF medyumuna katılmaktadır. Ayrıca yüksek protein içeriği olan

koyun serumu veya bovine serum albuminin farklı oranları, kapasitasyon amacıyla IVF medyumlarına katılmaktadır (148). Pek çok fertilizasyon medyumunda kullanılan heparinin, spermatozoon kapasitasyonunu indüklediği belirtilmektedir. Ancak heparin yoğunluğunun artması, bölünme oranını ve blastosist gelişim yüzdesini etkilemektedir (165). Li ve arkadaşları (165) farklı heparin kullanarak yaptıkları bir çalışmada, bölünme oranını heparin içermeyen medyumda %86.7, 5 IU heparin içeren medyumda %85.6 ve 10 IU heparin içeren medyumda ise %75.5 bulmuşlardır.

2.11.4. *İn Vitro* Kültür

Embriyo gelişim oranı takibi ve değerlendirilmesi *in vitro* kültür aşamasında önemli bir yer tutar. Günümüzde geliştirilen koyun embriyolarının morula ve blastosist dönemine ulaşma oranları istenilen düzeylerde değildir. Özellikle embriyoların blastosist dönemine ulaşma oranları, uzun süre yaşama ve yavru oluşturma kabiliyetlerinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (149).

Koyun embriyoları genellikle 5-7 gün süre ile *in vitro* kültüre edilmekte ve gelişme aşamaları değerlendirilmektedir (157). O'Brien ve arkadaşları (166) prepubertal veya erişkin koyun ovaryumlarından elde edilen oositlerin maturasyonu, fertilizasyonu ve bölünme oranları arasında fark olmadığını ancak prepubertal koyun ovaryumlarının *in vitro* fertilizasyonu sonucu kazanılan embriyoların, çoğunlukla kültürdeki 6. gün blastosist dönemine eriştiğini, erişkin koyunlardan *in vitro* fertilizasyonla elde edilen embriyoların ise 5. gün blastosist dönemine ulaşabildiğini bildirmişlerdir.

İn vitro kültür amacıyla kullanılan medyumlar, embriyonik gelişimi etkilemektedir. Kimi durumlarda bu medyumların destekleyici etkisi türe bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Koyunlarda en yaygın kullanılan ve embriyonik gelişimi destekleyen kültür medyumunu, sentetik ovidukt sıvısı (SOF)'dır (167). SOF medyumundan başka TCM 199, Hams-F10, Tyrods, CR1 ve KSOM medyumları da kültür medyumunu olarak kullanılmaktadır (145, 167, 168).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Sunulan tez çalışması, Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu (08/04/2011 tarih ve 2011-05/02 nolu etik kurul kararı) onayı alınarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan kimyasal madde listesi ve marka bilgileri Tablo-17'de verilmiştir. Araştırmada hayvan materyali olarak, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Merkezi Koyunculuk Ünitesi'nde aynı bakım ve besleme koşullarında barındırılan 2-4 yaşlı 5 baş Kıvrıkcık ırkı koç kullanılmıştır.

3.1. Koçlardan Sperma Alınması ve Spermatolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi

Sperma elektroejakülatör (Minitube, Germany) kullanılarak alındı. Sperma alma işlemi aşım mevsimi içinde (Eylül-Ekim) haftada 2 kez olmak üzere 5 kez yinelenmiştir.

Sperma almak için koç yatırılarak iki kişi tarafından zapturapta alındıktan sonra, prepusial bölgenin kılları temizlenerek serum fizyolojik ile yıkanıp kurutuldu. Elektroejakülatörün probu (Electro-Ejaculator probe 1, Minitube, Germany) rektuma yerleştirildikten sonra, penis elle manipüle edilerek prepusyumun dışarısına çıkarılıp otomatik olarak her 4 saniyede bir elektrik uyarımları verilerek penise masaj uygulandı. Bu işlem sperma alınmaya kadar yinelenmiştir. Ejakülasyonun başlaması ile birlikte sperma, bir huni yardımı ile ısıtılmış sperma toplama kadehine alındı. Avuç içerisinde tutulan sperma toplama kadehleri, sıcaklığı 30°C'ye ayarlanmış su banyosuna hızlıca aktarılarak taze spermada hacim, kitle hareketi, motilite, yoğunluk, morfolojik muayene ve plazma membran fonksiyonel bütünlük testi'nden oluşan spermatolojik değerlendirmeler gerçekleştirildi. Tüm spermatolojik ve boyama yöntemlerinde kullanılan cam malzemenin temiz ve steril olmasına, kullanılan sulandırıcı ve boyaların sperma ile aynı sıcaklıkta ve taze hazırlanmış olmasına dikkat edildi.

3.1.1. Sperma Hacmi

Sperma toplama kadehine alınır alınmaz, üzerinde bulunan skaladan yararlanarak hacmi okunup ml olarak kaydedildi (17). Hacimleri en az 0.3 ml olan ejakülat örnekleri çalışmada kullanıldı.

3.1.2. Kitle Hareketi (Mass-aktivite)

Sperma alınır alınmaz hızlıca kitle hareketi değerlendirildi. Bunun için mikroskopun ısıtıcı tablasında bulunan lam üzerine 1 damla taze sperma damlatılarak lamel kapatılmadan faz-kontrast mikroskopun (Olympus BX51) x10'lük objektifi ile değerlendirme yapıldı. Kitle hareketini ölçmede (+,++++)'lük skaladan yararlanıldı. En az +++ ve üzeri mass aktivitesi olan ejakülat örnekleri çalışmaya katıldı.

3.1.3. Spermatozoon Motilitesi

Önceden ısıtılmış lam üzerine 1 damla serum fizyolojik ve 1 damla sperma damlatılıp karıştırıldıktan sonra üzerine lamel kapatıldı. Faz-kontrast mikroskop altında x40'lık objektifte incelendi. İncelemede üç ayrı mikroskop alanı göz önünde bulundurularak ileriye doğru hareket eden spermatozoonlar dikkate alınarak % olarak belirlendi (17). En az %75 ve üzeri motilitesi olan ejakülat örnekleri dondurma amacıyla kullanıldı.

3.1.4. Spermatozoon Yoğunluğu

Spermatozoon yoğunluğunu saptamak için İleri ve arkadaşlarının (9) belirttiği hemositometrik yöntemden yararlanıldı. Bu amaçla, eritrosit sayma pipetinin 0.5 çizgisine kadar taze sperma, 101 çizgisine kadar %3'lük NaCl solüsyonu çekilerek sulandırılma işlemi gerçekleştirildi. Önceden hazırlanmış Thoma lamına sulandırılmış sperma damlatılarak yayılması sağlandı. Thoma lamının köşelerinden ve merkezinden birer adet olmak üzere toplam 5 büyük karede (toplam 80 küçük kare) sayım gerçekleştirildi. Sayılan spermatozoon sayısı, 10^7 ile çarpılarak yoğunluk $x10^9/ml$ cinsinden hesaplandı (9). Çalışmada en az $1.5x10^9$ spermatozoa/ml ve üzeri yoğunluğa sahip ejakülat örnekleri kullanıldı.

3.1.5. Morfolojik Muayene

Morfolojik muayene için Gimza boyama yöntemi kullanıldı (9). On damla Gimza ana solüsyonu, 5 ml distile su ile karıştırılarak Gimza boyası elde edildi. Lam üzerine bir damla serum fizyolojik, bir damla da taze sperma konularak frotiler çekildi ve kuruması beklendi. Hazırlanan frotiler 10 dakika metil alkolde tespit edildi. Metil alkolden alınan frotiler, Gimza boyası içeren küvetlerde 50 dakika bekletildi. Boyama işleminden sonra preparatlar su ile yıkanarak boyaları akıtıldı ve distile sudan geçirilip, ardından kurutuldu. Hazırlanan preparatlar, ışık mikroskopunun immersiyon objektifi (x100) ile incelendi. Her preparattan

toplam 200 adet spermatozoon sayılarak akrozom ve diğer (baş, orta ve kuyruk bölümüne ait) morfolojik bozukluğu olan spermatozoonların sayısı % olarak hesaplandı.

3.2. Plazma Membran Fonksiyonel Bütünlük Testi (HOST)

HOST için ilk önce 100 mOsm'lük sodyum sitrat-früktoz hipotonik solüsyonu hazırlandı. Mikropipet yardımı ile taze veya eritilmiş spermadan 20 µl alınıp içinde beden sıcaklığında 1 ml HOST medyumunu bulunan tüplere aktarılarak 37°C'a ayarlı su banyosunda 1 saat bekletildikten sonra HOST incelemeleri gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası lam üzerine bir damla örnek aktarılarak üzeri lamel ile kapatılıp faz-kontrast mikroskopta 1000 büyütmede incelendi. Her preparattan toplam 200 hücre sayılarak kuyruk kısmı şişmiş hücrelerin % değerleri kaydedildi (137).

Hacim, kitle hareketi motilite ve yoğunluk değerlendirmeleri taze alınmış spermada gerçekleştirildi. Motilite, morfoloji, HOST muayeneleri sperma pooling yapıldıktan, I.aşama sulandırıcısıyla sulandırıldıktan, 5°C sıcaklığa soğutulduktan, ekilibrasyonu tamamladıktan ve eritildikten sonraki aşamalarda gerçekleştirildi.

3.3. Spermanın Sulandırılması

Çalışmada iki aşamalı sulandırma tekniğinden yararlanıldı. Bu amaçla Tris-sitrik asit-früktoz sulandırıcısı kullanıldı (169). Çalışmada kullanılan Tris-sitrik asit-früktoz sulandırıcısı aşağıdaki formüle göre hazırlandı.

Tris-sitrik asit-früktoz sulandırıcısı: Sulandırıcı A (1000 ml)

THAM [Tris (hydroxymethyl) aminometane]	27,1 g
D- früktoz	10,0 g
Sitrik asit	14,0 g
Penisilin G	0,3 g
Dihidrostreptomisin	0,4 g/l
Yumurta sarısı	%20

Sulandırıcı B

THAM [Tris (hydroxymethyl) aminometane]	27,1 g
D- früktoz	10,0 g

Sitrik asit	14,0 g
Penisilin G	0,3 g
Dihidrostreptomisin	0,4 g
Trehaloz	38 g
EDTA	1,5 g
Yumurta sarısı	%20

Sulandırıcı B 4 eşit gruba bölündü.

1. Gruba %6 Gliserol,
2. Gruba %6 Etilen glikol,
3. Gruba %6 DMSO,
4. Gruba %6 1,2 Propanediol eklendi.

Sulandırıcılar sperma alma gününde hazırlandı. Kriyoprotektan madde içermeyen sulandırıcı (sulandırıcı A) su banyosuna yerleştirildi ve sıcaklığı 26-28°C'a ayarlandı. Yukarıda anılan kriyoprotektan maddeleri içeren sulandırıcılar (Sulandırıcı B) ise buzdolabına yerleştirilerek 5°C'ta saklandı.

Sperma 1:1 oranında sulandırıcı A ile sulandırıldıktan sonra içinde 30°C su bulunan bir kaba aktarıldı ve kap 5°C'a ayarlanmış soğuk kabine yerleştirildi. Kabın sıcaklığı en az 1 saat içerisinde buz kalıpları atılarak 5°C'a indirildi. Bu aşamada rutin spermatolojik muayeneler yapıldı.

Sulandırıcı A ile sulandırılıp 5°C'a düşürülmüş olan sperma 4 eşit hacme bölündükten sonra (split sample), B sulandırıcılarından biri ile 1:1 oranında aşamalı olarak sulandırıldı. B sulandırıcısı ile sulandırma işlemi 50 dakika içinde tamamlandı. Sulandırma işlemi tamamlandıktan sonra sperma 5°C'ta 2 saat ekilibrasyona bırakıldı.

3.4. Spermamın Dondurulması

Ekilibrasyon süresinin sonunda sperma 0.25 ml'lik mini payetlere çekildi ve otomatik sperm embriyo dondurma makinesinde (Nicol Plus PC Freezing Machine, Air Liquide, FRANCE) 5°C'tan -20°C'a 0.5°C/dak, -20°C'tan -120°C'a 25°C/dak hızla donduruldu. Daha sonra, payetler sıvı azot (-196°C) içine aktarıldı. Eritme sonrası spermatolojik muayene ve *in vitro* embriyo üretimi amacıyla kullanılıncaya kadar sıvı azot tankında saklandı.

3.5. Eritme Sonrası Spermatolojik Muayeneler

Bu amaçla her çalışma grubundan olmak üzere her denemeden en az 3 payet eritilerek eritme sonrası değerlendirmeler gerçekleştirildi. Eritme sonrası aşamada donmuş spermanın kalitesini belirlemek amacıyla motilite, morfoloji, HOST ve FITC-Pisum Sativum Agglutinin (FITC-PSA) muayeneleri gerçekleştirildi.

3.6. FITC-Pisum Sativum Agglutinin (FITC-PSA) ile Akrozomal Yapının Ortaya Konması

Eritme sonrası aşamada, Gimza metodu ile değerlendirilen akrozomal yapının sonuçlarının desteklenmesi amacıyla, FITC-PSA yönteminden yararlanıldı. Bu amaçla Nur ve arkadaşlarının (13) bildirdiği yöntem kullanıldı. 500 µl PBS içine 20 µl eritilmiş sperma eklendi ve 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek yıkandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra üzerine 250 µl PBS eklenerek dikkatlice karıştırıldı. Elde edilen yıkantı sıvısından froti çekilerek havada kurutuldu. Kurutulan frotiler 4°C sıcaklıkta aseton ile 10 dk tespit edildikten sonra, karanlıkta 30 dakika süre boyunca FITC-PSA (50 µg/ml fosfat buffer solüsyonu) ile boyandı. Boyama işleminden sonra Fosfat Buffer solüsyonu ile yıkayıp gliserol ile kaplanarak farklı floresan filtresi (U-DM-DA/FI/TX2) bulunan mikroskop (BX51, Olympus Inc, Japan) altında incelendi. Akrozomun tamamı yeşil görünen spermatozoitler sağlam olarak sayıldı. Her bir preparattan en az 100 spermatozoa incelenerek sağlam akrozoma sahip spermatozoa oranı % olarak belirlendi.

3.7. *In Vitro* Çalışmalar

Ovaryumların elde edilmesi, aspirasyon, *in vitro* maturasyon, *in vitro* fertilizasyon, *in vitro* kültür aşamalarında kullanılan stok solüsyon (Tablo 2-10), medyum (Tablo 11-16) ve yöntemler, Gomez ve arkadaşlarının kullandıkları protokoller modifiye edilerek hazırlandı (28).

3.7.1. Ovaryumların Temin Edilmesi

Bursa Et-Balık Kurumu mezbahasında kesilen koyunlardan ovaryumlar alındı ve zaman kaybetmeden 37 °C'ta 500 ml %0.9'luk fizyolojik tuzlu su (FTS) içeren termoslara aktarıldı. Yeterince ovaryum alındıktan sonra kısa sürede U.Ü. Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı *In Vitro* Fertilizasyon laboratuvarına getirildi.

3.7.2. Oositlerin Elde Edilmesi

Ovaryumlar çevrelerindeki fazla doku ve yağlardan arındırıldı ve üç kez 37°C'taki PBS ile yıkandı. İşleyinceye kadar su banyosu içinde ısıtılmış (37°C) PBS içinde bekletildi. Ovaryum yüzeyinde görülen folliküller bir bistüri yardımıyla kesildi ve insülin iğnesi takılmış 20 ml'lik enjektörlerdeki oosit yıkama medyumu (Tablo-11) ile plastik petri kutuları içerisine yıkandı. Stereo mikroskop (Nikon SMZ 1000) x10-20 büyütme altında en az 3-4 sıra kumulus hücresi tarafından sıkı bir şekilde sarılmış, uygun çapta ve vitellusları homojen görünen (vakuol, yer yer yoğunlaşma vb farklılıklar olmayanlar) oositler (COCs) seçildi.

3.7.3. *In Vitro* Maturasyon

Maturasyon amacıyla dört kuyucuklu olgunlaşma petripleri kullanıldı. Bu amaçla, her bir kuyucuğunda 500 µl maturasyon medyumu bulunan, üzeri mineral yağla kaplı ve en az 6 saat inkubatörde (Heraeus Heracell) bekletilen petripler önceden hazırlandı. Elde edilen oositler (COCs) üç kez oosit yıkama medyumundan geçirildikten sonra bir kez de maturasyon medyumundan (Tablo-12) geçirilerek iyice yıkandı. Her bir kuyucukta en fazla 40 oosit olacak şekilde aktarma yapıldı. Daha sonra oositler Germinal Vezikül (GV) aşamasından MII aşamasına gelebilmesi için 19–24 saat 39°C sıcaklıkta neme doyurulmuş %5 CO₂'li atmosferde inkübe edildi.

3.7.4. Spermanın Fertilizasyon İçin Yıkınması ve Hazırlanması

Hiperaktif spermatozoonları ayırtmak amacıyla kullanılacak olan percoll gradient tekniği için 10 ml deney tüpü hazırlandı. Percoll-SOF gradients %90 ve %45'lik olmak üzere iki katman şeklinde tüplere yerleştirildi. 2 ml 1:1 oranında karıştırılmış HSOF (hepes tamponlu modifiye SOF) ve percoll-SOF (%45'lik percoll-SOF) konik dipli 10 ml'lik santrifüj tüpü içinde bulunan 2 ml hacmindeki %90'lık percoll-SOF üzerine dikkatlice iki solüsyon karışmayacak şekilde tabakalandırılarak konuldu. 200 µl dondurulmuş sperma %45'lik percoll solüsyonunun üstüne tabakalandırılarak konuldu. Sperma konulduktan sonra hazırlanmış olan tüpler 1500 g santrifüj gücünde 15 dakika santrifüje edildi. Santrifüj işleminden sonra üstteki percoll tabakaları dikkatli bir şekilde alınıp atıldı. Tüpün dip kısmında spermatozoonlar tarafından oluşturulan pellet 2 ml HSOF ile yeniden sulandırıldı ve 600 g santrifüj gücünde 6 dakika santrifüj edildi. Üst kısımdaki süpernatant alınarak atıldı. Tüpte geriye kalan spermatozoon sayısı hemositometrik yöntemle belirlendi.

3.7.5. *In Vitro* Fertilizasyon

In vitro olgunlaşmayı izleyen dönemde genişlemiş kumulusu olan oositler olgunlaşma ortamından alındı ve kumulus hücreleri ile korana hücreleri HSOF içinde 3–5 dakika hafifçe pipetlenerek uzaklaştırıldı. Oositler, kumulus hücreleri uzaklaştırıldıktan sonra %2 koyun serumu (sheep serum; SS) destekli bikarbonat tamponlu sentetik ovidukt sıvısı (BSOF) içinde bir kez yıkandı. Temizlenmiş olan oositler, üzeri 400 µl mineral yağ ile örtülmüş 500 µl BSOF + SS içeren 4 kuyucuklu petrinin kuyucuklarına aktarıldı. Her bir kuyucuk içine en fazla 40 oosit koyuldu. Fertilizasyon petrilere aktarılan oositler percoll gradient tekniği ile elde edilmiş olan sperma ile fertilize edildi. Fertilizasyon ortamına spermatozoonlar final yoğunluğu 0.8×10^6 spermatozoa/ml olacak şekilde ayarlandı. Fertilizasyon süreci neme doyurulmuş %5 CO₂'li atmosferde ve 39°C sıcaklıkta 19-21 saat süre ile gerçekleştirildi.

3.7.5.1. Koyun Serumunun (SS) Hazırlanması

Koyunlarda ovulasyonları oluşturmak için progesteron emdirilmiş olan vaginal süngerler 14 gün boyunca vagenleri içinde tutuldu. Süngerlerin çıkarılma günü 400 IU gebe kısarak serum gonadotropini (PMSG) kas içi yolla enjekte edildi. Süngerlerin çıkarılmasından 72 saat sonra vena jugularisten kan alındı. Alınan kanlar hemen 5 dakika 100 G kuvvetinde santrifüj edildi. 37 °C sıcaklıkta 1 saat inkübe edildi. Oluşan pıhtı serumdan ayrıldı ve kazanılan serumlar inaktive olmaları için 56°C sıcaklıkta 30 dakika bekletildi. İnaktivasyon sonrası elde edilen serumlar 0.22 µm filtreden geçirilerek 250 µl hacimlerde porsiyonlandı. Kullanılincaya kadar -20°C sıcaklıkta derin dondurucuda saklandı.

3.7.6. *In Vitro* Kültür

BSOF + SS ortamında 19–21 saat sürdürülen *in vitro* fertilizasyon işleminden sonra, zigot olarak varsayılan hücreler iki kez HSOF içinde yıkandı ve daha sonra bir kez de SOF içinden geçirildi. En az 6 saat önce petrilere her bir bölmesine 500 µl SOF I koyularak, 400 µl mineral yağ ile kaplandı. Hazırlanan petrilere IVM koşullarında inkübe edildi. Fertilizasyon ortamından alınıp yıkanarak üzerindeki spermatozoonlardan arındırılmış olan olası zigotlar, neme doyurulmuş %5 CO₂'li atmosferde ve 39°C sıcaklıkta inkübe edilmiş petrilere içine alındı. Her bir kuyucuk içine en fazla 40 hücre konuldu. İnkübasyonun dördüncü gününde embriyolar SOF II'ye aktarılarak inkübasyon sürdürüldü. Embriyonik gelişim 48., 92., 120. saatler ile 7. ve 8. günlerde değerlendirildi (Tablo-1).

Tablo-1. Embriyonik Gelişme Aşamalarının Değerlendirilme Zamanı

EMBRİYONİK	KAYIT ZAMANI
AŞAMA	(Fertilizasyon 0. saat)
2-4 Hücre	48. Saat
8-16 Hücre	92. Saat
Morula	120. Saat
Blastosist	7- 8. Gün

3.8. Sonuçların İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS 20 programından yararlanıldı. Spermatolojik değerlendirmelerde; One-Way ANOVA ve Tukey testleri, embriyonik değerlendirmelerde ise Ki Kare testi kullanıldı. Tüm değerlendirmelerde $P < 0.05$ düzeyinin istatistiksel fark bakımından önemli olduğu kabul edildi. Grafikler için Microsoft Office Excel 2007 ve Sigma Plot 10 programlarından yararlanıldı.

3.9. Çalışmada Kullanılan Stok Solüsyonlar

Tablo-2. Bikarbonat Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Bikarbonat Stok (B)	
NaHCO ₃	1,05 g
Milli-Q su son hacim	50 ml
Hazırlanan solüsyon 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. 4°C sıcaklıktaki buzdolabında muhafaza edilerek 2 hafta kullanıldı.	

Tablo-3 Heps Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Heps Stok (H)	
Na Heps	1,627 g
Heps (free acid)	1,5 g
Milli-Q su son hacim	50 ml
Hazırlanan solüsyon 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. 4°C sıcaklıktaki buzdolabında muhafaza edilerek 2 ay kullanıldı.	

Tablo-4.Tuz Karışımı Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Tuz Karışımı Stok (S2)	
NaCl	3,147 g
KCl	0,267 g
NaH ₂ PO ₄	0,027 g
Milli-Q su son hacim	50 ml
Hazırlanan solüsyon 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. 4°C sıcaklıktaki buzdolabında muhafaza edilerek 3 ay kullanıldı.	

Tablo-5. Laktat Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Laktat Stok (L)	
Na lactate	2,35ml
Milli-Q su son hacim	50 ml

Hazırlanan solüsyon 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. 4°C sıcaklıktaki buzdolabında muhafaza edilerek 2 ay kullanıldı.

Tablo-6. Glükoz Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Glükoz Stok (G)	
Glucose	270 mg
Milli-Q su son hacim	25 ml

Hazırlanan solüsyon 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. 4°C sıcaklıktaki buzdolabında muhafaza edilerek 2 ay kullanıldı.

Tablo-7. Kalsiyum Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Kalsiyum Stok (C)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	630 mg
Milli-Q su son hacim	25 ml

Hazırlanan solüsyon 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. 4°C sıcaklıktaki buzdolabında muhafaza edilerek 3 ay kullanıldı.

Tablo-8. Bikarbonat Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Magnezyum Stok (M)	
MgCl ₂ .6H ₂ O	250 mg
Milli-Q su son hacim	25 ml

Hazırlanan solüsyon 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. 4°C sıcaklıktaki buzdolabında muhafaza edilerek 3 ay kullanıldı.

Tablo-9. Antibiyotik Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Antibiyotik Stok (PS)	
Penicilin	187,5 mg
Streptomycin	125 mg
PBS	25 ml

Hazırlanan solüsyon 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. 500 µL'lik hacimlerde eppendorf tüplerine porsiyonlanarak -20°C sıcaklıktaki derin dondurucuda kullanıncaya kadar muhafaza edildi.

Tablo-10. Percoll SOF Solüsyonunun Hazırlanması

Percoll SOF Solüsyonu	
S2 stok	5,0 ml
Na HEPES	137 mg
HEPES (free acid)	126 mg
D stok	0,5 ml
M stok	0,5 ml
Percoll	50 ml

Percoll-SOF'un pH'sı 7,2-7,4, osmotik basıncı 280-300 mOsmol/kg'a ayarlandı. Filtre edilmeden 4°C sıcaklıktaki buzdolabında 1 ay boyunca muhafaza edilerek kullanıldı.

3.10. Çalışmada Kullanılan Medyumlar

Tablo-11. Oosit Yıkama Medyumunun Hazırlanması

Oosit Yıkama Medyumu	
TCM 199	2,475 g
H Stok	21 ml
B Stok	4 ml
Kanamisin	19 mg
Heparin	2,5 mg
Milli-Q su son hacim	250 ml

Hazırlanan solüsyon 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. 4°C sıcaklıktaki buzdolabında muhafaza edilerek 3 ay kullanıldı. Oosit elde edilmesi sırasında kullanılacak bu medyum, uygulama yapılmadan bir saat önce buzdolabından çıkartıldı ve içerisine 300 mg/100 ml oranında BSA Fract V ve % 1 oranında PS ilave edildi. Medyumun ozmotik basıncı 283±10 mOsmol/kg'a, pH'sı 7,2-7,4'e, ayarlanarak 0.22 µm filtreden geçirildi ve 37°C sıcaklıktaki etüv de kullanılabilecek kadar bekletildi.

Tablo-12. Oosit Olgunlaştırma Medyumunun Hazırlanması

Oosit Olgunlaştırma Medyumu	
TCM 199	95 mg
NaHCO ₃	22 mg
Milli-Q su son hacim	10 ml
Karışımdan 9 ml alınarak aşağıdaki kimyasallar eklendi	
FCS	1 ml
Na Pyruvat	0,33 mg
Gentamisin	0,55 mg
FSH	10 µg/ml
LH	10 µg/ml
EGF	10 ng/ml

Hazırlanan solüsyonun pH'sı 7,9'a ozmotik basıncı 283±10 mOsmol/kg'a ayarlandı ve 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. Oositleri aktarmadan en az 6 saat önce 39°C sıcaklık ve %5 CO₂ ayarlı inkübatörde inkübe edildi. Medyum günlük olarak hazırlandı ve kullanıldı.

Tablo-13. Hepes Tamponlu SOF Medyumunun Hazırlanması

Hepes Tamponlu SOF Solüsyonu (HSOF)	
S2 STOK	5 ml
H STOK	4,2 ml
B STOK	0,8 ml
D STOK	0,5 ml
M STOK	0,5 ml
L STOK	0,5 ml
G STOK	2 ml
PS STOK	0,5 ml
Na Pyruvate	1,8 mg
Glutamine	0,250 µl
BSA(Fract. V)	150 mg
Kanamisin	3,8 mg
Milli Q Su	50 ml
Phenol Red	0,5 mg

PH'sı 7,2-7,4, osmotik basıncı 283±10 mOsm/kg'a ayarlandı. 0.22 µm filtreden geçirildi. 4°C sıcaklıktaki buzdolabında 1 ay boyunca muhafaza edilerek kullanıldı.

Tablo-14. *İn Vitro* Fertilizasyon Medyumunun Hazırlanması

<i>İn Vitro</i> Fertilizasyon Solüsyonu (BSOF)	
S2 STOK	1 ml
B STOK	1 ml
D STOK	0,2 ml
M STOK	0,1 ml
L STOK	0,3 ml
Na Pyruvat	1,08 mg
Glutamine	50 µl
PS STOK	0,1 ml
Kanamisin	0,8 mg
Milli-Q su son hacim	10 ml

Hazırlanan solüsyondan 200 µl çıkartıldı ve 200 µl SES (östrustaki koyun serumu) ilave edildi. PH'sı 7,9'a ozmotik basıncı 283±10 mOsmol/kg'a ayarlandı ve 0,22µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. Oositleri aktarmadan en az 6 saat önce 39°C sıcaklık ve %5 CO₂ ayarlı inkübatörde inkübe edildi. Medyum günlük olarak hazırlandı ve kullanıldı.

Tablo-15. *In Vitro* Kùltür I Medyumunun Hazırlanması

<i>In Vitro</i> Kùltür Solüsyonu (SOF-I)	
S2 STOK	1 ml
B STOK	1 ml
D STOK	0,1 ml
M STOK	0,1 ml
L STOK	0,1 ml
Na Pyruvat	0,36 mg
Glutamine	15,8 µl
PS STOK	0,1 ml
Kanamisin	0,8 mg
Phenol Red	0,1 mg
BSA (fatty acid free)	40 mg
MEM-amino asit	200 µl
MEM –non esansiyel amino asit	100 µl
Milli-Q su son hacim	10 ml

Medyumun ozmotik basıncı 283 ± 10 mOsmol/kg'a, pH'sı 7,9'a ayarlanarak 0.22 µm filtreden geçirilerek steril edildi. Oositleri aktarmadan en az 6 saat önce 39°C sıcaklık ve %5 CO₂ ayarlı inkübatörde inkübe edildi. Medyum günlük olarak hazırlandı ve kullanıldı.

Tablo-16. *In Vitro* Kùltür II Medyumunun Hazırlanması

<i>In Vitro</i> Kùltür Solüsyonu (SOF-II)	
S2 STOK	1 ml
B STOK	1 ml
D STOK	0,1 ml
M STOK	0,1 ml
L STOK	0,1 ml
Na Pyruvat	0,36 mg
Glutamine	15,8 µl
PS STOK	0,1 ml
Kanamisin	0,8 mg
Phenol Red	0,1 mg
MEM-amino asit	200 µl
MEM –non esansiyel amino asit	100 µl
Milli-Q su son hacim	10 ml

Karışımından 500 µl çıkartıldı ve 500 µl FCS ve 240 µl G STOK eklendi. Medyumun ozmotik basıncı 283±10 mOsmol/kg'a, pH'sı 7,9'a ayarlanarak 0.22 µm filtreden geçirilerek steril edildi. Oositleri aktarmadan en az 6 saat önce 39°C sıcaklık ve %5 CO₂ ayarlı inkübatörde inkübe edildi. Medyum günlük olarak hazırlandı ve kullanıldı.

Tablo-17. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Malzemenin Adı	Firma/Marka
Follicle Stimulating Hormone (FSH) From Ovine Pituitaries	Sigma
Luteinizing hormone from ovine pituitaries	Sigma
Föetal Calf Serum 500 ml	Sigma
Bovine Serum Albumin Fraction V Fatty Acid Free 5 g	Sigma
Bovine Serum Albumin Fraction V 50 g	Sigma
Medium 199 powder	Sigma
Medium 199 liquid 100 ml	Sigma
MEM Aminoacid Solution(50x) 100 ml	Sigma
MEM Non Essential Aminoacid Solution(100x) 100 ml	Sigma
Hyaluronidase 30 mg	Sigma
Heparin	Sigma
Di-Sodium Hydrogen Phosphate (Na ₂ HPO ₄) 500 g	Sigma
Sodium phosphate dibasic dihydrate (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	Fluka
Potassium hydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄) 100g	Sigma
Sodyum Klorür (NaCl) 500 g	Sigma
KCl cell culture tested	Sigma
NaH ₂ PO ₄ anhidrous	Sigma
Glucose Anhydrous 100 g	Sigma
Sodium Lactat syrup %60 (w/w) embryo tested	Sigma
Embryo Tested Water 500ml	Sigma
Percoll 500 ml	Sigma
Mineral Oil Embryo Tested 1lt	Sigma
Gentamicin Sülfate 50 mg	Sigma

Kanamycin Monosulfate	Sigma
Streptomycin Sülfate 50 g	Sigma
Penicilin G 10.000.000 units	Sigma
Penicillin -Streptomycin Solution (100 x) 100 ml	Sigma
Neomycin Sülfat	Sigma
Calium Chloride dihydrate cell culture tested	Sigma
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma
Na- HEPES cell culture tested	Sigma
Na-Pyruvat	Sigma
Hepes (free acid) (Embryo tested)	Sigma
Gliserol	Sigma
DMSO	Sigma
Etilen Glikol	Sigma
1,2 Propanediol	Sigma
Aseton	Tekkim
PSA	Sigma
Trehaloz	Sigma
Sitrik Asit	Merck
THAM (Tris (hydroxymethyl) aminometane)	Sigma
Fruktoz	Sigma
EDTA	Merck
Gimza	Merck
Metanol	Tekkim

4. BULGULAR

Sperma alınır alınmaz en az +++ mass aktivite, 0,3 ml hacim, %75 motilite, $1,5 \times 10^9$ spermatozoa/ml özelliğinde olan ejakülat örnekleri pooling yapılarak diğer işlemlere geçildi. Gimza boyama sonrası akrozomal bölgenin postakrozomal bölgeye göre daha koyu boyandığı gözlemlendi (Şekil-1). Yapılan HOST sonrası plazma membran fonksiyonel bütünlüğüne sahip spermatozoonların kuyruk bölümlerinin Şekil-2 de görüldüğü gibi şişerek kıvrıldığı saptandı.

4.1. Taze Spermada, Sulandırma Sonrasında ve 5°C' ta Saptanan Spermatolojik Bulgular

Taze spermada pooling sonrası, Tris-sitrik asit-früktoz sulandırıcısı ile sulandırma sonrasında ve 5°C' ta saptanan motilite, HOST, akrozom ve diğer morfolojik bozukluklara (DMB) ait ortalama değerler ve standart hataları Tablo-18'de verilmiştir.

Tablo-18. Pooling, Sulandırma Sonrası ve 5°C' ta Saptanan Spermatolojik Bulgular

($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

AŞAMA	n	MOTİLİTE (%)	HOST (%)	AB (%)	DMB (%)
Pooling Sonrası	5	77.0±2.0 ^a	89.6±0.7 ^a	6.4±0.5 ^a	1.6±0.4 ^a
Sulandırma Sonrası	5	74.0±1.9 ^{ab}	86.3±0.4 ^a	7.6±0.5 ^a	0.6±0.2 ^a
5°C' de	5	71.0±1.0 ^b	84.6±0.6 ^a	10.0±0.3 ^b	1.4±0.2 ^a

a,b: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası istatistiksel fark vardır (P<0.05)

AB: Gimza boyama sonrası elde edilen Akrozomal Bozukluk oranı

DMB: Diğer Morfolojik Bozukluk

Sulandırma işleminin spermatolojik özellikleri etkilemediği gözlemlendi. Pooling sonrası elde edilen taze sperma bulguları ile sulandırma sonrası bulgular arasında istatistiksel fark saptanmamıştır (P>0.05). 5°C sıcaklığa soğutma işleminin motiliteyi ve akrozomal bütünlüğü

olumsuz etkilediği gözlemlendi ($P<0.05$). Bu olumsuz etki plazma membran bütünlüğünde de görünmesine karşın, istatistiksel fark saptanmadı. Sulandırma ve soğutma işleminin DMB üzerine etkisinin olmadığı görüldü ($P>0.05$).

4.2. Ekilibrasyon Sonrası Saptanan Spermatolojik Bulgular

5°C'a soğutulan koç sperması içerisinde, %6 gliserol, %6 DMSO, %6 1,2 propanediol ve %6 etilen glikol içeren Tris-sitrik asit-früktoz sulandırıcısı ile sulandırılarak 2 saat ekilibrasyona bırakıldıktan sonra saptanan spermatolojik bulgular Tablo-19'da verilmiştir.

Tablo-19. Ekilibrasyon Sonrası Saptanan Spermatolojik Bulgular ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLER					
GRUP		MOTİLİTE	HOST	AB	DMB
	n	(%)	(%)	(%)	(%)
Gliserol	5	65.0±0.0 ^a	80.0±0.4 ^a	12.4±0.7 ^{ab}	2.0±0.3 ^a
DMSO	5	50.0±3.2 ^b	70.2±0.7 ^b	13.6±0.5 ^a	2.0±0.4 ^a
1,2 Propanediol	5	59.0±1.9 ^b	75.6±0.9 ^{ab}	10.2±0.6 ^b	2.0±0.3 ^a
Etilen Glikol	5	59.0±2.9 ^b	76.4±0.9 ^{ab}	10.8±0.4 ^b	1.6±0.4 ^a

a,b: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası istatistiksel fark vardır ($P<0.05$)

AB: Gimza boyama sonrası elde edilen Akrozomal Bozukluk oranı

DMB: Diğer Morfolojik Bozukluk

Çalışmada kullanılan kriyoprotektanlardan motilite göz önüne alındığında, gliserolün en üstün olduğu saptandı ($P<0.05$). DMSO içeren gruptaki plazma membran bütünlüğünün diğer gruplara göre daha fazla etkilendiği gözlemlendi. Gliserolün plazma membranının işlevsel bütünlüğünü DMSO grubuna göre daha iyi koruduğu saptandı ($P<0.05$).

Gimza boyama sonrası elde edilen akrozomal bozukluk oranının en yüksek olduğu DMSO içeren grup ile 1,2 propanediol ve etilen glikol grupları arasında istatistiksel fark

olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). Ekilibrasyon sonrası aşamada kullanılan kriyoprotektan maddelerinin DMB oranlarını etkilemediği saptandı ($P<0.05$).

4.3. Eritme Sonrası Saptanan Spermatolojik Bulgular

%6 gliserol, %6 DMSO, %6 1,2 propanediol ve %6 etilen glikol içeren Tris-sitrik asit-früktöz sulandırıcısı ile dondurulan spermada eritme sonrası saptanan motilite, HOST, akrozom ve DMB' ye ait spermatolojik bulgular Tablo-20' de verilmiştir.

Ekilibrasyon sonrası bulgular ile eritme sonrası bulgular karşılaştırıldığında, tüm gruplarda dondurma eritme işleminin sperma motilitesini ($P<0.01$), akrozom bütünlüğünü ($P<0.01$), plazma membranının işlevsel bütünlüğünü ($P<0.01$) ve diğer morfolojik bütünlüğünü ($P<0.05$) olumsuz etkilediği saptandı. Eritme sonrası sonuçlar değerlendirildiğinde, çalışmada kullanılan kriyoprotektanların eritme sonrası sperma motilitesi üzerine farklı düzeyde koruyucu etki gösterdikleri gözlemlendi. Gliserol içeren grubun diğer gruplardan istatistiksel olarak üstün olduğu saptandı ($P<0.05$). 1,2 propanediol ve etilen glikol içeren gruplarda saptanan eritme sonrası motilite değerleri birbirine benzer bulundu, en düşük motilite değeri ise DMSO grubunda saptandı ($P<0.05$).

Plazma işlevsel membran bütünlüğü, motilitesi yüksek gruplarda daha yüksek olarak saptandı. En yüksek plazma membran işlev bütünlüğü olan spermatozoa oranı, gliserol içeren grupta saptandı ($P<0.05$). 1,2 propanediol ve etilen glikol içeren gruplarda saptanan eritme sonrası HOST değerleri birbirine benzer bulundu, en düşük HOST oranı ise DMSO grubunda saptandı ($P<0.05$).

Eritme sonrası aşamada gerçekleştirilen FITC-PSA boyama sonrası akrozomal bölgenin Şekil-3'te görüldüğü gibi yeşil floresan boya aldığı saptandı. FITC-PSA ve Gimza değerlendirme sonrası elde edilen bulgular bakımından, 1,2 propanediol ve etilen glikol içeren grupların gliserol ve DMSO gruplarına göre daha üstün olduğu saptandı ($P<0.05$). Akrozomal yapının bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla kullanılan FITC-PSA ve Gimza yöntemleri arasında sonuçlar bakımından farklılık olduğu gözlemlendi. 1,2 Propanediol dışındaki grupların tümünde FITC-PSA boyama sonrası elde edilen akrozomal bozukluk oranının, Gimza sonuçlarına göre daha yüksek olduğu saptandı ($P<0.05$). Dondurma sonrası aşamada DMB bakımından gruplar arası istatistiksel fark gözlemlenmedi ($P>0.05$).

Tablo-20. Eritme Sonrası Saptanan Spermatojistik Bulgular ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

GRUP	n	MOTİLİTE (%)	HOST (%)	Akrozomal Bozukluk (%)		DMB (%)
				FITC-PSA	Gimza	
Gliserol	15	53.3±0.9 ^a	68.3±0.8 ^a	55.3±0.9 ^{ax}	50.5±1.3 ^{ax}	3.6±0.3 ^a
DMSO	15	15.3±0.9 ^b	30.4±0.8 ^b	55.6±1.0 ^a	51.7±1.6 ^a	3.6±0.2 ^a
1,2 Propanediol	15	40.6±0.8 ^c	52.2±0.8 ^c	49.7±0.9 ^{bx}	44.6±1.3 ^{bx}	3.8±0.2 ^a
Etilen Glikol	15	43.3±0.9 ^c	56.7±0.7 ^c	51.3±0.5 ^{bx}	47.5±0.8 ^{bx}	3.9±0.2 ^a

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası istatistiksel fark vardır (P<0.05)

x: Akrozomal bozukluk için aynı satırda aynı harf taşıyan ortalamalar arası istatistiksel fark vardır (P<0.05)

DMB: Diğer Morfolojik Bozukluk

4.4. *In Vitro* Fertilizasyon Bulguları

%6 gliserol, %6 DMSO, %6 1,2 propanediol ve %6 etilen glikol gruplarında elde edilen embriyo gelişimi ile ilgili değerler Tablo-21'de verilmiştir.

Her bir gruba 150' den fazla mature olmuş oosit kullanılarak yapılan *in vitro* fertilizasyon sonrası en yüksek bölünme oranı, gliserol içeren grupta elde edilmiştir. DMSO içeren grubun fertilizasyon sonuçlarının düşük olduğu saptandı (P<0.05).

8-16 hücreli embriyo sayısı bakımından en düşük değer, DMSO içeren grupta bulunurken (P<0.05), gliserol, 1,2 propanediol ve etilen glikol içeren grupların benzer olduğu saptandı (P>0.05).

Morula aşamasına ulaşan oosit oranı bakımından gliserol içeren grubun diğerlerine göre daha üstün olduğu gözlemlendi (P<0.05). 1,2 propanediol ve etilen glikol içeren gruplarda elde edilen morula oranı birbirine benzer bulundu. En düşük morula oranı ise DMSO içeren grupta elde edildi (P<0.05).

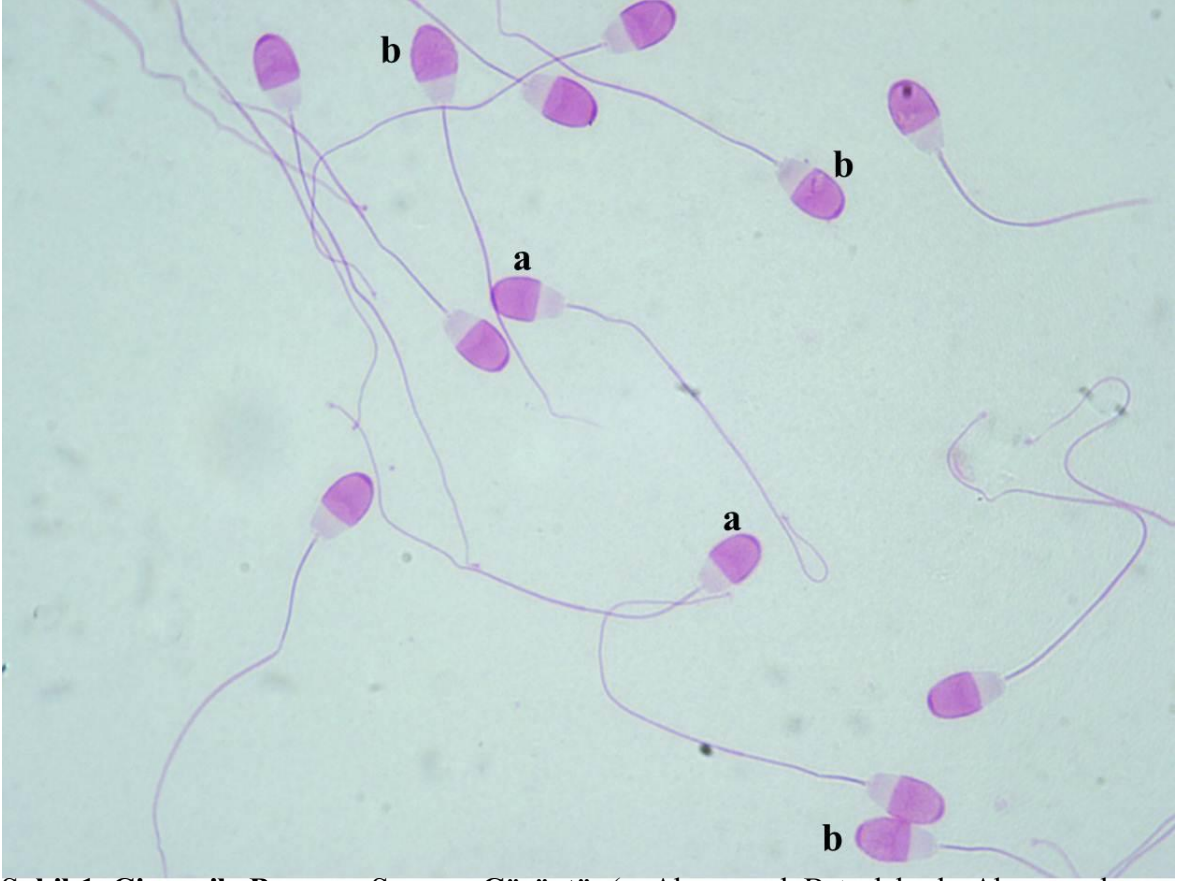
Blastosist aşamasına ulaşan embriyo sayısı bakımından, gliserol içeren grubun en iyi olduğu gözlemlendi. DMSO içeren grupta ise, hiçbir embriyonun blastosist aşamasına ulaşmadığı saptandı (P<0.05).

Tablo-21. *In Vitro* Fertilizasyon Sonucunda Elde Edilen Değerler

GRUP	n	2- 4 Hücre	8- 16 Hücre	Morula	Blastosist
		(%)	(%)	(%)	(%)
Gliserol	159	126 ^a (79.25)	83 ^a (65.87)	52 ^a (41.27)	32 ^a (25.40)
DMSO	152	58 ^b (38.16)	14 ^b (24.14)	4 ^c (6,90)	0 ^c (0)
1,2 Propanediol	151	109 ^a (72.19)	63 ^a (57.80)	28 ^b (25.69)	17 ^{ab} (15.60)
Etilen Glikol	155	96 ^a (61.94)	54 ^a (56.25)	21 ^b (21.89)	11 ^b (11.46)

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası fark önemlidir (P<0.05)

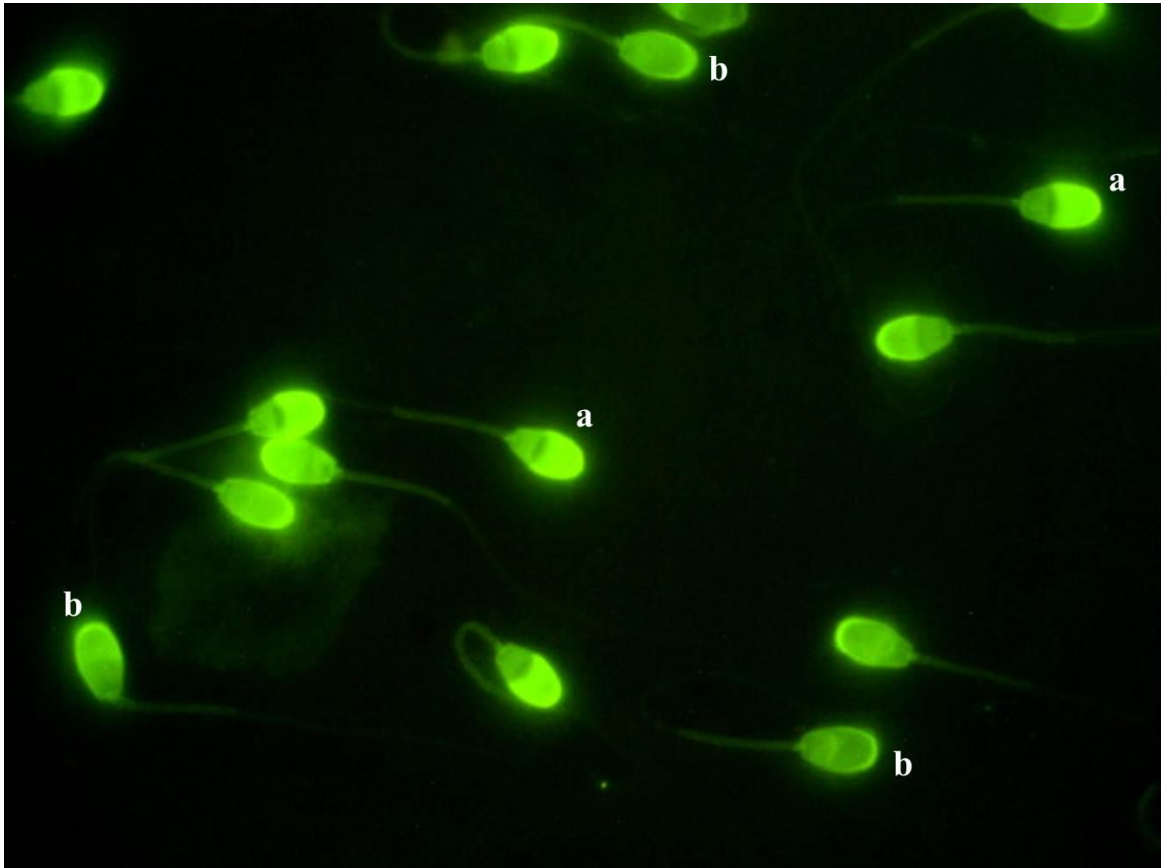
n: Fertilizasyona alınan oosit sayısı



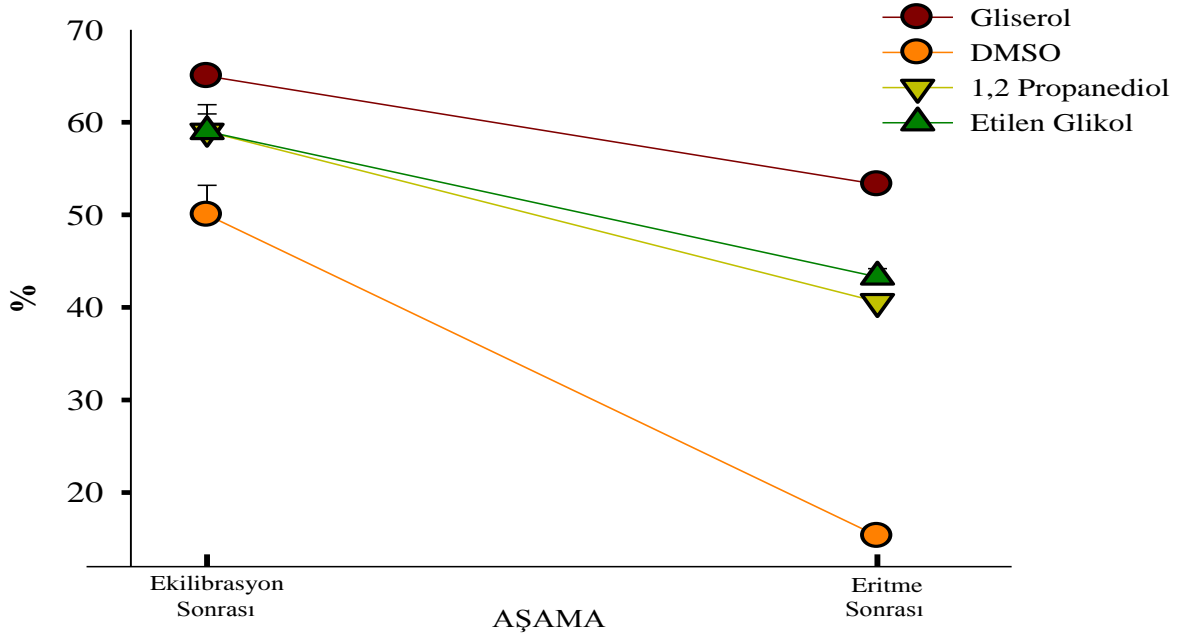
Şekil-1. Gimza ile Boyama Sonrası Görüntü (a: Akrozomal Bütünlük, b: Akrozomal Bozukluk)



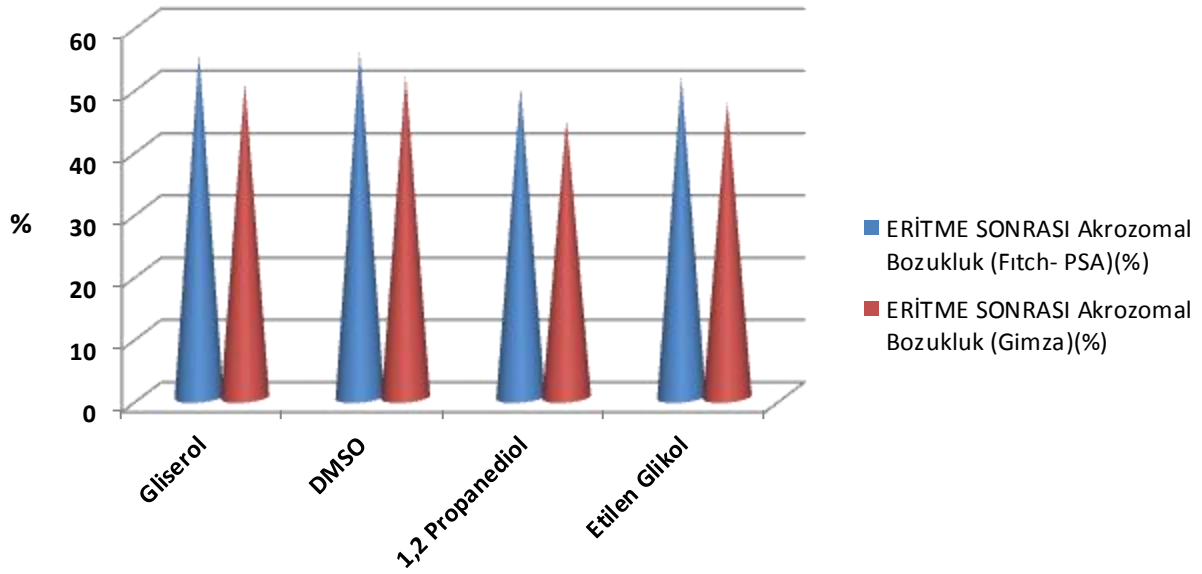
Şekil-2. HOST Sonrası Görüntü



**Şekil-3. FITC-PSA ile Boyama Sonrası Görüntü (a: Akrozomal Bütünlük,
b: Akrozomal Bozukluk**



Şekil-4. Grupların Motilite Yüzdeleri



Şekil- 5. Grupların Eritme Sonrası Akrozomal Bozukluk Yüzdeleri



**6. Ovaryumların Kesilerek
Alınması**

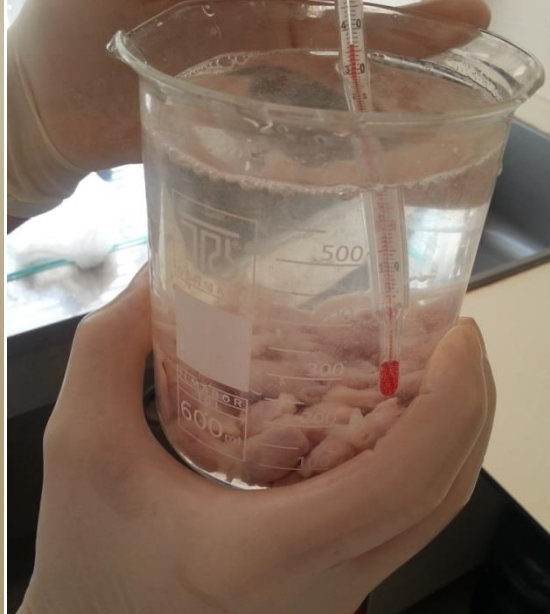


Şekil-7. Termosa Aktarılması

Şekil-



Şekil-8. Ovaryumların Yıkanması



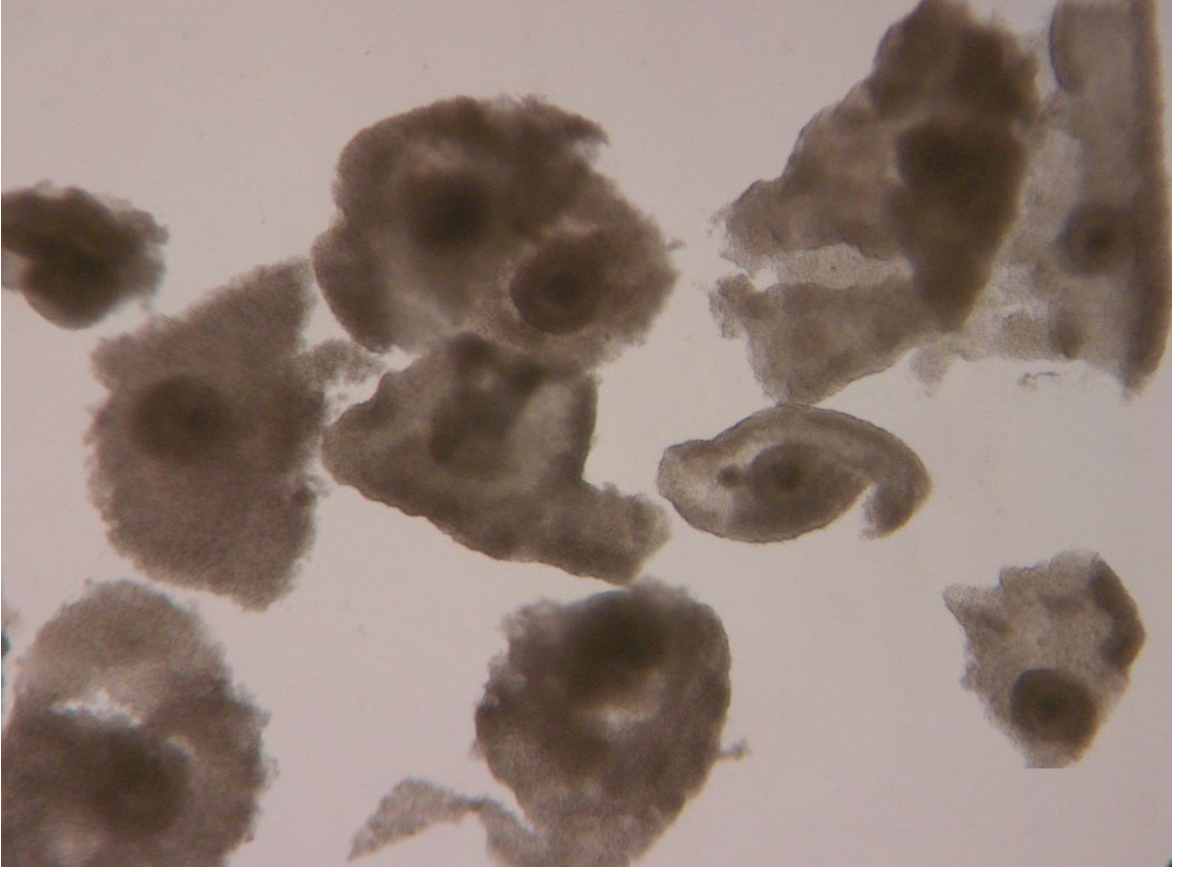
Şekil-9. PBS'e Aktarılması



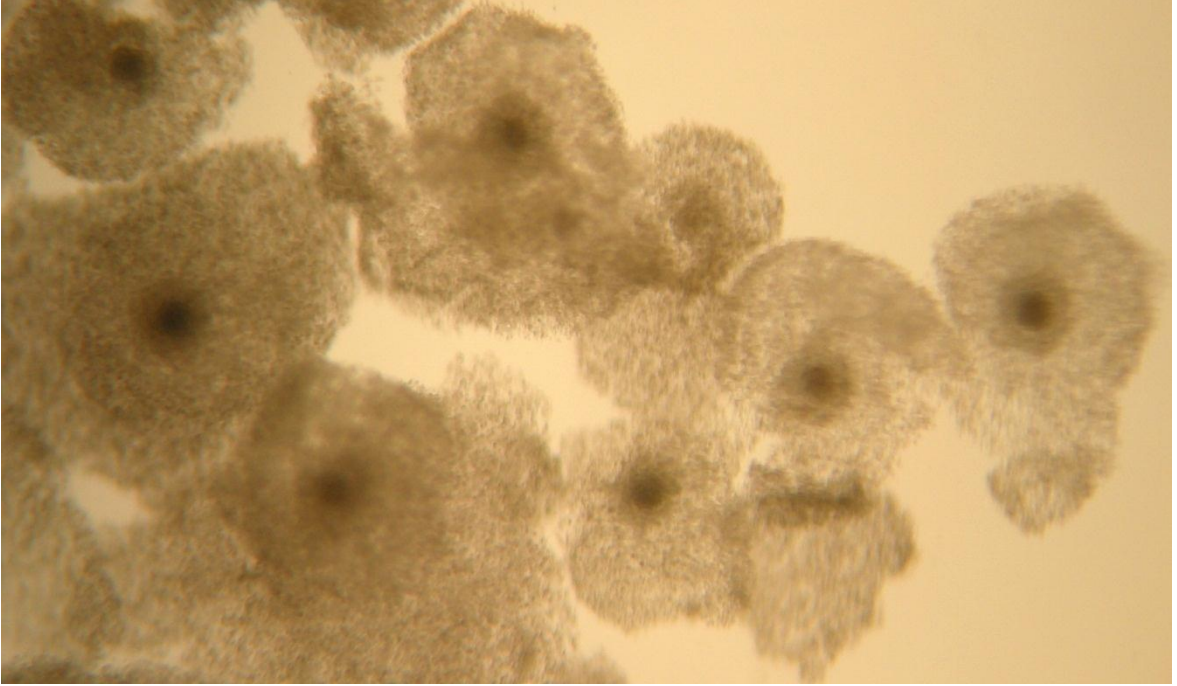
Şekil-10. Slicing Öncesi Su Banyosundaki Ovaryumlar



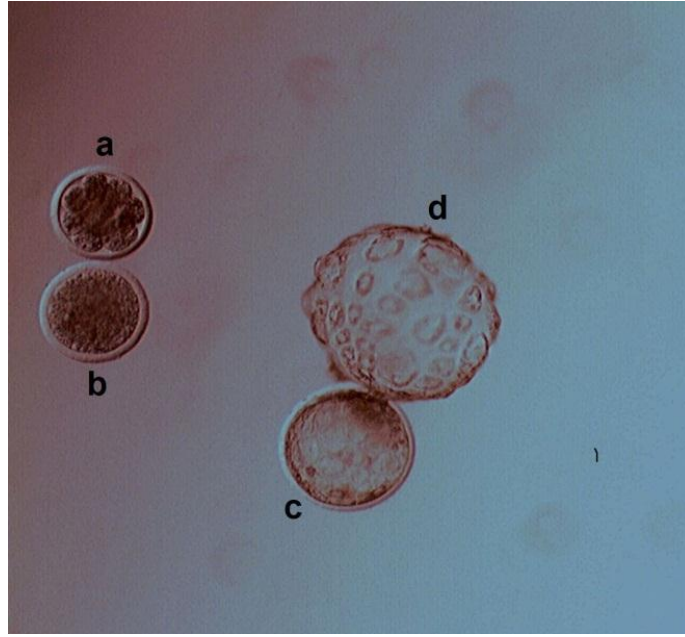
Şekil-11. İnkübatördeki Medyum Görüntüsü



Şekil-12. Slicing Sonrası Seçilmiş Oositlerin Görüntüsü



Şekil-13. Mature Olmuş Oositlerin Görüntüsü

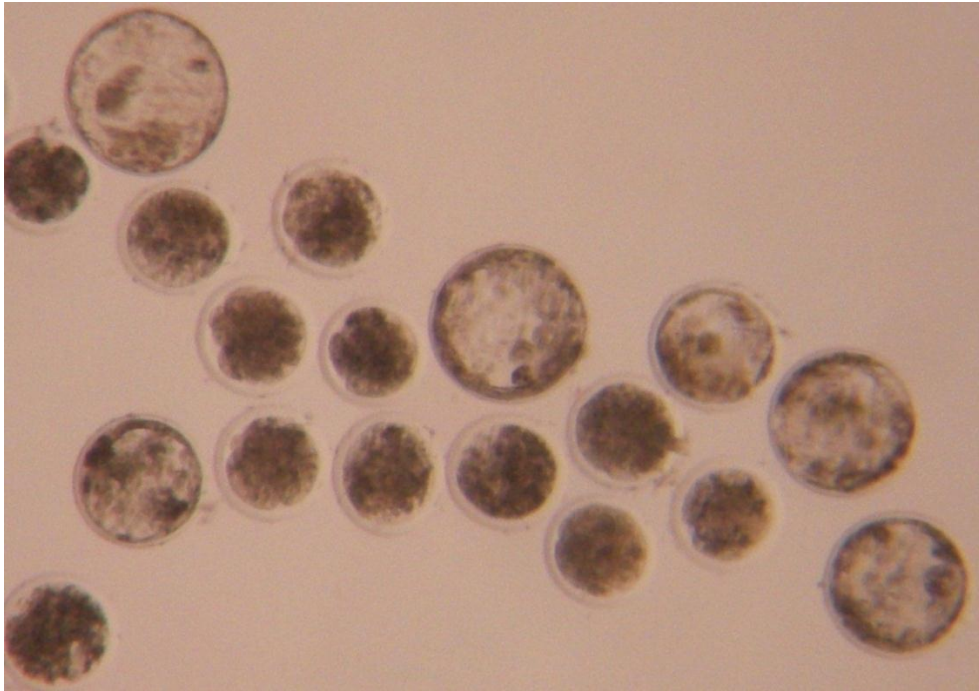


Şekil-14. Kültürün 7. Günü Farklı Aşamalardaki Embriyolar

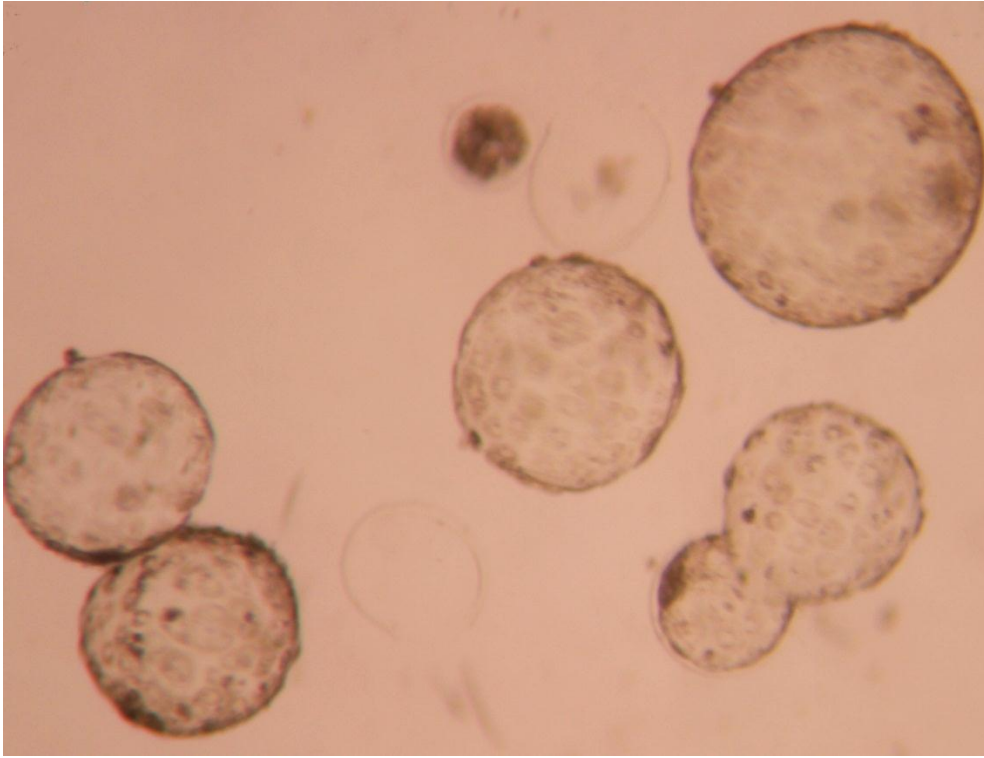
a- 8-16 Blastomerli Embriyo, b- Kompakt Morula,

c- Genişlemiş (Expanded) Blastosist,

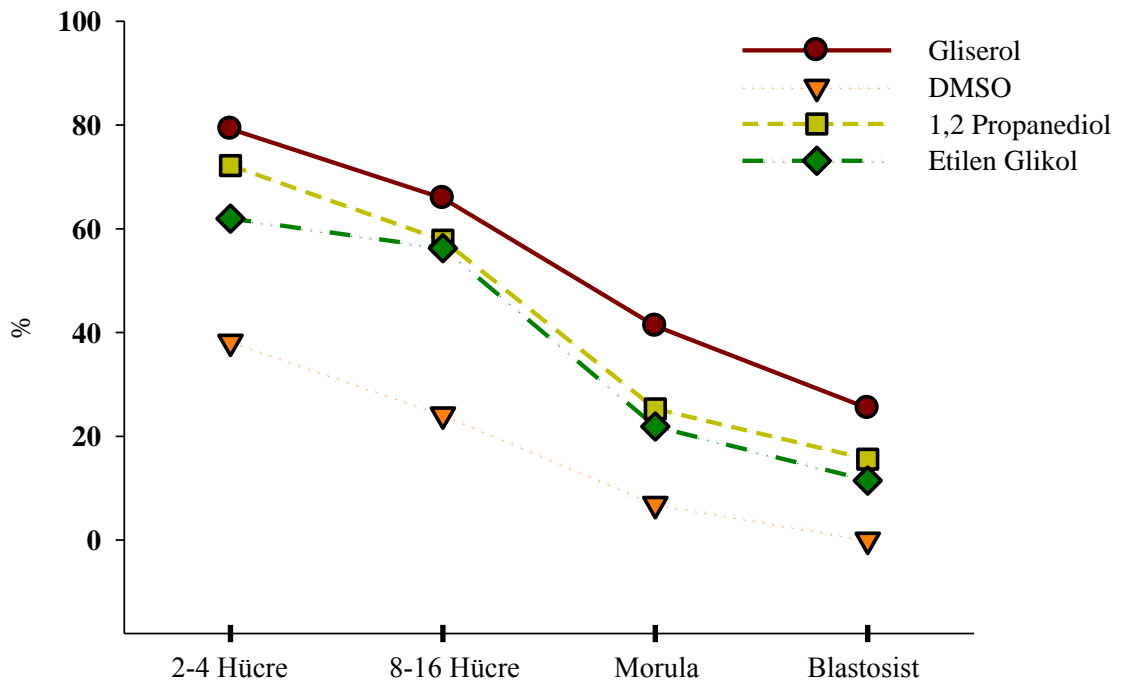
d- Zonasından Çıkmış (Hatched) Blastosist



Şekil-15. Kültürün 7. Günü Expanding Blastosist



Şekil-16. Kültürün 8. Günü Zonadan Çıkmış (Hatched) Blastosist



Şekil-17. Grupların Embriyo *İn Vitro* Fertilizasyon Yüzdeleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Biyoteknolojik yöntemler kullanarak hayvan ıslahını hızlandırmak ve hayvanların verim düzeylerini artırmak mümkün görülmektedir. Hayvan üreme biyoteknolojisinde spermanın dondurulması, *in vitro* fertilizasyon ile embriyo üretimi ve spermanın fertilizasyon yeteneğinin değerlendirilmesi, suni tohumlama yoluyla dişi hayvanların gebe bırakılması önemli yer tutmaktadır. Bu nedenle IVF ve suni tohumlamanın entansif küçükbaş hayvan üretimi ve yetiştiriciliğinde önemli bir yere sahip olmasının yanında, elde edilecek başarıda spermanın dondurulması önem kazanmıştır.

Alınan spermanın kalitesi; soğutma, dondurma ve eritme sonrası fertilizasyon yeteneğini etkilemektedir (13, 69). Sperması alınan hayvanın sağlık durumu, sperma alma yöntemi ve sıklığı ile sperma alma işlemi sırasında yapılan uygulamalar da eritme sonrası sperma kalitesini etkilemektedir (9, 17, 26). Elektroejakülasyon yöntemi ile alınan koç spermasının motilitesinin ortalama %80 olduğu bildirilmiştir (29). Ejakülasyon ile birlikte spermanın toplama kadehine teması, kadehe aktarılması, kadehin sıcaklığı ve temizliği, gün ışığı, numune alınması gibi zaman ve yapılan her türlü uygulama sperma kalitesini etkilemektedir (9, 17). Sunulan çalışmada, 2–4 yaşlı 5 baş Kıvrıcık ırkı koçtan elektroejakülasyon yöntemi kullanılarak sperma alındı. Alınan ejakulatların muayeneleri gerçekleştirilerek en az +++ mass aktivite, 0,3 ml hacim, %75 motilite, $1,5 \times 10^9$ spermatozoa/ml özelliğine sahip ejakulatlar pooling yapılarak çalışmada kullanıldı. Pooling yapılan spermada motilite, HOST, akrozomal bozukluk ve DMB oranlarına ait ortalama spermatolojik değerler sırasıyla %77,0, %89,6, %6,4 ve %1,6 olarak bulundu. Pooling sonrası spermatolojik özellikleri, kullanılan ejakulatların başlangıç kalitesi etkilemektedir. %70 ve üzerinde motilitesi olan ejakulat örneklerini pooling yapan Soylu ve arkadaşları (69) pooling sonrası motilite, akrozomal bozukluk ve DMB oranlarının sırasıyla %72,2, %9,4 ve %2,6 olduğunu bildirmişlerdir. Kıvrıcık ve İvesi ırkı koçlardan üreme sezonu içinde alınan spermanın benzer özelliklere sahip olduğunu bildiren Alcay ve arkadaşları (170) Kıvrıcık ırkı koçların ejakulatlarını bireysel olarak değerlendirdikleri çalışmada, ortalama motilite, HOST ve akrozomal bozukluk oranlarını sırasıyla %73, %74 ve %13 olarak saptadıklarını bildirmişlerdir.

Spermanın testis dokusu içinde üretimi, taşınması ve ejakülasyonu sırasında, ayrıca sulandırma, dondurma ve çözündürme işlemleri aşamalarında hücrede işlev kaybı şekillenmektedir (171, 172). Bu kaybı minimize etmek için spermanın uygun sulandırıcılar ile sulandırılması gerekmektedir (9). Spermanın sulandırılması ve dondurulması amacıyla içinde farklı kriyoprotektif madde bulunan sulandırıcılar geliştirilmiştir (13, 69). Spermanın

30°C sıcaklıkta sulandırma sonrası spermatolojik özellikleri pooling sonrası özelliklerle karşılaştırıldığında sulandırma işleminin spermatolojik özellikleri olumsuz etkilediği fakat istatistiksel fark olmadığı bildirilmiştir (94, 173). Çalışmada, sulandırılmış spermmanın spermatolojik bulgularının, pooling sonrası elde edilen bulgulardan daha düşük olduğu saptandı ($P>0.05$). Bu etkinin sulandırıcı içeriği, sulandırma sıcaklığı ve geçen zamandan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Memeli spermasının dondurulması, hayvancılık sektöründe özellikle genetik değerlendirme ve seleksiyon programlarının yürütülmesinde çok sayıda avantaj sağlamaktadır (9, 17). Çoğu memelilerde olduğu gibi, donmuş koç sperması ile yapılan tohumlamalardan elde edilen fertilité sonuçları, taze sperma ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür (13). Soğutma, dondurma ve eritme işlemleri diğer memeliler gibi koç spermasının morfolojisini, biyokimyasını ve işlevini olumsuz yönde etkiler (13). Soğutma/dondurma prosedüründen kaynaklanan fiziksel ve kimyasal stres nedeniyle; koşullar ne kadar optimize edilirse edilsin sperma başlangıç motilitesinin %20-70'ini kaybeder (103). Ortamın soğutulması sırasında açığa çıkan ozmotik basınç ve serbest oksijen parçacıkları bu kayba neden olan faktörlerdendir (174). Bu çalışmada 30°C sıcaklıkta sulandırılan sperma 5°C sıcaklığa düşürüldüğünde motilitenin ($P>0.05$), plazma ($P>0.05$) ve akrozomal ($P<0.05$) membran bütünlüğünün düştüğü görüldü. Ak ve arkadaşlarının (70) farklı sulandırma, soğutma hızı ve sulandırma oranının koç spermasının eritme sonrası özelliklerini belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, spermmanın 30°C sıcaklıktan 5°C sıcaklığa soğutma hızının ekilibrasyon sonrası motilite ($P<0.01$) ve toplam morfolojik bozukluk oranına ($P<0.01$) olumsuz etkisi olduğu bildirilmiştir.

Hücre içine girebilen kriyoprotektanlar kullanıldığında hücre içi ve dışındaki denge eşitlenene kadar madde alışverişi devam eder. Hücre içine giremeyen kriyoprotektanlarda ise hücre içinden dış ortama ozmotik basınçlar eşitlenene kadar su çıkışı şekillenir. Bu işlemin gerçekleşme hızı hücrenin metabolizma hızı (9) ve kullanılan kriyoprotektanın hücre içine geçme yeteneği ile ilgilidir (175). Her ne kadar 5°C sıcaklıkta spermaya kriyoprotektan madde içeren sulandırıcı katılsa da bu madde alışverişi kaçınılmazdır (9). Bu olaylar zinciri sırasında hücrede şişme, büzülme vb yapısal değişiklikler şekillenir (9, 17).

Spermaya katılan kriyoprotektanların olumsuz etkilerinin engellemesi için, iki aşamalı sulandırma tekniği koç spermasının dondurulması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (9, 32). Bu teknikte, sperma 30°C sıcaklıkta içinde kriyoprotektan bulunmayan sulandırıcılar ile sulandırıldıktan sonra aşamalı olarak 5°C sıcaklığa düşürülüp, metabolizması yavaşlatılarak

bu sıcaklıkta kriyoprotektan madde bulunan sulandırıcı ile aşamalı bir şekilde sulandırılır (9, 17). Ak ve arkadaşları (70) yaptıkları bir çalışmada, spermanın 30°C sıcaklıkta gliserol içeren sulandırıcı ile sulandırılmasının 5°C sıcaklıkta sulandırmaya göre daha başarısız olduğunu bu nedenle kriyoprotektan içeren sulandırıcının 5°C sıcaklıkta eklenmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Memeli spermasını dondurma sırasında, soğuk ortamın olumsuz etkilerinden korumak amacıyla (polietilen glikol, ficoll 70, BSA, dekstran, mannitol ve polivilinil prolidonmakromol gibi) non permeable (gliserol, etilen glikol, 1,2 propanediol, DMSO, methanol, asetamid, adenitol, perseitol, metil formamide gibi) ve permeable çok sayıda farklı etkiye sahip kriyoprotektanlar tek başına veya farklı kombinasyonlarda kullanılmıştır (13, 69, 85, 104). Ayrıca hızlı soğutma esnasında şekillenen mekanik basıncı azaltarak hücreyi yapısal deformasyonlardan korumak amacıyla (92) glikoz, sükroz, trehaloz ve raffinoz gibi sakkaritlerin farklı konsantrasyonları da kullanılmaktadır (13, 69). Sunulan çalışmada koç sperması 5°C sıcaklıkta içinde %6 oranında gliserol, DMSO, 1,2 propanediol, etilen glikol, bulunan sulandırıcılarla sulandırılıp 2 saat ekilibrasyona bırakıldıktan sonra yapılan değerlendirmede, gliserolün motiliteyi daha iyi koruduğu saptandı ($P<0.05$). DMSO içeren gruptaki plazma membran fonksiyon bütünlüğünün diğer gruplara göre daha fazla etkilendiği gözlemlendi.

Kullanılan kriyoprotektanın moleküler ağırlığı hücre içine geçebilme yeteneğini belirler. Çalışmada kullanılan kriyoprotektanları moleküler ağırlıkları ve hücre içine geçebilme hızı bakımından etilen glikol (62,07 g/mol), 1,2 propanediol (76,09 g/mol), DMSO (78,13 g/mol) ve gliserol (92,09 g/mol) olarak sıralayabiliriz. Gliserolün koruyucu etkisindeki başarı hücre içine daha yavaş geçişi ile açıklanabilir. Kriyoprotektanların hücre içine geçiş yetenekleri türler arası farklılık gösterebilir. DMSO domuz sperması için çok toksik iken impala ve fil sperması için daha az toksiktir (176). Gliserol, DMSO, 1,2 porpanediol ve etilen glikol içeren sulandırıcılarla sulandırılan arı spermasında ekilibrasyon sonrası aşamada kullanılan kriyoprotektanların motilite üzerindeki koruyucu etkisinin benzer olduğu bildirilmiştir (124).

Plazma membran fonksiyon bütünlüğü ile akrozom bozukluğu arasında negatif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (139). Gimza boyama sonrası elde edilen akrozomal bozukluk oranının, en yüksek DMSO içeren grupta olduğu ve DMSO grubu ile 1,2 propanediol ve etilen glikol grupları arasında istatistiksel fark olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). Akrozomal bozukluk oranındaki farklılığın kullanılan kriyoprotektanların hücre içine penetrasyon yeteneklerindeki farklılıktan ileri geldiği düşünülebilir. Ekilibrasyon sonrası aşamada kullanılan kriyoprotektan maddelerinin DMB oranlarını etkilemediği saptandı ($P<0.05$).

Sunulan çalışmada spermanın 5°C sıcaklıkta içinde kriyoprotektan bulunan sulandırıcı ile sulandırılıp 2 saat ekilibrayon işleminin uygulanmasının spermatolojik özellikleri olumsuz etkilediği saptandı. Bu olumsuz etki sulandırma, kriyoprotektan madde, zaman ve soğuk ortamın etkilerinden ileri gelmektedir. Farklı ozmotik basınca sahip sulandırıcılarla sulandırılan koç spermasında gliserol içeren grupta motilitenin 1,2 propanediol içeren gruba göre daha yüksek, akrozomal bozukluk oranının ise daha düşük olduğu bildirilmiştir (69).

Fertilite, fertilizasyon bölgesine ulaşan motil spermatozoa sayısı ve bu spermatozoanın dışı genital kanalda canlı kalma süresi ile doğru orantılıdır (33). Dondurma eritme işleminin sperma motilitesi (12, 14, 108, 125), akrozomal bütünlüğü (12, 14, 108, 125), plazma membran bütünlüğü (1, 12) ve DNA bütünlüğü (13) üzerine negatif etkisi vardır. Koç sperması diğer çiftlik hayvanları ile karşılaştırıldığında dondurmaya karşı en duyarlı olanıdır (80, 84, 125). Dondurma eritme aşamalarında hücre içeriğinin değişimi ve membranda şekillenen bozukluklar (177), gerekli enerji kaynaklarının değişimi ve aksonemmada şekillen farklılıklar (178) sonucu sperma motilitesi kaybolur. Sunulan çalışmada ekilibrayon sonrası bulgular ile eritme sonrası bulgular karşılaştırıldığında, tüm gruplarda dondurma eritme işleminin motiliteyi ($P<0.01$), akrozomal bütünlüğü ($P<0.01$), plazma membran fonksiyonel bütünlüğü ($P<0.01$) ve diğer morfolojik bütünlüğü ($P<0.05$) olumsuz etkilediği saptandı. Sulandırıcı bileşenleri ve kullanılan kriyoprotektan çeşidi eritme sonrası sperma kalitesi üzerine etkilidir (13, 69, 85). Kriyoprotektanların dondurma sonrası memeli spermasını, dondurmanın zararlı etkilerine karşı koruduğu belirtilmiştir (12, 108, 112, 125, 126). Sperma dondurma amacıyla kullanılan bu kriyoprotektanların koruyucu etkileri tür spesifiktir (179). Gliserol sperma dondurmada kullanılan ilk ve en yaygın kriyoprotektanlardandır (15, 169). Ancak gliserolün, sperma fertilizasyon kapasitesini ve kalitesini düşürdüğü bildirilmiştir (108, 112, 125). Sunulan çalışmada kullanılan kriyoprotektanların eritme sonrası sperma motilitesi üzerine farklı düzeyde koruyucu etki gösterdikleri gözlemlendi. Farklı ozmotik basınca sahip sulandırıcılarla dondurulan koç spermasında gliserolün 1,2 propanediol göre motiliteyi daha iyi koruduğu bildirilmiştir (69). Gliserol ve 1,2 propanediol içeren sulandırıcı ile dondurulan koç spermasında eritme sonrası sırasıyla %51,2, %35 motilite saptandığı bildirilmiştir (13). Sunulan çalışmada, gliserol içeren grubun diğer gruplardan istatistiksel olarak üstün olduğu saptandı ($P<0.05$). 1,2 propanediol ve etilen glikol içeren gruplarda saptanan eritme sonrası motilite değerleri birbirine benzer bulunurken, en düşük motilite değeri ise DMSO grubunda saptandı ($P<0.05$). Molinia ve arkadaşları (104) beş farklı konsantrasyonda (%0, %1,5, %3, %6, %12) gliserol, DMSO, etilen glikol ve 1,2 propanediol içeren sulandırıcılarla

dondurdukları koç spermasında eritme sonrası gliserol ve etilen glikol gruplarında motilite oranlarını, DMSO ve 1,2 propanediol gruplarından yüksek bulmuşlardır. Etilen glikol konsantrasyonunun yükseltilmesinin eritme sonrası motilite oranını düşürdüğünü bildiren Silva ve arkadaşları (85) %5 gliserol ve %3-5 etilen glikol gruplarında eritme sonrası motilite oranlarını sırasıyla % 53,1 ve % 53,4- 49,4 saptamışlardır. %6 oranında etilen glikol kullandığımız bu çalışmada elde edilen eritme sonrası motilite değeri, Silva ve arkadaşlarının bulunduğu değerlerden daha düşük olarak saptandı.

Plazma membran ve akrozom bütünlüğü hasarları, dondurma sırasında oluşan soğuk ortam ve ozmotik değişiklikler, hücre zarında morfolojik bozukluklara ve lipid bileşenlerinin kompozisyonunun farklılaşmasına neden olur (180). Plazma membran fonksiyon bütünlüğü spermanın dış ortamlarla madde alışverişinin fizyolojik olarak işlevsel olduğunun bir göstergesidir (133). Motilite ile plazma membran fonksiyonel bütünlüğü arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır (13). Sunulan çalışmada da plazma membran fonksiyonel bütünlüğü, motilitesi yüksek olan gliserol grubunda saptandı ($P<0.05$). Hücre içine giriş hızı daha yüksek olan diğer kriyoprotektanların plazma membran fonksiyon bütünlüğü üzerine olan zararlı etkileri daha yüksek bulundu. 1,2 propanediol ve etilen glikol içeren gruplarda saptanan eritme sonrası HOST değerleri birbirine benzer bulunurken, en düşük HOST oranı ise DMSO grubunda elde edildi ($P<0.05$).

Fertilizasyonda önemli rol oynaması bakımından morfolojik incelemelerde akrozomun ayrı bir önemi vardır. Memeli spermasının yaşlanmasına veya dondurma eritme işlemlerinden kaynaklanan zararlı etkilere bağlı olarak apikal bölgede bulunan akrozomal enzimleri içeren yapıların bozulmasına bağlı olarak fertilitate kaybı oluşabilmektedir (9). Arzu edilen oranda fertilitate elde etmek için motilitenin tek başına yeterli olmadığı, bunun yanında hyaluronidase, corona penetreting enzyme, neuraminidase ve tripsin gibi fertilizasyonda etkin rol oynayan enzimleri içeren akrozomal yapının bütünlüğünün bozulmamış olması gerektiği bildirilmektedir (9, 17). Dondurma eritme işleminin, erken kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonunu indüklediği bildirilmiştir (17). Akrozomal bütünlüğü değerlendirmek için ışık, faz kontrast, floresan mikroskopi yanında flow sitometri gibi çok sayıda teknik ve yöntem geliştirilmiştir (13, 69, 173). Flow sitometri yönteminde, akrozoma spesifik floresan boyalarla objektif olarak, kısa süre içinde çok sayıda spermatozoon değerlendirilir (173). FITC-PSA ve Gimza boyama yöntemi gibi mikroskopi tekniğine dayalı yöntemlerde ise değerlendirilen spermatozoa sayısının daha az olması ve subjektif bir değerlendirmenin yapılması sonuçları oldukça etkilemektedir (173). Çalışmamızda akrozomal bütünlük

dondurma çözdürme sürecinden olumsuz bir biçimde etkilenmiştir. Eritme sonrası akrozomal bozukluk oranları; sulandırma sonrası, 5°C ve ekilibrasyon sonrası bozukluk oranlarından daha yüksek saptanmıştır ($P<0.001$).

Eritme sonrası aşamada Gimza sonuçlarını desteklemek amacıyla kullanılan FITC-PSA sonrası genel olarak daha yüksek oranda akrozomal bozukluk tespit edildi ($P<0.05$). Bu farklılığın kullanılan yöntemin farklılığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. FITC-PSA boyama yönteminde spermanın santrifüj ediliyor olması da akrozomal bozukluğun yükselmesinde etkili olabilir (181). Nur ve arkadaşları (13) farklı kriyoprotektanları kullanarak dondurdukları koç spermasında FITC-PSA yöntemi ile elde edilen eritme sonrası akrozomal bozukluk oranının %53-59 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Her iki FITC-PSA ve Gimza yönteminde elde edilen akrozomal bozukluk bakımından, 1,2 propanediol ve etilen glikol içeren gruplarının gliserol ve DMSO gruplarına göre daha üstün olduğu saptandı ($P<0.05$).

Koç spermasyonu ile yapılan çoğu çalışmada eritme sonrası akrozomal bozukluk oranları %45-65 arasında bulunmuştur. (13, 80, 84, 69). Sunulan çalışmada gliserol ve 1,2 propanediol gruplarında gimza boyama sonrası elde edilen akrozomal bozukluk oranları, Soylu ve arkadaşlarının (69) farklı ozmotik basınca sahip sulandırıcılarla dondurdukları koç spermasından elde ettikleri akrozomal bozukluk oranından yüksek bulunmuştur. FITC-PSA boyama yöntemi ile elde edilen akrozomal bozukluk oranı, Nur ve arkadaşlarının (13) başlangıç motilitesi için en az %70 ve üzeri motiliteye sahip ejakülatları kullanarak yapmış oldukları çalışmada bildirdikleri değerden daha düşük olduğu görülmüştür. Bu farklılığın başlangıçta kullanılan sperma kalitesindeki farktan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Silva ve arkadaşları (85)'nin %5 gliserol ve %3-5 etilen glikol gruplarında bildirdiği akrozomal bozukluk oranlarından ise yüksek bulunmuştur. Bir spermatozoada birden çok morfolojik bozukluk görülebilir. Morfolojik bozukluklar değerlendirilirken spermanın ön uç kısmına yakın olanı kaydedilir (9). Dondurma sonrası aşamada DMB bakımından gruplar arası istatistiksel fark gözlemlenmedi ($P>0.05$). Bu durum öncelikli olan akrozomal bozukluk oranının eritme sonrası aşamada yüksek oluşu ile açıklanabilir.

Fertilitenin büyük bir kısmı annenin sağlığı ile ilintilidir. Oositin üretimi, fertilizasyonu, embriyonun implantasyonu ve fötusun gelişimi doğrudan annenin sağlığı ile ilişkilidir (33). Günümüzde, bireyin fertilitate yeteneği ile ilgili bilgi edinebilmek için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Ancak, bu yöntemlerin hiçbiri bireyin fertilitate yeteneğini kesin bir biçimde

ortaya koyamamaktadır. Bu yöntemler, kendi içinde doğrudan gebelik sonuçlarına bakarak bireyin fertilitite yeteneğinin tahmini ve gebelik oranı ile ilgili parametrelere bakarak fertilitite yeteneğinin tahmini olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir (33). Sperma üretim merkezlerinde yoğunluk, motilite, morfoloji ve viabilite gibi test sonuçlarına bakılarak ejakülatın fertilitite yeteneği değerlendirilmektedir. Bu teknikler bireyden kaynaklanan infertiliyi göstermek için önemli bilgiler versede, ejakulat kalitesi fizyolojik sınırlar içinde olan bireylerde karşılaşılan infertilitiyi betimlemede yetersiz olmaktadır. Fertilizasyon için morfolojik ve fonksiyon bakımından sağlam spermatozoaya gereksinim bulunmaktadır (27, 28). Fertilizasyon; kapasitasyon, hiperaktivasyon, akrozom reaksiyonu, zona pellusidaya bağlanması ve oosite penetre olabilme yeteneği gibi sperma ve oosit etkileşimini kapsayan olaylar zinciridir. Bu amaçla HOS test, sperm-zona bağlanma testi ve IVF gibi testler kullanılmaktadır (17). Ülkemizde koyun oositlerinin *in vitro* maturasyonu, *in vitro* fertilizasyonu ve *in vitro* kültürü ile ilgili çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiş ve canlı yavru elde edilmiştir (3). Bu çalışmalar, çoğu taze veya dondurulmuş koç sperması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. IVF amacıyla kullanılan oosit kalitesi erken embriyonik gelişim, gebeliğin oluşması ve devamı üzerine etkilidir. Oositin elde edildiği folliküler gelişim evresi, oositin kalitesi ve gelişim yeteneğini belirler (144). Sunulan çalışmada her bir grupta 150' den fazla mature olmuş oosit kullanılarak yapılan *in vitro* fertilizasyon sonrası elde edilen bölünme oranlarını gliserol, 1,2 propanediol, etilen glikol ve DMSO olarak yüksekte düşüğe sıralayabiliriz. DMSO içeren grubun fertilizasyon sonuçlarının düşük olduğu saptandı ($P<0.05$). Taze sperma kullanılarak yapılan IVF çalışmalarında %62 (28), %76 (3), %88 (149) ve %94 (70) bölünme oranı bildirilmiştir. Wani (145) kauda epididimisten aldıkları spermayla yaptığı çalışmada %49,5- 52,7 bölünme oranları bulmuştur. Farklı yöntemlerle dondurulmuş koç sperması kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda; Ustuner ve arkadaşları (95) %6 gliserol içeren lesitinli ve yumurta sarılı sulandırıcılarla %28,5- 85,5, Romão ve arkadaşları (182) %48 ve %45,1 bölünme oranları saptadıklarını belirtmişlerdir. O'meara ve arkadaşları (141) dondurulmuş koç sperması kullanarak sperma dozlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında IVF amacıyla kullanılan spermatozoa konsantrasyonunun artırılması ile fertilizasyon oranının arttığını, yaptıkları çalışmada %40,2- 79,7 arasında bölünme oranları saptadıklarını bildirmişlerdir. Donmuş sperma kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmada %38 ile %79 oranları arasında bölünme elde edilmiştir. Gliserol, 1,2 propanediol ve etilen glikol içeren sulandırıcılarla elde edilen bölünme oranı taze sperma ile kıyaslanabilecek düzeyde olduğu görülmüştür.

Sperma kalitesi, fertilizasyon oranı ve fertilizasyon sonrası embriyonik gelişim üzerine etkilidir. IVF sonrası bölünme oranı ile koçun fertilité yeteneği arasında da yüksek düzeyde korelasyon bulunmaktadır (141). Eritme sonrası aşamada en kötü spermatolojik özellikler DMSO içeren grupta elde edilmiştir. Buna paralel olarak DMSO içeren grupta en düşük bölünme ve en kötü embriyonik gelişme oranı gözlemlendi ($P<0.05$). 8-16 hücreli embriyo sayısı bakımından, eritme sonrası kabul edilebilir düzeyde motilite elde edilen; gliserol, 1,2 propanediol ve etilen glikol gruplarında benzer oranlar olduğu saptandı ($P>0.05$). %46 oranında motiliteye sahip sperma ile yapılan IVF sonrası %69 oranında 8-16 hücreli embriyo elde edildiği, daha düşük oranda motiliteye (%29-34) sahip diğer gruplarda ise %11 ila %17 oranlarında 8-16 hücreli embriyo bildirilmiştir (95). Ak ve arkadaşları (70) eritme sonrası %50 motiliteye sahip olan grupta %20, %36 motiliteye sahip olan grupta %11, taze sperma kullandıkları grupta ise %28 8-16 hücreli embriyo oranları bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada eritme sonrası sperm kalitesinin embriyonik gelişim üzerine etkili olduğu gözlemlendi. Ayrıca 8-16 hücreli embriyo oranlarının, gliserol grubunda %66, 1,2 propanediol grubunda %58, etilen glikol grubunda %56 ve DMSO grubunda %24 olduğu görüldü.

İn vitro fertilizasyon aşamaları uygulandıktan sonra bölünmüş olan embriyoların morula ve blastosist dönemine ulaşma oranları günümüzde halen istenilen düzeyde değildir (149). IVM sonrası embriyonik gelişim oranını IVF ve IVM koşulları belirler (141). Fertilizasyonda etkin rol oynayan spermatozoa ve oosit kalitesi de embriyonik gelişim üzerine etkilidir. Fertilize olmuş her oosit embriyonik gelişimin ileri aşamaları olan morula ve blastosist aşamalarına ulaşamaz. Koyunlarda fertilize olmuş oositlerin %2 ile %54 (70) oranında morula aşamasına, %0 (95) ve %43 (182) oranında blastosist aşamasına ulaşabildiklerini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Sunulan çalışmada morula aşamasına ulaşan oosit oranı bakımından gliserol içeren grubun (%41) diğer gruplara göre daha üstün olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). 1,2 propanediol (%26) ve etilen glikol (%22) içeren gruplarda elde edilen morula oranı birbirine benzer bulundu. En düşük morula oranı ise DMSO içeren grupta (%7) elde edildi ($P<0.05$).

İn vitro fertilizasyon sonucunda elde edilen embriyoların blastosist dönemine ulaşma oranları, daha ileri yaşama ve yavru oluşturma kabiliyetlerinin bir göstergesidir (149). Blastosist aşamasına ulaşan embriyo sayısı bakımından, gliserol içeren grubun en iyi olduğu gözlemlendi. DMSO içeren grupta ise, hiçbir embriyonun blastosist aşamasına ulaşmadığı saptandı ($P<0.05$). Sunulan çalışmada elde edilen blastosist oranları diğer birçok araştırmacı (2, 3, 28, 105, 149) tarafından bildirilen blastosist oranları ile benzerlik gösterirken, Ustuner ve

arkadaşlarının (95) bildirdikleri blastosist oranlarından (%0-4.03) oldukça yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak;

- Koç sperma sulandırıcılarına %6 oranında katılan gliserol, DMSO, 1,2 propanediol ve etilen glikolün farklı düzeylerde kriyoprotektif etki gösterdiği,
- Gliserolün 1,2 propanediol, DMSO ve etilen glikole göre eritme sonrası motiliteyi ve plazma membran fonksiyonel bütünlüğünü daha iyi koruduğu,
- 1,2 propanediol ve etilen glikol gruplarının, gliserol ve DMSO gruplarına göre akrozomal bütünlüğü daha iyi koruduğu,
- FITC-PSA sonrası elde edilen akrozomal bozukluk oranının gimza sonuçlarına göre daha yüksek olduğu,
- Gimza sonrası elde edilen akrozomal bozukluk oranı yüksek olan gruplarda genellikle FITC-PSA boyamada da akrozomal bozuklukların yüksek çıktığı,
- Eritme sonrası yüksek oranda motilite ve fonksiyon bakımından sağlam hücre zarına sahip spermadan daha yüksek oranda fertilizasyon ve blastosist oranı elde edildiği,
- Eritme sonrası %40 ve üzerinde motiliteye sahip sperma kullanılarak yapılan IVF sonrası taze spermaya benzer düzeyde bölünme oranı elde edilebildiği saptandı.

KAYNAKLAR

1. BYRD SR, FLORES-FOXWORTH G, APPLEWHITE AA, WESTHUSIN ME. *In vitro* maturation of ovine oocytes in a portable incubator. *Theriogenology*, 47: 857-864, 1997.
2. SEVILLANO C, ANEL L, DE LAFUENTE J, ALVAREZ M, CELORRİO I, DE PAZ P, BOİXO JC, OLMEDO JA. *In vitro* development of sheep embryos derived of repeated laparoscopic folliculoaspiration. *Theriogenology*, 47: 298, 1997.
3. BİRLER S, PABUÇÇUOĞLU S, ATALLA H, ALKAN S, ÖZDAŞ ÖB, BACINOĞLU S, CİRİT Ü, ZAVAR İ. *In Vitro* Üretilen Koyun Embriyolarının Transferi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 26: 1421-1426, 2002.
4. TÜİK, Hayvansal Üretim İstatistikleri, 2011.
5. KAYMAKÇI M, SÖNMEZ R. Koyun yetiştiriciliği, 3, Hasad Yayıncılık, İstanbul, 1992.
6. ŞEKERDEN Ö. Hayvan Islahının Genetik Esasları, Ofset Matbaacılık, Antakya, 2001.
7. MAXWELL WMC, WATSON PF. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 42: 55-65, 1996.
8. ÇOYAN K, AKSOYM, TEKELİ, T, AYAR A, ATAMAN M. Laparoskopi yardımı ile koyunların donmuş sperma kullanarak intrauterin tohumlanması. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 2: 15-17, 1992.
9. İLERİ İK, AK K, PABUÇÇUOĞLU S, BİRLER S. Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama, *Ders Notu*, 59, sayfa 75-90, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, İstanbul, 2000.
10. EVANS G, MAXWELL VMC. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, Sydney, page 194, 1987.
11. BEARDEN HJ, FUQUAY JW. Semen collection. Editors: BEARDEN HJ, FUQUAY JW, *Applied animal reproduction*, Prentice-Hall Incorporation, New Jersey, page 147-157, 1997.
12. DE LEEUW FE, DE LEEUW AM, DEN DAAS JHG, COLENBRANDER B, VERKLEIJ AJ. Effect of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30: 32-44, 1993.
13. NUR Z, ZIK B, USTUNER B, SAGIRKAYA H, OZGUDEN CG. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*, 73: 1267-1275, 2010.
14. BUCAK MN, TEKİN N. Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54: 67-72, 2007.
15. GILLAN L, MAXWELL WMC. The functional integrity and the fate of cryopreseved ram spermatazoa in the female tract. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54: 271-283, 1999.
16. BEILBY KH, DE GRAAF SP, GRUPEN CG. The effect of sperm and cryoprotectant concentration on the freezing success of sex sorted ram sperm for *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 74: 786-794, 2010.
17. HAFEZ ESE. *Reproduction in farm animals*, 6th edition, Philadelphia, page 330-343, 405-423, 1993.
18. GORDON I. *Controlled reproduction in sheep and goats*, 2nd edition, CABI Publishing, page 351-359, 1999.
19. YOUNGQUIST RS. *Current therapy in large animal theriogenology*, 1st edition, Philadelphia, page 481-499, 1997.
20. DOGAN I, NUR Z, GUNAY U, SOYLU MK. Semen characteristics during the transition period in Saanen bucks. *Indian Veterinary Journal*, 82: 1080-1082, 2005.

21. PLATZ C, FOLLIS T, DEMOREST N, SEAGER S. Semen Collection, Freezing and Insemination in The Domestic Cat. VII. International Congress Animal Reproduction, Krokow 4: 1053-1056, 1976.
22. DOOLEY MP, PINDEDA MH. Effect of Method of Collection on Seminal Characteristics of The Domestic Cat. American Journal of Veterinary Research, 47: 286-292, 1986.
23. SCHATTEN H, CONSTANTINESCU GM. Comparative reproductive biology, Blackwell Publishing, USA, 5-111, 2007.
24. BEDFOED JM, HOSKINS DD. The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. Editor: Lamming GE, Marshall's Physiology of Reproduction, Churchill Livingstone, Edinburg London Melbourne and New York, page 379-568, 1990.
25. SHARMA RK, SAID T, AGARWAL A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assesing reproductive outcome. Asian Journal of Andrology, 6, 139-148, 2004.
26. KAYA A, AKSOY M, TEKELI T. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. Small Ruminant Research, 44: 153-158, 2002.
27. SONGSASEN N, LEIBO SP. Live mice from cryopreserved embryos derived in vitro with cryopreserved ejaculated spermatozoa. Laboratory Animal Science 48: 275-281, 1998.
28. GOMEZ MC, CATT JW, EVANS G, MAXWELL WM. Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. Theriogenology, 49 (6): 1143-1154, 1998.
29. ÖZTÜRKLER Y, AK K, İLERİ İK. Koç spermasının yoğun gliserollü sulandırıcılarla dondurulması. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 25 (2): 399-414, 1999.
30. MATTNER PE, VOGLMAYR JK. A Comparison of ram semen collected by the artificial vagina and by electroejaculator. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry, 2: 78-81, 1962.
31. AKSOY M, ATAMAN M.B, KARACA F, TEKELİ T. Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'ne ait çeşitli ırklardan koçların spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar. Veteriner Bilimler Dergisi, 10 (1-2): 111-112, 1994.
32. ÇOYAN K. Evcil hayvanlarda dölerme ve suni tohumlama, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ünitesi, Konya, sayfa 15-43, 2002.
33. NUR Z. Spermanın alınması ve muayenesi, saklanması ve eritilmesi. Editör: SOYLU MK, Doğum Bilgisi ve Suni Tohumlama, Anadolu Üniversitesi Yayınları, 18-59, 2014.
34. CHENOWETH PJ, BALL L. Breeding Soundness Evaluation in Bulls. Editor: MORROW DA. Current Therapy in Theriogenology, Diagnosis treatment and vention of reproductive diseases in animals, W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronro, Page 330-339, 1980.
35. AK K. Evcil hayvanlarda reproduksiyon ve suni tohumlama. İ Ü Vet Fak Yayını. Ders Notu no:112 İstanbul pp; 69,76, 102, 196-197, 2000.
36. SOYLU MK. Çeşitli sulandırıcılar ve yöntemler kullanılarak dondurulan koç spermalarının bazı spermatolojik özellikleri üzerine araştırmalar. Doktora Tezi. T.C. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1988.
37. ÖZKOCAA. Lalahan zootekni araştırma enstitüsünde yetiştirilen merinos koçlarının ve Ankara keçisi tekelerinin spermatolojik özellikleri üzerine araştırmalar. LZAED, 5(1-2): 19-25, 1965.
38. GÖKÇEN H, ÇAMAŞ H, ERDİNÇ H, ŞENER E, AŞTI RN, ÇEKGÜL E. Koçlarda rasyona ve spermaya katılan vit E ve selenyumun dondurulmuş spermatozoonların

- akrozom morfolojisi, enzim aktivitesi ve dölverimi üzerine araştırmalar. *Doğa*, 14: 207-218, 1990.
39. AK K, AK S, GUREL A, HASÖKSÜZ M, BARAN A. Koçlarda mycoplasma agalactiae'nin spermatolojik özelliklere deneysel araştırmalar. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 26 (2): 139-155, 1995.
 40. PONTBRIAND D, HOWARD JG, SCHIEVE MC, STUART LD, WILDT DE. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26: 341-354, 1989.
 41. MATHUR AK, SRIVASTAVA RS, JOSHI A, KARLA DB. Pellet freezing of ram semen. *Indian Journal of Animal Sciences*, 59 (12): 1529-1531, 1989.
 42. ÖZKOCAA. Çiftlik Hayvanlarında Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, İstanbul 1984.
 43. YOSHIDA M. Conservation of sperms: Current status and new trends. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 349-355, 2000.
 44. AN TZ, IWAKIRI M, EDASHIGE K, TAKASHI M. Factors affecting the survival of frozen mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 40: 237-249, 2000.
 45. GIL J, LUNDEHEIM N, SODERGUIST L, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, 59: 1241-1255, 2003.
 46. SILVA AR, CARDOSO RCS, UCHOA DC, SILVA LDM. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, 59: 821-829, 2003.
 47. TEKELİ T, ÇOYAN K. İneklerde Sun'i Tohumlama, 2. baskı, Bahçivanlar Basım San. A.Ş. Konya, sayfa 120-154, 1996.
 48. BAHAMONDES L, FAZANO F, DE LUCIO MA, NEVES PA, BOTTOCHER LUIZ F, LORENZETTI GB. Evaluation of human sperm membrane integrity using the water test and the hypoosmotic test. *Andrologia*, 33: 75-77, 2001.
 49. BLACKSHAW AW. Factors effecting the reveal of bull and ram spermatozoa after freezing to -79°C. *The Australian Veterinary Journal*, 31: 238-241, 1995.
 50. KANEKO T, WHITTINGHAM DG, YANAGIMACHI R. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 68: 136-139, 2003.
 51. WAKAYAMA T, YANAGIMACHI R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nature Biotechnology*, 16: 639-641, 1998.
 52. KESKİNTEPE L, PACHOLCZYK G, MACHNICKA A, NORRIS K, CURUK MA, KHAN I, BRACKETT BG. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 67: 409-415, 2002.
 53. HOLT WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53: 47-58, 2000a.
 54. FOOTE RH. The history of artificial insemination: selected notes and notables. *American Society of Animal Science*, 2002.
 55. CURRY MR, KLEINHANS FW, WATSON PF. Measurement of water permeability of the membrane of boar, ram and rabbit spermatozoon using concentration dependent self quenching of an entrapped fluorophore. *Cryobiology*, 41: 167-173, 2000.
 56. AISEN EG, ALVAREZ HL, VENTURINO A, GAEDE JJ. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents, *Theriogenology*, 53: 1053-1061, 2000.
 57. FISER P, AINSWORTH L, FAIRFULL R. Evaluation of a new diluents and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 28: 599-607, 1985.

58. MOLINIA FC, EVANS G, CASARES PI, MAXWELL WMC. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 36, 113-122, 1994.
59. SCHMEIHL MK, VAZQUEZ I, GRAHAM E. The effect of non-penetrating cryoprotectants added to Test-yolk-glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 23: 512-17, 1986.
60. SALAMON S, MAXWELL, WMC. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37: 185-249, 1995.
61. WHOELDERS H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Veterinary Quarterly*, 19: 135-138, 1997.
62. STANIC P, TANDARA M, SONICKIZ, SIMUNIC V, RADAKOVIC B, SUCHANEK E. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 91: 65-70, 2000.
63. SANCHES-PARTIDA LG, MAXWELL WMC, PATEG LG, SETCHELL BP. Proline and glycine betaine in the cryoprotective diluents for ram spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development*, 4: 113-118, 1992.
64. NUR Z, ILERI IK, AK K. Effect of different temperature treatments applied to deep stored bull semen on post-thaw cold shocked spermatozoa. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 50: 79-83, 2006.
65. NUR Z, ZIK B, USTUNER B, TUTUNCU S, SAGIRKAYA H, OZGUDEN C.G, GUNAY U, DOĞAN I. Effects of freezing rate on acrosome and chromatin integrity in ram semen. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 58: 267-272, 2011.
66. USTUNER B, ALCAY S, NUR Z, TOKER MB, SAGIRKAYA H, SOYLU MK. Effect of freezing rate on goat sperm morphology and DNA integrity. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 39: 110-114, 2015.
67. HAMMADEH ME, ASKARI A, GERORG T, ROSENBAUM P, SCHMIDT W. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *International Journal of Andrology*, 22: 155-162, 1999.
68. HAMMADEH ME, DEHN CH, HIPACH M, ZEGINIADOU T, STIEBER M, GEORG T, ROSENBAUM P, SCHMIDT W. Comparison between computerized slow-stage and static liquid nitrogen vapour freezing methods with respect to the deleterious effect on chromatin and morphology of spermatozoa from fertile and subfertile men. *International Journal of Andrology*, 24: 66-72, 2001.
69. SOYLU MK, NUR Z, USTUNER B, DOGAN I, SAGIRKAYA H, GUNAY U, AK K. Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thaw ram semen. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 51: 241-246, 2007.
70. AK K, CIRIT U, NUR Z, BACINOGLU S, PABUCCUOGLU S, OZDAŞ OB, BIRLER S. Effects of extender osmolality, cooling rate, dilution rate and glycerol addition time on post-thaw ram semen characteristics and fertilization. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 36(2), 33-46, 2010.
71. PE'REZ-PE' R, GRASA P, FERNANDEZ-JUAN M, PELEATO ML, CEBRIAN-PE'REZ JA, MUINˆO-BLANCO T. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 61: 226-33, 2002.
72. MORRIS ID, ILOTT S, DIXON L, BRISON DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell electrophoresis (COMET assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction*, 17: 990-998, 2002.

73. MARTIN G, SABIDO O, DURAND P, LEVY R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biology of Reproduction*, 71: 28-37, 2004.
74. BAĞIŞ H, SAĞIRKAYA H. Klonlama. *Journal of Faculty of Veterinary Medicine*, 20: 187-198, 2001.
75. FABROCINI A, DEL SORBO C, FASANO G, SANSONE G. Effect of differential addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of Mediterranean buffalo (*B. Bubalis*) spermatozoa. *Theriogenology*, 54: 193-207, 2000.
76. WATSON PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Reproduction Science*, 60-61: 481-492, 2000.
77. GÖKÇEN H, SOYLU MK, DOĞAN İ. Sıvı azotta dondurulan koç spermasının spermatolojik özellikleri ve değişik yöntemlerle tohumlamada kullanılması üzerine araştırmalar. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 24: 539-544, 2000.
78. TEKİN N, GÜNCEL AR. Koç spermasının değişik sulandırıcılarla dondurulması ve in vitro değerlendirme yöntemleri üzerine araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 33(3): 381-393, 1986.
79. TAŞDEMİR U, KİNİT H, ÖZCAN İ, YURTSEVEN R, TUNCER PB. Farklı sulandırıcılar kullanılarak dondurulmuş çözdürülmüş koç sperması ile laparoskopik intrauterin tohumlama. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 43(1):1-8, 2003.
80. ABDELHAKEM AA, GRAHAM EF, VAZQUEZIA. Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology*, 28: 36-42, 1991a.
81. BYRNE GP, LONERGAN P, WADE M, DUFFY P, DONOVAN A, HANRAHAN JP, BOLAND MP. Effects of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science*, 62: 265-275, 2000.
82. FISER PS, AINSWORTH L, FAIRFULL RW. Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 28: 599-607, 1987.
83. RITAR AJ, BALL PD. The effect of freeze-thaw of goat and sheep at a high density of spermatozoon on cell viability and fertility after insemination. *Animal Reproduction Science*, 31: 249-262, 1993.
84. ABDELHAKEM AA, GRAHAM EF, VAZQUEZ IA, CHALONER KM. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. Development of an extender for freezing: effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars and the method of dilution. *Cryobiology*, 28: 43-49, 1991b.
85. SILVA ECB, CAJUEIRO JFP, SILVA SV, VIDAL AH, SOARES PC, GUERRA MMP. *In vitro* evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide. *Animal Reproduction Science*, 132: 155-158, 2012.
86. WANI AR, KHAN MZ, SOFİ KA, LONE FA, MALIK AA, BHAT FA. Effect of cysteamine and epidermal growth factor (EGF) supplementation in maturation medium on in vitro maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. *Small Ruminant Research*, 106: 160-164, 2012.
87. GIL J, RODRIGUEZ-IRAZOQUI M, LUNDEHEIM N, SODERQUIST L, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, 59 (5-6): 1157-1170, 2003.
88. LEAHY T, EVANS G, MAXWELL WM, MARTI JI. Seminal plasma proteins do not consistently improve fertility after cervical insemination of ewes with non-sorted or sex-sorted frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development* 22 (4): 606-612, 2010.

89. HILL JR, THOMPSON JA, PERKINS NR. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28, 447 Merino ewes under commercial conditions: A survey. *Theriogenology*, 49: 697-709, 1998.
90. MCKELVEY WAC, ROBINSON JJ, AITKEN RP. The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology*, 24: 519-535, 1985.
91. TICIANO GUIMARÃES LEITE TG, do Vale FILHO VR, de ARRUDA RP, de ANDRADE AF, EMERICK LL, ZAFFALON FG, MARTINS JAM, de ANDRADE VJ. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 120: 31-38, 2010.
92. WOELDERS H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Veterinary Quarterly*, 19: 135-138, 1997.
93. SALAMON S. Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods. *Australian Journal of Biological Science*, 21: 355-360, 1968.
94. BACİNOĞLU S, CİRİT Ü, NUR Z, AK K. Eritilmiş koç spermasında farklı gliserol katma tekniklerinin ve soğutma hızının spermatojistik özelliklere etkisi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 33: 11-21, 2007.
95. USTUNER B, ALCAY S, NUR Z, SAGIRKAYA H, SOYLU MK. Effect of Egg Yolk and Soybean Lecithin on Tris-Based Extender in Post-Thaw Ram Semen Quality and *in vitro* Fertility. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20: 393-398, 2014.
96. SALAMON S, MAXWELL WMC. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 77-111, 2000.
97. KARAGIANNIDIS A. The distribution of calcium in bovine spermatozoa and seminal plasma in relation to cold shock. *Journal of Reproduction and Fertility*, 46 (1): 83-90, 1976.
98. DARIN-BENNETT A, WHITE IG. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14 (4): 466-470, 1977.
99. LEIBO SP, BRANDLEY L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. Editor: Gagnon C, *The male gamet*, Cache River Pres, St Louis, 502-515, 1999.
100. POLGE C, SMITH A, PARKES A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666, 1949.
101. LEIBO SP, SONGSASEN N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, 57: 303-326, 2002.
102. MAZUR P. Principles of medical cryobiology: the freezing of living cells, tissues, and organs. *Cell Chemistry and Physiology*, 4: 355-384, 1996.
103. WATSON P F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60: 481-492, 2000.
104. MOLINIA FC, EVANS G, MAXWELL WMC. Incorporation of penetrating cryoprotectants indiluent for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*, 42 (5): 849-858, 1994.
105. VALENTE SS, PEREIRA RM, BAPTISTA MC, MARQUES CC, VASQUES MI, SILVA PEREIRA MVC, HORTA AEM, BARBAS JP. *In vitro* and *in vivo* fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. *Animal Reproduction Science*, 117: 74-77, 2010.
106. TEKIN N, SEÇER S, AKCAY E, BOZKURTY, KAYAM S. Effects of glycerol additions on post-thaw fertility of frozen rainbow trout sperm, with an emphasis on interaction between extender and cryoprotectant. *Journal of Applied Ichthyology*, 23 (1): 60-63, 2007.

107. DURAN N, YARKIN F, ALLAHVERDİYEV AM. Çeşitli Dondurma Yöntemlerinin Hep-2 Ve Tavşan Böbrek Hücrelerinin Kriyoprezervasyonunda Hücre Canlılığına Etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 58: 53-60, 2001.
108. BALL BA, VO A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology*, 22: 1061-1069, 2001.
109. CABRIA E, ANEL L, HERRAEZ MP. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 52: 623-635, 2001.
110. KASAI M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Animal Reproduction Science*, 42: 67-75, 1996.
111. MCWILLIAMS RB, GIBBONS WE, LEIBO SP. Osmotic and physiological responses zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. *Human Reproduction*, 10: 1163-1171, 1995.
112. MCGANN LE. Differing action of penetrating and nonpenetrating agents. *Cryobiology*, 15: 382-390, 1978.
113. ARAV A, HEHU D, MATTIOLI M. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99: 353-358, 1993.
114. HOLT WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 3-22, 2000.
115. GOMES GM, JACOP JCF, MEDEIROS ASL, PAPA FO, ALVARENGA MA. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the mangalarga marchador breed. *Theriogenology*, 58: 277-279, 2002.
116. FERNÁNDEZ-SANTOS MR, ESTESO MC, MONTORO V, SOLER AJ, GARDE JJ. Influence of various permeating cryoprotectants on freezability of iberian red deer (*cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: effects of concentration and temperature of addition. *Journal of Andrology*, 27 (6): 734-745, 2006.
117. GAO DY, CRISTER JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR Journal*, 41: 187-196, 2000.
118. ALVARENGA MA, ALVARENGA FC, MOREIRA RM, CESARINO MM. Acrozoal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packing systems. *Equine Veterinary Journal*, 32: 541-545, 2000.
119. WOODS EJ, GILMORE JA, LIU J. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities; convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Human Reproduction*, 15: 335-343, 2000.
120. HAMMERSTEDT RH, GRAHAM JK, NOLAN JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11: 73-88, 1990.
121. AISEN EG, MEDINA VH, VENTURINO A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57: 1801-1808, 2002.
122. MOTAMEDİ-MOJDEHI R, ROASTAEI-ALI MEHR M, RAJABI-TOUSTANI R. Effect of Different Levels of Glycerol and Cholesterol-Loaded Cyclodextrin on Cryosurvival of Ram Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 49: 65-70, 2014.
123. COLAS G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 42 (2): 277-285, 1975.
124. ALCAY S, USTUNER B, CAKMAK I, CAKMAK S, NUR Z. Effects of Various Cryoprotective Agents on Post-Thaw Drone Semen Quality. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21: 31-35, 2015.

125. TEKIN N, SECER S, AKÇAY E, BOZKURT Y. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Israeli Journal of Aquaculture*, 55: 208-212, 2003.
126. VICENTE JS, VIUDES-DE-CASTRO MP. A sucrose-dmsO extender for freezing rabbit semen. *Reproduction Nutrition Development*, 36: 485-492, 1996.
127. TASDEMİR U, BUYUKLEBLEBİCİ S, TUNCER PB, COSKUN E, OZGURTAS T, AYDIN FN, BUYUKLEBLEBİCİ O, GURCAN IS. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology*, 66: 38-42, 2013.
128. DE JARNETTE MS. Interactive effects of semen quality, semen quality and insemination techniques on conception rates of artificial inseminated cattle. Editors: ELLEN L, JORDAN S. *National Reproduction Symposium Pittsburg*, page 139-150, 1994.
129. CHRISTENSEN P, BROCKHOFF PB, LEHN-JENSEN H. The relationship between semen quality and the nonreturn rate of bulls. *Reproduction in Domestic Animals*, 34: 503-507, 1999.
130. MALMGREN L. Assessing the quality of raw semen: review. *Theriogenology*, 48: 523-530, 1997.
131. KJÆSTAD H, ROPSTAD E, ANDERSEN BERG K. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Veterinaria Scandinavica* 34: 299-303, 1993.
132. AHMADI A, SOON-CHYE NG. The single sperm curling test, a modified hypo-osmotic swelling test, as a potential technique for the selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 68: 346-350, 1992.
133. JEYENDRAN RS, VAN DER VEN HH, PEEZ-PELAEZ M, CRABO BG, ZANEVELD LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70: 219-228, 1984.
134. ROGERS BJ, PARKER RA. Relationship between the human sperm hypo osmotic swelling test and sperm penetration assay. *Journal of Andrology*, 12: 152-158, 1991.
135. CHECK JH, EPSTEIN R, NOWROOZI K, SHANIS BS, WU CH, BOLLENDORF A. The hypoosmotic swelling test as a useful adjunct to the semen analysis to predict fertility potential. *Fertility and Sterility*, 52: 159-161, 1989.
136. KUMI-DIAKA J. Subjecting canine semen to the Hypo-osmotic test. *Theriogenology*, 39: 1279-1289, 1993.
137. NUR Z, DOĞAN I, SOYLU MK, AK K. Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen. *Revue De Medecine Veterinaire*, 154: 487-490, 2003.
138. NUR Z, DOĞAN I, YERLIKAYA H, SOYLU MK. Relationship between the canine sperm membrane integrity and other semen characteristics. *Indian Veterinary Journal*, 81: 1119-1121, 2004.
139. NUR Z, DOĞAN I, GUNAY U, SOYLU MK. Relationships between sperm membrane integrity and other semen quality characteristics of the Saanen goat bucks. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 49: 183-188, 2005.
140. LIN MH, MORSHEDI M, SRISOMBUT C, NASSAR A, OEHNINGER S. Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test and eosin-Y staining. *Fertility and Sterility*, 70: 6148-6155, 1998.
141. O'MEARA CM, HANRAHAN JP, DONOVAN A, FAIR S, RIZOS D, WADE M, BOLAND MP, EVANS ACO, LONERGAN P. Relationship between in vitro fertilisation of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, 64: 1797-1808, 2005.

142. GANDOLFI F, BREVINI TAL, CILLO F, ANTONINI S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Revue Scientifique et Technique*, 24: 413-423, 2005.
143. ZHU SX, SUN Z, ZHANG JP. Ovine (*Ovis aries*) blastula from an in vitro production system and isolation of primary embryonic stem cells. *Zygote*, 15: 35-41, 2007.
144. KRISHER RL. The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, 82: 14-23, 2004.
145. WANI NA. *In vitro* maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research*, 44, 89-95, 2002.
146. KANE MT. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture on potential impact on future animal biotechnology. *Animal Reproduction Science*, 79: 171-190, 2003.
147. KATSKA-KSIAZKIEWICZ L, OOIELA J, RYNSKA B. Effects of oocytes quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastosyst production in goats. *Theriogenology*, 68: 736-744, 2007.
148. WANI NA, WANI GM, KHAN MZ, SALAHUDIN S. Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. *Small Ruminant Research*, 36: 63-67, 2000.
149. BİRLER S, PABUÇÇUOĞLU S, ALKAN S, ÖZDAŞ ÖB, ATALLA H, İLERİ İK. *In vitro* fertilizasyonla elde edilen koyun embriyolarının blastosist dönemine kadar geliştirilmesi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 26: 891-894, 2002.
150. WANI NA, WANI GM, KHAN MZ, SIDIQI MA. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro maturation and in vitro fertilisation procedures in sheep. *Small ruminant Research*, 34: 71-76, 1999.
151. LOZANO JM, LONERGAN P, BOLAND MP, O'CALLAGHAN D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction*, 125: 543-553, 2003.
152. TEIXEIRA PPM, PADILHA LC, OLIVEIRA MEF, MOTHEO TF, SILVA ASL, BARROS FFPC, COUTINHO LN, FLÔRESFN, LOPES MCS, BANDARRA MB, SILVA MAM, VASCONCELO SRO, RODRIGUES LFS, VICENTE WRR. Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. *Animal Reproduction Science*, 127: 169-175, 2011.
153. KIDSON A. In vitro embryo development in pig: impact of oocyte maturation milieu on blastocyst morphology and viability, *Tekst. - Proefschrift Universiteit Utrecht* 2004.
154. SCHOEVERS EJ, COLENBRANDER B, ROELEN BA. Developmental stage of the oocyte during antral follicle growth and cumulus investment determines in vitro embryo development of sow oocytes. *Theriogenology*, 67: 1108-1122, 2007.
155. BIRLER S, PABUCCUOĞLU S, ALKAN S, AK K, EVECEN M, ILERI IK. Effects of different maturation and culture media on ivf of sheep oocytes. *Pakistan Veterinary Journal*, 21 (2), 2001.
156. GUPTA PSP, RAVINDRA JP, GIRISH KUMAR V, RAGHU HM, NANDI S. Stimulation of in vitro oocyte maturation with a novel peptide isolated from follicular fluid of the buffalo (*Bubalus bubalis*). *Small Ruminant Research*, 59: 33-40, 2005.
157. BIRLER S, PABUCCUOĞLU S, ALKAN S, EVECEN M, ILERI IK. Effects of serum and hormone additions to maturation media and co-culture with sheep oviductal epithelial cells (SOEC) on in vitro fertilization of sheep oocytes. *Journal of reproduction and fertility*, 23 (abs): 21, 1999.

158. MAHOETE N. *In vitro* embryo production and semen cryopreservation in sheep. Doktora Tezi. Faculty of Natural and Agricultural Sciences Department of Animal, Wildlife and Grassland Sciences University of the Free State Bloemfontein, 2010.
159. ARMSTRONG D. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*, 55: 1303-1322, 2001.
160. GONDOLFI F, BREVINI T, CILLO F, ANTONINIS S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Revue scientifique et technique*, 24: 413-423, 2005.
161. WANG S, LIU Y, HOLYOAKGR, EVANS RC, BUNCH TD. A protocol for *in vitro* maturation on fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research*, 29: 83-88, 1998.
162. LONERGAN P O'KEANEY-FLYNN M, BOLAND MP. Effect of protein supplementantion and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology*, 64: 1833-1843, 1999.
163. IZQUIERDO D, VILLAMEDIANA P, PALOMO MJ, MOGAS T, PARAMIO MT. Effect of sperm capacitation and fertilization media on IVF and early embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, 49: 1501-1513, 1998.
164. WATSON AJ, WATSON PH, WARNES D, WALKER SK, ARMSTRONG DT, SEAMARK RF. Pre implantation development of *in vitro* matured and *in vivo* fertilized ovine zygotes: comparison between co-cultured on oviductal epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. *Biology of Reproduction*, 50: 715-724, 1994.
165. LI F, PI WH, ZHU HZ, ZHANG SS, LIU SR, XUE JL. The effect of estrous ewe serum and heparin on *in vitro* fertilization and subsequent embryonic development in sheep. *Small Ruminant Research* 63, 226-232, 2006.
166. O'BRIEN JK, CATT SL, IRELAND KA, MAXWELL WMC, EVANS G. *In vitro* and *in vivo* developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology*, 47: 1433-1443, 1997.
167. WALKER SK, HILL JL, KLEEMANN DO, NANCARROW CD. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biology of Reproduction*, 55: 703-708, 1996.
168. CAMARGO LSA, VIANA JHM, SÁ WF, FERREIRA AM, RAMOS AA, VALE FILHO VR. Factors influencing *in vitro* embryo production. *Animal Reproduction Science*, 3: 19-28, 2006.
169. AISEN E, QUINTANA M, MEDINA V, MORELLO H, VENTURINO A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, 50: 239-49, 2005.
170. ALCAY S, TOKER B, USTUNER B, NUR Z, SAGIRKAYA H, SOYLU MK. Investigation of relationships between DNA integrity and fresh semen parameters in rams. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20 (5): 793-798, 2014.
171. BAILEY JL, BILODEAU JF, CORMIER N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21: 1-7, 2000.
172. BILODEAU JF, CHATTERJEE S, SIRARD MA, GAGNON C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 55: 282-288, 2000.
173. ALCAY S, SOYLU MK, USTUNER B. Boğa ve alabalık seminal plazmasının koç spermasının dondurulması üzerine etkisi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10 (1): 7-14, 2013.
174. SARIÖZKAN S. Spermada lipid peroksidasyon ve antioksidanların rolü. *Veteriner Hekim Derneği Dergisi*, 79 (4): 19-22, 2008.

175. RASUL Z, AHMED N, ANZAR M. Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glycerol during cryopreservation of buffalo sperm. *Theriogenology*, 68: 813-819, 2007.
176. GILMORE JA, MCGANN LE, ASHWORTH E, ACKER JP, RAATH JP, BUSH M. Fundamental cryobiology of selected African mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking. *Animal Reproduction Science*, 53: 277-297, 1998.
177. SILVA PFN, GADELLA BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65: 958-978, 2006.
178. WATSON PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, 7: 871-891, 1995.
179. AWAD MM. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 123: 157-162, 2011.
180. AMANN RP, PICKETT BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, 7: 145-173, 1987.
181. MATÁS C, DECUADRO G, MARTÍNEZ-MIRÓ S, GADEA J. Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. *Theriogenology*, 67: 1087-1091, 2007.
182. ROMÃO R, MARQUES CC, BAPTISTA MC, VASQUES MI, BARBAS JP, HORTA AEM, CAROLINO N, BETTENCOURT E, PLANCHA C, RODRIGUES P, PEREIRA RM. Evaluation of two methods of in vitro production of ovine embryos using fresh or cryopreserved semen. *Small Ruminant Research*, 110: 36-41, 2012.

TEŞEKKÜR

Doktora çalıőmamın tım aşamalarını titizlikle izleyen, bilimsel uyarı ve eleőtirileriyle yönlendiren ve destek olan danışman hocam Prof.Dr. Zekariya NUR'a teőekkürü bir borç bilirim. Araőtırmamda bilimsel önerilerini ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. M.Kemal SOYLU'ya saygı ve teőekkürlerimi sunarım. Çalıőmam sırasında yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof.Dr. İbrahim DOğAN, Prof.Dr. Ülgen GÜNAY ve Prof.Dr. Hakan SAğIRKAYA' ya teőekkürlerimi sunarım. Çalıőmamın her aşamasında destek olan ve bilimsel uyanlılarıyla yönlendiren hocam Yard.Doç.Dr. Burcu ÜSTÜNER'e teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitesi Üyesi hocam Prof.Dr. Seran TEMELLİ'ye, çalışma arkadaşlarım Araştırma Görevlisi Berk TOKER ve Doktora Öğrencisi Elif GÖKÇE'ye, manevi desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen Yeőim ÖZ'e ve bugünlere eriőmemi sağlayan çok değerli aileme sonsuz sevgi ve teőekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

1984 Ereğli doğumluyum. İlkokulu Ordu ve Urfa'da okudum. Orta ve lise öğrenimimi Bursa'da, Yüksek Lisans öğrenimimi 2003-2009 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde tamamladım.

2009 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda Doktora Öğrencisi ve 2010 yılında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. 2012-2014 yılları arasında U.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrenci temsilciliği yaptım. U.Ü. Veteriner Fakültesi Araştırma Görevlisi Temsilciliği, Objektif yayın kurulu üyeliği ve Rafting Topluluğu danışmanlığı görevlerini 2012 yılından itibaren yapmaktayım. Halen aynı Anabilim Dalı'nda görevimi sürdürmekteyim.