



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



**L-KARNİTİN VE ALFA LİPOİK ASİTİN KOÇ SPERMASI
DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE VE ÇÖZDÜRME SONRASI
YAŞAM SÜRESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

NAİL TEKİN ÖNDER

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2019



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



**L-KARNİTİN VE ALFA LİPOİK ASİTİN KOÇ SPERMASI
DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE VE ÇÖZDÜRME SONRASI
YAŞAM SÜRESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

NAİL TEKİN ÖNDER

(DOKTORA TEZİ)

**DANIŞMAN:
Prof. Dr. Zekariya NUR**

BURSA-2019

**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum “L-karnitin ve Alfa lipoik asitin koç sperması dondurulabilirliği üzerine ve çözündürme sonrası yaşam süresi üzerine etkileri” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Adı Soyadı
Tarih ve İmza
18.09.2019
Nail Tekin ÖNDER


SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Nail Tekin ÖNDER tarafından hazırlanan "L-karnitin ve Alfa lipoik asitin koç sperması dondurulabilirliği üzerine ve çözündürme sonrası yaşam süresi üzerine etkileri" konulu Doktora tezi 18.09.2019 günü, 11.00-13.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Sovadı</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Zekariya NUR
Üye	Prof. Dr. M. Kemal SOYLU
Üye	Prof. Dr. Berrin ZIK
Üye	Prof. Dr. Kemal AK
Üye	Prof. Dr. Alper BARAN

İmza


Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun 01.10. 2019 tarih ve
..... 2019 / 29 sayılı toplantısında alınan 09 numaralı
kararı ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Gülşah GECENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

18/09/2019

Adı Soyadı: Nail Tekin ÖNDER**Anabilim Dalı:** Veteriner – Dölerme ve Suni Tohumlama**Tez Konusu:** L-karnitin ve Alfa lipoik asitin koç sperması dondurulabilirliği üzerine ve çözdürme sonrası yaşam süresi üzerine etkileri

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	☒	☐	
Dış Kapak Sayfası	☒	☐	
İç Kapak Sayfası	☒	☐	
Kabul Onay Sayfası	☒	☐	
Sayfa Düzeni	☒	☐	
İçindekiler Sayfası	☒	☐	
Yazı Karakteri	☒	☐	
Satır Aralıkları	☒	☐	
Başlıklar	☒	☐	
Sayfa Numaraları	☒	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	☒	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	☒	☐	
Kaynaklar	☒	☐	

DANIŞMAN ONAYI**Unvanı, Adı Soyadı:** Prof. Dr. Zekariya NUR**İmza:**

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN	II
KABUL ONAY	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	VIII
İNGİLİZCE ÖZET	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Koçlardan Spermanın Alınması	4
2.1.1. Suni Vajina Yöntemi Kullanılarak Spermanın Alınması	4
2.1.2. Elektro-Ejakülatör Yöntemi Kullanılarak Spermanın Alınması	6
2.2. Koç Sperması ve İçeriği	6
2.2.1. Seminal Plazmada Bulunan İnorganik Maddeler	8
2.2.2. Seminal Plazmada Bulunan Organik Maddeler	9
2.3. Spermatolojik Muayene	11
2.3.1. Makroskobik Muayene	12
2.3.1.1. Hacim	12
2.3.1.2. Renk	13
2.3.1.3. Koku	13
2.3.1.4. Kıvam	13
2.3.1.5. Kitle Hareketi	14
2.3.2. Mikroskobik Muayene	14
2.3.2.1. Kitle Hareketi	14
2.3.2.2. Motilite	15
2.3.2.3. Spermanın Yoğunluğu	16
2.3.2.4. Ölü/Canlı Spermatozoa Oranı	17
2.3.2.5. Morfolojik Muayene	17
2.3.3. Fiziko-Kimyasal Muayene	19

2.3.4. Spermanın Mikrobiyal Muayenesi	20
2.3.5. Spermanın Fonksiyonel Muayenesi	20
2.3.5.1. Plazma Membran Dayanıklılığının Değerlendirilmesi	21
2.3.6. Spermanın İnkübasyon Testleri	22
2.4. Spermanın Dondurulması	23
2.4.1. Spermanın Sulandırılması	24
2.4.2. Sulandırıcılarda Kullanılan Maddeler	25
2.4.3. Antioksidanlar	27
2.4.3.1. L-karnitin	30
2.4.3.2. Alfa Lipoik Asit	31
2.4.4. Spermanın Eritilmesi	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Kullanılan Kimyasallar	36
3.2. Spermanın Alınması ve Spermatolojik Değerlendirmeler	36
3.3. Pooling Öncesi Yapılan Spermatolojik Muayeneler	37
3.3.1. Kitle hareketi	37
3.3.2. Sperm Motilitesinin Muayenesi	37
3.3.3. Sperm Yoğunluğunun Belirlenmesi	38
3.4. Pooling Sonrası Yapılan Spermatolojik Muayeneler	38
3.4.1. Plazma Membran Fonksiyonel Bütünlüğünün Değerlendirilmesi	38
3.4.2. Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi	39
3.5. Sulandırıcıların Hazırlanması ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması	39
3.6. Spermanın Sulandırılarak Soğutulması	42
3.7. Spermanın Eritilmesi ve İnkübasyonu	42
3.8. İstatistiksel Değerlendirme	42
4.BULGULAR	44
4.1. Sulandırma ve Ekilibasyon Sonrası Bulgular	44
4.2. Eritme Sonrası Elde Edilen Bulgular	46
4.2.1. Eritme Sonrası 0. Saat Bulguları	46
4.2.2. Eritme Sonrası 3. Saat Bulguları	47
4.3.3. Eritme Sonrası 6. Saat Bulguları	48
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	57
6.KAYNAKLAR	72

7.SİMGELER ve KISALTMALAR	89
8.TEŞEKKÜR	91
9.ÖZGEÇMİŞ	92



ÖZET

Sunulan çalışmada; koç sperma sulandırıcısına eklenen 25 mM, 50 mM ve 100 mM L-karnitin ve 0,25 mM, 0,50 mM ve 1 mM Alfa lipoik asitin bireysel ve birlikte kullanılarak, inkübasyon boyunca spermanın yaşam süresini nasıl etkileyeceği ve spermatozoonların dişi genital kanaldaki olası ömrünün artırılabilmesi amaçlanmıştır.

Sperma, beş adet Kıvırcık ırkı koçtan elektro-ejakülatör yöntemi kullanılarak alındı. En az +++ mass aktivite, %70 motililite ve $1,5 \times 10^9$ spermatozoon/ml özelliğinde olan sperma örnekleri birleştirilerek (pooling) 16 eşit hacme bölündü. Biri kontrol olmak üzere içinde L-karnitin, Alfa lipoik asit veya her ikisinin karışımlarının farklı yoğunluklarını içeren sulandırıcılardan biri ile iki aşamalı sulandırma tekniğine göre sulandırılarak payet yöntemine göre donduruldu. Pooling, sulandırma, ekilibasyon, eritme sonrası (0. saat) ve inkübasyon sonrası 3. ve 6. saatlerde spermanın motilite, plazma membran fonksiyon bütünlüğü (HOST) ve akrozomal bütünlüğü (PSA) değerlendirildi.

Dondurma-eritme ve inkübasyon aşamalarına bağlı olarak, motilite, plazma membran fonksiyonel ve akrozom bütünlüğünün her işlemde azaldığı görüldü. Eritme sonrası aşamada sadece Alfa lipoik asit içeren grupların spermatolojik değerlerinin kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği ($P>0.05$), L-karnitin eklenmesinin akrozomal bütünlüğü anlamlı bir şekilde koruduğu ($P<0.05$), diğer gruplara ait spermatolojik bulguların ise genellikle daha düşük olduğu bulundu. İnkübasyon sonrası aşamada antioksidan içeren grupların motilite ve plazma membran bütünlüğünün kontrol grubuna göre olumsuz etkilendiği, genellikle L-karnitin içeren gruplarda akrozomal bütünlüğün daha iyi korunduğu belirlendi. Koç sperması sulandırıcılarına L-karnitin ve Alfa lipoik asit eklenmesinin zamana bağlı olarak motilite ve plazma membran

fonksiyonel bütünlüğünün hızlıca düşmesine yol açarak birlikte kullanıma uygun olmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Koç sperması, İnkübasyon, L-karnitin, Alfa lipoik asit

SUMMARY

The aim of this study is to evaluate the effects of 25 mM, 50 mM ve 100 mM L-carnitine and 0,25 mM, 0,50 mM ve 1 mM Alpha lipoic acid on ram semen cryopreservation and post-thaw life span to increase survivability of ram semen in female genital tract.

Semen was collected from 5 Kivırcık rams by using electro-ejaculation method. Semen has +++ mass activity, 70% motility ve $1,5 \times 10^9$ spermatozoa/ml used at pooling stage. After pooling, semen was divided into 16 groups and diluted using two-step dilution method by control and each antioxidant groups or mix groups. After dilution, semen was cryopreserved in straws. Motility, plasma membrane functional integrity (HOST) and acrosome integrity (PSA) were evaluated at after pooling, dilution, equilibration, post thaw and after 3 and 6 hours of incubation.

Motility, plasma membrane functional integrity and acrosome integrity negatively effected from cryopreservation process and incubation. At the post-thaw stage, spermatological values of the groups containing only alpha lipoic acid were similar to those of the control group ($P > 0.05$). Addition of L-carnitine significantly maintained acrosomal integrity ($P < 0.05$) and spermatological findings of other groups were generally lower. At the post-incubation stage, it was determined that the motility and plasma membrane integrity of the antioxidant groups were adversely affected compared to the control group and generally the acrosomal integrity was better preserved in the L-carnitine-containing groups.

It was concluded that the addition of L-carnitine and Alpha lipoic acid to ram semen diluents is not suitable for concomitant use due to the rapid decrease in motility and plasma membrane functional integrity.

Key words: Ram semen, Incubation, L-carnitine, Alpha lipoic acid



1. GİRİŞ

Tarih boyunca insanlığın en önemli sorunu dengeli ve yeterli beslenememe olmuştur. Hayvansal gıdaların tüketimi dengeli beslenme içerisinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Koyun-keçi yetiştiriciliği et, süt, yün, kıl, tiftik ve deri üretimi açısından, diğer ülkelerde olduğu gibi, ülkemiz ekonomisinde de önemli bir yer tutmaktadır. Türkiye'de kişi başına üretilen ve tüketilen hayvansal protein miktarı, gelişmiş ülkelere oldukça geride olduğundan, ülkemiz hayvansal ürünlerin üretimini artırmak zorundadır. Kırsal alanda yaşayan halkımız için kolay bir uğraş alanı ve aynı zamanda ekonomik güvence olan koyun ve keçi yetiştiriciliği, en eski hayvansal üretim alanlarından biridir. Yakın tarihimize kadar koyunculuk özellikle Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgeleri'nde yaşayan halkımızın önemli bir geçim kaynağı olmuştur. Bunun yanı sıra, küçükbaş hayvancılığının sağladığı et, süt, yün, kıl, tiftik ve deri gibi birçok ürün, yeni iş alanları oluşturmaktadır. Ayrıca, bu ürünlerin farklı alanlarda son ürüne dönüştürülerek değerlendirilmesi de ülke ekonomisi içerisindeki değerini artırmaktadır (Semerci ve Çelik, 2016; TİGEM, 2016).

Türkiye'de ilkbahar mevsimi yağmurlarıyla yeşerip ardından sararan, bitkisel üretime elverişli olmayan, çayır ve çalılıklarla kaplı araziler yaygın olarak bulunmaktadır. Bu nedenle, koyun ve keçi yetiştiriciliğinin yaygın bir biçimde yapılmasına uygun bir ülkedir (Semerci ve Çelik, 2016). TÜİK verilerine göre, ülkemizin koyun varlığı giderek artış göstermektedir. TÜİK'in 2018 verilerine göre ülkemizde 35.000.195 baş koyun ve 10.419.027 baş keçi bulunmaktadır. Yaklaşık olarak et üretiminin %12,2'si, süt üretiminin ise %9'u olmak üzere, çok az bir bölümü küçükbaş hayvancılıktan temin edilmektedir (TÜİK, 2017). Dünyada koyun keçi yetiştiriciliği büyük oranla Asya ve Afrika ülkelerinde yapılmaktadır ve bu ülkelerdeki koyun keçi ırkları yetersiz bakım ve beslenme koşullarına, hastalıklara karşı uyum sağlamış olmasına karşın, verim yetenekleri düşüktür. FAO 2017 verilerine göre, karkas başına düşen et Avustralya'da 23,2, Yeni Zelanda'da 19,7, ABD'de 30,

İngiltere'de 20,1 ve Türkiye'de 16 kg'dır. Rakamlara bakıldığında, anılan verim yönünden ülkemiz koyuncululuğunun gerilerde olduğu görülmektedir. Hayvancılık sektöründe vazgeçilmez önemi olan reproduksiyon biyoteknolojisi, senkronizasyon, suni tohumlama, in-vitro fertilizasyon, embriyo transferi, gen transferi ve klonlama gibi birtakım teknikleri kapsamaktadır. Bu teknikler arasında en etkin ve yaygın olanı, değerli erkek gamet hücrelerinin dondurulması ve dişi hayvanların suni yolla tohumlanması esasına dayanan suni tohumlama biyoteknolojisidir. Suni tohumlama alanındaki gelişmeler hızla ilerlemiş ve günümüzde uygulamalar tüm dünyaya yayılmıştır. Koyunlarda suni tohumlama çalışmaları ilk olarak 1899 yılında Rus bilim adamı Ivanoff tarafından başlatılmıştır. Türkiye'de ise suni tohumlama çalışmaları 1925 yılında Mihailof isimli Rus veteriner hekimi tarafından başlatılmıştır (Birler ve ark., 2002; Foote, 2002; İleri ve ark., 2000).

Ülkemizde koyun ve keçilerde suni tohumlama uygulamaları sığircılık alanında olduğu kadar yaygın değildir. Yapılan çalışmaların çoğu akademik çalışma düzeyinden ileriye gidememiştir. Yurdumuzda küçükbaş hayvanlarda suni tohumlama uygulamaları maliyet, başarı oranının düşüklüğü, yetişmiş personel sayısının sınırlı olması ve olumsuz coğrafi koşullar nedeniyle istenilen düzeye ulaşamamıştır. Avustralya ve Fransa gibi kültür koyuncululuğunun gelişmiş olduğu kimi ülkelerde, dondurulmuş sperma ile suni tohumlama yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Spermanın dondurulması sulandırma, soğutma, ekilibasyon, dondurma ve eritme aşamalarından oluşmaktadır. Ancak, dondurmanın gamet hücreleri üzerine olumsuz etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler spermanın fizyolojisi, morfolojisi ve biyokimyasal yapısında geridönüşümü olmayan değişikliklere yol açmaktadır. Sperm motilitesi, yaşam süresi ve morfolojisindeki bu değişiklikler fertilitiyi olumsuz etkilemektedir (Alcay ve ark., 2016b). Dondurma işleminin olumsuz etkilerinin azaltılması amacıyla, sperma sulandırıcılarına katılan kriyoprotektif maddeler, pH ve ozmotik basınç dengeleyiciler ve antioksidan özelliği olan maddeler kullanılmıştır (Alcay ve ark., 2016a; Alcay ve ark., 2016b; Nur ve ark., 2010).

Sunulan tez çalışmasında, sperma sulandırıcısına eklenen Alfa lipoik asit ve L-Karnitin, dondurma-eritme işleminin olumsuz etkilerinin azaltılması ve eritme sonrası spermatozoonların yaşam süresinin artırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Reprodüktif faaliyetler; çevre, genetik yapı, fizyolojik, hormonal, davranışsal ve psikolojik faktörler aracılığı ile düzenlenirler. Siklik aktivitelere göre hayvanlar; poliöstrik hayvanlar, mevsime bağlı poliöstrik hayvanlar ve monoöstrik hayvanlar olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Poliöstrik olarak adlandırılan inek, manda ve domuzlar gebe kalmadıkları sürece yıl boyu seksüel aktivite gösterir. Mevsime bağlı poliöstrik olan hayvanlar, gebe kalmadıkları sürece üreme mevsimi boyunca seksüel siklus gösterirler. Kuzey yarım kürede kısırak, dişi hamster ve kediler, ilkbahar başlangıcında, günlerin uzamaya başlamasıyla seksüel aktivite gösterirken; koyun ve keçiler gün ışığının kısaltmaya başladığı yaz mevsimi sonu ve sonbahar aylarında seksüel aktivite göstermeye başlarlar. Köpekler ve yabanıl karnivorlar monoöstrik hayvanlardır. Bu hayvanlarda iki östrus arasında bir anöstrus dönemi bulunur (Hafez, 2000; McDonald ve Pineda, 1989).

Mevsime bağlı seksüel aktivite gösteren koyunlar, üreme mevsiminde gebe kalmadıklarında 6 ile 9 kez kızgınlık gösterebilmektedirler. Merinos ve Saanen gibi kimi melez ve kültür koyun ve keçi ırkları, bakım besleme koşullarının düzeltilmesi ve seleksiyon sonucu, yıl boyu seksüel aktivite gösterme eğilimindedirler. Mevsime bağlı poliöstrik olan özellikle kültür ırkı koyun ve keçilerde yaşam koşullarının (ışık, beslenme, ısı, ortamda erkek hayvanın bulundurulması vb.) üreme mevsimine benzetilmesiyle yıl boyunca seksüel etkinlik gösterebilmektedir (Hafez, 2000; McDonald ve Pineda, 1989).

Reprodüktif yaşam döngüsü türe, ırka, cinsiyete bağlı olarak, gonadal aktivitenin başlaması ile birlikte başlar, pike ulaşır ve zamanla azalarak sonunda durması ile karakterizedir. Gonadal aktivitenin başlaması ile karakterize olan puberte, erkek ya da dişi hayvanın fertilite yeteneği olan gamet hücrelerini üretmeye başlayıp cinsiyete özel cinsel davranış göstermesi olarak tanımlanır. Diğer bir deyişle puberte; gonadotropik aktivite ile gonadların steroit ve fertilite yeteneği olan gamet hücrelerini üretmesi arasındaki uyumun sağlanması olarak da tanımlanabilir. Beden yapısı ve

yağ/protein oranı, diyet, stres, mevsimsel fotoperiyot, enerji alımı, lokomotor aktivite, enlem ve boylam, iklim koşulları, gonadal steroid düzeyi ve olfaktorik uyarımlar gibi çok sayıda faktör puberteye ulaşma yaşını etkilemektedir (Hafez, 2000; McDonald ve Pineda, 1989). Kış sonu veya ilkbahar başında doğan kuzular 5-7 aylık yaşta; daha geç doğan kuzular 12-16 aylık yaşta veya ergin canlı ağırlıklarının %55-60'ına ulaştıklarında puberteye erişerek, izleyen ilk üreme mevsiminde östrus göstermeye başlarlar (Canoğlu ve Sarıbay, 2012; McDonald ve Pineda, 1989). Hızlı kilo alma özelliği olan kültür ırkları, yerli, yabanıl ve ilkel ırklara göre daha erken erişkinliğe ulaşırlar (Hafez, 2000). Koçlarda puberte, koyunu gebe bırakabilecek özellikle spermanın ejaküle edebilmesi olarak tanımlanır. Seksüel olgunluğa erişmiş ergin koçlarda tüm yıl boyunca libido ve spermatogenezis sürer. Üreme sezonu dışında spermanın kalitesinde ve miktarında hafif azalma görülebilir. (Hafez, 2000; McDonald ve Pineda, 1989)

2.1. Koçlardan Spermanın Alınması

Hayvanlarda bilimsel çalışmalar ve suni tohumlama çalışmalarını yürütebilmenin yanında, genetik özelliği yüksek bireylerden daha fazla yararlanmak, aşım yapamayan yaşlı veya deneyimsiz genç hayvanlardan yararlanmak ve bireyin cinsel sağlık kontrolü amacıyla sperma alınmaktadır (İleri ve ark., 2000).

Sperma suni vajina, elektro-ejakülatör, iç genital organlara masaj (ampulla), penis masajı, ejakülasyon sonrası dışı genital organından alma, prezervatif yöntemi, postmortem epididimis ve testisin vasat içinde doğranması veya epididimisin punksiyonu gibi değişik yöntemler kullanılarak memeli hayvanlardan alınabilmektedir. Bu yöntemler arasında en kaliteli sperma, suni vajina yöntemi ile elde edilenidir. Koçlardan genellikle suni vajina veya elektro-ejakülasyon yöntemi ile sperma alınmaktadır. Diğer kimi yöntemler ise deneysel çalışmalar düzeyinde kullanılmaktadır (Hafez, 2000; İleri ve ark., 2000).

2.1.1. Suni Vajina Yöntemi Kullanılarak Spermanın Alınması

Suni tohumlama sonrası olumlu sonuç alabilmenin ilk koşulu temiz ve sağlıklı sperma elde etmektir. Ejakülasyon çeşidine göre değişik biçim ve yöntemlerle hayvanlardan sperma alınabilmektedir (Gordon, 2004). Bu yöntemlerin arasında suni

vajina ile sperma alma diğer yöntemlere göre daha üstündür. Koçlar kızgın dişi varlığında ereksiyon, arama bulma, yüklenme ve ejakülasyon ile karakterize çiftleşme davranışı gösterir. Suni vajina yöntemi ile sperma almak için de kızgın bir koyuna gereksinim vardır. Ters durumda koçun fantoma alıştırılmış olması gerekir. Koçun libidosu doğal aşımaya yakın düzeyde uyarıldığından, alınan sperma doğal aşım sonrası elde edilen spermaya en yakın özelliktedir. Bu yöntem ile koçun cinsel sağlığını etkilemeksizin 5 dakika aralıklarla günde 3 ila 8 kez sperma alınabilmektedir (İleri ve ark., 2000).

Suni vajinanın yapısı, üzerinde hava ve su girişine olanak veren bir ventil bulunan dış sert plastik boru, iç lastik, sperma toplama hunisi ve sperma toplama kadehinden oluşur. Hayvanın yaşı, türü ve ejakülasyon çeşidine göre farklılık gösterir. Koçlarda kullanılan suni vajinanın uzunluğu 19-20 cm ve iç çapı 5 cm'dir (İleri ve ark., 2000).

Suni vajina ile sperma alabilmek için, suni vajinada östrustaki bir hayvanın vajinasının ısı, basınç ve kayganlık özelliklerinin bulunması gerekir. Koçlardan sperma alırken gerekli ısıyı sağlamak için 41-44°C ısıdaki su, basınç için hava ve kayganlık için vazelin sürülerek suni vajina kullanıma hazır hale getirilir (İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

Sperma vermeye alışmış olan koçlar, sperma verme yerine geldiklerinde (arena) veya arenada östrustaki koyunu veya alıştırılmış ise fantomu gördüklerinde duyuşsal ve görsel olarak uyarılırlar. Sperması alınacak koçun bir kaç kez östrustaki dişiye veya fantoma atlamasına izin verilerek ön sekretin akması sağlanır. Ardından koç fantoma atlatılır, kavrama hareketinden sonra, penisi suni vajinaya yönlendirilerek yüklenmesine ve ejakülasyon yapmasına izin verilir. Ejakülasyon sonrası suni vajenin havası boşaltılarak spermanın toplama kadehine akması sağlanır. Özellikle fantom olarak östrustaki koyun kullanıldığında, doğal çiftleşmenin olmasını engellemek için sperma alan personel dikkatli ve atik davranmalıdır. Ayrıca koçun daha önceden suni vajinaya alıştırılmasının gerekmesi, suni vajinayı reddetme ve tecrübesizliğe bağlı spermanın alınamaması gibi istenmeyen sonuçlar suni vajina yönteminin başlıca olumsuzluklarından (Hafez, 2000; İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

2.1.2. Elektro Ejakülatör Yöntemi Kullanılarak Spermanın Alınması

Elektro-ejakülatör yönteminde, suni vajina ile elde edilen spermanın kalitesine benzer nitelikte sperma elde edilebilmektedir. Bu yöntemde, kızgın dişi veya fantoma gereksinim duyulmaması ve yaşlanma, libido eksikliği, hayvanın aşım yapmasına engel olan eklem rahatsızlıkları gibi hastalıkları bulunan hayvanlardan da sperma alınabilmektedir. Cihaz gereksinimi yanında, bu yöntemde uzman personele gereksinim duyulması ve hayvanın yatırılması gibi dezavantajları da bulunmaktadır (İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

Elektro-ejakülatör ile sperma alma yöntemi, sperması alınacak hayvanın bel bölgesindeki ejakülasyon merkezinin veya ampulla ve vezikula seminalisin (idrar kesesinin boyun kısmına) elektrik impulsları ile uyarılması temeline dayanır. Bu amaçla kullanılan elektro-ejakülatörlerin otomatik veya manuel uyarım verme özelliğinde olan değişik modelleri bulunmaktadır. Bu cihazlar, voltmetre (10-30 volt), ampermetre (0-600 mA), elektrik uyarımı üreten güç ünitesi ve hayvanlara göre değişik büyüklükteki proplardan oluşur. Hayvan uygun şekilde (anestezi, travay veya uygun şekilde bağlanarak) zapturapta alınarak prepusyum bölgesinin kılları kesilir ve serum fizyolojik ile temizlenerek kurulanır. Elektro-ejakülatörün üç elektrotlu rektal probu kayganlaştırılarak rektuma yerleştirilir ve manuel olarak penis prepusyum dışına alınır. Prop rektuma yerleştirildikten sonra 2-3 saniyede bir, aşamalı olarak 12 volta kadar artış gösterebilen akım verilir. Bireysel farklılıklarla birlikte, genellikle 5-7 uyarım sonucu ejakülasyon gerçekleşir. Uyarımlar arası penil masaj yapılarak ereksiyon olmadan ejakülasyon uyarılır. Bu yöntemle ejakülasyon uyarılırken eklenti üreme bezleri de uyarılır. Buna bağlı olarak, eklenti üreme bezlerinin salgısı da spermaya karışır ve suni vajina yöntemi ile karşılaştırıldığında, daha yüksek hacimde sperma elde edilir (İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

2.2. Koç Sperması ve İçeriği

Memeli spermatozoonu, genetik materyali taşıyan haploid yapıdadır. Spermatogenezisin son aşamasında seminifer tübüllerde bölünme yeteneğini yitirerek spermiyogenezis aşamasında son şeklini alan spermatozoonlar, baş ve kuyruk olmak üzere iki ana bölümden oluşur. Oval ve basık yapıdaki baş kısmında, genetik materyali

barındıran çekirdek ve fertilizasyonda önemli rol oynayan hyaluronidaz, korona penetrating enzim ve tripsin gibi enzimleri içeren akrozom bulunur. Histolojik olarak, hücre membranı, dış akrozomal membran, post-nükleer kap bölümünde dış akrozomal membran ile birleşen iç akrozomal membran, iki akrozomal membran arasında akrozom içeriği, nükleer membran, nükleus ve implantasyon çukurluğundan oluşmaktadır (İleri ve ark., 2000; Kaya ve ark., 2014). Memeli spermasının hücre uzunluğu yaklaşık olarak 28,3 – 356,3 µm'dir. Koç spermasının ise başı 8,2 µm, orta bölümü 14 µm ve kuyruk bölümü ise 65 µm uzunluğundadır (Bedfoed ve Hoskins, 1990).

Spermatozonun devinimini sağlayan kuyruğu, boyun, orta, asıl kuyruk ve kuyruk sonu olmak üzere dört bölümden oluşur. Boyun bölümü, implantasyon çukurluğu bölgesinde başı kuyruğa bağlayan kapitulum ve fibril yapılarını içerir. Orta bölümünde aksonemayı heliks şeklinde saran spermatozoanın enerji gereksinimini karşılayan mitokondriyalar (mitokondrial heliks), sentrioller ve fibriller bulunur. Orta bölüm, annulus ile asıl kuyruğa bağlanır. Asıl kuyruk bölümü; motiliteden sorumlu aksonema, yoğun lif katı ve fibröz kılıftan oluşmaktadır. Kuyruğun son bölümü ise aksonema ve plazma membranından oluşur (İleri ve ark., 2000; Kaya ve ark., 2014).

Koçlarda ampulla duktus deferens, prostat, veziküla seminalis ve bulbo üretral bez olmak üzere eklenti üreme bezlerinin tümü bulunur. Koç ejakülatı, içinde spermatozoonların bulunduğu testiküler doku ve bu eklenti üreme bezlerinden köken alan sıvılardan (seminal plazma) oluşur. Büyük bölümünü eklenti bezlerinin salgılarından oluşan seminal plazmanın içeriği hayvanlar arasında farklılık gösterir (Hafez, 2000; Soleilhavoup ve ark., 2014). Seminal plazma spermatozoonlar için besleyici ve koruyucu bir ortam oluşturur. Genital kanaldan köken alan epitel döküntüler ve büyüme faktörleri içeren seminal plazmada çok yüksek düzeyde sitrik asit, ergotiyonin, früktoz, gliserilfosforilkolin ve sorbitol; yüksek düzeyde askorbik asit, aminoasitler, peptitler, proteinler, lipitler, yağ asitleri ve sayısız enzimler bulunur. Ayrıca, farklı düzeylerde androjenler, östrojenler, prostaglandinler, folikül stimüle edici hormon, lüteinleştirici hormon, koryonik gonadotropin, büyüme hormonu, insülin, glukagon, prolaktin, relaksin ve tiroid uyarıcı hormon gibi çeşitli steroidal ve

non-steriodal hormonları da içerir (Hafez, 2000; Pohanka ve ark., 2002; Owen ve Katz, 2005).

2.2.1. Seminal Plazmada Bulunan İnorganik Maddeler

Seminal plazmada bulunan Na, Cl, Ca, Mg ve Zn gibi inorganik maddeler, hücre metabolizmasında ve hücre içi ve hücre dışı ozmotik basıncının dengelenmesinde etkilidir. Kanal reseptörleri aracılığıyla hücre içine giriş çıkış yapan Na^+ , K^+ , Ca_2^+ , Mg_2^+ Cl^- gibi iyonlar, koçun da dahil olduğu birçok türün sperm motilitesini etkilemektedir (Pegg, 2002). Sperm motilitesi, metabolik fonksiyonlar, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyonda etkin olan inorganik maddeler eklenti üreme bezlerin salgılarında yoğun olarak bulunur. Bu maddeler çok sayıda fizyolojik, biyokimyasal olguda katalizör olarak görev alırlar (Gagnon ve de Lamirande, 2006; Ho ve Suarez 2001; Murarka ve ark., 2015; N'Guessan, 2016; Valsa ve ark., 2012) .

Ekstraselüler ortamda Na^+ ve Cl^- bol miktarda iken; hücre içinde ise K^+ ve P daha fazla bulunmaktadır. Ekstraselüler sıvıda bulunan başlıca katyon Na, seminal plazma ile sperm arasında madde alışverişinde görev alır. Na^+ hücre içi ve hücre dışı pH'nın dengede tutulmasında etkilidir. Ayrıca, hücre dışı ortamın ozmolaritesinin sürekliliği ve spermanın metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rolleri vardır. Klor, sodyum ve potasyum katyonlarının hücre dışında dengede bulunmasını sağlayan temel anyondur. Homeostazis, spermatogenezis ve kapasitasyonda yer almaktadır (N'Guessan, 2016).

Kalsiyum, epididimisteki immotil spermatozoaların hücre membranı üzerindeki proteinlerine bağlanarak hücre içi solunumu uyarır ve flagellumun kontraktıl bölümünün stimülasyonunu sağlar. Plazma membranında bulunan bikarbonat (HCO_3^-) sperm fonksiyonları üzerine uyarıcı bir etkiye sahiptir (Gagnon ve de Lamirande, 2006). Biyokimyasal olarak HCO_3^- intraselüler pH değerini yükseltmesi ile hücre arası Ca^{2+} ve cAMP'ı artıran olaylar zincirini başlatarak sperm motilitesini uyarır (Gagnon ve de Lamirande, 2006; Ho ve Suarez, 2001). Hücre içinde bulunan potasyum hücrenin repolarizasyonunda kilit rol oynamaktadır. Kanal reseptörleri aracılığıyla sodyum ve kalsiyumun hücre içerisine girmesiyle depolarize olan hücreler, potasyum akışı ile birlikte repolarize olmaktadır (N'Guessan, 2016).

Magnezyum ATP üretiminde ve anaerobik glikolizde görev alan enzimler için gereklidir. Enerji metabolizmasındaki, etkisi nedeniyle sperm motilitesi üzerine de etkilidir. Spermanın canlılığını koruyabilmesi için intrasellüler ortamda magnezyumun uygun yoğunluklarda bulunması gerekmektedir (Valsa ve ark., 2012). Birçok hücre ve dokularda 300'den fazla enzim için kofaktör olarak görev yapan çinko elementi, DNA replikasyonu, RNA polimerazlar, protein sentezi gibi birçok metabolik işlemlerde görev yapmaktadır. Hücre çoğalması, protein sentezi ve büyüme işlemlerinde de çinkoya gereksinim duyulmaktadır. Seminal plazmada bulunan çinko, hücre membranı ve spermatozoanın nükleer kromatin yapısının düzenliliğini sağlamaktadır. Aynı zamanda antibakteriyel etkisinin olabileceği de düşünülmektedir (Murarka ve ark., 2015).

2.2.2. Seminal Plazmada Bulunan Organik Maddeler

Seminal plazma yapısında, testiküler doku ve eklenti üreme bezlerinden üretilen karbonhidratlar, amino asitler, peptidler, proteinler, lipitler, yağ asitleri, vitamin ve enzimler gibi sayısız aktif bileşen bulundurur. Bu bileşenlerin, spermanın üretiminden, devinim yeteneğini kazanarak fertilizasyon aşamasına, hatta implantasyona kadar şekillenen fizyolojik olgularda etkin rolleri bulunur. Ayrıca, spermatozoonları iç ve dış ortamdan kaynaklanan zararlı etkenlere karşı korurlar (Hafez, 2000; İleri ve ark., 2000; Soleilhavoup ve ark., 2014).

Yapılarında karbon, hidrojen ve oksijen içeren karbonhidratlar canlıların birincil enerji kaynaklarıdır. Mono, di, tri, poli ve heterosakkaritler olmak üzere beşe ayrılırlar. Ayrıca hücre zarında glikolipit ve glikoprotein formunda yer alırlar (Altınışık, 2010; Jequier, 1994; Mayes, 1993; Seven, 2012, Zengin, 2012). Spermatozoa früktoz, glikoz ve mannozu laktik aside metabolize ederek enerji kaynağı olarak kullanır. Koç seminal plazmasında yüksek düzeyde früktoz bulunur. Spermanın enerji metabolizmasında etkin rolü olan früktoz, ejakülasyon sırasında veziküla seminalisten salgılanarak spermaya karışır (İleri ve ark., 2000; Setchell, 2014).

Genellikle epididimis ve eklenti üreme bezlerinden salgılanan protein ve peptitler, seminal plazmada kandakinden daha az bulunmaktadır. Koç seminal plazmasında 700 den fazla protein bulunur. Bu proteinler, spermanın üretilmesinden,

dişi genital kanalda taşınması ve fertilizasyona kadar birçok aşamada rol alır (Hafez, 2000; Soleilhavoup ve ark., 2014; Setchell, 2014). Embriyonik gelişimin tüm aşamaları, hücrel ve moleküler olgular tarafından koordine edilen gen ekspresyonları sonucu şekillenir (Bromfield, 2014). Dişi genital kanaldaki spermatozoonlar, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve aktivasyon gibi kimi yapısal ve fizyolojik değişikliğe uğrayarak fertilizasyon yeteneği kazanır (İleri ve ark., 2000). Leptin, insülin benzeri büyüme faktörü-1, fosfolipit bağlayıcı proteinler ve heparin bağlayıcı proteinler kapasitasyonda etkilidir. Ayrıca seminal plazma bulunan granülosit makrofaj-koloni uyarıcı faktör (Robertson ve ark., 2001), lösemi inhibe edici faktör (Lavranos ve ark., 1995), interlökin 6, dönüştürücü büyüme faktörü β , tümör nekroz faktörü α (Hardy ve Spanos, 2002), dönüştürücü büyüme faktörü alfa (Schultz ve Heyner, 1993), insülin, insülin benzeri büyüme faktörü (Harvey ve Kaye, 1992), epidermal büyüme faktörü (Brice ve ark., 1993) ve heparin bağlayıcı-epidermal büyüme faktörü benzeri büyüme faktörü proteinlerinin erken embriyolojik gelişim ve implantasyonda da etkin görevleri bulunmaktadır (Bromfield, 2014). Buna ek olarak, seminal plazmada glutamik asit ve antioksidan özelliği olan hipotaurine gibi aminoasitler ve karnitin gibi azot içeren bileşikler de bulunmaktadır (Setchell, 2014).

Seminal plazmada fertilitiyi olumsuz etkileyen spermatozoanın metabolit artıkları, yangı sonucu oluşan moleküller, progesteron ve prostaglandin E gibi bazı hormonlar kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunda görev alan kimi peptit, steroidal veya non-steroidal yapılar da bulunmaktadır (Fujihara ve ark., 2018; Hafez 2000; İleri ve ark., 2000).

Spermatozoanın yapısal fonksiyonları ve metabolizması için gerekli maddelerden oluşan koç seminal plazması, proteinlerin dışında, önemli miktarda doğal yağları ve yağ asidi formundaki fosfolipitleri içermektedir. Steroidlerin çoğu epididimisten salgılanırlar. Koç seminal plazmasında, fosfotidilkolin, domuz seminal plazmasında lesitin yoğunluktadır. Boğa seminal plazmasında ise bu iki fosfolipid de eşit olarak bulunmaktadır. Progesteron, dihidrotestosteron, östrojen gibi steroidler, kan içeriğinden daha fazla seminal plazmada görülmekteyken, testosteron kan plazması ile benzer yoğunlukta bulunmaktadır (Setchell, 2014).

Seminal plazmada türler arasında farklı düzeylerde suda eriyen tiamin (B1), riboflavin (B2), pantetonik asit (B3) ve niasin (B5) gibi B kompleks ve C vitaminleri yanında A, D ve E gibi yağda eriyen kimi vitaminler de bulunmaktadır (İleri ve ark., 2000; Karakuş ve ark., 2016). Ayrıca, seminal plazma, dişi genital kanalının kan akımını artıran faktörler ve immünosupresif özelliği olan maddeleri de içerir (Gordon, 2004).

2.3.Spermatolojik Muayene

Erkek hayvanın dişi hayvanı gebe bırakması olarak tanımlanan fertilite, anne ve babanın genetik, yaş, bakım ve beslenmesi, çevresel faktörler ile uygulayıcı ve yetiştiriciye bağlı nedenlerden etkilenmektedir (Hafez, 2000; İleri ve ark., 2000; Nur, 2011). Koçların fertilite yeteneğinin belirlenmesinde, genital organ muayenesi ve çiftleşme yeteneği gibi klinik muayene yanında, spermatozoon yoğunluğu, ejakülatta bulunan toplam hücre sayısı, spermatozoon motilitesi, ileriye doğru devinimin hızı, ölü/canlı spermatozoa oranı, akrozom ve diğer morfolojik bütünlüğü değerlendirilir. Bunun yanı sıra, DNA niteliği, enzimatik aktivite, ozmotik stres testleri (Hypoosmotic Swelling Test; HOST), yüksek veya düşük ısılarda inkübasyon testleri, artırılmış akrozom reaksiyon oranı, mukus veya jel penetrasyon testi ve hamster yumurta penetrasyon testi gibi çoğu hücrenin motor sistemi, metabolizması ve membran bütünlüğü ile ilgili spermatolojik testlerden yararlanılır. Klinik muayenenin, spermanın muayenesi ile desteklenmesi, bireyin fertilite yeteneği hakkında elde edeceğimiz verilerin gerçeğe daha yakın olmasını sağlar (Hafez, 2000; Horward ve Pace, 1988; Nur, 2011; İleri ve ark., 2000).

Spermanın dişi genital kanalda yaşam süresi ve fertilite arasında sıkı bir ilişki vardır. Motilite, canlı kalma süresi (viabilite) ve morfolojik bütünlüğün sürekliliği ile ilintilidir (Nur, 2011). Beslenme, çevre ısısı ve mevsim, sperma alma sıklığı, sperma alınırken hayvana yapılan muamele, damızlığın sağlık durumu, nakli, yaşı, ön sekret, sperma alma öncesi boşa atılması, kullanılan malzemenin asepsi ve antisepsisi, sperma alma sırasında ortamın ısısı, su, nem ve güneş ışığı spermanın niteliğini olumsuz etkilediğinden, sperma alınır alınmaz değerlendirilmelidir (Hafez, 2000, İleri ve ark., 2000; Nur, 2011).

Erkek hayvanın kısa bir dönem içinde çok sayıda dişiyi tohumlayabilmesi nedeniyle erkek donörün fertilite yeteneğindeki bir düşüklük, bireysel olarak bir dişideki fertilite düşüklüğünden çok daha fazla ekonomik kayba neden olur. Bu nedenle, erkek hayvanın fertilite yeteneğinin ortaya konması çok önemlidir. Tek bir teste dayandırılarak damızlığın fertilite gücüne ilişkin bilimsel bir öngöründe bulunabilmek olası değildir. Bunun için bir dizi test yapmak ve bu testlere dayandırarak potansiyel fertiliteyi belirlemek gerekmektedir. Potansiyel fertilite yeteneği belirlenmesinde, genital organlarının sağlık durumunun değerlendirilmesi ve elde edilen ejakülatın spermatolojik muayeneleri, diğer memeli hayvanlarda olduğu gibi koçlarda da çok önemlidir. Ejakülattaki anormal yapı ve morfolojik bozuklukların infertilite ile doğrudan ilgili olduğu çok sayıda araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Klasik olarak hem doğal aşım hem de suni tohumlama amacıyla hayvanlardan alınan ejakülatın fertilite yeteneğini belirlemek için; spermanın makroskopik, mikroskopik, mikrobiyel ve fonksiyonel muayenesi yapılmaktadır (Hafez, 2000; İleri ve ark., 2000; Nur, 2011).

Ejakülattaki spermatolojik bulguların fizyolojik sınırlar içerisinde olmasına normospermi denir. Sağlıklı bir koç ejakülatının ortalama $>0,5$ ml hacmi; $\geq 2 \times 10^9$ spermatozoa/ml yoğunluğu, $\geq 80\%$ motilitesi vardır ve $\geq 80\%$ sağlam morfolojisi olan spermatozoa içerir. Spermatolojik değerlerin hafiften orta dereceye kadar farklılık göstermesine dispermi denir (Hafez, 2000; İleri ve ark., 2000; Nur, 2011).

2.3.1. Makroskopik muayene

Makroskopik muayene başlığı altında spermanın hacmi, rengi, kokusu ve kıvamı gibi görsel muayeneler yer almaktadır. Kimi kitaplarda sperm yoğunluğu çok yüksek olan koç ve teke spermasının kitle hareketi makroskopik muayene başlığı altında değerlendirilmektedir (İleri ve ark., 2000).

2.3.1.1. Hacim

Ejakülatın toplam hacmi, spermatozoa, testis kanal sistemi ve eklenti üreme bezleri hücre döküntü ve sıvılarından oluşur. Elde edilen ejakülat niceliği; ırk, yaş, sperma alma sıklığına, seksüel uyarım derecesine, sperma alma yöntemine, beslenme durumuna, hastalıklara, mevsime ve bireysel farklılıklara göre değişiklikler

göstermektedir. Ejakülasyonun ardından spermanın hacmi dereceli sperma toplama kadehlerini skalasından mililitre cinsinden okunur (Hafez, 2000; İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

Ejakülasyonun şekillenememesi olgusuna aspermia adı verilir. Koçun bir ejakülasyon sonunda verdiği toplam sperma hacmi 0,5 -2 ml arasında (normospermia) değişir. Tür için beklenen hacimden daha düşük olmasına hipospermia, daha yüksek olmasına hiperspermia olarak adlandırılır (İleri ve ark., 2000; Nur, 2011).

2.3.1.2. Renk

Türlere göre spermanın rengi değişmekle birlikte, ejakülattaki sperm yoğunluğuna bağlı olarak spermanın rengi açık krem rengi ile koyu krem rengi arasında değişkenlik göstermektedir. Ankara keçisi, İsviçre esmeri gibi kimi türlerde spermanın rengi sarı gözlemlenmekle birlikte, merada beslenen hayvanlarda beta karotenden kaynaklı spermada sarı renk görülmektedir. Ejakülatın tür için kabul edilen normal renk dışındaki renk değişiklikleri patolojik olarak değerlendirilir. Spermanın pembe, kırmızı kahverengi renkte olması, spermaya kanamadan ileri gelen kanın (hemospermi), sarı renk idrarın (ürospermi) ve yeşilimsi bir renk olması irinin (piyospermi) karıştığını göstermesi gibi pratikte karşılaşılan başlıca patolojik renk değişiklikleridir (İleri ve ark., 2000; Nur, 2011; Sönmez, 2013).

2.3.1.3. Koku

Sağlıklı bir hayvandan elde edilen spermanın kendine özel ve aromatik bir kokusu vardır. Spermadan alınacak anormal bir koku (dışkı, idrar, irin, kokuşma vs.), içine yabancı bir maddenin karışması nedeniyle olabileceği gibi, hayvandaki bir rahatsızlıktan kaynaklı da olabileceği için, bu konuda dikkat edilmesi gerekmektedir (İleri ve ark., 2000; Nur, 2011; Sönmez, 2013).

2.3.1.4. Kıvam (Viskozite)

Viskozite terimi herhangi bir sıvının akmaya karşı direncinin anlatımıdır. Spermanın kıvamı ejakülatın akışkanlığı ile ölçülür. Viskozite ejakülatın yoğunluğuna, yani bir ejakülattaki spermatazoon sayısı ile doğrudan ilişkilidir. Boğa spermasının, yoğunluğuna bağlı olarak, 1,7-10,5 centipoise viskozitesi vardır. Bir

ejakülatında, birim hacimdeki spermatozoon sayısı daha yüksek olan koçların sperm viskozitesi daha yüksektir (İleri ve ark., 2000; Nur, 2011; Sönmez, 2013).

2.3.1.5. Kitle Hareketi (Mass Aktivite)

Özellikle birim hacim içerisinde çok fazla spermatozoon içeren koç, teke, boğa gibi hayvanlarda, dış bakı ile kitle hareketi gözlemlenmesi nedeniyle kimi kitaplarda makroskopik muayene başlığı altında değerlendirilmektedir. Kitle hareketi çoğu eserde mikroskopik muayene başlığı altında değerlendirilmektedir. Makroskopik olarak sperma eldesinin hemen ardından toplama kadehi ışık arkadan gelecek şekilde avuç içerisinde tutulur, kadeh içerisinde kaynama ve girdap hareketleri gözlenir. Bu kitle hareketinin belirgin olması spermanın motilitesi ve yoğunluğu hakkında olumlu bir bilgi vermektedir (İleri ve ark., 2000; Nur, 2011; Sönmez, 2013).

2.3.2. Mikroskopik Muayene

Spermanın motilite, morfoloji ve dişi genital kanalda yaşam süresi ile fertilizasyon oranı arasında sıkı bir ilişki vardır. Maksimum fertilizasyon oranı elde etmek için ovulasyon anında, ovidukta yeterli sayıda kaliteli sperma hücresinin bulunması gerekir. Spermanın niteliğini belirlemek amacıyla değişik özellikleri olan mikroskop, fotometre, sperma analiz sistemi gibi gelişmiş alet ve yazılımlara gereksinim duyulmaktadır. Spermanın kitle hareketi, motilite, yoğunluk ve morfolojik muayeneleri, temelde ışık ve faz kontrast mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildiğinden mikroskopik muayeneler başlığı altında değerlendirilmektedir (İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

2.3.2.1. Kitle Hareketi (Mass Aktivite)

Spermanın kitlesel olarak yapmış olduğu kaynama veya dalgalanma hareketine kitle hareketi (mass aktivite) adı verilir. Kitle hareketi ile motilite, yoğunluk ve fertilité arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır (Christensen ve ark., 1999; İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013). Bu nedenle, kitle hareketinin gözlemlendiği koç, teke ve boğa gibi bazı türlerde önemi büyüktür. Herhangi bir işlem uygulanmamış taze spermada bu inceleme yapılabilir. Muayene amacıyla, ısıtılmış temiz lam üzerine bir damla taze sperma damlatılır. Hazırlanan lam, ısıtma tablalı ışık mikroskobu veya faz

kontrast mikroskop altında x10'luk büyütmede incelenir. Spermanın yoğunluğu ve devinim hızına göre +, ++, +++ ve ++++ olarak değerlendirilir. Sağlıklı koç ve teke spermasında +++ ve üzeri kitle hareketi gözlemlenir (İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

2.3.2.2. Motilite

Motilite sağlıklı bir spermatozoonun temel koşuludur. Spermanın dişi genital kanalında ilerleyerek fertilizasyon noktası olan oviduktun ampullasına kadar gelebilmesi, oosit yüzeyinde bulunan kumulus hücreleri ve zona pellusidayı geçişinde, dolaylı olarak başarılı bir gebeliğin elde edilmesinde büyük bir önemi vardır (İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

Spermatozoa hareket çeşidine göre; ileri doğru hareket (lineer), ileri hızlı (progressif), yerinde durarak dairesel hareket edenler (sirküler), yerinde durarak titreşenler (vibratör), geriye doğru hareket edenler (revers), hareketsiz (statik) diye de sınıflandırılır. Motilite, sperma içerisindeki belirli bir hız ve güç ile başı yönünde ileriye doğru hareket eden spermatozoa oranının % olarak anlatımıdır. Diğer bir deyişle, lineer ve progressif hareket biçimi olan spermatozoa oranıdır (İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

Taze koç spermasının motilitesi genellikle >%80'dir (İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013). Spermanın motilite düşüklüğüne astenozoospermi denir (Nur, 2011). Astenozoospermi olan sperma örnekleri dondurma amaçlı kullanılmaz. Günümüzde spermatozoanın hızı, hareket şekli, yoğunluğu ve sulandırma oranı hakkında ayrıntılı bilgi veren gelişmiş sistemler bulunmaktadır. Temelde ısıtma tablalı faz kontrast mikroskop, kamera, yazılım ve bilgisayar birimlerinden oluşan bu sistemlerin motilite yanında, sonuçları karşılaştırma, saklama ve grafik şeklinde verebilme özellikleri de bulunmaktadır (Hafez, 2000; Nur, 2011). Motilite muayenesi, özellikle yoğun olan ejakülatlarda sperma birkaç kat sulandırıldıktan sonra yapılır. Mikroskopik olarak motilite muayenesi yapılacak sulandırılmış spermadan bir damla lam üzerine damlatıldıktan sonra üzeri lamel ile kapatılarak ısıtma tablalı faz kontrast mikroskop ve x400 büyütmede değerlendirilir. Gerçekçi bir değerlendirme için, lamelin kapatılması ve titreşimden kaynaklanan akışın durması beklendikten sonra, preperatın

3 farklı alanı dikkate alınarak objektif olarak yapılır (İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

Motilite değeri bireyler arasında farklılıklar gösterebilir. Bu nedenle, istenilen düzeyde fertilite elde edebilmek için, motil spermatozoa sayısı dikkate alınarak tohumlama dozu ayarlanır (Hafez, 2000; İleri ve ark., 2000). Isı ve soğuk gibi çevresel faktörler kadar, sulandırıcının ozmotik basıncı ve sulandırıcının bileşenleri de motilite sonuçlarını etkiler. Ayrıca; ejakülatın içeriği, alındığı hayvanın sağlığı, sperma alma biçimi, sulandırıcı çeşidi, hijyen, ışık ve ısı gibi çok sayıda iç ve dış faktör de motiliteyi etkiler. Özellikle fizyolojik veya patolojik olaylar sonucu açığa çıkan reaktif oksijen parçacıkları, hücre zarı fosfolipitlerine bağlanıp dejenere olmuş yağ asitlerinin ortaya çıkmasına neden olarak peroksidlerin üretimine yol açar. Açığa çıkan peroksidler ve diğer dejeneratif etkili ürünler spermanın motilitesini olumsuz etkiler (Nur, 2011).

2.3.2.3. Spermanın Yoğunluğu

Sperma yoğunluğu birim hacimde bulunan spermatozoon sayısıdır. Sperma yoğunluğu hemositometrik, fotolemetrik, elektronik sayaç yöntemi gibi değişik yöntemlerle saptanmaktadır. Spermatozoon yoğunluğu, spermanın sulandırma oranının belirlenmesi ve uygun biçimde en ekonomik olarak dozlanabilmesi için önemlidir (İleri ve ark., 2000; Nur, 2011).

Spermanın yoğunluğu, sperma alma yöntemi, yetersiz seksüel uyarım, çok sık sperma alımı, yaş, beslenme ve iklim koşulları gibi faktörler etkilemektedir (Hafez, 2000; McDonald ve Pineda, 1989; Sönmez, 2013). Koç ejakülatının yoğunluğu $2-3 \times 10^9$ spermatozoa/ml dolaylarındadır (normozoospermia). Ejakülatta spermatozoanın bulunmaması durumuna aspermi denir. Normal yoğunluktaki ejakülatlar normozoospermia, normalden daha düşük yoğunluğu olan ejakülatlar oligozoospermia ve normalden daha yüksek yoğunluğu olan ejakülatlar polizoosperma olarak değerlendirilir (Nur, 2011).

Yeterli düzeyde fertilite elde edebilmek için tohumlama dozundaki motil spermatozoa sayısı çok önemlidir. Taze ve donmuş sperma için bir tohumlama dozunda servikal tohumlama için en az 200×10^6 , laparoskopik tohumlama için en az 100×10^6 motil spermatozoa bulunması gerekir (Nur, 2011).

2.3.2.4. Ölü/Canlı Spermatozoa Oranı

Canlılık, spermanın niteliği için önemli bir belirteç ve başarılı bir dölleme için ön koşuldur. Hücre zarı, spermatozoanın diğer hücre ve ortamı ile etkileşimde olup spermatozoanın canlılığı doğrudan hücre zarı bütünlüğü ile ilişkilidir. Bu nedenle, ölü spermatozoonların ayırt edilmesinde eozin-nigrozin, propidyum iodid, karboksifluoresin diasetat gibi mikroskopiye dayalı ve hücre zarı geçirgenliği ile ilgili vital boyalardan yararlanılır. Membran bütünlüğüne göre farklı davranan bu boyalar, kullanılan boya miktarı, lamın ısısı, frothinin kalınlığı, kuruma sıcaklığı, sperma sulandırıcısının yapısı ve spermatozoa sayısı sonuçları etkilemekte, yöntem ve uygulayıcılar arası farklılıklar bulunmaktadır (Nur, 2011).

Hareketli spermatozoa canlı olarak nitelendirilse bile, membran geçirgenliği bozuk olabilmektedir. Bu nedenle, ejakülattaki canlı spermatozoa oranı fertilitenin belirlenmesinde motiliteyi destekler niteliktedir. Ejakülatta bulunan spermatozoanın tümünün ölü olması durumuna nekrozoospermia adı verilir. Normal koç ejakülatının canlı spermatozoa oranı >%80 olmalıdır. Ölü hücreler serbest oksijen parçacıklarının artışına neden olarak sperm membran yapısını bozar. Bu nedenle, ölü spermatozoa oranı yüksek olan ejakülatlar, tohumlama amacıyla kullanılmamalıdır (Tekin, 1994; Tümen ve ark., 1991).

2.3.2.5. Morfolojik Muayene

İstenilen düzeyde gebelik elde edebilmek için, motilite tek başına yeterli değildir. Morfolojik olarak anormal olan spermatozoonların fertilite yetenekleri bulunmadığından, morfolojik değerlendirmelerin spermanın potansiyel fertilitesinin belirlenmesinde büyük önemi vardır. Tohumlamada kullanılacak her ejakülatın morfolojik değerlendirmelerden geçmesi gerekmektedir; fizyolojik sınırlar dışında olanlar kullanılmamalıdır. Sağlıklı spermada her zaman %5-10 arasında morfolojik bozukluğu olan hücreler bulunmasına karşın, bu oran %20'yi geçmemelidir. Spermadaki morfolojik bozukluk oranının yükselmesi ile birlikte fertilizasyon oranı düşer (Nur, 2011).

Gimza, çini mürekkebi, metilenblue, opakblue, fast green gibi değişik boyama tekniklerinin yanında, Hancock'un formalin solüsyonu, Hayem eriği gibi bazı tespit solüsyonları morfolojik muayene amacıyla kullanılmaktadır. Muayenede kullanılan malzemelerin ısısı, pH, boyama süresi ve yöntemi gibi faktörler sonuçları etkilemektedir (Nur, 2011).

Sperm anomalilerinin akrozom, baş, boyun, orta bölüm ve kuyruk gibi bulundukları yere göre sınıflandırması yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bölümlerden herhangi birinde olan bir değişiklik anormal olarak sayılır. Buna göre morfolojik bozukluklar; akrozoma, başa, implantasyon çukurluğuna, başın orta bölüme bağlanmasına, orta bölüme ve kuyruğa bağlı bozukluklar olarak sınıflandırılır. Bazı eserlerde morfolojik bozukluklar; birincil bozukluklar; spermatogenezis sırasında, ikincil bozukluklar; spermatozoanın kanal sisteminden geçişi sırasında ve üçüncül bozukluklar da ejakülasyon sırasında veya sonrasında (spermanın alınması, sulandırılması, dondurulması, depolanması vb) şekillenenler olmak üzere üç başlık altında sınıflandırılmaktadır. Bu yöntemde anormal baş, orta bölümün abaksiyal bağlanması, kuyruğun kuvvetli kıvrılması gibi spermatogenezis hatasından ileri gelen bozukluklar birincil bozukluklar olarak sayılırken; ayrılmış baş, distal damlacık, kıvrık kuyruk gibi kanal sisteminden ileri gelen bozukluklar ikincil bozukluklar olarak değerlendirilir. Akrozom bozuklukları, kopuk kuyruk, kuyruk şişmesi vb. ısı ve ozmotik basınç değişikliği sonucu şekillenen bozukluklar da üçüncül tip bozukluklar olarak sayılır (Hafız, 2000; Nur, 2011; Özkoca, 1984). İnfertiliteye neden olan (majör) ve infertiliteye neden olmayan (minör) bozukluklar sınıflandırma tekniğinde ise özellikle baş ve akrozoma bağlı bozukluklar infertilite nedeni olup majör bozukluklardan sayılır (Nur, 2011; Özkoca, 1984). Spermada gözlemlenen morfolojik bozukluklar akrozom, baş, boyun ve kuyruk bölümlerine göre ayrı sınıflandırılmaktadırlar. Akrozom bozuklukları; dejenere akrozom, granüllü akrozom veya akrozom yokluğu, baş bölgesi; armut baş, kopuk baş ve kürek baş, boyun bölgesi; bağlantı kusurları, proksimal ve distal protoplazmik damlacık ve kuyruk bölgesi; kopuk kuyruk, kırık kuyruk, çift kuyruk vb morfolojik bozukluğun lokalize olduğu bölgeye göre gözlemlenen morfolojik bozukluklara örnek olarak verilebilir (İleri ve ark., 2000; Özkoca, 1984).

Fertilizasyondaki önemli etkileri nedeniyle spermatozoanın baş kısmının büyük bölümünü kaplayan akrozomal yapının morfolojik incelemelerde ayrı bir önemi vardır. Bu yapı, fertilizasyon sırasında spermatozoanın oosit katmanlarını geçerken gerekli olan hiyaluronidaz, korona delici enzim, nöraminidaz ve tripsin gibi çok sayıda farklı etkili enzimleri içerir. Bu enzimler akrozom reaksiyonu sonucu ortaya çıkarlar ve penetrasyon öncesi spermatozoondan ayrılarak etkilerini gösterirler. Akrozomal yapı spermatozoonunun yaşlanması sulandırılma, soğutma ve dondurma eritme işlemlerinden kaynaklanan zararlı etkilere bağlı olarak fertilite kaybı oluşabilmektedir (İleri ve ark., 2000; Hafez, 2000). Akrozom bütünlüğü faz kontrast mikroskoplarda veya diferansiyel interferans kontrast mikroskoplarla, ışık mikroskoplarıyla boyama yapılarak veya yapılmadan, in vitro koşullarda değerlendirilmektedir. Akrozomal yapının durumunu ortaya koymak için rutinde kullanılan faz kontrast mikroskopi ve Giemsa boyama, eozin nigrozin boyama, klor tetrasiklin, ricinus communis aglütinin I, Pisum sativum aglütinin (PSA), peanutaglütinin (PNA), concanavalin A ve soybean aglütinin gibi lektin içeren floresan boyalar ve elektron mikroskopi de kullanılmaktadır (Hafez, 2000; Lybaert ve ark., 2009). Lektinlerin bağlanma özellikleri; (a) bağlama yerlerinin sayısını ölçmek için radyo-etiketli türevlerin miktarının belirlenmesi; (b) ferritin, peroksidaz veya florokrom bağlı türevlerinin hücre yüzeyi üzerindeki dağılımı ve (c) hücrelerin lektinlerle aglütinasyon yeteneği ve şekli ile yarı nicel olarak değerlendirilir. Pisum sativum aglütinin ve peanut aglütinin gibi çeşitli lektinler memeli sperması akrozomunun değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Magargee ve ark., 1988). Bu lektinler, dış akrozomal membrandaki glukokonjugatlara veya akrozomal matrikse bağlanırlar ve bu özelliklerinden yararlanarak akrozomal bütünlük değerlendirilir. FITC-PNA yalnızca dış akrozomal membrana bağlanırken, FITC-PSA akrozomun hem dış membranında bulunan glukokonjugatlara ve hemde akrozomal matrikse bağlanır (Cheng ve ark., 1996).

2.3.3. Fiziko-Kimyasal Muayene

Fiziko-kimyasal muayene, alınan ejakülatın fiziko-kimyasal yapısı hakkında bilgi edinmek için gerçekleştirilen pH, metabolik aktivite ve dayanıklılık testleridir. Spermanın metabolik faaliyetleri sonucu şekillenen pH değişimleri, çeşitli pH belirleyici kağıtlar (turnosol) ve pH ölçüm cihazları ile belirlenmektedir. Hayvan

türlerine göre değişkenlik gösteren spermanın pH değeri koçlarda ortalama 5,9 – 7,3 değerleri arasındadır (İleri ve ark., 2000; Setchell, 2014).

Spermanın metabolik aktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla, metilen mavisi redüksiyon testi kullanılmaktadır. Bu testle kullanılan oksijenin miktarı değerlendirilmektedir. Yine metabolik aktivite hakkında bilgi edinmek amacıyla sperma içerisindeki früktozun ne ölçüde kullanıldığının değerlendirildiği früktolizis testi de kullanılmaktadır (İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

Spermanın düşük ve yüksek sıcaklıklarda ne kadar canlılığını koruyabildiğinin değerlendirildiği tuzlu su testi, termorezistans testi ve soğuk şoku testi gibi dayanıklılık testleri de kullanılmaktadır (İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013).

2.3.4. Spermanın Mikrobiyal Muayenesi

Memeli hayvanların spermasında belirli düzeyde saprofit özellikte bakteri içeriği bulunmaktadır. Testiküler doku, ürogenital kanal ve ejakulasyon sırasındaki kirleticilerden köken alan bu bakteriyel flora, sperma sulandırıcılarına eklenen streptomisin ve penisilin gibi çeşitli antibiyotikler yardımıyla kontrol altında tutulmaktadır. Sperma alınırken gerekli hijyene dikkat edilmemesi veya hayvanda bulunan sistemik ya da lokal hastalık etkenleri nedeniyle bu flora içerisindeki bakteri yoğunluğunun artması spermatozoonları olumsuz yönde etkiler. Kontamine ejakülatlar ile yapılan tohumlama işlemleri, tohumlanan ineklerde genital kanal enfeksiyonlarına neden olarak fertilité kayıplarına yol açabilir. Veneral yolla bulaşan şap hastalığı virüsü, sığır vebası virüsü, Mycoplasma mycoides gibi viral ve bakteriyel mikroorganizmaların ejakülatta bulunmaması gerekir. Veneral hastalığı olan hayvanların sperması üretimde kullanılmamalıdır. Damızlık hayvanların sağlığının izlenmesi amacı ile belirli aralıklarla prepusiyum akıntısı, ön sekret, sperma, kan, serum, idrar ve dışkı örnekleri alınarak soğuk zincir ve asepsi kurallarına uygun bir şekilde laboratuara gönderilir (Nur, 2011).

2.3.5. Spermanın Fonksiyonel Muayenesi

Veteriner androlojide spermatolojik değerlendirmeler, erkek hayvanın reproduktif organlarının sağlık durumunu araştırmak veya spermasının fertilizasyon

yeteneğini belirlemek amacıyla yapılır. Erkek damızlık materyalin fertilite yeteneğinin belirlenmesinde bireyin ejakülatı, ejakülatta bulunan toplam hücre sayısı, spermatozoon motilitesi, ileriye doğru devinimin hızı, ölü/canlı spermatozoa oranı, akrozom ve diğer morfolojik bütünlüğü gibi değerlendirmeler görsel olarak mikroskop ile değerlendirilir. Bunun yanı sıra, DNA kalitesi, enzimatik aktivite, ozmotik stres testleri (Hypoosmotic Swelling Test; HOST), yüksek veya düşük ısılarda inkübasyon testleri, artırılmış akrozom reaksiyon oranı, mukus veya jel penetrasyon testi ve hamster yumurta penetrasyon testi gibi testlerden de yararlanılır (Hafez, 2000).

Yüksek düzeyde fertilizasyon oranı elde etmek için, ovulasyon anında, ovidukta yeterli sayıda kaliteli fertilizasyon yeteneğini olan fonksiyonel sperm hücresinin bulunması gerekir. Yoğunluk, morfoloji ve motilite gibi standart sperma değerlendirme testleri fertilite hakkında az da olsa bir fikir vermektedir. Fertiliteyi belirlemek için kullanılan bu testler, spermatozoanın görünümündeki ve viabilitesindeki temel değişimleri ortaya koyarlar. Ancak hücrenin yapısal, biyokimyasal ve metabolik ayrıntılarını ya da membran işlevselliği açısından çevre ile etkileşim yeteneğini ortaya koymak için hücrenin devinim biçimi, spermanın dışı kanalda ilerleme gücü ve hücrenin donma yeteneği gibi test bulguları ile desteklenmesi gerekir. Bu testlerin çoğunda gelişmiş alet, gereç ve uzman personele gereksinim bulunmaktadır (Hafez, 2000; Nur, 2011).

2.3.5.1. Plazma Membran Dayanıklılığının Değerlendirilmesi

Spermiyogram, spermatozanın doğumla sonuçlanabilecek fertilizasyon yeteneğini ortaya koyabilmelidir. Bunun için spermaya ait ne kadar çok parametreye bakılırsa elde edilen bulgular o kadar değerli olacaktır. Sperma membranı, hücre içi ve dışı ortamların dengesinin sağlanması, motilite ve dışı genital kanal veya oosit-kumulus kompleksinin geçilmesi gibi dolaylı veya dolaysız olarak fertilizasyonda görev almaktadır (Hafez, 2000).

Spermatozoanın membranı tüm bir hücreyi sarmasına karşın; akrozom çevresini, akrozomdan sonra başın geri kalanını ve kuyruğu saran bölümü olmak üzere üç farklı yapıda bölümlerden oluşmaktadır. Spermatozoayı saran hücre membranının her bir bölümü, dışı genital kanalda migrasyon, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, kumulus hücrelerinin aşılması, fertilizasyon ve füzyon gibi fekdasyonun farklı

aşamalarında önemli işlevleri vardır. Hücrenin plazma membran bütünlüğünü değerlendirme amacıyla, eozin gibi supravital ve SYBR-14/propidium iodide gibi floresan boyalar yanında, hipo-osmotik şişme testi, water testi, zona-free hamster oosit testi ve servikal mukus penetrasyon testi gibi hücre zarı işlevsel bütünlüğünü değerlendirmeye yönelik yöntemler birçok çalışmada kullanılmıştır (Hafez, 2000; Sönmez 2013; Nur ve ark., 2005).

Fertilizasyon, çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik olayların yer aldığı karmaşık bir olgudur. Yarı geçirgen membran yapısı olan spermatozoonlar hipoozmotik bir ortama maruz kaldıklarında hücre içerisine sıvı girişi şekillenmekte ve baş bölümleri şişmekte, kuyruklarında ise kıvrılma şekillenmektedir (Nur ve ark., 2005). Bu ilkeye dayalı, Jeyendran ve ark. (1984) tarafından hipo-osmotik şişme testi (HOST), geliştirilerek memeli spermasının işlevsel bütünlüğünün değerlendirilmesinde etkin bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bu test ile işlevsel olarak sağlam membranı olan spermatozoanın hücre membranı aktif olarak görev alarak düşük ozmotik ortamda su alıp şişer. Water testin çalışma ilkesi aynı HOS test gibidir. Bu testte saf su kullanıldığından spermatozoa HOS teste göre daha düşük ozmotik ortamda tutulur (Nur ve ark., 2005).

Veteriner androlojide rutin mikroskopik muayeneler yanında floresan mikroskopi ve flow sitometrik yöntemlerin kullanımının her geçen gün popülaritesi artmakta ve sürekli yeni yöntemler geliştirilmektedir (Petrunkina ve Harrison, 2011).

2.3.6. Spermanın İnkübasyon Testleri

Doğrudan doğal aşım veya tohumlama sonrası gebelik sonuçlarına ya da hayvanın fiziksel muayenesi, libidosunun ve aşım yeteneğinin muayenesi, iç ve dış üreme organlarının muayenesi ve spermanın muayenesi gibi gebelik oranı ile ilgili parametrelere bakılarak fertilité yeteneği belirlenmeye çalışılmaktadır. İnfertilité hem dişiye hem de erkeğe bağlı nedenlerden ileri gelen bir üreme sorunudur. Maksimum fertilizasyon oranı elde etmek için ovulasyon anında, ovidukta yeterli sayıda motil ve morfolojisi sağlam nitelikli sperma hücresinin bulunması gerekir (Hafez, 2000).

Spermadan ileri gelen fertilité 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 motilite, viabilite yeteneği ve morfolojik bütünlüğün sürekliliği gibi spermatozoonun dışı genital kanalda ilerleme yeteneği ve yaşama süresi ile ilgilidir. Spermatozoon sayısının artırılması ile karşılanamayan nedenler de fertilizasyondan çok erken embriyonik ölümlerle ilgili olanlardır (Hafez, 2000; Sönmez 2013).

Canlı türlerine göre spermanın dışı genital kanaldaki yaşam süresi (viabilitesi) östrus süresine bağlı olarak değişiklik gösterir. Ovulasyon sırasında, ovidukta bulunan canlı spermatozoa oranı ile gebelik oranı arasında yüksek düzeyde bir ilişki bulunmaktadır. Taze koç spermasının, ortalama 30 ila 48 saat dışı genital kanalda canlılığının sürdüğü bildirilmektedir. Dondurulmuş spermatozoanın ömürleri taze spermaya göre daha düşüktür (Hafez, 2000).

Günümüzde çalışmalarda, çözülmüş spermanın viabilitesini belirlemek için 37°C, 20°C veya 5°C'de 3, 4, 5, 6 saat ya da gün bazında bekletilerek değerlendirmek rutin bir prosedür durumuna gelmiştir (Alcay ve ark., 2016b; Katila, 2001; Ohl ve Menge, 1996; Samper, 2008; Üstüner ve ark., 2016). Özellikle eritme sonrası spermanın viabilitesinin değerlendirilmesi, tohumlama sonrası vajina veya uterus içerisindeki geçireceği süre içerisinde ne gibi değişiklikler ile karşılaşacağı ve potansiyel fertilitenin belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Ohl ve Menge, 1996; Samper, 2008).

Eritme sonrasında spermanın inkübasyonunun ardından sperma motilitesi ile birlikte plazma membran bütünlüğü, akrozom bütünlüğü, mitokondriyal membran işlevler ve DNA bütünlüğü gibi çeşitli parametreler de incelenmektedir (Alcay ve ark., 2016b; Samper, 2008; Üstüner ve ark., 2016; Üstüner ve ark., 2018).

2.4. Spermanın Dondurulması

Memeli sperması sıvı, donmuş ve liyofilize olmak üzere farklı şekillerde ve değişik sürelerde saklanmaktadır. Sıvı saklama yönteminde, sperma olduğu gibi veya farklı özellikteki sulandırıcılar ile sulandırılarak 5°C gibi düşük ısılarda saklanır. Bu yöntem ile sperma yaşamsal aktivitesini ancak 2-3 gün koruyabilir. Donma yöntemi ise spermanın 0°C'ın altındaki ısılarda saklanması temeline dayanır. Uygun özellikte içeriği olan sulandırıcılarla sulandırılan sperma, ampul (-79°C etil alkol banyosunda),

pellet (-79°C kuru buzda) veya payet (-110°C sıvı azot buharında) yöntemiyle dondurularak -196°C ısıdaki sıvı azot içerisinde saklanır. Dondurarak saklama yönteminde, uygun saklama koşullarında sperma potansiyel fertilesini yıllarca koruyabilir (İleri ve ark., 2000; Nur, 2011; Sönmez 2013). Liyofilizasyon yöntemiyle spermanın saklanması ise, genetik materyali koruyarak spermanın basınç altında düşük ısılarda kurutulması temeline dayalıdır. Bu teknolojide, spermanın genetik materyali etkilenmeksizin oda koşullarında uzun süre saklanabilmektedir. Spermanın uzun süre saklanması, üstün genetik materyalin ülkeler arası transferine, evcil hayvanlar yanında nesli tükenmekte olan yabanıl hayvanların neslinin korunmasında da kullanılmaktadır (İleri ve ark., 2000; Kaneko ve ark., 2014; Nur, 2011; Sönmez, 2013).

Spermanın dondurulması insan, laboratuvar hayvanları, yabanıl ve evcil hayvanlarda yardımcı üreme tekniklerin yaygınlaşmasını ve uygulanabilirliğini artırmıştır. Gliserolün kriyoprotektif etkisi Polge ve ark., (1949) tarafından keşfedildikten sonra, memeli spermasını dondurmak amacıyla uygun sulandırıcıların geliştirilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (Pegg, 2002). Gerçekleştirilen çalışmalarda, koç spermasının başarılı bir şekilde dondurulduğu ve eritme sonrası yüksek oranda motilite elde edildiği, ancak tohumlama sonrası farklı düzeylerde fertilitite elde edildiği bildirilmektedir (Evans, 1988).

2.4.1. Spermanın Sulandırılması

Günümüzde gamet hücrelerinin saklanması amacıyla 5°C ısıda kısa süreli saklama, dondurma veya liyofilize ederek uzun süreli saklama yöntemleri kullanılmaktadır. Her iki yöntemde de memeli sperması, soğutma, dondurma, porsiyonlara ayırma, hacmini artırma, metabolik artıklarını elimine etme, enerji gereksinimini karşılama vb. amaçlarla sulandırılmak zorundadır. Sulandırılmış spermanın yaşamsal işlevlerini saklama ısısı, soğutma hızı, sulandırıcının kimyasal bileşenleri ve kullanılan kriyoprotektif maddeler belirler (Kaneko ve ark., 2014; Sönmez, 2013).

Sperm plazma zarının kolesterol düzeyi soğuk şokuna karşı direnci etkiler (Darin-Bennett ve ark., 1973). Darin-Bennett ve ark. (1973), spermatozoitlerdeki

kolesterol düzeyi ile spermatozoitlerin soğuk şokuna duyarlılığı arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında, insan ve tavşan spermatozoitlerindeki doymuş fosfolipit oranını, boğa ve koç spermatozoitlerindeki daha fazla olduğunu, buna bağlı olarak insan ve tavşan spermatozoitlerinin soğuk şokuna karşı daha dirençli olduklarını açıklamışlardır. Bu nedenle, dondurma protokolü spermatozoanın yapısı, hacmi, organel büyüklüğü ve bileşenlerindeki çeşitliliğe bağlı olarak türler arasında farklılık gösterir (Medeiros ve ark., 2002). Spermanın fiziko-kimyasal yapısı hem donma hem de eritme işlemleri sırasında şekillenen buz kristalleri nedeniyle zarar görür. Bu zararlı etkileri azaltmak için çeşitli pH tamponlayıcı maddeler (Tris-sitrik asit, sodyum-sitrat, sodyum bikarbonat, potasyum klorür, Hepes, vb), düşük molekül ağırlığına sahip hücre zarını geçebilen şekerler (früktoz, glukoz vb) ve membran-koruyucu maddelerin (gliserol ve diğer polialkoller, dimetilsülfoksit [DMSO], amino asitler vb) kullanıldığı farklı sulandırıcılar geliştirilmiştir (Aisen ve ark., 2000). Ayrıca, laktoz, sükroz ve dekstran, polietilen glikol (PEG), polivinilpirolidon (PVP) gibi non-permeating şekerler, antifriz proteinleri ve membran stabilizatörleri (yumurta sarısı, süt, lipitler ve aminoasitler) de sulandırıcılarda kullanılmıştır (Aisen ve ark., 2000). Koç sperması, farklı içerikte sulandırıcı ve kriyoprotektan kullanılarak dondurulmuştur (Salamon ve Maxwell, 1995).

2.4.1.1. Sulandırıcılarda Kullanılan Maddeler

Günümüzde yapılan çalışmalarda, hayvan türlerine göre sulandırıcılarda kullanılan maddelerin etkileri üzerine odaklanılmıştır. Düşük ısılardan kaynaklanan zararlı etkileri azaltarak eritme sonrası sperm niteliğini ve fertilesini artırmak amacıyla, sperma sulandırıcılarına farklı özellikte kriyoprotektanlar, tamponlayıcı solüsyonlar, yumurta sarısı, süt, şekerler, antibiyotikler ve antioksidanlar yaygın bir şekilde katılmaktadır (Alcay ve ark., 2016a; Sönmez, 2013).

Spermayı soğuk ortamın zararlı etkilerinden korumak amacıyla sulandırıcılara katılan kriyoprotektanların etkisi, soğutma hızına ve türe bağlı olarak değişmektedir (Hafez, 2000). Kriyoprotektanlar, moleküler ağırlığına göre düşük veya yüksek moleküler ağırlığı olanlar (Nash, 1966); hücre içine giriş yeteneklerine göre intrasellüler, eksrasellüler kriyoprotektanlar; hücre içine giriş hızlarına göre 30 dk gibi kısa sürede hücre membranını hızla geçen (metanol, etanol, etilen glikol, propilen

glikol, DMSO) kriyoprotektanlar ve hücre mebranını daha yavaş geçen (gliserol) kriyoprotektanlar olarak sınıflandırılabilirler (Meryman, 2007). Gliserol gibi suda çözünen kriyoprotektanların etkinliği, dondurulan hücrenin zar permeabilitesi ile, belirgin bir şekilde ısıya ve hücre tipine bağlıdır. Bu nedenle belirli koşullarda penetre olan kimi kriyoprotektanlar düşük geçirgen olarak sınıflandırılmaktadır. Mono-, oligo- ve polisakkaritler, mannitol, sorbitol, dekstran, hidroksietil nişasta (HES), metil sellüloz, albümin, jelatin, diğer proteinler, PVP, PEG ve polietilen oksit (PEO) ekstrasellüler kriyoprotektanlar olup hücre içine giremezler. Bundan başka, bazı kriyoprotektanlar yalnızca hücre duvarını geçerken kimileri sitoplazmik membranı da geçer. Böylece penetrasyon yeteneğine bağlı olarak kriyoprotektanlar; (1) hem hücre duvarını hem de sitoplazmik membranı geçenler (gliserol); (2) hücre duvarını geçen ancak sitoplazmik membranı geçemeyenler (mono- ve disakkaritler, aminoasitler); ve (3) hücre duvarını geçemeyenler (proteinler, polisakkaritler, PEO, dekstran, HES ve PVP) olmak üzere üçe ayrılırlar (Tao ve Li, 1986). DMSO, etilen glikol, gliserol ve 1,2 propandiolün farklı dozları spermayı soğuk ortamdan kaynaklanan olumsuz etkilerden korumak için sıklıkla kullanılmaktadır (Soylu ve ark., 2007; Alcaay ve ark., 2016b). Gliserol memeli spermasında genetik yıkıma yol açarak fertilitiyi düşürmesine karşın; çoğu araştırmada koç spermasının dondurulmasında en başarılı kriyoprotektan olduğu bildirilmiştir (Alcaay ve ark., 2016b; Barbas ve Mascarenhas, 2009; Nur ve ark., 2010; Soylu ve ark., 2007; Sönmez, 2013).

Fosfat ve sodyum sitrat solüsyonları gibi tampon maddeler, spermatozoonların kimyasal aktiviteleri sonucu ortaya çıkan ve ortamın pH değerini etkileyen atıkları nötralize ettikleri için, ortamın asit-baz dengesini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Günümüzde koç, teke, boğa, köpek gibi birçok hayvanın spermasının dondurulmasında Tris buffer solüsyonu, sitrik asit katkısıyla birlikte kullanılmaktadır (Sönmez, 2013).

İleri ve ark. (2000), süt lipitleri ve proteinlerinin yanı sıra, kazein iyonlarının da kriyoprotektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. İçerdiği lesitin ve B-lipovitellin gibi fosfolipit ve lipoprotein içeriği aracılığıyla, spermanın soğutulmaya başlaması ve soğuk şokunun zararlı etkilerinden koruma amacıyla yumurta sarısı da oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Lipit peroksidasyonunu azaltarak antioksidan özellik de

gösteren yumurta sarısı, aynı zamanda kolloidal yapısı nedeniyle spermatozoonların hareket kabiliyetini sınırlar; metabolizmayı yavaşlatır. Yumurta sarısı memeli sperması sulandırıcılarına %15-20 aralığında katılmaktadır (İleri ve ark., 2000; Sakanaka ve Tachibana, 2006; Sönmez 2013).

Spermatozoonların başlıca enerji kaynakları früktoz olmasına karşın, sulandırıcılara glikoz ve mannoz katılması ile de enerji gereksinimi karşılanabilmektedir. Ayrıca trehaloz, sükroz gibi polioller de düşük ısılarda hücreyi korumak amacıyla sulandırıcılara eklenmektedir. Sulandırıcıya katılan bu şekerlerin soğutmaya bağlı şekillenen mekanik basıncı azaltarak hücreyi yapısal deformasyonlardan korudukları bildirilmiştir (Woelders ve ark., 1997). Son yapılan çalışmalarda, sükroz veya trehalozun farklı yoğunluklarının dondurma eritme sonrası sığır (El-Sheshtawy ve ark., 2015), koç (Jafaroghli ve ark., 2011) ve köpek (Yamashiro ve ark., 2007) spermatozoitlerinin motilitesini önemli oranda artırdığı saptanmıştır. Ayrıca bakteriyel üremeyi engellemek amacıyla sulandırıcılara penisilin ve streptomisin kombinasyonu antibiyotikler de katılmaktadır (Sönmez, 2013).

2.4.1.2. Antioksidanlar

Taze sperma ile karşılaştırıldığında, dondurulmuş spermanın, genelde fertilitesi daha düşüktür. Bu da eritme sonrası hem canlı spermatozoon oranının düşüklüğünden, hem de canlı ama işlevini yitirmiş hücrelerden ileri gelmektedir (Alcay ve ark., 2016a). Soğuk şoku, donma hızı, sulandırıcı bileşenleri, ozmotik basınç farklılıkları gibi çok sayıda etmen spermada yaşam yeteneğinin yitirilmesine neden olurken, serbest oksijen radikallerinin yol açtığı membran yapısındaki değişiklikler (oksidatif zarar), membran reseptörlerinin yapısının bozulması, yerkürenin nükleer yapısından kaynaklanan radyoaktivite vb. etkiler de spermada işlevsel zararlara yol açmaktadır (Hafez, 2000; Mazur, 1984; Sönmez 2013; Türk, 2015).

Yapılarında bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran moleküller, serbest radikaller olarak isimlendirilir. (Türk, 2015; Zhong ve Zhou, 2013). Bu radikaller, yapılarındaki elektronlarını hücre içerisinde bulunan iyon transfer kanalları aracılığı ile hücrelerden geçirirler ve onların membran yapılarındaki protein ve lipid bölümlerini etkilerler (Bucak ve ark., 2015). Serbest radikaller, reaktif oksijen türlerini ve reaktif nitrojen türlerini içermektedir. Reaktif oksijen türlerinin üç

büyük tipi bulunmaktadır ve bunlar süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksildir (Zhong ve Zhou, 2013). Aerobik solunum ile kullanılan ve yüksek bir oksitleyici etkisi bulunan oksijenin yapısında da iki tane eşlenmemiş elektron bulunur. Serbest oksijen radikalleri, radikal olan veya olamayan moleküllerle reaksiyona girerek onların yapı ve işlevlerinde değişikliğe neden olurlar (Şimşek, 1999). Halliwell (2006), değişik adlarla da tanınan serbest radikalleri, reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırmış ve bu tanımlamaya karşın, oksijen moleküllerinin radikal olduklarını ancak reaktif olmayan yapılarının da olduğunu bildirmiştir.

Spermanın testis dokusu içinde üretimi sırasında, kanal sistemi ve epididimiste, ejakülasyon sırasında ejakülasyon sonrası aşamada olduğu gibi sulandırma, dondurma ve çözme işlemleri sırasında ve sonrasında oluşan hücre ölümü ve hücre işlevlerinin yitilmesi, oksidatif stres ile ilgilidir (Bailey ve ark., 2000; Bilodeau ve ark., 2000). Spermatozoa testisten kauda epididimise geçişi sırasında olgunlaşır ve yüzeyinde pek çok değişiklik oluşur ve bu değişiklikler epididimiste de sürer. Plazma membranında bulunan yüksek oranda doymamış yağ asitleri, spermatozoayı özellikle ROS saldırılarına karşı savunmasız duruma getirir (O ve ark., 2006).

Olgunlaşmamış ve morfolojik olarak anormal olan spermatozoa ve seminal lökositler ejakülattaki temel ROS kaynağıdır. Ayrıca, dondurma, saklama veya transfer etme amacıyla alınan sperma, dış ortamdaki kirleticileri, gün ışığı ve oksijen nedeniyle ROS'un açığa çıkmasını tetikler ve spermatozoon yapısında geri dönüşümsüz bozukluklara yol açar (Sariozkan ve ark., 2009a; Sariozkan ve ark., 2009b).

Vücut içerisindeki hücre ve dokularda, serbest radikallerin oluşumunu ve oluşturduğu oksidatif etkileri engelleyebilen bir savunma sistemi bulunmaktadır. Bu savunma sisteminde görev yapan maddelere, antioksidan maddeler denilmektedir (Bucak ve ark., 2015; Şimşek, 1999). Antioksidanlar işlevsel yapılarına göre; radikalleri temizleyerek etki eden “serbest radikal oluşumunu engelleyenler” ve radikaller ile dengeli bir ürün oluşturarak reaksiyonlara son veren “zincir kıran antioksidanlar” olarak ikiye ayrılırlar. Serbest radikal oluşumunu engelleyen antioksidanlar, albümin, transferrin gibi metal bağlayıcılar, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz olarak kendi içerisinde ayrılırken; zincir kıranlar ise yağda eriyen (alfa tokoferol, ubiquinon, beta karoten) ve suda eriyenler (glutatyon,

üret, sistein, askorbat) olarak kendi içerisinde ayrılmaktadır (Şimşek, 1999). Ayrıca, selenyum ve çinko gibi antioksidatif enzimler için kofaktör görevi olan maddelerde bulunmaktadır (Hezavehei ve ark., 2018).

Seminal plazmanın büyük çoğunluğunu oluşturan erkek eklenti bezlerinin salgıları, fertilizasyona kadar spermanın besin gereksinimini karşıladığı gibi, superoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler kadar, vitamin C ve E, hipotaurin, taurin, ürik asit ve albumin gibi serbest radikal temizleyicileri (scavengers) gibi ejakülasyon sonrasında oksidatif strese karşı spermatozoanın korunmasına katkıda bulunan çok sayıda antioksidan maddeleri de içerir (Chen ve ark., 2003; O ve ark., 2006; Vernet ve ark., 2004). Doğal yapısı gereği koç spermasının mevsime bağlı olarak antioksidan içeriği değişkenlik gösterir. Üreme mevsimi dışında yüksek seyreden endojen antioksidan düzeyi, üreme mevsiminde düşüş gösterir (Marti ve ark., 2007).

Oksidatif stres, antioksidanların parçalayamayacağı kadar reaktif oksijen türevi (ROS) üretmek olarak tanımlanabilir. Kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, sperm-oosit füzyonu ve protein tirozin fosforilasyonu gibi sperma işlevleri için belirli bir miktar ROS düzeyi gereklidir (Agarwal ve Allamaneni, 2004; Türk, 2015; Zhong ve Zhou, 2013). Ortamda aşırı ROS düzeyinin artışı antioksidan savunma sistemini baskılayarak oksidatif stresi oluşturur. ROS'un plazma membran bütünlüğünü ve nükleer DNA'yı etkileyerek DNA ve kromatin bağlarında kopmalara neden olduğu belirlenmiştir (Said ve ark., 2005). Bu kopmalar arttıkça DNA hasarı, morfolojik değişiklikler, mitokondrial bozukluklar ve dolayısıyla infertilite artar (Zhong ve Zhou, 2013; Gagnon ve ark., 1991; Sikka ve ark., 1995).

Spermatozoonların plazma membran yapısını yüksek oranda fosfolipitler, doğal lipitler ve glikolipit yapı oluşturmaktadır. Kriyoprezervasyon işlemleri ile spermatozoonların membran yapılarında ve akrozom üzerinde yapısal deformasyonlar şekillenmektedir. Farklı hayvan türlerinin değişen hücresel yağ oranları, dondurma ve eritme başarısını değiştirmektedir (Salamon ve Maxwell, 2000). Koç spermasının serbest oksijen parçacıkların zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için indirgenmiş glutatyon, glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz içeren endojen bir antioksidan sistemi bulunur. Her ne kadar endojen bir antioksidan savunma sistemi bulunsada, bu sistem, büyük çoğunluğu ölü spermatozoalardan kaynaklanan yüksek

miktardaki ROS'un oksidatif zararlı etkilerinin önlenmesinde yeterli değildir. Bu zararlı etkiler, sperma membranların yapısal ve işlevsel bütünlüğünün yitirilmesine, membran geçirgenliğinin artmasına, DNA'nın yapısal yıkımına ve hücre ölümüne yol açar (Banday ve ark., 2017).

Koç sperması yağ oranı yönünden zengin yapısı nedeniyle, başka hayvan türlerine göre, dondurma eritme işlemlere karşı daha duyarlıdır (Bucak ve ark., 2015). Son yıllarda koç ve diğer memeli spermasının dondurma ve eritmeye bağlı olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla, sulandırıcılara, metiyonin, sistein, sisteamin, bütül hidroksitoluen, melatonin, vitamin E, vitamin C gibi antioksidan ve serbest radikal temizleyici özelliğe sahip çeşitli maddeler katılmaktadır (Amidi ve ark., 2016; Toker ve ark., 2016; Farshad ve ark., 2010). Antioksidanların eritme sonrası spermanın niteliğini iyileştirdiğini bildiren çalışmaların yanında (Toker ve ark., 2016), antioksidanların kullanılmasının eritme sonrası spermatolojik özellikler üzerinde etkisiz (Duru ve ark., 2000) veya zararlı (Amidi ve ark., 2016) olduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Hezavehei ve ark., 2018).

2.4.1.2.1. L-Karnitin

İlk kez Rus bilim adamları tarafından 1905 yılında sığır etinden izole edilen ve kimyasal formülü 3-hidroksi-4-N-trimetilaminobütirik asit olan L-karnitin (LK), suda eriyebilen yarı esansiyel vitamin benzeri bir aminoasittir (Ahmadi ve ark., 2016; Fattah ve ark., 2017; Zhou ve ark., 2007). Memelilerde vücut içerisinde doğal olarak bulunan (sentezlenen) L-karnitin, yağ yakımını artırma, kasları güçlendirme ve sperm motilitesini artırma gibi özellikleri vardır. Ayrıca, hipertansiyon ve şeker hastalığı gibi hastalıkların sağaltımında destek olarak kullanılmaktadır (Kurt ve El, 2011).

L-karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondrinin iç membranından içeriye taşınmalarını sağlayarak, beta-oksidasyon yoluyla enerji üretiminde görev almaktadır (Agarwal ve Said, 2004; Zhou ve ark., 2007). L-karnitin yağları mitokondri içerisine taşınması ve kullanımını sağlaması ile, peroksidasyona uğrayan yağ miktarını azaltarak antioksidatif etki gösterir (Fattah ve ark., 2017). Karbonhidratlar, yağlar ve proteinlerin mitokondri içerisinde parçalanmaları ile asetil-KoA üretilir. Asetil-KoA'nın düzeyinin artması metabolizmayı olumsuz etkiler ve toksik etki oluşturur. L-

karnitin biriken fazla asetil-KoA'ların taşınmasını ve detoksifikasyonunu sağlayarak olumsuz etkilerini ortadan kaldırır (Kurt ve El, 2011).

L-karnitinin vücut içerisinde en yoğun bulunduğu yerler epididimis, seminal plazma ve spermatozodur (Agarwal ve Said, 2004). Karnitin, epididimiste, kanda olduğundan 2000 kat daha fazla bulunur (Shahrzad ve ark., 2013). Antioksidatif özellikleriyle, reaktif oksijen türlerinden, spermatozoonların mitokondriyal membranlarının stabilizasyonunu ve DNA yapısını koruyan L-karnitin, epididimiste spermatozoonlarda olgunlaşmayı ve motiliteyi destekler (Fattah ve ark., 2017; Manee-in ve ark., 2014).

Sperma sulandırıcılarına L-karnitin eklenmesinin, insan (Shahrzad ve ark., 2013), horoz (Fattah ve ark., 2017), domuz (Lee ve ark., 2014), sığır (Bucak ve ark., 2010b), kedi (Manee-in ve ark., 2014), keçi (Bucak ve ark., 2010a) ve aygır (Gibb ve ark., 2015) spermanın saklanması esnasında motilite, membran ve akrozom bütünlüğü ile DNA yapısı üzerine olumlu etkilerinin olabileceği bildirilmiştir.

2.4.1.2.2. Alfa Lipoik Asit

Çok iyi bir antioksidan olarak bir ditiol doğal bileşiği olan alfa-lipoik asit (ALA, 1,2-ditiolan-3-pentanoik asit), mitokondride oktanoik asitten sentezlenir; bitki ve hayvanlarda ise doğal olarak sentezlenmektedir (Karaca, 2008; Mohamed ve ark., 2018; Packer ve ark., 1995). İlk kez 1937 yılında, laktobasillusların gelişimi için patates özütü içerisindeki bir maddeye gereksinim duyduklarının fark edilmesiyle bulunmuştur. Keşfedilmesinin ardından, bir süre patates büyüme faktörü olarak (Snell ve ark., 1937). Birçok prokaryot ve ökaryot hücrede bulunan ALA, hücresel metabolizmada pirüvat dehidrogenaz ve alfa-ketoglutarat dehidrogenaz için bir kofaktör olarak, enerji üretiminde görev alır (Büyükleblebici ve ark., 2015; Güngör ve ark., 2016; Karaca, 2008; Packer ve ark., 1995).

Antioksidanların antioksidatif etkileri, ROS'un söndürülmesine olan özgüllük, metal şelatlama aktivitesi, başka antioksidan maddeler ile ilişkisi, gen ifadesi üzerine etkileri, emilimi ve biyo-yararlanımı, hücre, doku ve hücre dışı sıvılardaki yoğunluğu, affinitesi (suda veya yağda) gibi birçok kimyasal ve biyokimyasal ölçütler yönünden

değerlendirilir (Packer ve ark., 1995). Alfa lipoik asit, hem yağda hem de suda çözünebilen yapısı ile, bu ölçütlerin neredeyse tümünü sağladığı için evrensel antioksidan olarak anılmaktadır (Karaca, 2008; Packer ve ark., 1995).

Alfa lipoik asit, gıdalar ile alındığında, birçok doku içerisinde indirgenmiş durumu olan dihidrolipoik asit (DHHA) formuna dönüştürülmektedir. Alfa lipoik asit ve DHHA, birçok ROS türünü yağda ve suda etkisizleştirir (Packer ve ark., 1995). Her iki antioksidanın da metal şelasyonu aktivitesi vardır. DHHA, diğer antioksidanlar ile sinerjik bir şekilde de çalışabilmektedir. Antioksidanlar serbest radikalleri etkisizleştirdikten sonra indirgenirler ve DHHA Vitamin E, askorbat, glutatyon ve koenzim Q10 gibi kimi antioksidanların indirgenmiş veya radikal durumlarını, doğrudan veya dolaylı yollarla yine eski durumlarına getirir. Ek olarak, alfa lipoik asitin hücre içerisinde glutatyon artışına olanak sağladığı da bildirilmektedir (Karaca, 2008 ; Packer ve ark., 1995).

Alfa lipoik asitin antioksidan özellikleri dolayısıyla diyabet, iskemi, ağır metal zehirlenmesi, radyoaktif yıkımlarda, nörodejenerasyon ve HIV enfeksiyonlarının sağaltımında potansiyel etkilerinin belirlenmesi yanında, eritme sonrası sperm niteliğini ve fertilitiyi artırmak için birçok araştırmada kullanılmıştır (Packer ve ark., 1995; Büyükleblebici ve ark., 2015; Gohar ve ark., 2014; Güngör ve ark., 2016). ROS ve reaktif azot türlerini temizleyen alfa lipoik asitin antioksidan kapasitesi güçlüdür (Rochette ve ark., 2013). Domuz (Shen ve ark., 2016), sığır (Büyükleblebici ve ark., 2015; Gohar ve ark., 2014; Güngör ve ark., 2016) ve keçi (İbrahim ve ark., 2008) spermanın saklanması amacıyla yapılan çalışmalarda antioksidan özelliğinden yararlanmak amacıyla sulandırıcılara eklenen alfa lipoik asitin eritme sonrası spermatolojik özellikler üzerinde farklı düzeyde olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir.

2.5. Spermanın Eritilmesi

Sperm motilitesi, plazma membranının işlevsel bütünlüğü, akrozom bütünlüğü ve eritme sonrası canlı spermatozoa oranı, spermanın dondurulması ile birlikte düşüş göstermektedir (Alcay ve ark., 2016b). Sulandırıcı içeriği, kullanılan kriyoprotektan çeşit ve niceliği, kriyoprotektanın spermaya katılma şekli ve ısısı, dondurma yöntemi ve hızı, erime ısısı ve süresine bağlı olarak, taze koç sperması eritme sonrası aşamada

başlangıç motilitesini yaklaşık %30-%90 düzeyinde kaybeder (Alcay ve ark., 2016b; Salamon ve Maxwell, 2000; Soylu ve ark., 2007). Dondurma-eritme işlemleri sırasında şekillenen mitokondriyal ve membran yıkımları ve hücre içi ve dışı ortamdaki ozmotik değişiklikler; düşük ısılarda oluşan buz kristallerinin motilite yitimi ile ilişkilendirilmesine karşın, bu düşüklük tam olarak açıklanamamıştır (Salamon ve Maxwell, 2000). Ortam, sperm kirleticileri ve artan ölü spermatozalardan üretilen ROS düzeyinin artması ve düşük antioksidan enzim aktivitesi, apaoptozise yol açan yolların açılmasına neden olarak sperm canlılığını düşürür (Di Santo ve ark., 2012). Ayrıca, dondurma eritme işlemi spermatozoanın DNA bütünlüğünü etkileyip spermin epigenetik ve proteomik modülasyonuna neden olarak gelecek nesillerin yapısını etkiler (Hezavehei ve ark., 2018).

Hayvanlar arasında spermatozoa zarının yapısının farklı olduğundan dolayı, spermatozoanın soğuk ortamdaki davranışı türler arasında farklılık gösterir (Salamon ve Maxwell, 2000). Dondurma işleminin olduğu kadar, eritme işleminin hızı spermatozoonun canlılığını koruması açısından önemlidir. Soğutma hızının yüksek olması, hücre içi sıvıların donarak kristalleşmesine neden olurken, yavaş olması ise hücrelerde yüksek oranda dehidrasyon ile sonuçlanmaktadır (Salamon ve Maxwell, 1995; Salamon ve Maxwell, 2000).

Spermatozoa, soğutma ve donma işlemleri sırasında çevresinde şekillenen birtakım fiziksel ve kimyasal değişikliklere maruz kalır. Sıvı durumdaki suyun buz durumuna geçişi, faz değişimi, -5°C ile -15°C 'de şekillenir. Spermatozoa, faz değişiminin şekillendiği düşük ısılarla karşı belirli bir direnç gösterir. Özellikle faz değişimi sırasında şekillenen küçük buz kristallerinin yüzey gerilimlerinin büyük olmasından dolayı termodinamik olarak tutarlı değildir. Kinetik enerjileri daha düşük ve tutarsız buz kristalleri, kendiliğinden bir araya gelerek, tutarlı büyük buz kristallerini oluşturur. Bu aşamadan sonra, buz kristalleri, hızla ve bütün yönlere doğru, soğutulduğu dereceye kadar büyümelerini sürdürürler. Ortamın ısısı düşmesini sürdürdükçe, donmayan bölümün oranı hızla düşer ve geriye ortamda bulunan şeker, tuz ve kriyoprotektif maddelerin çeşidi ve niceliğine bağlı olarak donmayan bölüm kalır. Bu donmayan bölüm, ortamın ozmotik basıncını hızla yükselterek hücre içindeki suyun hücre dışına doğru akmasına neden olur. Bu olgu, hücre içi ozmotik basınç dış ortamla eşitleninceye kadar sürer (Woelders, 1997).

Spermatozoaların yaşamlarını sürdürebilmeleri yönünden, eritme aşaması en az dondurma aşaması kadar önemlidir. (Andrabi, 2009). Hızlı eritme, spermanın sağlıklı bir şekilde canlandırılabilmesi için en iyi yöntemdir. Tersi durumda, yavaş eritme işleminde, donma sırasında şekillenen hücre içi buz kristalleri, kaldıkları yerden büyümelerini sürdürerek spermanın morfolojisine ve işlevlerine zarar verir (Holt, 2000). Özellikle -60°C ile -15°C arasındaki ısı geçiş hızının, spermanın canlılığını koruyabilmesi açısından kritik bir önemi vardır (Salamon ve Maxwell, 2000).

Seri üretime uygunluğu, saklama kolaylığı, yüksek gebelik oranları gibi birçok avantajları olmasından dolayı, sperma yaygın olarak payetler içinde dondurulmaktadır. Ayrıca payetler hacimlerine göre yüzey alanlarının fazla olmalarından dolayı soğutma, dondurma ve eritme sırasındaki ısı değişimlerine çok duyarlıdırlar (İleri ve Ak, 1993; İleri ve ark., 2000). Yapılan araştırmalarda, -196°C 'de payetlerde saklanan spermanın herhangi bir nedenden $>-100^{\circ}\text{C}$ 'ye ısınmasının spermatozoonlardaki buz kristallerinin yapısının etkilendiği ve ısı tekrar -196°C 'ye indirildiğinde kristalleşme olayının yeniden şekillendiği (mikrotorik rekristalizasyon) hatta bu termodinamik olayların -130°C 'de bile oluşabileceği bildirilmiştir (İleri ve Ak, 1993; İleri ve ark., 2000; Pickett ve Berndtson, 1980). Bu nedenle, payet yöntemine göre dondurulmuş spermanın en uygun eritme tekniğinin kullanıldığı çok sayıda çalışma yapılmıştır (Alcay ve ark., 2016a; Alcay ve ark., 2016b; Nur ve ark., 2010; Üstüner ve ark., 2018). Sulandırıcı bileşenleri ve dondurma yöntemi, spermanın eritme şeklini de belirler (Salamon ve Maxwell, 2000). Payet yöntemiyle dondurulmuş spermanın genellikle 37°C 'lik sıcak su içeren bir kap içerisinde, 30 saniye sürede eritmesi önerilmektedir (Sönmez, 2013).

Donmuş spermin eritme sonrası değerlendirmesi, sperm motilitesi, viabilitesi ve morfolojisine yönelik testlere dayanır. Donmuş spermanın potansiyel fertilitesi tohumlama dozunda/payette bulunan motil spermatozoon sayısı, spermanın işlevsel ve morfolojik bütünlüğü ile spermanın dişi genital kanalda canlı kalma süre süresi doğru orantılıdır (Hafez, 2000; İleri ve ark., 2000; Salamon ve Maxwell, 1995; Sönmez, 2013). Donmuş spermanın niteliğini belirlemek için taze spermanın mikroskopik muayenelerinin tümü eritme sonrası aşamada da kullanılmaktadır. Ayrıca, DNA kalitesi, enzimatik aktivite, ozmotik stres testleri (Hypoosmotic Swelling Test;

HOST), yüksek veya düşük ısılarda inkübasyon/direnç testleri, artırılmış akrozom reaksiyon oranı, mukus veya jel penetrasyon testi ve hamster yumurta penetrasyon testi gibi spermanın ileri işlevsel testlerinden de yararlanılmaktadır (Alcay ve ark, 2016a; Hafez, 2000; İleri ve ark., 2000; Nur ve ark., 2010; Salamon ve Maxwell, 1995; Sönmez, 2013).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Sunulan tez çalışması, Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (13.12.2016 tarih ve 2016-15/05 no'lu etik kurul kararı) onayı alınarak, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne bağlı Koyunculuk Ünitesi ve Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Androloji Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmada, materyal olarak 2-4 yaşlarında 5 adet Kıvırcık ırkı koç kullanıldı. Koçlar deneme süresince aynı bakım ve besleme koşullarında tutuldu. Bu çalışma, Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından DDP(V)-2017/15 no'lu proje ile desteklenmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Sunulan tez çalışmasında, THAM[Tris(hidroksimetil)aminometane] (Sigma, T6791), sitrik asit (Merck, 100242), D-früktöz (Merck, 104007), penisilin G (Sigma, P7794), dihidrostreptomisin (Sigma, S1277), trehaloz (Sigma, T0167), EDTA (Merck, 108418,1000), gliserol (Sigma, S5516); alfa lipoik asit (Sigma, T5625), L-karnitin (Sigma, C0283), PBS Tablet (Sigma, P4417), FITC-PSA (Sigma, L0770), aseton (Tekkim TK.010050.1000) ve sodyum sitrat (Sigma, W302600) kimyasalları kullanıldı.

3.2. Spermanın Alınması ve Spermatolojik Değerlendirmeler

Sperma Eylül-Ekim aylarında, haftada iki kez olmak üzere, toplam 5 kez elektro-ejakülatör (Minitübe, Germany) yöntemi ile alındı (Nur ve ark., 2010). Sperma almadan önce koç zapturapta alınarak prepusyal bölgenin kılları kesildi ve bölgenin temizliği serum fizyolojik ile yapılarak kurutuldu. Elektro-ejakülatöre ait prop (Ruakura koç probu, Hamilton, Yeni Zelanda) üzerine kayganlaştırıcı sürüldükten sonra elektrotlar ampulla bölgesi üzerine gelecek şekilde rektuma yerleştirildi. Penis

elle dışarı çıkarılarak kontrolü sağlandı. Ardından cihaz otomatik modda çalıştırılarak elektrik uyarımları verildi. Uyarımlar arası penise masaj yapılarak ejakülasyon uyarıldı ve ejakulat sperma toplama kadehine alındı. Kadehin spermayı ihtiva ettiği bölüm avuç içerisinde tutularak 30°C sıcaklıktaki su banyosuna konuldu. Tüm koçlardan sperma alma işlemi tamamlandığında laboratuvara geçildi. Zaman yitirmeden spermanın birleştirme (pooling) öncesi muayeneleri gerçekleştirilerek çalışmada kullanılabilirliği değerlendirildi.

3.3. Pooling Öncesi Yapılan Spermatolojik Muayeneler

Sperma alınarak laboratuvara getirildikten sonra, pooling öncesi aşamada, her bir ejakulatın hacim, renk, koku, mass aktivite, motilite ve yoğunluk muayeneleri gerçekleştirildi (İleri ve ark., 2000).

Spermanın hacmi kadeh üzerinde yer alan skaladan yararlanılarak mililitre olarak değerlendirildi. Anormal bir renk olup olmadığı kontrol edildi ve koyu krem rengi ejakülatlar çalışmada kullanıldı. İstenmeyen kokusu olan, kirli ejakülatlar çalışmada kullanılmadı (İleri ve ark., 2000).

3.3.1. Kitle Hareketi

Spermanın laboratuvara getirilmesinden sonra, ısıtıcı tablalı (37°C) faz-kontrast mikroskop (Olympus BX51-TF - Olympus Optical Co., Ltd., Japonya) üzerindeki lama bir damla taze sperma damlatıldı. Lam üzerine lamel kapatılmadan x10 objektif ile değerlendirme gerçekleştirildi (İleri ve ark., 2000, Sönmez, 2013). Kitle hareketi +’dan ++++’ya kadar olan derecelendirme sistemi üzerinden değerlendirilerek +++ ve üzeri kitle hareketine sahip olan sperma örnekleri çalışmada kullanıldı.

3.3.2. Sperm Motilitesinin Muayenesi

Motilite muayenesi, ısıtıcı (37°C) tablalı faz-kontrast mikroskopta (Olympus BX51-TF - Olympus Optical Co., Ltd., Japonya) x40’lık objektif ile değerlendirildi (İleri ve ark., 2000). Bu amaçla, ısıtıcı tabla üzerinde önceden ısıtılmış lam üzerine bir damla serum fizyolojik ve bir damla sperma örneği damlatılarak karıştırıldı ve üzeri lamel ile kapatılarak en az üç farklı alan incelenerek, sonuç % olarak değerlendirildi.

Değerlendirmede hızlı ve güçlü bir şekilde, başı yönünde herhangi bir yöne doğru giden spermatozoonlar motil olarak kabul edildi (İleri ve ark., 2000; Sönmez, 2013). Taze spermanın muayenesinde en az %70 ve üzeri motiliteye sahip olan örnekler pooling yapılarak deneyde kullanıldı.

3.3.3. Sperm Yoğunluğunun Belirlenmesi

Hemositometrik yöntemden yararlanılarak gerçekleştirilen bu muayenede, eritrosit sayma pipetinin 0,5 çizgisine kadar sperma, 101 çizgisine kadar çekilerek sulandırma tamamlandı. Hazırlanmış olan Thoma lamına sulandırılmış spermadan damlatıldı ve yayılmasının ardından, köşelerden birer ve merkezden 1 tane olmak üzere toplam 5 tane büyük kare içerisindeki spermatozoa sayıldı. Elde edilen hücre sayısı 10^7 ile çarpılarak 1 mililitre içerisindeki toplam sayıya ulaşıldı (İleri ve ark., 2000). Çalışmada en az $1,5 \times 10^9$ spermatozoon/ml özellikte olan ejakülatlar pooling yapılarak çalışmada kullanıldı.

3.4. Pooling Sonrası Yapılan Spermatolojik Muayeneler

Çalışmada kullanılmaya uygun en az +++ mass aktivite, %70 motilite ve $1,5 \times 10^9$ spermatozoon/ml özelliğe sahip sperma örnekleri bireysel farklılığı ortadan kaldırmak amacıyla karıştırılarak pooling yapıldı. Pooling aşamasından itibaren sulandırma, ekilibasyon, eritme sonrası ve inkübasyon aşamalarının tümünde taze spermada gerçekleştirilen motilite muayenesi yanında; Hipoozmotik Swelling Test (HOST) ile plazma membran fonksiyonel bütünlüğü ve FITC bağlanmış Pisum Sativum Agglutinin (FITC-PSA) ile akrozom bütünlüğü değerlendirildi. HOST ve FITC-PSA muayeneleri pooling örneklerine de uygulandı.

3.4.1. Plazma Membran Fonksiyonel Bütünlüğünün Değerlendirilmesi (HOST)

HOST muayenesi amacıyla 100 mOsm'lük sodyum sitrat-früktoz içeren solüsyon hazırlandı (Nur ve ark., 2010). Sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış olan su banyosu içerisinde bekletilen tüplerdeki 100 µl HOST solüsyonu üzerine, 10 µl sperma aktararak 1 saat bekletildi. Süre sonunda bekletilmiş spermadan bir damla lama damlatılarak faz-kontrast mikroskopta x100 objektif ile 200 adet spermatozoon sayıldı. Kuyruğu kıvrık ve şişmiş spermatozoa, membranı sağlam olarak kaydedildi.

3.4.2. Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Akrozomun muayenesinde Fitc-Pisum Sativum Agglutinin (FITC-PSA) boyama yöntemi kullanıldı (Alcay ve ark., 2016b). Bu yöntemde, ortamdaki yumurta sarısı ve sulandırıcıdan ayırmak amacıyla 10 µl sperma, 250 µl PBS içerisine koyulduktan sonra 2000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Spermanın üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, üzerine 250 µl PBS eklenerek yavaşça karıştırıldı. Bu karışımdan frotiler çekilip açık ortamda kurutuldu. Frotilerin 4 °C’deki aseton ile tespiti sağlandı, ardından 30 dakika süreyle PSA ile boyandı. Boyama işleminden sonra, fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan frotilerin üzeri gliserol ile örtülerek çoklu floresan filtresi ataşmanlı (BX2-FLBB-000), (Olympus BX51-TF - Olympus Optical Co., Ltd., Japonya) mikroskop, U-MWB2 yansıtıcı, 460–490 nm eksitasyon ve 530 nm bariyer, x100 objektif ile incelendi. Sınırları belirgin ve tümüyle homojen yeşil renkte akrozomu olan spermatozoalar sağlam olarak değerlendirildi. Her preparattan en az 100 hücre sayılarak sağlam akrozom oranı belirlendi.

3.5. Sulandırıcıların Hazırlanması ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada Alcay ve ark.’nın (2016b) kullandığı iki aşamalı sulandırmaya uygun Tris-sitrik asit-früktoz temel sulandırıcısı kullanıldı. İçerikleri aşağıda verilen 30°C ısıda spermaya eklenen ilk aşama sulandırıcısı olan Sulandırıcı A ve 5°C ısıda spermaya eklenen ikinci aşama sulandırıcısı, Sulandırıcı B olmak üzere iki farklı sulandırıcı sperma alma gününde hazırlandı.

Sulandırıcı A: THAM [Tris(hidroksimetil)aminometane] 27,1 gr/l; sitrik asit 14,0 gr/l; D-früktoz 10,0 gr/l; penisilin G 0,3 gr/l; dihidrostreptomisin 0,4 gr/l, yumurta sarısı %20 olacak şekilde hazırlandı.

Sulandırıcı B: THAM [Tris(hidroksimetil)aminometane] 27,1 gr/l; Sitrik asit 14,0 gr/l; D-früktoz 10,0 gr/l; Penisilin G 0,3 gr/l; Dihidrostreptomisin 0,4 gr/l, Yumurta Sarısı %20. Trehaloz 38 gr/l; EDTA 1,5 gr/l; Gliserol %6 olacak şekilde sulandırıcı B hazırlandı.

Alfa lipoik asit (Büyükleblebici ve ark., 2015) ve L-karnitin (Manee-in ve ark., 2014) sırasıyla sığır ve kedilerde kullanılan dozlar temel alınarak çalışma grupları

oluşturuldu. Bu amaçla hazırlanan Sulandırıcı A ve Sulandırıcı B, 16 bölüme ayrıldı. Bunlardan birer tanesi, içine hiçbir şey eklenmeden kontrol grubu olarak ayrıldı. Diğerlerinin içine Alfa lipoik asit [0,25 mM (A1), 0,5 mM (A2), 1 mM (A3)], L-karnitin [25 mM (L1), 50 mM (L2), 100 mM (L3)] ve ikisinin karışımı [25 mM L-karnitin ve 0.25 mM Alfa lipoik asit (L1A1), 25 mM L-karnitin ve 0.50 mM Alfa lipoik asit (L1A2), 25 mM L-karnitin ve 1 mM Alfa lipoik asit (L1A3), 50 mM L-karnitin ve 0.25 mM Alfa lipoik asit (L2A1), 50 mM L-karnitin ve 0.50 mM Alfa lipoik asit (L2A2), 50 mM L-karnitin ve 1 mM Alfa lipoik asit (L2A3), 100 mM L-karnitin ve 0.25 mM Alfa lipoik asit (L3A1), 100 mM L-karnitin ve 0.50 mM Alfa lipoik asit (L3A2) veya 100 mM L-karnitin ve 1 mM Alfa lipoik asit (L3A3)] eklendi.

Böylece kontrol grubu yanında sulandırıcılara eklenen Alfa lipoik asit, L-karnitin, ikisinin birlikte dozlarından oluşan ve kontrol grubu olmak üzere toplamda 16 grup oluşturuldu. Çalışma gruplarına ait Alfa lipoik asit ve L-karnitin sulandırıcıdaki final yoğunlukları aşağıdaki gibidir:

- Kontrol grubu: Yalnızca Sulandırıcı A ve Sulandırıcı B (temel sulandırıcıları) içerecek şekilde hazırlandı

3.5.1. Yalnızca Alfa Lipoik Asit İçeren Gruplar

Yalnızca Alfa lipoik asit içeren gruplar (Grup A1-Grup A3); temel sulandırıcılar üzerine Alfa lipoik asitin 0,25, 0,50 ve 1 mM'lık farklı yoğunlukları eklenerek hazırlandı.

- Grup A1: Temel sulandırıcılar içersine 0,25 mM Alfa lipoik asit,
- Grup A2: Temel sulandırıcılar içersine 0,5 mM Alfa lipoik asit,
- Grup A3: Temel sulandırıcılar içersine 1 mM Alfa lipoik asit eklenerek hazırlandı.

3.5.2. Yalnızca L-Karnitin İçeren Gruplar

Yalnızca L-karnitin içeren gruplar (Grup L1-Grup L3); temel sulandırıcılar üzerine L-karnitin 25, 50 ve 100 mM'lük farklı yoğunlukları eklendi.

- Grup L1: Temel sulandırıcılar içerisinde 25 mM L-karnitin,
- Grup L2: Temel sulandırıcılar içerisinde 50 mM L-karnitin,
- Grup L3: Temel sulandırıcılar içerisinde 100 mM L-karnitin, eklenerek hazırlandı.

3.5.3. L-Karnitin ve Alfa Lipoik Asit İçeren Karışım Grupları (L-A-)

Alfa lipoik asit ve L-karnitin içeren karışım grupları (Grup L1A1-Grup L3A3); temel sulandırıcılar üzerine Alfa lipoik asit ve L-karnitin farklı yoğunlukları eklenerek hazırlandı.

- Grup L1A1: Temel sulandırıcılara 25 mM L-karnitin ve 0.25 mM Alfa lipoik asit,
- Grup L1A2: Temel sulandırıcılara 25 mM L-karnitin ve 0.50 mM Alfa lipoik asit,
- Grup L1A3: Temel sulandırıcılara 25 mM L-karnitin ve 1 mM Alfa lipoik asit,
- Grup L2A1: Temel sulandırıcılara 50 mM L-karnitin ve 0.25 mM Alfa lipoik asit,
- Grup L2A2: Temel sulandırıcılara 50 mM L-karnitin ve 0.50 mM Alfa lipoik asit,
- Grup L2A3: Temel sulandırıcılara 50 mM L-karnitin ve 1 mM Alfa lipoik asit,
- Grup L3A1: Temel sulandırıcılara 100 mM L-karnitin ve 0.25 mM Alfa lipoik asit,
- Grup L3A2: Temel sulandırıcılara 100 mM L-karnitin ve 0.50 mM Alfa lipoik asit,

- Grup L3A3: Temel sulandırıcılara 100 mM L-karnitin ve 1 mM Alfa lipoik asit eklenerek hazırlandı.

3.6. Spermanın Sulandırılarak Soğutulması

Sunulan tez çalışmasında, sperma iki aşamalı sulandırma tekniğine göre sulandırıldı (İleri ve ark., 2000). Kısaca birinci aşamada pooling yapılan sperma 16 hacme bölünerek 32°C'lik su banyosunda, aynı ısıdaki her biri gruplara ait sulandırıcı A ile 1:1 oranında sulandırıldı. Sulandırıcı A ile sulandırılan sperma örnekleri su kabı içerisine yerleştirilerek 5°C sıcaklığındaki yatay buzdolabına konuldu. Suyun içerisine ufak buz parçaları atılarak en az 45 dk içinde spermanın ısısı 5°C sıcaklığa düşürüldü. Bu aşamada, gruplara ait Sulandırıcı B aşamalı olarak 50 dk içinde 1:1 oranında spermaya eklendi. Sulandırıcı B ile sulandırılan sperma 5°C ısıdaki buzdolabı koşullarında 2 saat ekilibrasyona bırakıldı.

Ekilibrasyon aşamasının tamamlanmasıyla birlikte gerekli muayeneler için örnekler alınarak değerlendirildi. Daha sonra spermalar 0.25 ml hacimdeki payetlere çekilerek kapatıldı. Doldurulan payetler, payet dizme rafına yerleştirildikten sonra, azot buharında (-120°C) 10 dakikada donduruldu. Donmuş sperma sıvı azot içerisine daldırılarak muayene zamanına kadar sperma saklama konteynerinde bekletildi.

3.7. Spermanın Eritilmesi ve İnkübasyonu

Sperma, 37°C su içeren su kaplarında 30 saniye bekletilerek eritildi (İleri ve ark., 2000). Eritme sonrası sperm motilitesi, akrozom bütünlüğü ve plazma membran fonksiyonel bütünlüğü muayeneleri için gerekli örnek alındıktan sonra payetin geri kalan bölümü 3. ve 6. saatte yapılacak incelemeler için 39°C sıcaklıkta neme doyurulmuş ve %5 CO₂'li atmosferde (HERAcell 240 CO₂ Incubator, Kendro Laboratory Products Ltd., Almanya) inkübasyona bırakıldı.

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışma bulguları, SAS 9.4 istatistik programında, PROC MIXED modeli kullanılarak analiz edildi (SAS Inc, Cary, NC). Modelde motilite, HOST pozitif ve akrozom bütünlüğü olan spermatozoa oranı bağımlı değişken olarak yer alırken, aşama, grup ve bu iki faktör arasındaki interaksiyonun etkisi incelendi. Modelde grup

etkisi rastgele faktör olarak göz önüne alındı. Değerlendirmelerde $P<0.05$ önemli olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

Bu çalışmada kullanılan ejakülatlara ait (n=5, pooling) ortalama sperma motilitesi, plazma membran ve akrozom bütünlüğü sırasıyla; %85,00, %92,80 ve %91,60 olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Çalışmada elde edilen sulandırıcı A ile sulandırma, ekilibrasyon ve eritme sonrası 0., 3. ve 6. saat aşamalarına ait motilite, plazma membran ve akrozom bütünlüğüne (PSA) ait bulgular ve istatistiki sonuçlar Tablo-1’de verilmiştir.

4.1. Sulandırma ve Ekilibrasyon Sonrası Bulgular

Sulandırıcı A ile sulandırma sonrası kontrol grubunda motilite, plazma membran ve akrozom bütünlüğü sırasıyla; %79,00, %91,91 ve 93,40 olarak bulundu. Temel sulandırıcının motilite, plazma membran ve akrozom bütünlüğünü etkilemediği görüldü ($P>0.05$). L2 grubunun motilite değeri dışında, L-karnitin ve Alfa lipoik asidin tek başına kullanıldığı diğer gruplarda sulandırma işleminin motilite, plazma ve akrozom bütünlüğünü etkilemediği bulundu ($P>0.05$). L-karnitin ve Alfa lipoik asidin birlikte kullanıldığı gruplarda (L-A-) L3A1-3 gruplarının motilitesi sulandırma işleminden olumsuz etkilenirken ($P<0.05$), plazma membran ve akrozom bütünlüğünün etkilenmediği görüldü ($P>0.05$). Deneme gruplarının sulandırma sonrası spermatolojik bulguları ile kontrol grubu bulgularının benzer olduğu görüldü ($P>0.05$). Sulandırma sonrası aşamada deneme grupları arasında istatistiksel fark bulunmadı ($P>0.05$).

Sperma birinci aşama sulandırıcısıyla sulandırıldıktan sonra, en az 1 saat içerisinde 5°C ısıya düşürüldü. Bu aşamada sulandırıcı B ile sulandırılan sperma, 2 saat ekilibrasyona bırakıldı. Sulandırıcı A ile sulandırma sonrası ve ekilibrasyon sonrası bulgular karşılaştırıldığında, ekilibrasyon sonrası aşamada sperm motilitesi

($P<0.001$), plazma membran ($P<0.001$) ve akrozom ($P>0.05$) bütünlüğünün daha düşük olduğu saptandı(Tablo 2-4).

L-karnitin ve Alfa lipoik asidin tek başına kullanıldığı L1, A1, A2, A3, gruplarının ekilibrasyon sonrası ortalama motilite değerlerinin, kontrol grubu ile benzer olduğu görüldü ($P>0.05$). Sulandırıcıdaki L-karnitin dozu yükseldikçe sperm motilitesinin düştüğü gözlemlendi. L3 grubunun ortalama motilitesinin L1 ve L2 gruplarına göre daha düşük olduğu görüldü ($P<0.05$). A1, A2 ve A3 gruplarının motilitesi birbirine yakın olduğu ve kontrol grubu ile benzer olduğu belirlendi. L-karnitin ve Alfa lipoik asidin birlikte kullanıldığı gruplarda L-karnitin ve alfa lipoik asitin düşük olduğu L1A1 grubunun motilite değeri dışında ($P>0.05$), kontrol grubundan daha düşük olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). L-A- gruplarında sulandırıcı içerisindeki L-karnitin düzeyi arttıkça genel olarak motilitenin düştüğü saptandı. L2 ve L3 gruplarının motilite değerleri dışında, L-karnitin ve Alfa lipoik asidin tek başına kullanıldığı gruplardan elde edilen ortama motilite değeri, L1A1 grubunun motilite değeri hariç, L-A- gruplarına göre genel olarak daha yüksek olduğu görüldü (Şekil-1-6).

L3 grubunun ortalama plazma membran fonksiyonel bütünlüğü dışında ($P<0.05$), L-karnitin ve Alfa lipoik asidin tek başına kullanıldığı grupların plazma membran bütünlüğü değerlerinin, kontrol grubu bulguları ile benzer olduğu görüldü ($P>0.05$). Alfa lipoik asidin tek başına kullanıldığı deneme gruplarının plazma membran bütünlüğü değerlerinin birbirine benzer olduğu belirlendi ($P>0.05$). L-A- gruplarına ait plazma membran bütünlüğü değerlerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gözlemlendi. L-A- grupları arasında L-karnitin 100 mM gruplarına ait plazma membran bütünlüğünün diğerlerine göre daha düşük olduğu görüldü.

L-karnitin ve Alfa lipoik asitin tek başına kullanıldığı gruplardan elde edilen plazma membran bütünlüğü, L-A- grupları ile karşılaştırıldığında, L-karnitin 25 mM grupları ve L2A1, L2A2 grupları dışında L-A-’nın diğer gruplarına göre daha yüksek olduğu görüldü ($P<0.05$).

Ekilibrasyon sonrası çalışma gruplarının akrozom bütünlüğü bulgularının kontrol grubuna benzer olduğu ve çalışma grupları arasında istatistiksel fark bulunmadığı saptandı ($P>0.05$).

4.2. Eritme Sonrası Elde Edilen Bulgular

Her bir gruptan toplamda 15 olmak üzere toplam 240 adet payet 37°C 'ta 30 sn su banyosunda çözdürüldü ($n=15 \times 16=240$ payet). Eritme sonrası aşamada sperm motilitesi, plazma membran ve akrozom bütünlüğü değerlendirildi. Payetin geri kalan bölümü 3. ve 6. saat spermatojik değerlendirmeleri için 39°C sıcaklıkta neme doyurulmuş %5 CO_2 'li atmosferde inkübasyona bırakıldı. Ekilibrasyon ve eritme sonrası spermatolojik veriler karşılaştırıldığında, dondurma eritme işleminin motilite ($P<0.001$), HOST ($P<0.001$) ve PSA ($P<0.001$) sonuçları üzerine zararlı etkilerinin olduğu belirlendi (Tablo 2-4).

4.2.1. Eritme Sonrası 0. Saat Bulguları

Temel sulandırıcılar ile sulandırılıp dondurulan kontrol grubunun eritme sonrası ortalama motilite, HOST ve PSA değerleri sırasıyla %56,00, %50,07 ve %74,13 olarak bulundu (Tablo-1). L-karnitin ve Alfa lipoik asidin tek başına kullanıldığı gruplarda, eritme sonrası en yüksek motilite %59,00 ile A1 grubundan elde edildi. Kontrol grubu ve Alfa lipoik asit içeren gruplara ait eritme sonrası motilite değerlerinin, L-karnitin içeren gruplara göre daha yüksek olduğu görüldü ($P<0.05$) (Şekil-1).

L-karnitin düşük dozunun kullanıldığı L1 grubundan, L2 ve L3'e göre daha yüksek eritme sonrası motilite değeri elde edildiği gözlemlendi ($P<0.05$). Yalnızca Alfa lipoik asit içeren grupların eritme sonrası motilitelerinin birbirine benzer olduğu görüldü ($P>0.05$) (Şekil-1).

Alfa lipoik asitin, L-karnitin ile birlikte kullanıldığı L-A- gruplarında, L-karnitin ve Alfa lipoik asitin birlikte kullanılmasının eritme sonrası motilite üzerine olumlu etkisi görülmedi. Buna bağlı olarak, eritme sonrası motilite bakımından Alfa lipoik asit ile L-karnitin arasında antagonist bir etki olduğu belirlendi. L2 ve L3 grupları dışında, L-karnitin ve Alfa lipoik asidin tek başına kullanıldığı grupların

eritme sonrası motilite değerlerinin, birlikte kullanıldığı L-A- gruplarına göre genel olarak daha yüksek olduğu görüldü. Sulandırıcıda bulunan Alfa lipoik asit ($P>0.05$) ve L-karnitin düzeyi ($P<0.05$) arttıkça eritme sonrası motilitenin düştüğü görüldü (Şekil-2).

Eritme sonrası kontrol ve Alfa lipoik asit gruplarının plazma membran bütünlüğünün benzer ($P>0.05$) ve diğer gruplardan daha üstün olduğu görüldü ($P<0.05$). Sulandırıcıdaki L-karnitin düzeyi artıkça plazma membran bütünlüğü değerinin düştüğü gözlemlendi ($P<0.05$). L-karnitin ve Alfa lipoik asitin birlikte kullanıldığı grupların plazma membran bütünlüğü sonuçlarına bakıldığında; L-karnitinin düşük dozunun kullanıldığı grubun daha iyi sonuç verdiği görüldü ($P<0.05$) (Şekil-3-4).

Kontrol grubu, L-karnitin ve Alfa lipoik asidin tek başına kullanıldığı gruplarda en yüksek akrozom bütünlüğü L3 (%84,80) grubunda elde edildi. İstatistiksel olarak L2 grubu dışında kontrol grubundan ve diğerlerinden üstün olduğu görüldü ($P<0.05$). L-karnitin, Alfa lipoik aside göre akrozom bütünlüğünü dahi iyi koruduğu bulundu ($P<0.05$). Farklı dozlarda Alfa lipoik asit içeren sulandırıcı gruplarından kendi içlerinde benzer sonuçlar elde edildi ($P>0.05$). Antioksidanların birlikte kullanıldıkları gruplar içerisinde en iyi akrozom bütünlüğü L-karnitin yüksek dozunu içeren L3A1, L3A2, L3A3 gruplarından elde edildi (Şekil-5-6).

4.2.2. Eritme Sonrası 3. Saat Bulguları

Eritme sonrası 3 saat inkübasyonun motilite, plazma membran ve akrozom bütünlüğü üzerinde olumsuz etkisi olduğu görüldü ($P<0.001$) (Tablo-2-4). İnkübasyonun 3. saatinde yapılan spermatolojik değerlendirmelere göre kontrol grubunun motilite (%48,67) ve plazma membran bütünlüğü (%37,27) değerlerinin deneme gruplarına göre daha yüksek olduğu bulundu ($P<0.05$). Akrozom bütünlüğü bakımından ise en iyi değer L3 grubundan (%75,4) elde edildi.

L-karnitin ve Alfa lipoik asidin tek başına kullanıldığı gruplarda, Alfa lipoik asit içeren grupların motilite değerinin, L-karnitin içeren gruplara göre genel olarak daha yüksek olduğu görüldü. En yüksek motilite değeri A1 grubundan elde edildi ($P<0.05$).

L-A-gruplarında, sulandırıcıdaki L-karnitin ve Alfa lipoik asit yoğunluğu arttıkça sperm motilitesinin düştüğü görüldü. En iyi motilite L1A1 grubundan elde edildi ($P<0.05$).

Deneme gruplarına göre kontrol grubuna ait plazma membran bütünlüğü oranının daha yüksek olduğu saptandı($P<0.05$). L-karnitin ve Alfa lipoik asitin tek başına kullanıldığı gruplarda, L-karnitin içeren grupların plazma membran bütünlüğünü daha iyi koruduğu görüldü ($P<0.05$). Yalnızca L-karnitin içeren gruplarda, sulandırıcı içindeki L-karnitin düzeyinin 100 mM'a çıkarılmasının, plazma membran bütünlüğünü olumsuz yönde etkilediği görüldü ($P<0.05$). Benzer şekilde, yalnızca Alfa lipoik asit içeren gruplarda, sulandırıcı içindeki Alfa lipoik asit içeriğinin 1 mM düzeyine çıkarılmasının da plazma membran bütünlüğünü olumsuz etkilediği görüldü ($P<0.05$). L-A- grupları arasında; L1A1 grubunun plazma membran bütünlüğü oranı diğer L-A- gruplarına göre üstün bulundu ($P<0.05$).

İnkübasyonun 3. saatinde, L-karnitin içeren L2, L3, L2A2, L2A3 ve L3A1, L3A2, L3A3 gruplarında, kontrol grubuna göre, akrozom bütünlüğünün daha başarılı şekilde korunduğu görüldü ($P<0.05$). Yalnızca L-karnitin içeren gruplar arasında L1 grubuna göre, L2 ve L3 gruplarında daha yüksek akrozomal bütünlük elde edildi. Yalnızca 1mM Alfa lipoik asit içeren grubun akrozom bütünlüğünün, diğer Alfa lipoik asit içeren gruplara göre daha düşük olduğu görüldü ($P<0.05$).

Yalnızca L-karnitin ve Alfa lipoik asit içeren gruplar ile L-A- grupları karşılaştırıldığında, yüksek miktarda L-karnitin içeren grupların akrozom bütünlüğünün genel olarak daha yüksek olduğu gözlemlendi. L-A- grupları arasında L3A1 L3A2 ve L3A3 gruplarının akrozom bütünlüğünün daha yüksek olduğu saptandı.

4.2.3. Eritme Sonrası 6. Saat Bulguları

İnkübasyonun 6. saatine gelindiğinde, 3. saate göre tüm grupların motilite, plazma membran bütünlüğü ve akrozomal bütünlüğe ait parametrelerde ciddi bir düşüş şekillendiği gözlemlendi ($P<0.001$) (Tablo-2-4). Motilite değerlerine bakıldığında, kontrol grubunun diğer gruplardan üstün olduğu görüldü ($P<0.05$). L-karnitin içeren gruplar arasında en iyi motilite L1 grubunda; alfa lipoik asit (ALA) grupları arasında A1'de, L-A- gruplarında ise L1A1 grubunda bulundu ($P<0.05$).

Bu aşamada plazma membran fonksiyonu değerinin, kontrol grubunda en yüksek olduğu belirlendi ($P<0.05$). Yalnızca L-karnitin içeren gruplar arasında, L1 ve L2 gruplarından benzer bir sonuç elde edilirken ($P>0.05$), L3 grubuna göre çok daha yüksek olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). ALA gruplarında A1 ile A2 benzer bir etki gösterirken ($P>0.05$); A3 grubu A1 grubuna göre daha düşük bulundu ($P<0.05$). L-A-grupları arasında, sulandırıcıdaki L-karnitin düzeyinin 100 mM'a yükseltilmesinin plazma membran bütünlüğünü düşürdüğü görüldü ($P<0.05$).

Kontrol ve deneme grupları arasında, akrozomal bütünlük bakımından, L-karnitin yüksek dozunu içeren L3 grubunda en yüksek olduğu saptandı ($P<0.05$). L-karnitin gruplarından L1 ve L2 arasında bir fark olmadığı gözlemlendi ($P>0.05$). ALA gruplarına bakıldığında, dozun 1 mM düzeyine çıkmasının olumsuz etkileri olduğu saptandı ($P<0.05$). Alfa lipoik asitin akrozom bütünlüğü üzerine olan olumsuz etkilerinin L-karnitin ile birlikte kullanıldığında azaldığı ve L-karnitin dozu arttıkça bu etkinin daha da azaldığı saptandı ($P<0.05$).

Tablo-1. Tüm Aşamalardan Elde Edilen Spermatolojik Parametreler

Aşama	Grup	Motilite (%)	HOST (%)	PSA (%)
Pooling		85,00±2,76 ^a	92,80±3,21 ^a	91,20±3,01 ^{AB}
Sulandırma Sonrası	Kontrol	79,00±2,76 ^{abcd}	91,91±3,60 ^a	93,40±3,01 ^B
	L-Karnitin 25 mM	82,00±2,76 ^{ab}	90,80±3,21 ^a	94,40±3,01 ^B
	L-Karnitin 50 mM	77,00±2,76 ^{bcde}	88,80±3,21 ^a	94,00±3,01 ^B
	L-Karnitin 100 mM	80,00±2,76 ^{abcd}	90,60±3,21 ^a	92,60±3,01 ^B
	Alfa lipoik asit 0,25 mM	80,00±2,76 ^{abcd}	90,60±3,21 ^a	92,60±3,01 ^B
	Alfa lipoik asit 0,50 mM	84,00±2,76 ^{ab}	90,40±3,21 ^a	90,25±3,36 ^{AB}
	Alfa lipoik asit 1 mM	81,00±2,76 ^{abc}	88,80±3,21 ^a	90,00±3,01 ^{AB}
	L-Karnitin 25 mM - Alfa lipoik asit 0,25 mM	83,00±2,76 ^{ab}	88,44±3,60 ^{ab}	92,80±3,01 ^B
	L-Karnitin 25 mM - Alfa lipoik asit 0,50 mM	79,00±2,76 ^{abcd}	89,00±3,21 ^a	92,00±3,01 ^B
	L-Karnitin 25 mM - Alfa lipoik asit 1 mM	81,00±2,76 ^{abc}	86,20±3,21 ^{abc}	95,20±3,01 ^B
	L-Karnitin 50 mM - Alfa lipoik asit 0,25 mM	80,00±2,76 ^{abcd}	89,20±3,21 ^a	91,40±3,01 ^{AB}
	L-Karnitin 50 mM - Alfa lipoik asit 0,50 mM	78,00±2,76 ^{abcd}	89,00±3,21 ^a	94,60±3,01 ^B
	L-Karnitin 50 mM - Alfa lipoik asit 1 mM	79,00±2,76 ^{abcd}	89,20±3,21 ^a	88,80±3,01 ^{zAB}
	L-Karnitin 100 mM - Alfa lipoik asit 0,25 mM	73,00±2,76 ^{defg}	85,60±3,21 ^{abcd}	94,40±3,01 ^B
Eklibrasyon Sonrası	L-Karnitin 100 mM - Alfa lipoik asit 0,50 mM	74,00±2,76 ^{cdef}	88,56±3,60 ^{ab}	90,82±3,36 ^{AB}
	L-Karnitin 100 mM - Alfa lipoik asit 1 mM	73,00±2,76 ^{defg}	86,20±3,21 ^{abc}	92,00±3,01 ^B
	Kontrol	69,00±2,76 ^{fgh}	79,80±3,21 ^{bcde}	90,80±3,01 ^{AB}
	L-Karnitin 25 mM	64,00±2,76 ^{hij}	77,40±3,21 ^{cdef}	92,60±3,01 ^B
	L-Karnitin 50 mM	57,00±2,76 ^{ijk}	73,40±3,21 ^{efg}	92,00±3,01 ^B
	L-Karnitin 100 mM	41,00±2,76 ^{opqr}	69,60±3,21 ^{fghi}	93,00±3,01 ^B
	Alfa lipoik asit 0,25 mM	70,00±2,76 ^{efgh}	77,60±3,21 ^{cdef}	92,00±3,01 ^B
	Alfa lipoik asit 0,50 mM	70,00±2,76 ^{efgh}	77,00±3,21 ^{def}	91,20±3,01 ^{AB}
	Alfa lipoik asit 1 mM	68,00±2,76 ^{fgh}	77,60±3,21 ^{cdef}	89,80±3,01 ^{AB}
	L-Karnitin 25 mM - Alfa lipoik asit 0,25 mM	66,00±2,76 ^{hgu}	75,19±3,60 ^{efg}	90,60±3,01 ^{AB}
	L-Karnitin 25 mM - Alfa lipoik asit 0,50 mM	60,00±2,76 ^{ijk}	72,00±3,21 ^{efg}	93,80±3,01 ^B
	L-Karnitin 25 mM - Alfa lipoik asit 1 mM	53,00±2,76 ^{klm}	71,00±3,21 ^{efgh}	91,80±3,01 ^B
	L-Karnitin 50 mM - Alfa lipoik asit 0,25 mM	49,00±2,76 ^{lmn}	66,80±3,21 ^{ghij}	90,20±3,01 ^{AB}
	L-Karnitin 50 mM - Alfa lipoik asit 0,50 mM	46,00±2,76 ^{mno}	71,81±3,60 ^{efgh}	93,80±3,01 ^B
Erime Sonrası 0. Saat	L-Karnitin 50 mM - Alfa lipoik asit 1 mM	45,00±2,76 ^{mno}	62,20±3,21 ^{ijkl}	90,80±3,01 ^{AB}
	L-Karnitin 100 mM - Alfa lipoik asit 0,25 mM	23,00±2,76 ^{vwx}	55,40±3,21 ^{lm}	94,40±3,01 ^B
	L-Karnitin 100 mM - Alfa lipoik asit 0,50 mM	18,00±2,76 ^{xy}	53,60±3,21 ^{lmn}	92,60±3,01 ^B
	L-Karnitin 100 mM - Alfa lipoik asit 1 mM	16,00±2,76 ^{xy}	54,20±3,21 ^{lm}	91,00±3,01 ^{AB}
	Kontrol	56,00±1,59 ^k	59,07±1,86 ^{kl}	74,13±1,74 ^{rstuv}
	L-Karnitin 25 mM	44,33±1,59 ^{nop}	52,67±1,86 ^{mn}	78,27±1,74 ^{vwx}
	L-Karnitin 50 mM	29,00±1,59 ^{uvw}	45,53±1,86 ^{opq}	81,67±1,74 ^{xy}
	L-Karnitin 100 mM	6,40±1,59 ^{AB}	23,47±1,86 ^{BCDEF}	84,80±1,74 ^{yzA}
	Alfa lipoik asit 0,25 mM	59,00±1,59 ^{ijk}	64,00±1,86 ^{hijk}	74,00±1,74 ^{rstuv}
	Alfa lipoik asit 0,50 mM	55,00±1,59 ^{kl}	63,60±1,86 ^{ijk}	76,80±1,74 ^{uvw}
	Alfa lipoik asit 1 mM	55,67±1,59 ^k	61,40±1,86 ^{kl}	75,47±1,74 ^{tuv}
	L-Karnitin 25 mM - Alfa lipoik asit 0,25 mM	41,67±1,59 ^{opq}	49,93±1,86 ^{mno}	78,53±1,74 ^{vwx}
	L-Karnitin 25 mM - Alfa lipoik asit 0,50 mM	39,33±1,59 ^{pqr}	48,13±1,86 ^{mnp}	76,40±1,74 ^{uvw}
	L-Karnitin 25 mM - Alfa lipoik asit 1 mM	36,33±1,59 ^{rs}	45,27±1,86 ^{opq}	74,93±1,74 ^{stuv}
Erime Sonrası 3. Saat	L-Karnitin 50 mM - Alfa lipoik asit 0,25 mM	25,67±1,59 ^v	34,73±1,86 ^{stuv}	71,53±1,74 ^{pqrst}
	L-Karnitin 50 mM - Alfa lipoik asit 0,50 mM	21,00±1,59 ^{wx}	33,67±1,86 ^{tuvw}	72,73±1,74 ^{qrstu}
	L-Karnitin 50 mM - Alfa lipoik asit 1 mM	27,67±1,59 ^{vu}	38,93±1,86 ^{rs}	75,93±1,80 ^{tuvw}
	L-Karnitin 100 mM - Alfa lipoik asit 0,25 mM	4,87±1,59 ^{BC}	13,80±1,86 ^H	82,00±1,74 ^{xyz}
	L-Karnitin 100 mM - Alfa lipoik asit 0,50 mM	4,40±1,59 ^{BCD}	16,13±1,86 ^{GH}	80,73±1,74 ^{wxy}
	L-Karnitin 100 mM - Alfa lipoik asit 1 mM	4,20±1,59 ^{BCD}	14,00±1,86 ^H	80,33±1,74 ^{wxy}
	Kontrol	48,67±1,59 ^{mn}	50,80±1,86 ^{mn}	63,80±1,74 ^{lmn}
	L-Karnitin 25 mM	32,00±1,59 ^{stu}	41,53±1,86 ^{qr}	66,36±1,80 ^{mno}
	L-Karnitin 50 mM	13,40±1,59 ^{yz}	35,93±1,86 ^{stu}	71,20±1,74 ^{opqrst}
	L-Karnitin 100 mM	0,20±1,59 ^D	6,93±1,86 ^I	75,40±1,74 ^{tuv}
	Alfa lipoik asit 0,25 mM	38,67±1,59 ^{qr}	46,40±1,86 ^{nopq}	57,27±1,74 ^{hi}
	Alfa lipoik asit 0,50 mM	32,33±1,59 ^s	44,47±1,86 ^{pq}	55,73±1,74 ^{fghi}
	Alfa lipoik asit 1 mM	25,33±1,59 ^{vw}	35,60±1,86 ^{stu}	49,80±1,74 ^{cde}
	L-Karnitin 25 mM - Alfa lipoik asit 0,25 mM	27,67±1,59 ^{vu}	37,93±1,86 ^{rst}	60,07±1,74 ^{ijkl}
	L-Karnitin 25 mM - Alfa lipoik asit 0,50 mM	9,40±1,59 ^{zA}	29,73±1,86 ^{vwxyz}	57,60±1,74 ^{hij}
	L-Karnitin 25 mM - Alfa lipoik asit 1 mM	3,73±1,59 ^{BCD}	25,07±1,86 ^{zABCD}	58,80±1,74 ^{hijk}
	L-Karnitin 50 mM - Alfa lipoik asit 0,25 mM	3,33±1,59 ^{BCD}	20,60±1,86 ^{DEFG}	64,40±1,74 ^{lmn}
	L-Karnitin 50 mM - Alfa lipoik asit 0,50 mM	1,47±0,49 ^{CD}	31,60±1,86 ^{uvwxy}	68,71±1,87 ^{nopq}
	L-Karnitin 50 mM - Alfa lipoik asit 1 mM	3,60±1,59 ^{BCD}	30,80±1,86 ^{uvwxy}	62,40±1,74 ^{ijklm}
	L-Karnitin 100 mM - Alfa lipoik asit 0,25 mM	0,00±1,59 ^D	5,67±1,86 ^I	72,80±1,74 ^{qrstu}
	L-Karnitin 100 mM - Alfa lipoik asit 0,50 mM	0,00±1,59 ^D	4,73±1,86 ^I	70,40±1,74 ^{opqrs}
	L-Karnitin 100 mM - Alfa lipoik asit 1 mM	0,00±1,59 ^D	3,33±1,86 ^I	69,67±1,74 ^{opqr}

Eritme Sonrası 6. Saat	Kontrol	27,00±1,59 ^v	37,27±1,86 ^{rs}	51,20±1,74 ^{def}
	L-Karnitin 25 mM	15,00±1,59 ^y	27,87±1,86 ^{xyzAB}	59,73±1,74 ^{ijkl}
	L-Karnitin 50 mM	3,60±1,59 ^{BCD}	25,87±1,86 ^{yzABC}	62,60±1,74 ^{klm}
	L-Karnitin 100 mM	0,00±1,59 ^D	2,80±1,86 ^I	67,53±1,74 ^{nop}
	Alfa lipoik asit 0,25 mM	14,00±1,59 ^y	31,80±1,86 ^{uvwx}	46,07±1,74 ^{bc}
	Alfa lipoik asit 0,50 mM	3,60±1,59 ^{BCD}	29,00±1,86 ^{wxyzA}	42,27±1,74 ^{ab}
	Alfa lipoik asit 1 mM	4,67±1,59 ^{BC}	24,00±1,86 ^{ABCDE}	35,13±1,74 ^a
	L-Karnitin 25 mM - Alfa lipoik asit 0,25 mM	9,40±1,59 ^{zA}	27,20±1,86 ^{xyzAB}	51,73±1,74 ^{defg}
	L-Karnitin 25 mM - Alfa lipoik asit 0,50 mM	0,20±1,59 ^D	22,73±1,86 ^{BCDEF}	47,13±1,74 ^{bcd}
	L-Karnitin 25 mM - Alfa lipoik asit 1 mM	1,00±1,59 ^{CD}	14,87±1,86 ^H	47,17±1,80 ^{bcd}
	L-Karnitin 50 mM - Alfa lipoik asit 0,25 mM	0,13±1,59 ^D	18,93±1,86 ^{EF GH}	57,27±1,74 ^{hi}
	L-Karnitin 50 mM - Alfa lipoik asit 0,50 mM	0,20±1,59 ^D	18,60±1,86 ^{F GH}	56,40±1,74 ^{ghi}
	L-Karnitin 50 mM - Alfa lipoik asit 1 mM	0,47±1,59 ^{CD}	21,79±1,92 ^{CDEF}	54,07±1,74 ^{efgh}
	L-Karnitin 100 mM - Alfa lipoik asit 0,25 mM	0,00±1,59 ^D	3,93±1,86 ^I	62,27±1,74 ^{ijklm}
	L-Karnitin 100 mM - Alfa lipoik asit 0,50 mM	0,00±1,59 ^D	2,53±1,86 ^I	62,40±1,74 ^{ijklm}
	L-Karnitin 100 mM - Alfa lipoik asit 1 mM	0,00±1,59 ^D	2,13±1,86 ^I	60,07±1,74 ^{ijkl}

a- z, A- Z: Aynı sütünde farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasında istatistiki fark vardır (P<0,05)

HOST: Plazma membran bütünlüğü

PSA: Akrozomal bütünlük

Tablo 2: Motilite ile Dondurma-Eritme ve İnkübasyon Aşamalarının İstatistiksel Etkileşimi

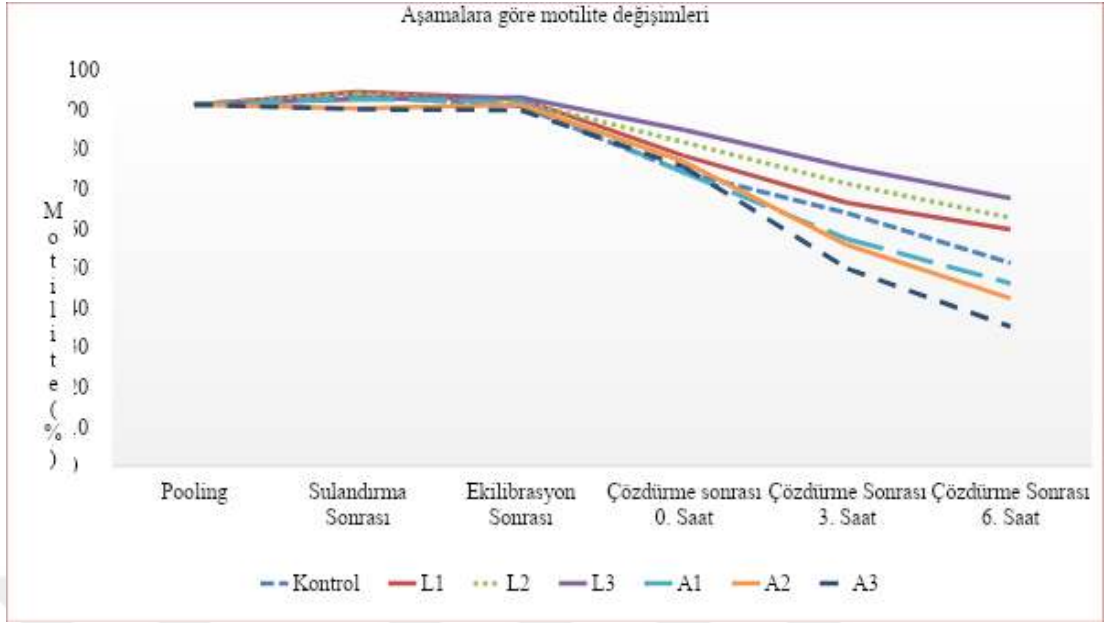
MOTİLİTE	Ekilibasyon Sonrası	Eritme Sonrası 0. Saat	Eritme Sonrası 3. Saat	Eritme Sonrası 6. Saat
Sulandırma Sonrası	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Ekilibasyon Sonrası	-	<0.001	<0.001	<0.001
Eritme Sonrası 0. Saat		-	<0.001	<0.001
Eritme Sonrası 3. Saat			-	<0.001

Tablo 3: Plazma Membran Fonksiyonel Bütünlüğü (HOST) ile Dondurma-Eritme ve İnkübasyon Aşamalarının İstatistiksel Etkileşimi

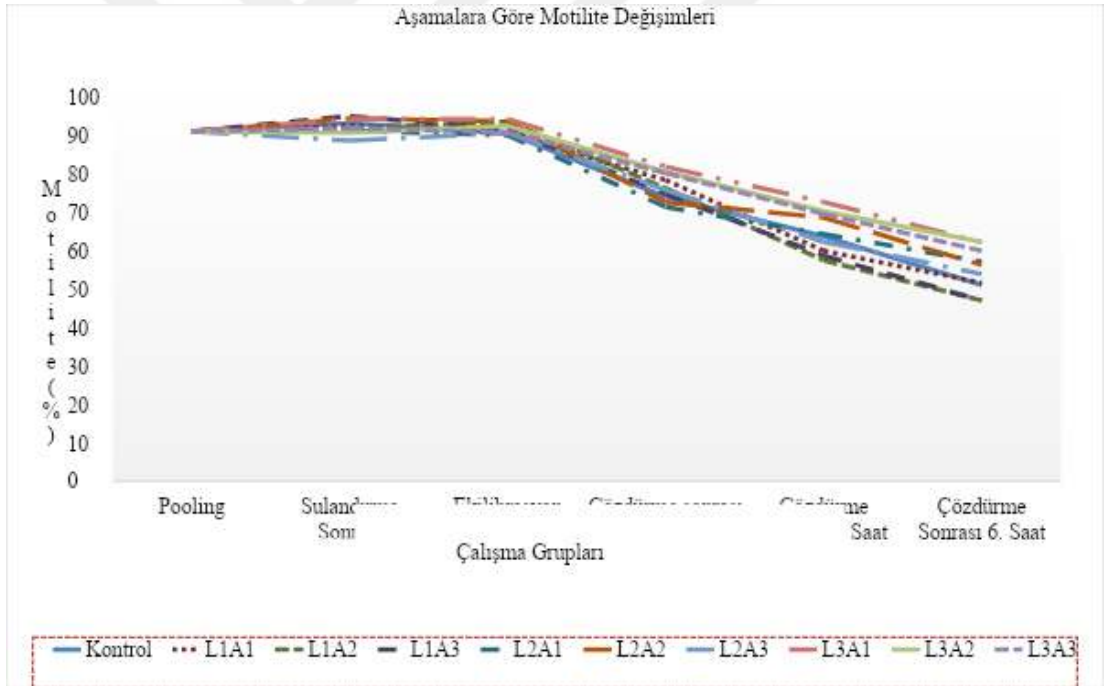
HOST	Ekilibasyon Sonrası	Eritme Sonrası 0. Saat	Eritme Sonrası 3. Saat	Eritme Sonrası 6. Saat
Sulandırma Sonrası	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Ekilibasyon Sonrası	-	<0.001	<0.001	<0.001
Eritme Sonrası 0. Saat		-	<0.001	<0.001
Eritme Sonrası 3. Saat			-	<0.001

Tablo 4: Akrozom Bütünlüğü (PSA) ile Dondurma-Eritme ve İnkübasyon Aşamalarının İstatistiksel Etkileşimi

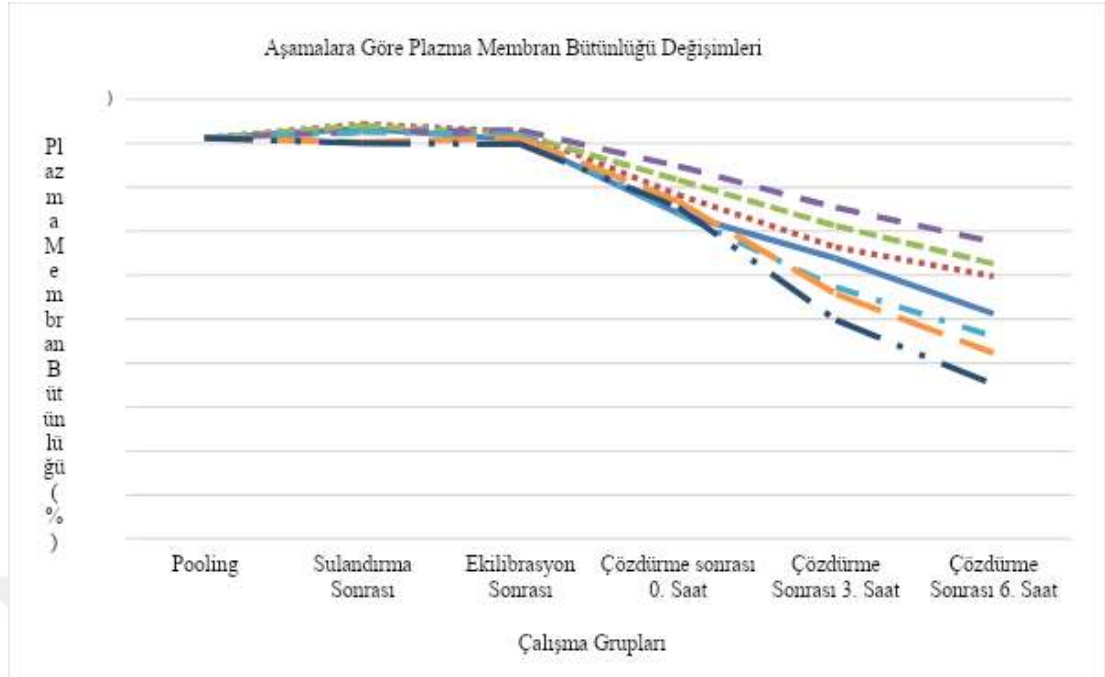
PSA	Ekilibasyon Sonrası	Eritme Sonrası 0. Saat	Eritme Sonrası 3. Saat	Eritme Sonrası 6. Saat
Sulandırma Sonrası	>0.05	<0.001	<0.001	<0.001
Ekilibasyon Sonrası	-	<0.001	<0.001	<0.001
Eritme Sonrası 0. Saat		-	<0.001	<0.001
Eritme Sonrası 3. Saat			-	<0.001



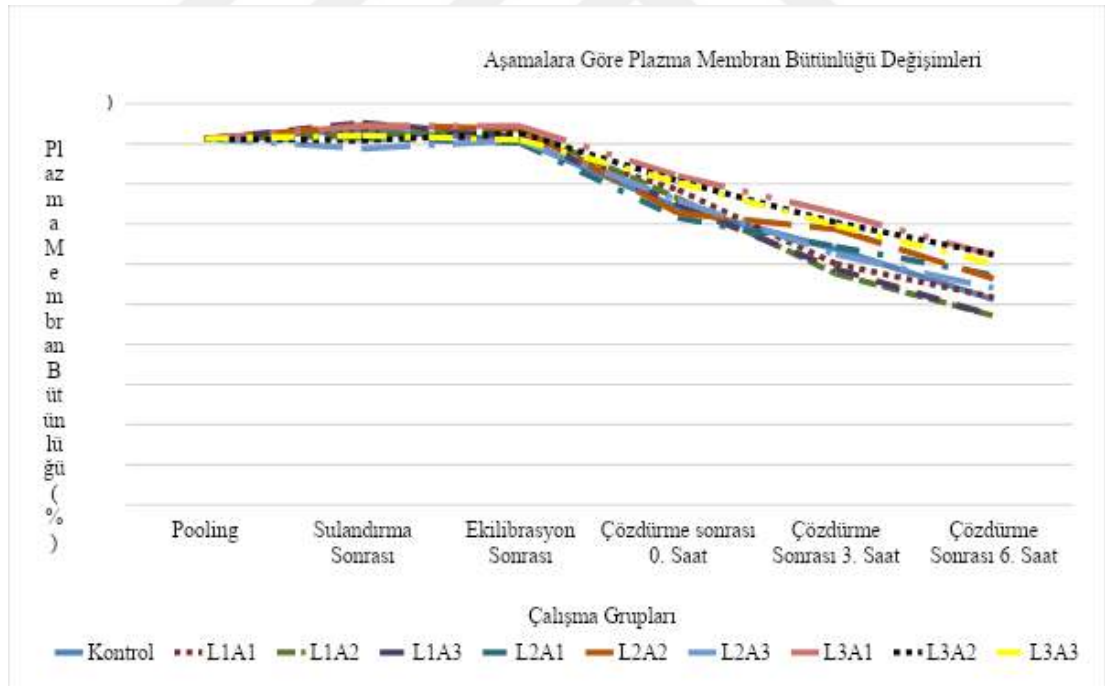
Şekil-1. Aşamalara göre motilite değişimi



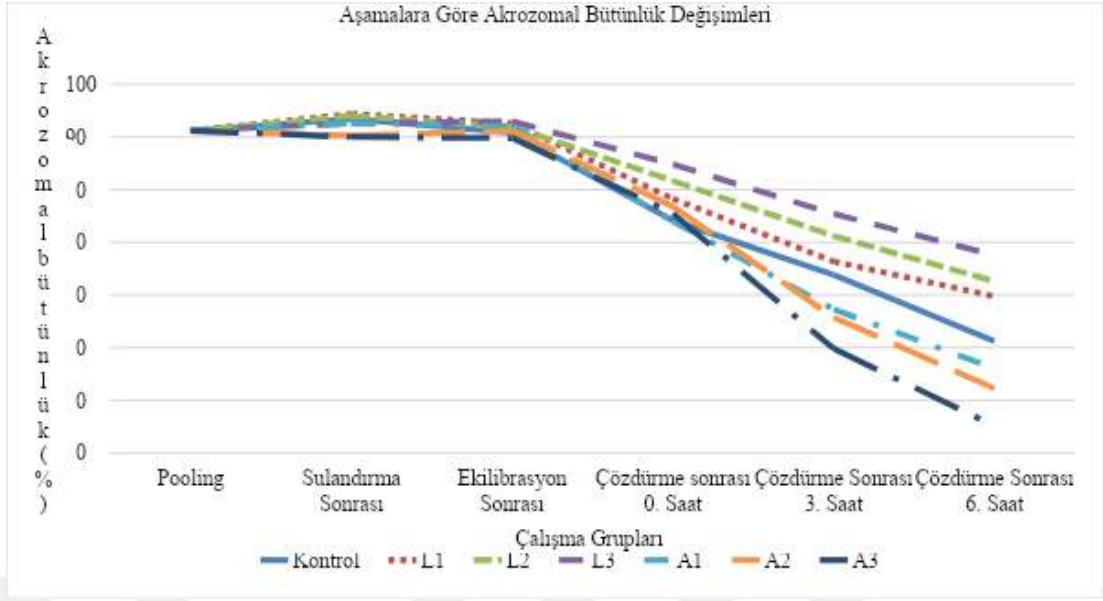
Şekil-2. Aşamalara göre karışım gruplarında motilite değişimi



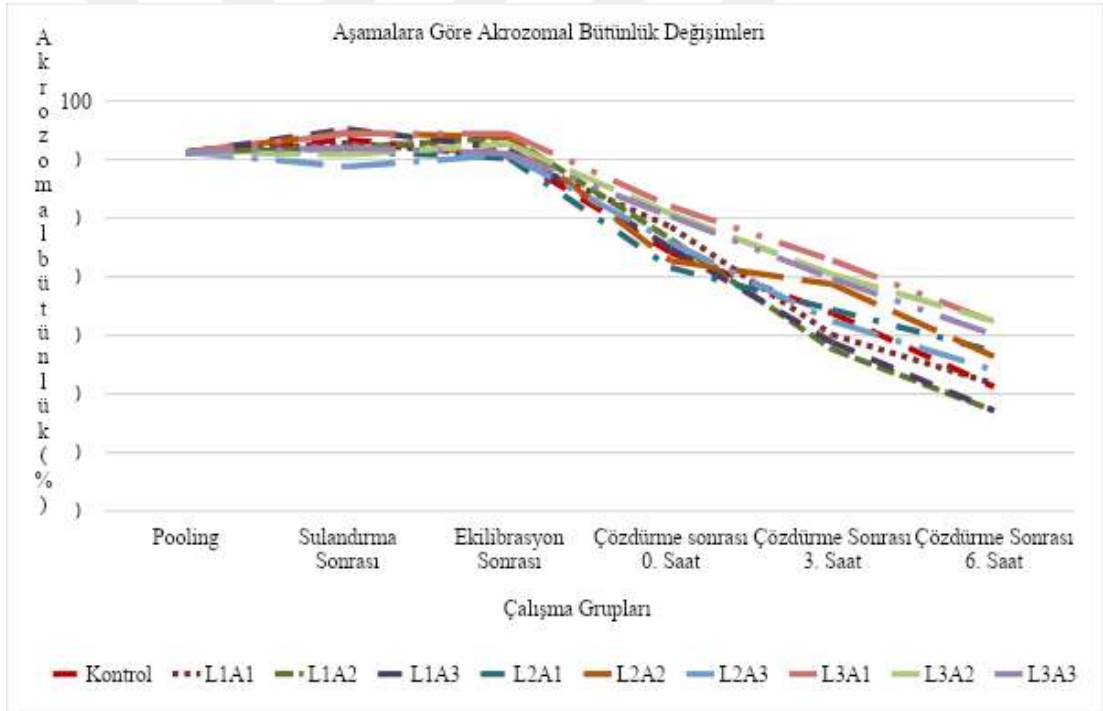
Şekil-3. Aşamalara göre plazma membran bütünlüğü değişimi



Şekil-4. Aşamalara göre karışım gruplarında plazma membran bütünlüğü değişimi



Şekil-5. Aşamalara göre akrozomal bütünlük değişimi



Şekil-6. Aşamalara göre karışım gruplarında akrozomal bütünlük değişimi



Şekil-7. FITC-PSA boyama sonrası sağlam akrozoma sahip spermatazoon



Şekil-8. FITC-PSA boyama sonrası bozuk akrozoma sahip spermatazoa



Şekil-9. HOST Sonrası Solda Sağlam Plazma Membran Bütünlüğüne Sahip Olmayan Spermatozoa ve Sağda Kuyruğu Kıvrılmış Sağlıklı Spermatozoa

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yardımcı üreme tekniklerinin en eskilerinden biri olan suni tohumlama, spermanın alınması, sulandırılması, porsiyonlara bölünerek soğutulup dondurulması ve eritildikten sonra çeşitli gereçler yardımıyla dişi genital kanal içerisine bırakılmasını kapsamaktadır. Suni tohumlama tekniğinin başlangıçtaki kullanım amacı, çeşitli hastalıklardan korunma gibi sağlıkla ilgili nedenlerden kaynaklanmıştır. Ancak, kısa sürede üreticiler bu yöntemin, sürünün birçok özelliğinin hızlı bir şekilde iyileştirilmesi için kullanılabileceği kanısına varmıştır. Spermanın kriyoprezervasyonu ile birlikte suni tohumlama uygulamalarının avantajları daha da artmıştır. Bu uygulamalar yardımıyla gebelik oranları iyileşmiş ve genetik ilerleme hızlandırılmıştır. İlerleyen dönemlerde, dişi reproduktif fizyolojisinin aydınlatılması ve tohumlamalarda kullanılan spermatozoa yoğunluğunun düşürülmesi ile birlikte, suni tohumlama uygulamalarının sayısı artmış ve genetik olarak çok değerli damızlık erkeklerin nesillerinin aktarımı hız kazanmıştır. (Faigl ve ark., 2012).

Taze koç ejakülatının genel olarak mililitresinde 3.5 ila 6 milyar hücre bulunur, motilitesi %80-90 arasındadır ve morfolojik yönden sağlam spermatozoa oranı %70-80'dir (Faigl ve ark., 2012). Üreme mevsimi, sperma alınırken hayvana yapılan muamele, sperma alma yöntemi, ortam ısısı, soğuk şoku, kontaminasyon ve güneş ışığı alınan spermanın kalitesini olumsuz yönde etkiler (Faigl ve ark., 2012; Nur, 2011). Sunulan çalışmada, elektro-ejakülatör yardımı ile sperma alınarak en az +++ mass aktivite, %70 motilite ve $1,5 \times 10^9$ spermatozoon/ml özelliğindeki sperma örnekleri pooling yapıldı. Pooling yapılan (n=5) ejakülatlara ait ortalama sperma motilitesi %85 olarak bulundu. Taze koç spermasında Aral ve Aral (2004) %83,75, Faigl ve ark. (2012) %80-90, Alcay ve ark. (2015) %79, Üstüner ve ark. (2016) %78 motilite oranı bildirmişlerdir. Bu değer farklılıklarının, koç spermasının mevsim içinde veya dışında alınmasından, bireysel özelliklerden, sperma alma yönteminden ve beslenme gibi farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sperm membranının fonksiyonel durumunun incelenmesinin özel bir önemi vardır. Fonksiyonel olarak aktif bir membranın metabolizma, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, oositin bağlanması ve penetrasyonunda önemli bir rolü bulunur (Correa ve ark., 1997; Hafez, 2000). Jeyendran ve ark. (1984) tarafından geliştirilen hipoozmotik şişme testi, memeli spermanın membranının fonksiyon bütünlüğünün değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Pooling sonrası taze spermada fonksiyonel plazma membran yapısı olan spermatozoon oranı %93 olarak bulunmuştur. Motilite ve sperma membran fonksiyonel bütünlüğü arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır (Bedfoed ve Hoskins, 1990). Koç spermasında Alcay ve ark. (2015) %89,2 ve Üstüner ve ark. (2016) %83 oranında fonksiyonel plazma membranı oranı bildirmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında elde edilen değere yakın olan bu değerler, çalışmada elde edilen poolinge ait sperma motilitesinin daha yüksek olması ile açıklanabilir.

Memeli hayvanlarda, sperma hücreleri fertilizasyon sırasında akrozom reaksiyonu olarak bilinen bir süreçten geçerler. Akrozom reaksiyonu, membran vezikülasyonu ile birlikte, spermanın baş bölgesindeki plazma membranı ile apikal ucun altında bulunan dış akrozomal membranın füzyonu olgularından oluşur. Plazma membranı ve dış akrozomal membranın yapısının bozulması ile akrozomal enzimler salınarak iç akrozomal membran açığa çıkar. Ortama bırakılan akrozomal enzimlerin parçalayıcı etkileri ile spermanın zona pellusidaya ilerleyerek oosite bağlanmasını ve fertilizasyonun tamamlanmasını sağlarlar (Larson ve Miller, 1999).

Fertilizasyonda görev alan hyaluronidaz, korona bağlayıcı enzim ve tripsin gibi çeşitli enzimleri içerisinde bulunduran akrozomun, oosit ile buluştuğunda sağlamlığını korumuş olması gerekmektedir (Hafez, 2000; İleri ve ark., 2000; Pesch ve Bergmann, 2006). Taze koç spermasında sağlam akrozom oranının %84 ile %96 arasında olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Alcay ve ark., 2013; Alcay ve ark., 2016b; Nur ve ark., 2011; Üstüner ve ark., 2016). Sunulan çalışmada da pooling yapılan spermada, benzer oranda, ortalama %91 oranında sağlam akrozom oranı elde edildi.

Spermanın saklanması amacıyla yapılan işlemlerde, spermatozoonun yaşamsal fonksiyonlarına devam ederek fertilizasyon yeteneğini koruyabilmesi için

sulandırılması gerekmektedir (Nur, 2011). Günümüzde yapılan çalışmalarda, yaygın olarak Tris bazlı, sodyum sitrat içeren ve yumurta sarılı sulandırıcılar kullanılmaktadır (Alcay ve ark., 2016b; Nur ve ark., 2010; Nur, 2011). Sperma, sulandırıcı çeşidine bağlı olarak, tek veya iki aşamalı sulandırma tekniğine göre sulandırılır (Alcay ve ark., 2016b; Nur ve ark., 2010; Nur, 2011).

Sperma sulandırıcıları; tampon maddeleri (Tris, EDTA), karbonhidratları (trehaloz, früktoz), tuzları (sitrik asit), antioksidanları (L-karnitin ve Alfa lipoik asit), kriyoprotektanı (yumurta sarısı ve gliserol) ve antibiyotikleri içerir. Sulandırıcı içeriğini oluşturan bu kimyasallar, spermelerin farklı bölümleriyle etkileşime girerek ozmotik ve toksik gerilmelere yol açar ve sulandırma işleminden hemen sonra hücre ile etkileşime geçerek metabolizmasında biyokimyasal değişikliklere neden olur (Aisen ve ark, 2002; Ak ve ark., 2010; Sönmez, 2013). Sulandırıcı A ile sulandırma sonrası kontrol grubunda motilite, plazma membran ve akrozom bütünlüğü bulguları pooling sonrası bulgularla karşılaştırıldığında, temel sulandırıcı ile sulandırmanın spermatolojik özellikleri etkilemediği görülmüştür ($P>0.05$). Tris-sitrik asit temel sulandırıcısı kullanılarak koç spermasında yapılan çalışmalarda, iki aşamalı sulandırma tekniğinde, sulandırıcı A ile sulandırmanın spermatolojik özellikleri önemsiz düzeyde etkilediği bildirilmiştir (Soylu ve ark., 2007; Alcay ve ark., 2013; Alcay ve ark., 2016b). Sulandırma işleminin deneme gruplarının spermatolojik özelliklerini değişik düzeylerde olumsuz etkilediği görülmüştür. L2 ve L3A1-3 gruplarına ait motilite değerlerinin sulandırma işleminden olumsuz etkilendiği belirlendi ($P<0.05$).

Fattah ve ark., (2017), taze horoz sperması ile yaptıkları çalışmada, farklı oranlarda sulandırıcılara eklenen L-karnitinin 0. saatte sperma motilitesini, viabilitesini, membran fonksiyonunu ve lipit peroksidasyonunu düşük düzeylerde etkilediği bildirilmişlerdir. Tavşan sperması ile yapılan bir çalışmada, sulandırıcılara farklı düzeyde L-karnitin eklenmesinin, sulandırma sonrası aşamada, spermatolojik özellikleri önemsiz düzeyde iyileştirdiği bildirilmiştir (Sarıözkan ve ark., 2014). Sunulan çalışmada, değerlendirilen spermatolojik özellikler bakımından, deneme gruplarının kimi spermatolojik değerlerinin rakamsal olarak daha iyi olmalarına karşın, kontrol grubu ile benzer olduğu görülmüştür ($P>0.05$). Bu durum, sulandırıcıya

eklenen L-karnitin veya Alfa lipoik asitin enerji döngüsündeki etkileri ve antioksidan özellikleri ile açıklanabilir.

Sperma, ilgili grubun birinci aşama sulandırıcısıyla sulandırıldıktan sonra, spermatozoanın metabolik aktivitelerinin yavaşlaması ve bu düşük metabolik aktiviteye alışması amacıyla en az 1 saat içerisinde 5°C ısıya düşürüldü. Daha sonra, aşamalı olarak sulandırıcı B ile sulandırılan sperma, 2 saat süreyle sulandırıcı B içeriği ile alışım ve spermanın içinde bulunduğu ortam ile dengelenmesi amacıyla ekilibrasyona bırakıldı. Bu aşamada, sulandırıcı A ile sulandırma sonrası bulgular ile karşılaştırıldığında sperm motilitesi ($P<0.001$), plazma membran ($P<0.001$) bütünlüğünün olumsuz etkilendiği görüldü. Sulandırıcının ozmotik basıncı, gliserol oranı ve katılma zamanı, soğutma hızı, sulandırıcı A ve sulandırıcı B ile sulandırma zamanı ekilibrasyon sonrası sperm motilitesini ve morfolojisini olumsuz etkilemektedir (Ak ve ark., 2010). Çalışmada kontrol grubunun sulandırılmasında kullanılan sulandırıcılar kullanılarak yapılmış olan çalışmalarda, ekilibrasyon sonrası %71 ve %65 düzeyinde, sunulan çalışmaya benzer (%69) motilite oranı bildirilmiştir (Alcay ve ark., 2015; Alcay ve ark., 2016b).

L-karnitin ve Alfa lipoik asidin sperma üzerindeki etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmalara rastlanmamıştır. Farklı oranlarda Alfa lipoik asit içeren sulandırıcı ile sulandırılarak 7 gün boyunca 17°C ısıda saklanan domuz sperması ile yapılan bir çalışmada, Alfa lipoik asitin, kısa süreli (1 gün) saklamada canlılık ve akrozom bütünlüğü üzerine olumlu etkisinin olmadığı, daha çok uzun süreli saklamada koruyucu olduğu bildirilmiştir (Pindaru ve Groza, 2015). Sunulan çalışmada da, ekilibrasyon sonrası yalnızca Alfa lipoik asit içeren grupların spermatolojik bulgularının kontrol grubu ile benzer olduğu bulunmuştur. Benzer biçimde, yalnızca L-karnitin yüksek dozunu içeren L2 ve L3 grubunun motilite değerleri, L3 grubunun plazma fonksiyonel membran bütünlüğü dışında, diğer bulguların kontrol grubu ile benzer olduğu belirlendi. Lee ve ark.(2014), 5°C ısıda 10 gün boyunca sakladıkları minyatür domuz sperması sulandırıcılarına farklı dozlarda L-karnitin ekledikleri bir çalışmada, 3. günde L-karnitin içermeyen kontrol grubunun canlı sperm oranı, canlı ve akrozomu bozuk spermatozoa oranının deneme grupları ile benzer, mitokondriyal bütünlüğün ise düşük olduğunu bildirmişlerdir. Ekilibrasyon sonrası motilite oranı

bakımından yalnızca Alfa lipoik asit içeren grupların motilite oranının, L1 grubu dışında, diğer L-karnitin içeren L2 ve L3 gruplara göre daha yüksek olduğu bulundu ($P<0.05$). Karışım gruplarına ait motilite değerlerinin, L1A1 grubunun motilite değeri hariç ($P>0.05$), kontrol grubundan daha düşük olduğu ($P<0.05$) ve sulandırıcı içerisindeki L-karnitin düzeyi arttıkça motilitenin genel olarak düştüğü görülmüştür. Bu durum, yalnızca L-karnitin içeren gruplarda da belirlenmiştir. Fattah ve ark. (2017) da, 24 saat bekletilen horoz spermasında sulandırıcıdaki L-karnitin düzeyi arttıkça motilitenin düştüğünü bildirmişlerdir.

Yapılan araştırmalarda plazma membran bütünlüğüne sahip spermatozoa oranı ile motilite ve canlı spermatozoa arasında yüksek düzeyde korelasyon olduğu bildirilmiştir (Alcay ve ark., 2015; Alcay ve ark., 2016b; Soylu ve ark., 2007). Ekilibrasyon aşamasında, L3 grubunun ortalama plazma membran bütünlüğü dışında ($P<0.05$), L-karnitin ve Alfa lipoik asidin tek başına kullanıldığı grupların plazma membran bütünlüğü değerlerinin kontrol grubu bulguları ile benzer olduğu görülmüştür ($P>0.05$). Deneme grupları arasında bir fark bulunmamıştır. L-karnitin ve Alfa lipoik asidin tek başına kullanıldığı gruplardan elde edilen plazma membran bütünlüğü, L-A- grupları ile karşılaştırıldığında, L-karnitin 25 mM grupları ve L2A1, L2A2 grupları dışında, L-A-'nın diğer gruplarına göre daha yüksek olduğu görüldü ($P<0.05$). Flow sitometri kullanarak farklı oranda L-karnitin ekleyen Lee ve ark. (2014), minyatür domuz spermasını 18°C'de 10 gün boyunca sakladıkları örneklerde, genellikle kontrol grubunda, daha yüksek oranda canlı spermatozoa oranı bildirmişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda L-karnitin eklenmesinin akrozom bütünlüğünü olumsuz etkilediği bildirilmişlerdir. Pindaru ve Groza (2015), Alfa lipoik asit içeren sulandırıcılarla sulandırılarak 7 gün beklettikleri domuz spermasında, 24 saat sonrasında akrozomal bütünlük bakımından fark olmadığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da, ekilibrasyon sonrası aşamada, çalışma gruplarının akrozom bütünlüğü bulgularının kontrol grubuna benzer olduğu ve çalışma grupları arasında istatistiksel fark bulunmadığı görülmüştür ($P>0.05$).

Spermatozoanın gelişimsel ve metabolik sürecini geçici olarak fertilizasyon zamanına kadar yavaşlatıp durdurma, diğer bir deyişle, yaşamsal aktivitesini askıya almanın başarısı, spermanın dondurularak saklanması temel sorundur. Dondurma sırasında buz kristalleri oluşmakta ve donmayan bölümlerin yarattığı ozmotik basınca

bağlı olarak, ozmotik, kimyasal ve mekanik stres serisi oluşarak hücrelere zarar vermektedir. Zararlı buz oluşumlarını engellemek için sulandırıcılara çeşitli kriyoprotektan maddeler katılmaktadır. Ancak, bu maddelerin de yüksek dozları da hücreler için toksik etki yaratmaktadır (Pesch ve Bergmann, 2006).

Önemli gen kaynaklarının saklanması, belli bir soya ait genin korunabilmesi, spermanın çok uzak yerlere taşınabilmesi ve birçok dışının istenilen bireyin spermasıyla rahatlıkla tohumlanabilmesi gibi olanaklar, spermanın dondurulmasındaki avantajlara örnek olarak verilebilir. Dondurma işlemleriyle birlikte, alınan gebelikler bize küçük ruminantlarda suni tohumlama uygulamalarının iyi bir başarı yakaladığını göstermektedir (Gillan ve ark., 2004). Koç sperması, yapısında bulunan yoğun miktardaki çoklu doymamış yağ asitleri nedeniyle, düşük sıcaklıklara ve lipid peroksidasyonuna diğer türlere göre daha duyarlıdır (Allai ve ark., 2018). Her ne kadar sperma dondurma protokollerinde iyileştirmeler yapılmaya çalışılmış olsa da, dondurma işlemleri, taze spermaya göre bir takım fonksiyonel ve neredeyse ölümcül olan yıkımlara yol açmaktadır (Gillan ve ark., 2004). Bu yıkımların önlenmesi amacıyla, koç spermasının eritme sonrası niteliğini artırmak için, çeşitli tipte ve etkide olan antioksidan kullanımına yönelik çalışmalar yaygınlaşmıştır (Arando ve ark., 2019; Toker ve ark., 2016).

Dondurma ve eritme işlemleri, spermanın lipid bileşimini ve plazma membranının yapısını etkiler ve bu da antioksidanlar, akrozin, aspartat aminotransferaz gibi önemli hücre içi enzimlerin yanında, ATP gibi enerji substratlarının sızmasına neden olarak hücre ölümüne yol açar (Castro ve ark., 2016; Pinart ve ark., 2015; Fraser ve ark., 2007; Fraser ve ark., 2016). Sunulan çalışmada, ekilibasyon ve eritme sonrası spermatolojik veriler karşılaştırıldığında, dondurma eritme işleminin motilite ($P<0.001$), plazma membran fonksiyonel bütünlüğü ($P<0.001$) ve akrozom bütünlüğünü ($P<0.001$) olumsuz etkilediği görülmüştür. Yapılan çalışmalar, her bir tür ve hücre tipinin farklı bir sulandırma, soğutma, dondurma ve eritme gerektirdiğini; standart bir dondurma yönteminin kullanılamayacağını göstermiştir (Davidson ve ark., 2014; Mazur, 1963). Hatta aynı tür ve ırk içinde genetik varyasyonlara bağlı olarak bireyler arasında, donmaya karşı duyarlılığın farklı olduğu bildirilmiştir (Thurston ve ark., 2001). Dondurmaya bağlı

yıkım, eritme sonrasındaki aşamada kısmi olarak motilite ve membran fonksiyonel bütünlüğünün kaybolması ile tanımlanır (Meryman, 2007).

Kriyoprotektan maddenin türü ve niceliği, sulandırma, soğutma, dondurma ve eritme eritme sonrası spermatolojik özelliklerin kalitesini belirleyen temel etkenlerdir (Alcay ve ark., 2016b). Sunulan çalışmada, koç spermasının dondurulması amacıyla trehaloz içeren tris-sitrik asit temel sulandırıcısı kullanılmıştır (Nur ve ark., 2010). Kontrol grubunda eritme sonrası motilite, plazma membran fonksiyonel bütünlüğü ve sağlam akrozom oranı sırasıyla %56, %59 ve %74 olarak bulunmuştur. Benzer sulandırıcı içeriği ile yapılan çalışmalarda %54 (Alcay ve ark., 2015), %53 (Alcay ve ark., 2016b) ve %51 (Nur ve ark., 2010) motilite, %65 (Alcay ve ark., 2015), %68 (Alcay ve ark., 2016b) fonksiyonel plazma membran oranı ve %64 (Alcay ve ark., 2015), %45 (Alcay ve ark., 2016b) ve %40 (Nur ve ark., 2010) oranında sağlam akrozom oranı bildirilmiştir.

Memeli spermasında, yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitleri bulunur. Bu nedenle, ROS membran akışkanlığını etkileyip kalsiyum akışını artırarak membran proteinlerini yeniden düzenleyip plazma membranının yapısını bozar (Ahmad ve ark., 2013). Sperma sulandırıcılarına, antioksidan ve enerji metabolizmasındaki rolleri nedeniyle, L-karnitin ilavesi yapıldığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Manee-in ve ark., 2014; Bucak ve ark., 2010a). L- karnitin antioksidan aktivitesinin serbest demir iyonlarını şelatlamak, üretilen süperoksit iyonlarını inhibe etme ve birikmiş hidrojen peroksit türlerini detoksifiye etme yeteneğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Gülçin, 2006). Antioksidan aktivitesinin yanında, enerji metabolizmasında önemli rol oynayan L-karnitin, yağ asitlerinin mitokondriyanın iç membranı boyunca taşınmasını kolaylaştırır ve bu yağ asitleri beta-oksidasyona uğrayarak ATP üretiminde kullanılırlar. Böylece, spermatozoa tarafından kullanılacak enerji sağlanmış olur (Steiber ve ark., 2004). Ayrıca, spermada reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesi ATP rezervuarında tükenmeye neden olarak spermin niteliğini olumsuz yönde etkilenmektedir (Dokmeci, 2005). Sperma sulandırıcılarında kullanılan gliserol, DMSO, etilen glikol gibi kimi kriyoprotektanların, hücre içi L-karnitin miktarını azalttığı bildirilmiştir (Setyawan ve ark., 2009). Yedi gün boyunca -20°C’de saklanan insan spermasında, süre sonunda

hücre içi L-karnitini azalttığı bildirilmiştir (Suter ve Holland, 1979). L-karnitin antioksidan ve enerji üretiminde eş zamanlı olarak görev aldığından, sperma sulandırıcılarına eklenmesinin eritme sonrası spermatolojik bulgular üzerine yararlı etkiler sağlayabileceği düşünülmüş ve çalışmaya katılmıştır. Sperma sulandırıcılarında kullanılan gliserol, DMSO, etilen glikol gibi kimi kriyoprotektanların hücre içi L-karnitin miktarını azalttığı bildirilmiştir (Setyawati ve ark., 2009). Yüksek oranda antioksidan kullanımı, membran akışkanlığını artırarak spermatozoanın dış etkilere karşı duyarlılığını artırmaktadır (Shoae ve Zamiri, 2008). Sunulan çalışmada, L-karnitin kullanılan L1, L2 ve L3 gruplarında eritme sonrası motilite değerleri sırasıyla, %44,33, %29,00 ve %6,40; plazma membran bütünlüğü değerleri %52,67, %45,53, %23,47; ve akrozom bütünlüğü %78,27, %81,67, %84,80 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında, kontrol grubunda göre L-karnitin eklenmesinin motilite ve plazma membran bütünlüğünü olumsuz etkilediği ($P<0.05$), yüksek dozunun ise yalnızca akrozomal bütünlüğü daha iyi koruduğu görülmüştür ($P<0.05$). L-karnitin yüksek dozlarının hücre içine kalsiyum geçişini hızlandırarak motiliteyi baskıladığı bildirilmektedir (Deana ve ark., 1989). Sunulan çalışmada da, L-karnitin dozu arttıkça motilite azalmıştır ($P<0.05$). Kedi epididimal sperması sulandırıcılarına 25 mM ve 50mM L-karnitin eklenerek yapılan bir çalışmada, yalnızca 25 mM L-karnitin eklenen grupta eritme sonrası motilitenin anlamlı olarak üstün olduğu, plazma membran ve akrozomal bütünlüğü bakımından etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Manee-in ve ark., 2014). Souza ve ark., (2019)'nın koç sperması kullanarak yaptıkları çalışmada, sulandırıcıya 5 mM ve 10 mM L-karnitin eklenmesinin, eritme sonrası spermatolojik özellikleri korumada etkisiz olduğunu bildirmişlerdir. Bucak ve ark. (2010a), teke sperma sulandırıcılarına l-karnitini 2,5mM, 5mM ve 10mM ekleyerek yaptıkları çalışmada, L-karnitin eklenen grupların eritme sonrası motilitelerinin kontrol grubuna benzer olduğu, akrozom ve toplam morfolojik bozukluk oranı bakımından ise koruyucu bir etkisinin olduğu bildirilmiştir ($P<0.05$). Antioksidanların antioksidatif etkileri yoğun olarak hücre sitoplazmasında görülür. Gamet hücrelerinin yapıları, somatik hücrelere göre 6 kat daha kondansedir. Sitoplazmalarının düşük olması nedeniyle, antioksidanların etkinliği somatik hücrelerde daha belirgindir (Berni ve ark., 2008; Ward ve Coffey 1991). Duru ve ark. (2000), insanlarda yaptıkları bir çalışmada, 2,5mM, 5mM, 10mM ve 20mM dozlarında

kullandıkları asetil-L-karnitin, motilite ve membran bütünlüğü üzerine olumlu bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Sonuçlar arasındaki farklılıkların, kullanılan sulandırıcı, hayvan türü ve L-karnitin doz farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Birçok çalışmada, farklı hayvan türü sperma sulandırıcılarına doğal bir antioksidan olan ALA'nın farklı dozlarda eklenmesinin eritme sonrası motilite, membran ve akrozom bütünlüğünün korunmasında düşük (Domínguez-Rebolledo ve ark., 2010) ya da hiç etkisinin olmadığı bildirilirken (Bucak ve ark., 2010a), teke (Ren ve ark., 2018), manda (Fayyaz ve ark., 2017) ve domuz (Shen ve ark., 2016) sperması üzerine olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir.

Alfa lipoik asit, mitokondriyal dehidrojenaz reaksiyonlarında rol oynayan ve bu yolla adenozin trifosfat (ATP) üretimini sağlayan, kükürt içeren bir koenzimdir (Carreau, 1979; Packer ve ark., 1995). Ana metaboliti olan dihidrolipoik asit ile birlikte, Alfa lipoik asit oksijensiz radikallerin temizlenmesi, diğer antioksidanlarla redoks etkileşimi ve lipid peroksidasyonunun engellenmesi yoluyla etki gösteren güçlü bir antioksidandır (Bast ve Haenen, 2003; Dinçer ve ark., 2002; Moini ve ark., 2002). Spermatozoalarının motilite, morfoloji ve plazma membran bütünlüğü üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı, çok sayıda çalışmada farklı hayvan türlerine ait sperma sulandırıcılarında kullanılmıştır (Büyükleblebici ve ark., 2015; Güngör ve ark., 2016; Ibrahim ve ark., 2008; Shen ve ark., 2016).

Sunulan çalışmada, 0,25 mM, 0,50 mM ve 1 mM Alfa lipoik asit içeren grupların eritme sonrası motilite değerleri sırasıyla, %59,00, %55,00 ve %55,67; plazma membran fonksiyonel bütünlüğü %64,00, %63,60 ve %61,40 ve akrozom bütünlüğü %74,00, %76,80 ve %75,47 olarak bulunmuştur. Alfa lipoik asitin, kontrol grubuna göre eritme sonrası spermatolojik özellikleri rakamsal olarak daha iyi koruduğu bulunmuştur. Sperm motilitesi üzerindeki bu az olumlu etki, ALA'nın mitokondriyal dehidrojenaz reaksiyonlarındaki etkinliğinden, plazma ve akrozomal bütünlüğün korunmasının ise ALA'nın ROS'u elimine ederek membran düzeyindeki koruyucu özelliğinden ileri geldiği düşünülebilir. Güngör ve ark. (2016), sığır sperması üzerinde yaptıkları çalışmada, 1 mM dozda eklenen Alfa lipoik asit eklediklerinde, motilite değerini %66, akrozomal bütünlüğü ise %40,7 olarak

bulduklarını, ancak kontrol grubu ile istatistiki bir fark görülmediğini bildirmişlerdir. Domuz spermasını 6 mg/ml Alfa lipoik asit eklenmiş sulandırıcı ile sulandırarak donduran Shen ve ark. (2016), motilitenin (%52,85) belirgin bir şekilde daha iyi korunduğunu bildirmişlerdir. Gohar ve ark. (2014), sığır sperması ile yaptıkları çalışmada, 0.5mM ve 1 mM Alfa lipoik asitin motiliteyi iyileştirdiği (sırasıyla %35,63, %33,75), ancak, artan dozlarının olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, akrozomal bütünlüğün en iyi 0.5 mM ALA içeren grupta ve %64 oranında korunduğunu, artan dozlarının ise akrozomal bütünlüğü azalttığını bildirmişlerdir. Alfa lipoik asitin 5, 10, 15 ve 20 mg/ml dozlarda kullanan Ren ve ark. (2018), teke sperması sulandırıcısındaki 10mg/ml dozda Alfa lipoik asit ile en iyi motilite sonucunun gözlemlendiğini ($P<0.05$), 15 mg/ml dozda ise düşmeye başladığını ($P<0.05$), 20 mg/ml dozda kontrol grubu ile benzer olduğunu, akrozom ve membran bütünlüğünün ise 10 ve 15 mg/ml dozda en iyi sonucu verdiği ($P<0.05$), 20 mg/ml grubunun kontrol grubu ile benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Etkileri bakımından farklı özellik (serbest radikal oluşumunu engelleyenler ve zincir kıranlar), moleküler ağırlık ve yapıda olan antioksidanların birlikte kullanılması additive, sinerjik veya antagonist etki oluşturabilir. Antioksidanlar, bireysel etkilerinden yararlanmak için tek başına (Souza ve ark., 2019) veya sinerjik etkilerinden yararlanmak gibi farklı amaçlar için birlikte oral yolla (Zhou ve ark., 2007) veya sulandırıcı içerisinde (Arando ve ark., 2019) katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Sunulan çalışmada, karışım gruplarını (L-A-) oluşturmak amacıyla Alfa lipoik asit ve L-karnitin tek başına kullanılan dozları eşleştirilerek birleştirildi. Yapılan literatür taramalarında, sperma sulandırıcılarında L-karnitin ve Alfa lipoik asitin birlikte kullanımı ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır.

L-A- gruplarında, sulandırıcıdaki L-karnitin arttıkça eritme sonrası motilite ve plazma membran bütünlüğünün düştüğü gözlemlenirken, akrozomal bütünlüğün ise genelde daha iyi korunduğu bulundu. L-A- gruplarında, L-karnitin içeren gruplarda Alfa lipoik asit eklenmesinin eritme sonrası motiliteyi olumsuz etkilediği görüldü. Kontrol ve antioksidanların tek başına kullanıldığı gruplara göre, L-A- gruplarının motilitesindeki düşüklük, antioksidanların enerji metabolizmasındaki uyarıcı rollerinin dondurma öncesi aşamadan sonra spermatoza enerjisinin hızlıca tüketilmiş

olması ile açıklanabilir. L-karnitin ve Alfa lipoik asitin birlikte kullanıldığı grupların plazma membran bütünlüğü sonuçlarına bakıldığında, L-karnitinin düşük dozunun kullanıldığı grubun daha iyi sonuç verdiği görüldü ($P<0.05$).

Akrozom membran ve proteinlerden oluşan özel bir yapıdır. Bu nedenle, ROS'a karşı çok duyarlı olduğu, yüksek antioksidan varlığında membran yapısının ve akrozomal bütünlüğün bozulduğu bildirilmiştir (Arando ve ark., 2019). Sunulan çalışmada, plazma membran fonksiyonel bütünlüğündeki düşüklük ise; L-A-gruplarda kullanılan yüksek oranda antioksidanların, membran akışkanlığını artırarak, spermatozoanın dış etkilere karşı duyarlılığını artırması ile ilişkilendirilebilir (Shoae ve Zamiri, 2008). Spermanın yaşam ömrünün değerlendirilmesi, tohumlama sonrası vajina veya uterus içerisindeki geçireceği süre içerisinde ne gibi değişiklikler geçireceği ve potansiyel fertilitenin belirlenmesinde önemi büyüktür (Samper, 2008; Ohl ve Menge, 1996).

İnkübasyon sonrası spermanın canlılığı ve morfolojik bütünlüğü, dondurma-eritme işlemine, kriyoprotektanın türü ve yoğunluğuna, sulandırıcı içeriğine ve zamana bağlı olarak azalır (Alcay ve ark., 2016b; Pontbriand ve ark., 1989; Üstüner ve ark., 2016). Sunulan çalışmanın eritme sonrası 3. saat inkübasyon bulgularına bakıldığında, tüm gruplarda motilite, plazma membran ve akrozom bütünlüğünün eritme sonrası 0. saate göre 3 saat süre ile inkübasyondan olumsuz etkilendiği görüldü ($P<0.001$). Dondurma işlemleri sırasında oluşan serbest radikaller, spermanın canlılığını ve bütünlüğünü yitirmesindeki temel nedenlerdendir.

İnkübasyonun 3. saatinde, L-karnitin gruplarında doz arttıkça motilite ve plazma membran bütünlüğünün paralel olarak kötü etkilendiği görüldü ($P<0.05$). Motilite ve plazma membran bütünlüğü değerleri L1, L2 ve L3 gruplarında sırasıyla, %32,00, %13,40, %0,20; akrozomal bütünlük değerleri ise %66,14, %71,20, %75,40 olarak bulundu. Alfa lipoik asit içeren sulandırıcı gruplarının motilitelerine bakıldığında A1, A2, A3 gruplarının %38,67, %32,33, %25,33 oranlarını yakaladığı görülmektedir. ALA gruplarında HOST ve PSA değerleri ise sırasıyla, %46,40, %44,47, %35,60 ve %57,27, %55,73, %49,80 olarak bulundu. Hücrenin aerobik veya kısmen anaerobik solunumda reaktif oksijen türlerinin şekillenmesi kaçınılmazdır (Fridovich, 1978). Süperoksit anyonu, peroksit ve hidroksil serbest radikalleri hücreye

en çok zarar verenlerdir ve bu serbest radikalleri üreten reaksiyonlar, yüksek ısılarda, düşük ısılara göre daha etkindir (Mann ve ark., 1980; Maxwell ve Stojanov, 1996). Antioksidan aktivitesinin yanında, enerji metabolizmasında önemli rol oynayan L-karnitin (Steiber ve ark., 2004) ve ALA (Carreau, 1979; Packer ve ark., 1995;) mitokondriyal ATP üretiminde etkin rolü bulunur. Sunulan çalışmada, kontrol grubuna göre antioksidan eklenen grupların tümünde motilite ve plazma membran fonksiyon bütünlüğü bakımından daha düşük spermatolojik bulgular elde edilmiştir. Bu durum, antioksidanların enerji metabolizması ve plazma membran lipit yapısı üzerindeki etkileri ile açıklanabilir. Ayrıca L-A- gruplarında da, antioksidanların tek başına kullanıldığı gruplar ile karşılaştırıldığında, bu durumun daha da belirgin olduğu gözlemlendi. Kontrol grubuna göre, antioksidanların tek başına veya birlikte kullanıldığı grupların motilitesindeki düşüklüğün, antioksidanların enerji metabolizmasındaki uyarıcı rollerinden ileri geldiği düşünülmektedir.

Eritilen koç spermasının inkübasyon ile birlikte motilite (0. saat %59,61, 3. saat 47,32) ve akrozomal yapısı normal olan spermatozoon oranında (0. saat %52,25, 3. saat 49,04) düşüklükler olduğunu bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2009). Üstüner ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada da inkübasyonun 3. saatinde motilite, plazma membran bütünlüğü ve akrozomal bütünlüğün inkübasyon süresine bağlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Koç sperması sulandırıcısına 5 mM ve 10 mM L-karnitin ekleyerek yapılan bir çalışmada, 3 saatlik inkübasyon sonrasında L-karnitin eklenmesinin, spermatolojik parametreler üzerinde olumlu herhangi bir etkisinin görülmediği bildirilmiştir (Souza ve ark., 2019). Sunulan çalışmada, L1 ve L3 gruplarının bulgularına bakıldığında, kullanılan L-karnitin miktarının artmasının, akrozomal bütünlüğü iyileştirdiği görülmüştür ($P<0.05$). Kontrol grubuna göre Alfa lipoik asitin 1mM dozunun olumsuz etkileri belirgin bir şekilde görülmektedir ($P<0.05$). Alfa lipoik asit 0,25mM ve L-karnitin 25mM gruplarına bakıldığında, Alfa lipoik asitin motiliteyi ve plazma membran bütünlüğünü daha iyi korumayı sürdürdüğü, ancak, akrozomal bozukluğun daha fazla olduğu görülmektedir ($P<0.05$).

Mitokondriyal aktivite ile motilite arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır (Ma ve ark., 2011). İnkübasyon sırasında mitokondriyal yaşlanmaya bağlı olarak spermanın ATP üretme yeteneğinde aşamalı düşüş ve ölü spermatozoalardan salınan aromatik

amino asit oksidazların toksik etkileri nedeniyle motilite, akrozom ve plazma membran bütünlüğü değerleri düşer (Viswanath ve Shannon, 1997). Spermada donmave eritme işlemleri sırasında şekillenen gizli yıkımın etkisi, inkübasyon sırasında belirgin olarak ortaya çıkar. Gizli yıkım ne kadar büyükse, spermatozoanın dışı genital kanalındaki ömrü o kadar kısa olacaktır (Sanchez-Partida ve ark., 1999). İnkübasyon süresi arttıkça spermatolojik parametrelerinde olumsuz yönde gelişmeler daha da dramatik bir durum alır (Bag ve ark., 2004; Üstüner ve ark., 2016). İnkübasyonun 6. saatine gelindiğinde, 3. saate göre tüm grupların motilite, plazma membran bütünlüğü ve akrozomal bütünlüğü ile ilgili parametrelerde ciddi bir düşüş şekillenmiştir ($P<0.001$).

Üstüner ve ark. (2016), koç spermasının 5 saatlik inkübasyonu sonucu, kontrol grubunda %5,40 motilite, %27,93 plazma membran bütünlüğü ve %63,92 oranında akrozomal bozukluk bildirmişlerdir. Toker ve ark. (2016)'da 6 saat beklettikleri eritilmiş koç spermasında %8 motilite, %44,80 plazma membran bütünlüğü ve %58,40 akrozomal bütünlük bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada, kontrol grubunda %27 motilite, %37 plazma membran bütünlüğü ve %51 oranında akrozmal bütünlük elde edildi. Motilite değerlerine bakıldığında, kontrol grubunun diğer gruplardan üstün olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). Sperma sulandırıcılarına antioksidan eklenmesinin eritme sonrası spermanın yaşam ömrü üzerine olumsuz etkileri bulundu. L-karnitin içeren gruplar arasında en iyi motilite L1 grubunda; ALA- grupları arasında A1, ve L-A- gruplarında L1A1 grubunda bulunmuştur ($P<0.05$).

ROS ile mücadele için mitokondriyal bölgede çok sayıda farklı yapı, molekül ağırlığı ve etki biçimi olan antioksidanlar bulunmalıdır. Ancak, mitokondriyal iç membranın seçici yapısı, bu moleküllerin mitokondriyal membranı geçerek etkilerini göstermelerine izin vermez. Sperm sulandırıcılarına antioksidan eklenerek yapılan çalışmalarda, bu durumla ilgili olarak, istenilen sonuçların alınamaması, mitokondriyal membranın geçirgenliği ile açıklanmaktadır (Stowe ve Camara, 2009). Bu aşamada plazma membran fonksiyonu değerinin, kontrol grubunda en yüksek olduğu belirlendi ($P<0.05$). Antioksidanların yüksek dozlarının motilite ve plazma membran bütünlüğü üzerine olumsuz etkileri görülmektedir. L-karnitin içeren L1, L2 ve L3 gruplarından elde edilen motilite, HOST ve PSA değerleri sırasıyla, %15,00,

%3,60, %0,00; %27,87, %25,87, %2,80; ve %59,73, %62,60, %67,53 olarak saptanmıştır. Alfa lipoik asit içeren A1, A2 ve A3 gruplarında ise bu parametreler sırasıyla, %14,00, %3,60, %4,67; %31,80, %29,00, %24,00; ve %46,07, %42,27, %35,13 olarak bulunmuştur. Sperma sulandırıcılarında bulunan antioksidanlar mitokondriyal aktiviteyi artırır ve enerji tüketimine bağlı olarak, motilitenin hızlıca düşmesine neden olur (Ma ve ark., 2011).

Sulandırıcıda kullanılan L-karnitindeki artışın akrozom bütünlüğüne olumlu etkisinin bulunduğu, Alfa lipoik asit artışının ise akrozom yıkımı ile paralel ilerlediği görülmüştür. Alfa lipoik asitin akrozom bütünlüğü üzerine olan olumsuz etkilerinin L-karnitin ile birlikte kullanıldığı karışım gruplarında da azaldığı saptanmıştır ($P<0.05$).

Yaptığımız çalışmada, eritme sonrası spermanın yaşam ömrünün antioksidan ilavesi ile değerlendirilmesinde sonuç olarak;

- Ekilibrasyon aşamasından itibaren dondurma ve eritme aşamaları koç spermasının motilite, plazma membran fonksiyonu ve akrozomal bütünlüğü olumsuz etkilediği,
- L-karnitin kontrol grubuna göre motilite ve plazma membran bütünlüğünü olumsuz etkilerken, akrozomal bütünlüğü anlamlı bir şekilde koruduğu,
- Alfa lipoik asitin kontrol grubuna göre benzer düzeyde motilite gösterdiği, plazma membran ve akrozom bütünlüğü bakımından az düzeyde olumlu etkisinin olduğu,
- Karışım gruplarında motilite ve plazma membran bütünlüğü bakımından Alfa lipoik asit ve L-karnitin karışımının zararlı olduğu,
- Yüksek dozda L-karnitin ilavesinin akrozomal bütünlüğü korumada daha etkili olduğu,
- Alfa lipoik asit ve L-karnitin kullanılan oranlarda karışım yapılmasının uygun olmadığı,
- Etkili dozun belirlenmesi için farklı oranların denenmesi gerektiği belirlendi.

İnkübasyon sonrasında;

- Zamana bağlı olarak sperm motilite, plazma membran bütünlüğü ve akrozomal bütünlük oranında düşüş şekillendiği,
- Antioksidan ilavesinin zamana bağlı olarak motilitenin hızlıca yitirilmesine neden olduğu, buna paralel plazma membran bütünlüğünün de düştüğü,
- L-karnitin ilavesinin akrozomal bütünlüğü daha iyi koruduğu,
- Alfa lipoik asit ilavesinin akrozomal bütünlüğü düşürdüğü,
- Karışım gruplarında L-karnitin düzeyi yükseldikçe, akrozomal bütünlüğün daha iyi korunduğu sonucuna varıldı.



6. KAYNAKLAR

Agarwal A, Allamaneni SS (2004) Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reproductive Biomedicine Online* 9(3): 338-347.

Agarwal A, Said TM (2004) Carnitines and male infertility. *Reproductive biomedicine online* 8(4): 376-384.

Ahmad E, Aksoy M, Serin İ et al (2013) Cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment of ram spermatozoa protects structural integrity of plasma membrane during osmotic challenge and reduces their ability to undergo acrosome reaction in vitro. *Small ruminant research* 115(1-3): 77-81.

Ahmadi S, Bashiri R, Ghadiri-Anari A et al (2016) Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review. *International Journal of Reproductive Biomedicine* 14(12): 729-736.

Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A et al (2000) Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.

Aisen EG, Medina VH, Venturino A (2002) Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57 (7): 1801-1808.

Ak, K, Cirit U, Nur Z et al (2010) Effects of extender osmolarity, cooling rate, dilution rate and glycerol addition time on post-thaw ram semen characteristics and fertilization. *Istanbul Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 36(2): 33-46.

Alcay S, Gokce E, Toker MB et al (2016a) Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology* 72(3): 269-273.

Alcay S, Soylu MK, Üstüner B (2013) Boğa ve Alabalık Seminal Plazmasının Koç Spermasının Dondurulması Üzerine Etkisi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10(1): 7-14.

Alcay S, Toker MB, Gokce E et al (2015) Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology* 71(2): 329-333.

Alcay S, Ustuner B, Nur Z (2016b) Effects of low molecular weight cryoprotectants on the post-thaw ram sperm quality and fertilizing ability. *Small Ruminant Research* 136: 59–64.

Allai L, Benmoula A, da Silva MM et al (2018) Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal reproduction science* 192: 6-17.

Altınışik M (2010) Karbonhidrat metabolizması bozukluklarına biyokimyasal yaklaşım. *Meandros Medical And Dental Journal* 11(1): 51-59.

Amidi F, Pazhohan A, Nashtaei MS et al (2016) The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and tissue banking* 17(4): 745-756.

Andrabi SMH (2009) Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(3): 552-569.

Aral F, Aral S (2004) Merinos koçlarda sperma alma yöntemlerinin karsilastirilmesi. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences* 28(1): 47-53.

Arando A, Delgado JV, Fernández-Prior A et al (2019) Effect of different olive oil-derived antioxidants (hydroxytyrosol and 3, 4-dihydroxyphenylglycol) on the quality of frozen-thawed ram sperm. *Cryobiology* 86: 33-39.

Bag S, Joshi A, Naqvi SMK et al (2004) Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. *Theriogenology* 62(3-4): 415-424.

Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N (2000) Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology* 21: 1–7.

Banday MN, Lone FA, Rasool F et al (2017) Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. *Cryobiology* 74: 25-30.

Barbas JP, Mascarenhas RD (2009) Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking* 10(1): 49-62.

Bast A, Haenen GR (2003) Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. *Biofactors* 17(1-4): 207-213.

Bedfoed JM, Hoskins DD (1990). The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. Editor: Lamming GE, Marshall's Physiology of

Reproduction. Churchill Livingstone, Edinburg London Melbourne and New York, pp: 379-568.

Berni A, Meschini R, Filippi S et al (2008) L-carnitine enhances resistance to oxidative stress by reducing DNA damage in Ataxia telangiectasia cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 650(2): 165-174.

Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA et al (2000) Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development* 55: 282–288.

Birler S, Pabuççuoğlu S, Atalla H et al (2002) İn vitro üretilen koyun embriyolarının transferi. *Turkish Journal Of Veterinary And Animal Sciences* 26: 1421-1426.

Brice EC, Wu JX, Muraro R et al (1993) Modulation of mouse preimplantation development by epidermal growth factor receptor antibodies, antisense RNA, and deoxyoligonucleotides. *Developmental Genetics* 14(3):174–184.

Bromfield JJ (2014) Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought. *Journal of assisted reproduction and genetics* 31(6): 627-636.

Bucak MN, Güngör Ş, Sarıözkan S et al (2015) Spermanın dondurulmasında antioksidanların etkisi. *Türkiye Klinikleri* 1(3): 39–47.

Bucak MN, Sarıözkan S, Tuncer PB et al (2010a) The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research* 89(1): 24-30.

Bucak MN, Tuncer PB, Sarıözkan S et al (2010b) Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology* 61(3): 248-253.

Büyükleblebici O, Büyükleblebici S, Tuncer PB et al (2015) Effect of α -lipoic acid supplementation to extender on quality of frozen-thawed bull semen. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21(3): 307-311.

Canoglu S, Saribay K (2012) Üreme Kanalının Morfolojisi ve Üreme Fizyolojisi. Editor: Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A, Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. Medipress Matbaacılık, Malatya, s: 521-548.

Carreau JP (1979) Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. Editor: Shukla AK, Methods in enzymology. Volume 62, Academic Press, Cambridge, pp:152-158.

Castro LS, Hamilton TRS, Mendes CM et al (2016) Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. Journal of Animal Science and Biotechnology 7(1): 17.

Chen H, Chow PH, Cheng SK et al (2003) Male genital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. Journal of Andrology 24: 704–711.

Cheng FP, Fazeli A, Voorhout WF et al (1996) Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. Journal of Andrology 17(6): 674-682.

Christensen P, Brockhoff PB, Lehn-Jensen H (1999) The relationship between semen quality and the nonreturn rate of bulls. Reproduction in Domestic Animals 34: 503-507.

Correa JR, Pace MM, Zavos PM (1997) Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. Theriogenology 48(5): 721-731.

Darin-Bennett A, Poulos A, White IG (1973) The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull, and boar spermatozoa. Australian journal of biological sciences 26(6): 1409-1420.

Davidson AF, Benson JD, Higgins AZ (2014) Mathematically optimized cryoprotectant equilibration procedures for cryopreservation of human oocytes. Theoretical Biology and Medical Modelling 11(1): 13.

Deana R, Rigoni F, Francesconi M et al (1989) Effect of l-carnitine and l-aminocarnitine on calcium transport, motility, and enzyme release from ejaculated bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction* 41(5): 949-955.

Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M et al (2012) Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Advances in urology* 2012: 1-12.

Dinçer Y, Telci A, Kayalı R et al (2002) Effect of α -lipoic acid on lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activities in diabetic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 29(4): 281-284.

Dokmeci D (2005) Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. *Folia Medica* 47: 26–30.

Domínguez-Rebolledo ÁE, Fernández-Santos MR, Bisbal A et al (2010) Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reproduction, Fertility and Development* 22(5): 856-870.

Duru NK, Morshedi M, Schuffner A et al (2000) Semen treatment with progesterone and/or acetyl-L-carnitine does not improve sperm motility or membrane damage after cryopreservation-thawing. *Fertility and sterility* 74(4): 715-720.

El-Sheshtawy RI, Sisy GA, El-Nattat WS (2015) Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the post-thawing quality of cattle bull semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 4(1): 26-31.

Evans G (1988) Current topics in artificial insemination of sheep. *Australian Journal of Biological Sciences* 41(1): 103-116.

Faigl V, Vass N, Jávör A et al (2012) Artificial insemination of small ruminants—A review. *Acta Veterinaria Hungarica* 60(1): 115-129.

FAO, 2017. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>, (06.03.2019)

Farshad A, Khalili B, Jafaroghli M (2010) Effects of butylated hydroxytoluene on freezability of ram spermatozoa. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 23(10): 1276-1281.

Fattah A, Sharafi M, Masoudi R et al (2017) L-carnitine is a survival factor for chilled storage of rooster semen for a long time. *Cryobiology* 74: 13-18.

Fayyaz MH, Ahmad M, Ahmad N (2017) Survival of buffalo bull spermatozoa: effect on structure and function due to alpha-lipoic acid and cholesterol-loaded cyclodextrin. *Andrologia* 49(4): e12652.

Foot RH (2002) The history of artificial insemination: selected notes and notables. *Journal of Animal Science* 80(2): 1–10.

Fraser L, Dziekońska A, Strzeżek R et al. (2007) Dialysis of boar semen prior to freezing thawing: Its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology* 67: 994-1003.

Fraser L, Zasiadczyk L, Pareek CS (2016) Effects of boar variability on comet-detected sperm DNA damage following cryopreservation. *Animal Production Science* 58(2): 252-261

Fridovich I (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* 201(4359): 875-880.

Fujihara Y, Miyata H, Ikawa M (2018) Factors controlling sperm migration through the oviduct revealed by gene-modified mouse models. *Experimental Animals* 67(2): 91–104.

Gagnon C, de Lamirande E (2006) Controls of Sperm Motility. Editor: De Jonge C, Barratt C, *The Sperm Cell*, University of Cambridge Press, pp: 108–133.

Gagnon C, Iwasaki A, De Lamirande E et al (1991) Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Annals of the New York Academy of Sciences* 637: 436–444.

Gibb Z, Lambourne SR, Quadrelli J et al (2015) L-carnitine and pyruvate are prosurvival factors during the storage of stallion spermatozoa at room temperature. *Biology of Reproduction* 93(4): 1-9.

Gillan L, Maxwell WC, Evans G (2004) Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reproduction, Fertility and Development* 16(4): 447-454.

Gohar A, Khan H, Yousaf MS et al (2014) Assessment of alpha lipoic acid inclusion in semen extender on cryopreservation of Nili-Ravi buffalo bull spermatozoa. *Life Science Journal* 11(9s): 45-50.

Gordon I (2004) *Reproductive Technologies in Farm Animals*. Cabi, Oxfordshire, pp: 49-81.

Gulcin I (2006) Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Science* 78: 803– 811.

Güngör Ş, Aksoy A, Yeni D et al (2016) Combination of cysteamine and lipoic acid improves the post-thawed bull sperm parameters. *Kocatepe Veterinary Journal* 9(2): 87-95.

Hafez ESE (2000) *Reproduction in Farm Animals*, 7th edition, Philadelphia, pp: 111, 330-343, 385, 405-423.

Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141(2): 312-322.

Hardy K, Spanos S (2002) Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *Journal of Endocrinology* 172(2): 221–236.

Harvey MB, Kaye PL (1992) Mediation of the actions of insulin and insulin-like growth factor-1 on preimplantation mouse embryos in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 33(3): 270–275.

Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM et al (2018) Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive Biomedicine Online* 37(3): 327-339.

Ho H, Suarez SS (2001) Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Biology of Reproduction* 122: 519–526.

Holt WV (2000) Basic aspects of frozen storage of semen. *Reproduction Science* 62: 3-22.

Horward TH, Pace MM (1988) Seminal evaluation and artificial incemination. Editor: Laing JA, Fertility and Infertility in Veterinary Practice. Fourt Edition, Bailliere Tindal London.

Ibrahim SF, Osman K, Das S et al (2008) A study of the antioxidant effect of alpha lipoic acids on sperm quality. Clinics 63(4): 545-550.

İleri İK, Ak K (1993) Payet yöntemine göre dondurulmuş boğa spermasının eritilmesinde eritme ısısı ve sürelerinin spermazitoitlerin motilite ve akrozom yapıları üzerine etkileri. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi ve Münih Ludwig-Maximilian Üniversitesi Veteriner Fakültesi Türk-Alman Günleri; 29-30 Nisan Mayıs Tebliğler, 58-62.

İleri İK, Ak K, Pabuçcuoğlu S et al (2000) Evcil hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını Ders Notu, s: 1-112.

Jafaroghli M, Khalili B, Farshad A et al (2011) The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. Small Ruminant Research 96(1): 58-63.

Jequier E (1994) Carbohydrates as a source of energy. The American Journal of Clinical Nutrition 59(3): 682-685.

Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Pelaez M et al (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. Reproduction 70: 219-228.

Kaneko T, Ito H, Sakamoto H et al (2014). Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. PLoS One 9(11): e113381.

Karaca EG (2008) Lipoik asit: Evrensel antioksidan. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 8(1): 231-245.

Karakus K, Mert N, Mert H et al (2016) Relationship between vitamin composition and spermatological characteristics in semen of different ram breeds of turkey. Pakistan Journal of Zoology 48(4): 969-975.

Katila T (2001) In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: A review. *Acta Veterinaria Scandinavica* 42(2): 199-217.

Kaya A, Birler S, Enwall L et al (2014) Determinants of Sperm Morphology. Editor: Chenoweth PJ, Lorton SP, *Animal Andrology Theories and Applications*. Cabi, Oxfordshire, pp: 34-56

Kumar D, Joshi A, Naqvi SMK (2009) Effect of post-thaw incubation on semen characteristics of ram spermatozoa cryopreserved under controlled and uncontrolled rate of cooling. *Animal Reproduction Science* 6(4): 526-534.

Kurt Ö, El SN (2011) Biyoaktif bir gıda bileşeni L-karnitin: Beslenme ve sağlık açısından önemi ve biyoyararlılığı. *Tübav Bilim Dergisi* 4(2): 97-102.

Larson JL, Miller DJ (1999) Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Molecular Reproduction and Development* 52(4): 445-449.

Lavranos TC, Rathjen PD, Seamark RF (1995) Trophic effects of myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF) on mouse embryos. *Reproduction* 105(2):331–338.

Lee YJ, Lee SH, Lee E et al (2014) Effects of l-carnitine during the storage of fresh semen in miniature pigs. *reproductive & developmental biology*, 38(4): 171-177.

Lybaert P, Danguy A, Leleux F et al (2009) Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Histology and histopathology*, 24(7): 999-1007.

Ma H, Quan F, Chen D et al (2011) Protective function of alpha-lipoic acid on sperm motility and mitochondrial function during goat sperm-mediated gene transfer. *Small Ruminant Research* 99(2-3): 191-198.

Magargee SF, Kunze E, Hammerstedt RH (1988) Changes in lectin-binding features of ram sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation. *Biology of Reproduction* 38(3): 667-685.

Manee-in S, Parmornsupornvichit S, Kraiprayoon S et al (2014) L-carnitine supplemented extender improves cryopreserved-thawed cat epididymal sperm motility. *Asian-Australasian journal of animal sciences* 27(6): 791-796.

Mann T, Jones R, Sherins R (1980) Oxygen damage, lipid peroxidation and motility of spermatozoa. Editor: Steinberger A, Steinberger E, Testicular development, structure and function. Raven Press, New York, pp: 497-520.

Marti E, Mara L, Marti JI et al (2007) Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology* 67(9): 1446-1454.

Maxwell WMC, Stojanov T (1996) Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development* 8: 1013–20.

Mayes PA (1993) *Carbohydrates of Physiologic Significance*. Editor: Murray RK, Granner DK, Türkiye PA, Rodwell VW, Harper's biochemistry. Appelton and Lange, Norwalk, CT, pp: 131-141.

Mazur P (1963) Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *The Journal of General Physiology* 47: 347–369.

Mazur P (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 247(3): C125–C142.

McDonald LE, Pineda MH (1989) *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Lea&Febiger Philadelphia, London, pp: 428-447.

Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT et al (2002) Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. *Theriogenology* 57: 327–344.

Meryman HT (2007) Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* 47: 935–945.

Mohamed WR, Mehany AB, Hussein RM (2018) Alpha lipoic acid protects against chlorpyrifos-induced toxicity in Wistar rats via modulating the apoptotic pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 59: 17-23.

Moini H, Packer L, Saris NEL (2002) Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology* 182(1): 84-90.

Murarka S, Mishra V, Joshi P et al (2015) Role of zinc in reproductive biology-an overview. *Austin Journal of Reproductive Medicine & Infertility* 2(2): 1009.

N'Guessan MF (2016) Evaluation of minerals in the seminal plasma of azoospermic semen. *International Journal of Biomedical Research* 7(01): 007-011.

Nash T (1966) Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. *Cryobiology* 46: 179-211.

Nur Z (2011) Spermanın Alınması ve Muayenesi, Spermanın Saklanması ve Eritilmesi. Editor: Soylu MK Doğum Bilgisi ve Suni Tohumlama. Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, s: 20-54.

Nur Z, Dogan I, Gunay U et al (2005) 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.

Nur Z, Zik B, Ustuner B et al (2010) Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology* 73(9): 1267–1275.

Nur Z, Zik B, Ustuner B et al (2011) Effect of freezing rate on acrosome and chromatin integrity in ram semen. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 58(4): 267-272.

O WS, Chen H, Chow PH (2006) Male genital tract antioxidant enzymes their ability to preserve sperm DNA integrity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 250: 80–83.

Ohl DA, Menge AC (1996) Assessment of sperm function and clinical aspects of impaired sperm function. *Frontiers in Bioscience* 1: 96-108.

Owen DH, Katz DF (2005). A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *Journal of andrology*, 26(4): 459-469.

Özkoca A (1984) Çiftlik Hayvanlarında Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.

Packer L, Witt EH, Tritschler HJ (1995) Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine* 19(2): 227-250.

Pegg DE (2002) The history and principles of cryopreservation. *Seminars in Reproductive Medicine* 20(1): 5–13.

Pesch S, Bergmann M (2006) Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* 37(7): 597-612.

Petrunkina AM, Harrison RAP (2011) Cytometric solutions in veterinary andrology: developments, advantages and limitation. *Cytometry* 79: 338–348,.

Pickett BW, Berndtson WE (1980) Procedures for handling frozen bovine semen in the field. Editor: Morrow DA *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals*. WB Saunders Company, Philadelphia London Toronto, pp: 354-370.

Pinart E, Yeste M, Bonet S (2015) Acrosin activity is a good predictor of boar sperm freezability. *Theriogenology* 83: 1525-1533.

Pindaru PL, Groza IȘ (2015) Effects of alpha-lipoic acids on sperm membrane integrity during liquid storage of boar semen. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies* 48(1): 162-165.

Pohanka M, Hampl R, Sterzl I, Starka L (2002) Steroid hormones in human semen with particular respect to dehydroepiandrosterone and its immunomodulatory metabolites. *Endocrine Regulations* 36(2): 79-86.

Polge C, Smith AU, Parks AS (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature* 164(4172): 666.

Pontbriand D, Howard JG, Schiewe MC et al (1989) Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26(4): 341-354.

Ren F, Feng T, Dai G et al (2018) Lycopene and alpha-lipoic acid improve semen antioxidant enzymes activity and cashmere goat sperm function after cryopreservation. *Cryobiology* 84: 27-32.

Robertson SA, Sjoblom C, Jasper MJ et al (2001) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. *Biology of Reproduction* 64(4):1206–1215.

Rochette L, Ghibu S, Richard C et al (2013) Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Molecular nutrition & food research* 57(1): 114-125.

Said TM, Aziz N, Sharma RK et al (2005) Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in infertile male patients. *Asian Journal of Andrology* 7(2): 121-126.

Sakanaka S, Tachibana Y (2006) Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food Chemistry*, 95(2): 243-249.

Salamon S, Maxwell WMC (2000) Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62(1-3): 77-111.

Salamon S, Maxwell WMC (1995) Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science* 37(3-4): 185-249.

Samper JC (2008) *Equine Breeding Management and Artificial Insemination E-Book*. Elsevier Health Sciences pp:126.

Sanchez-Partida GL, Windsor DP, Eppleston J et al (1999) Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *Journal of Andrology* 20: 280–288.

Sariozkan S, Tuncer PB, Bucak MN et al (2009a) Influence of various antioxidants on microscopic-oxidative stress indicators and fertilizing ability of frozen–thawed bull semen. *Acta Veterinaria Brno* 78: 463–469.

Sariozkan S, Bucak MN, Tuncer PB et al (2009b) The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation, *Cryobiology*, 58, 134–138,.

Sariözkan, S, Özdamar S, Türk G et al (2014) In vitro effects of l-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality, and plasma membrane integrity of rabbit sperm during liquid-storage. *Cryobiology* 68(3): 349-353.

Schultz GA, Heyner S (1993) Growth factors in preimplantation mammalian embryos. *Oxford Reviews of Reproductive Biology* 15: 43–81.

Semerci A, Çelik AD (2016) Türkiye’de küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin genel durumu. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(2): 182-196.

Setchell BP (2014) Semen and Its Constituents. Editor: Chenoweth PJ, Lorton SP, *Animal Andrology Theories and Applications*. Cabi, Oxfordshire, pp: 3-10.

Setyawan EE, Cooper TG, Widiastih DA et al (2009) Effects of cryoprotectant treatments on bovine sperm function and osmolyte content. *Asian Journal of Andrology* 11: 571– 581.

Seven A (2012) Karbonhidratların Yapısı. Editor: Burçak G, *Biyokimya Ders Kitabı*. Cilt 1, İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi Müdürlüğü, İstanbul, s: 159-182.

Shahrzad E, Zahiri S, Ghasemi F et al (2013) A study of effects of L-carnitine on morphology and apoptosis in cryopreserved sperm. *Advances in Environmental Biology* 7(9): 2126-2135.

Shen T, Jiang ZL, Li CJ et al (2016) Effect of alpha-lipoic acid on boar spermatozoa quality during freezing–thawing. *Zygote* 24(2): 259-265.

Shoae A, Zamiri MJ (2008) Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. *Animal Reproduction Science* 104(2-4): 414-418.

Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ (1995) Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology* 16: 464–468,.

Şimşek F (1999) Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu. *Turkiye Klinikleri Journal of Pediatrics* 8(1): 42-47.

Snell EE, Strong FM, Peterson WH (1937) Growth factors for bacteria: Fractionation and properties of an accessory factor for lactic acid bacterial. *Biochemical Journal* 31(10): 1789-1799.

Soleilhavoup C, Tsikis G, Labas V et al (2014) Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. *Journal of Proteomics* 109: 245-260.

Sönmez M (2013) Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Elazığ, s: 237-287.

Souza CV, Brandão FZ, Santos JDR et al (2019) Effect of different concentrations of L-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. *Cryobiology* (in press).

Soylu MK, Nur Z, Ustuner B et al (2007) Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen. *Bulletin-Veterinary Institute In Pulawy* 51(2): 241-246.

Steiber A, Kerner J, Hoppel CL (2004) Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. *Molecular Aspects of Medicine* 25: 455– 473.

Stowe DF, Camara AK (2009) Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxidants & redox Signaling* 11(6): 1373-1414.

Suter DA, Holland MK (1979) The concentrations of free L-carnitine and L-O acetylcarnitine in spermatozoa and seminal plasma of normal, fresh, and frozen human semen. *Fertility and Sterility* 31: 541– 544.

Tao D, Li PH (1986) Classification of plant cell cryoprotectants. *Journal of Theoretical Biology* 123: 305–310.

Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü Hayvancılık Sektör Raporu (2016), <https://www.tigem.gov.tr/WebUserFile/DosyaGaleri/2018/2/a374cc25-acc1-44e8-a546-63b4c8bce146/dosya/2016%20HAYVANCILIK%20SEKTOR%20RAPORU.pdf>, (07.11.2018).

Tekin N (1994) Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi. Editor: Alaçam E, Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Sun'ı Tohumlama, Doğum ve İnfertilite, Dizgi Evi, Konya, 69-79.

Thurston LM, Watson AJ, Mileham AJ et al (2001) Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculate correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *Journal of Andrology* 22: 383–394.

Toker MB, Alcay S, Gokce E et al (2016) Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. *Cryobiology* 72(3): 205-209.

Tümen H, Gökçen H, Soylu MK et al (1991) Değişik düzeylerde vitamin-E katılarak sulandırılan koç spermasının spermatolojik özellikleri ve dölverimi üzerine araştırmalar. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 10: 91-98.

Türk G (2015) Reaktif oksijen türlerinin spermatozoon fonksiyonları üzerindeki fizyolojik ve patolojik etkileri. *Türkiye Klinikleri* 1(3): 26–34.

Türkiye İstatistik Kurumu (2017) Hayvansal üretim istatistikleri. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002, (07.11.2018).

Türkiye İstatistik Kurumu (2018) Hayvansal üretim istatistikleri. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002, (07.02.2019).

Ustuner B, Alcay S, Toker MB et al (2016). Effect of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plasma on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based or egg yolk-based extender. *Animal Reproduction Science* 164: 97-104.

Ustuner B, Gokce E, Toker MB et al (2018) Effect of sperm pooling with seminal plasma collected in breeding or nonbreeding season on Saanen goat sperm cryosurvival. *Andrologia* 50(4): e12968.

Valsa J, Skandhan KP, Khan PS et al (2012) Split ejaculation study: semen parameters and calcium and magnesium in seminal plasma. *Central European Journal of Urology* 65(4): 216-218.

Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR (2004) Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 216: 31–39.

Viswanath R, Shannon P (1997) Do sperm cells age? A review of the physiological change in sperm during storage at ambient temperature. *Reproduction, Fertility and Development* 9: 321–331.

Ward WS, Coffey DS (1991) DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction* 44(4): 569-574.

Woelders H (1997) Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *The Veterinary Quarterly* 19: 135-138.

Woelders H, Matthijs A, Engel B (1997) Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35(2): 93-105.

Yamashiro H, Narita K, Sugimura S et al (2007) Trehalose enhanced the freezability of Poodle dog sperm collected by an artificial vagina. *Animal Reproduction Science* 102(1-2): 165-171.

Zengin E (2012) Karbonhidratların Yapısı. Editor: Burçak G, *Biyokimya Ders Kitabı*, Cilt 1, İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi Müdürlüğü, İstanbul, s: 183-220.

Zhong RZ, Zhou DW (2013) Oxidative stress and role of natural plant derived antioxidants in animal reproduction. *Journal of Integrative Agriculture* 12(10): 1826-1838.

Zhou X, Liu F, Zhai SD (2007) Effect of L-carnitine and/or L-acetyl-carnitine in nutrition treatment for male infertility: a systematic review. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 16(S1): 383-390.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

°C: Derece santigrat

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

A1-3: 0,25, 0,50, 1 mM Alfa Lipoik Asit İçeren Grup

ALA: Alfa Lipoik Asit

ATP: Adenozin trifosfat

Ca: Kalsiyum

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

Cl: Klor

CO₂: Karbondioksit

DHLA: Dihidrolipoik Asit

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

gr: Gram

HCO₃: Sodyum Bikarbonat

HES: Hidroksietil Nişasta

HOST: Hipoosmotik Şişme Testi

K: Potasyum

l: Litre

L1-3: 25, 50, 100 mM L-Karnitin İçeren Grup

L1-3A1-3: 25, 50, 100 mM L-Karnitin ve 0,25, 0,50, 1 mM Alfa Lipoik Asit İçeren Grup

L-A-: L-Karnitin ve Alfa Lipoik Asit İçeren Karışım Grupları

LK: L-Karnitin

Mg: Magnezyum

ml: Mililitre

mM: Milimolar

Na: Sodyum

P: Fosfor

PEG: Polietilen glikol

PEO: Polietilen oksit

PNA: Peanut Aglutinin

PSA: Pisum Sativum Aglutinin

PVP: Polivinilpirolidon

RNA: Ribo Nükleik Asit

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

Zn: Çinko

8. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime başlamama vesile olan, beni yönlendiren ve süreç içerisinde desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, tez çalışmamda büyük bir özveride bulunan hocam Prof.Dr. Zekariya NUR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitim sürecimde bilimsel ve kişisel önerilerini, desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof.Dr. M. Kemal SOYLU, Prof.Dr. İbrahim DOĞAN, Prof.Dr. Ülgen GÜNAY, Prof.Dr. Hakan SAĞIRKAYA ve Doç.Dr. Burcu ÜSTÜNER'e teşekkürlerimi sunarım. İstatistiksel değerlendirmede desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Serdal DİKMEN hocama yardımları için çok teşekkür ederim. Süreç içerisinde gelişmemde çok büyük katkıları olan, deneyimlerini ve bilgilerini paylaşan, tez çalışmamda desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, yolumu hep aydınlık tutan değerli abim Doç.Dr. Selim ALÇAY, Dr. M. Berk TOKER ve Dr. Elif GÖKÇE'ye sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım. Pek kıymetli arkadaşlarım Dr. Eda Baldan TOKER, Dokt. Öğr. Eren Can ÖZFIRAT'a yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emek ve katkıları olan, maddi-manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman ve her koşulda beni destekleyen annem, babam ve kız kardeşime sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

9. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İzmir’de doğmuştur. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmir’de tamamlamıştır. 2008 yılında başladığı Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 2014 yılında mezun olmuştur. 2015 yılı Şubat ayında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başlamıştır.