



Kollajenin Saanen Teke Spermasının Dondurulabilirliği Üzerine Etkisi

Burcu ÜSTÜNER^{1*} **Ahmet AKTAR¹** **Mehmet Melih Yılmaz¹**

Emine MÜLKPINAR¹ **Elif GÖKÇE²** **Ezgi BOZ³** **Selim ALÇAY¹** **Şenay UÇAR⁴**

¹ Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Görükle, Bursa, Türkiye

² Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Tekirdağ

³ Ahmet Erdem Anadolu Lisesi, Nilüfer, Bursa

⁴ BTO Kamil Tolon Bilim ve Sanat Merkezi

Received 12-03-2020 Accepted 12-10-2020

Özet

Bu çalışmada, Sazan Balığı (*Cyprinus carpio*) pullu derisinden elde edilen kollajen içerikli sıvı özütün teke spermasının dondurulabilirliği üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada, toplam 36 ejakülat altı baş tekedan gün aşırı elektro-ekajülatör ile alındı. En az +++ mass aktivite, %70 motilite ve 2×10^9 spermatozoon/mL özelliğe sahip sperma örnekleri birleştirilerek her grup için 4 eşit kısma bölündü. Sperma iki aşamalı sulandırma methodu ile final konsantrasyonu 1/5 (sperma/sulandırıcı) olacak şekilde; kollajen içermeyen kontrol grubu (K) ve farklı konsantrasyonda kollajen içeren (%1, %5 ve %10; sırasıyla K1, K5 ve K10) Tris-Na sitrat sulandırıcısı ile sulandırıldı. Payetler programlanabilir dondurma makinasında donduruldu ve daha sonra sıvı azot içine aktarıldı. Her gruptan en az 3 payet 37°C/30sn'de eritilerek eritme sonrası değerlendirmeler yapıldı. Sperma taze ve dondurma sonrası aşamalarda; motilite, plazma membran bütünlüğü Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST) ve akrozom hasarı yönünden FITC-Pisum sativum agglutinin (FITC-PSA) boyama ile değerlendirildi. Eritme sonrası deney gruplarının motilite değerleri karşılaştırıldığında, kollajen içeren grupların motilitelerinin kollajen içermeyen kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi ($P < 0.05$). Plazma membran bütünlüğünün, kollajen ilave edilen gruplarda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edildi ($P < 0.05$). Akrozom hasarının sayısal olarak en yüksek kontrol grubunda olduğu gözlemlenmesine rağmen gruplar arasında istatistiksel bir fark tespit edilmedi ($P > 0.05$). Sonuç olarak; teke spermasının dondurulmasında kullanılan sulandırıcılara %1, %5 ve %10 oranında kollajenin katılmasının motilite ve plazma membran bütünlüğü üzerine olumlu etkisi gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: Kollajen, teke, dondurma, Sazan balığı

The Effect of Collagen on Cryopreservation of Saanen Buck Semen Abstract

In this study, it was aimed to determine collagen-containing liquid extract obtained from scaly-skin of Carp (*Cyprinus carpio*) affect on cryopreservation of Saanen goat semen. In the study, a total of 36 semen samples were collected from 6 goats with one-day interval among each collections with an electroejaculator. Semen samples with at least +++ mass activity, 70% motility and 2×10^9 spermatozoa/mL were pooled and divided into 4 equal specimens for each group. Semen were diluted in a two-step dilution method to a final concentration of 1/5 (semen/extender) in Tris-Na citrate extender containing no collagen (C; control group) and different collagen concentrations (1%, 5%, and 10%; C1, C5 and C10 respectively). The straws were frozen by programmable-freezer and then transferred into liquid nitrogen. At least 3 straws from each group were thawed at 37°C / 30sec and post-thaw evaluations were done. Semen in the fresh stage and in the post-thaw stage; motility, plasma membrane integrity were evaluated by Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST) and FITC-Pisum sativum agglutinin (FITC-PSA) staining for acrosome damage. When the post-thaw motility values of experimental groups were compared, it was observed that the motility of the collagen-containing groups was higher than the control group ($P < 0.05$). Plasma membrane integrity was found to be higher in collagen added groups compared to the control group ($P < 0.05$). Although the numerically highest acrosome damage was observed in the control group, no statistical difference was found among implementation groups ($P > 0.05$). The results of the current study clearly demonstrated that enrichment with C1, C5 and C10 in freezing of goat semen extenders has positive effect on post-thaw motility and plasma membrane integrity.

Keywords: Collagen, goat, freezing, Carp (*Cyprinus carpio*)

* Corresponding author: Burcu ÜSTÜNER, Tel: (+90 224) 294 12 45, Fax: (+90 224) 294 12 02, E-posta: bbaspinar@uludag.edu.tr

GİRİŞ

Keçilerde suni tohumlama yönteminden yararlanarak üstün özellikteki tekelerin dondurulmuş spermalarının kullanımı, yetiştirme programlarında hızlı bir genetik iyileşme elde edilmesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Öte yandan, teke spermasının dondurulup suni tohumlama yöntemiyle tohumlamada kullanılması üzerindeki çalışmalar 1950'li yıllarda başlayarak günümüze kadar süregelmiştir.¹

Suni tohumlama uygulamalarının yaygınlaştırılması ile genetik ilerlemenin hızlandırılması, damızlık değeri yüksek tekelerden daha fazla yararlanılması, yetiştirmeye bağlı gereksiz uğraş ve masrafların azaltılması, çiftleşme ile ulaşabilecek reproduktif hastalıkların kontrolü ve döl veriminin arttırılabilmesi sağlanabilecektir. Keçilerde suni tohumlamanın yaygınlaştırılması ancak teke spermasının başarılı bir şekilde dondurulmasıyla mümkün olacaktır.²

Teke spermasının dondurulmasında yaygın olarak yağsız süt tozu ve Tris temelli sulandırıcılar kullanılmaktadır.² Günümüzde teke sperması ile yoğun çalışmalar yapılmasına, çeşitli sulandırıcılar, soğutma hızları, farklı gliserol konsantrasyonları ve kriyoprotektif maddeler denenmesine rağmen çözüm sonrası elde edilen başarılar sınırlı düzeyde kalmıştır.³⁻⁶ Dondurma ve eritme işlemi teke spermasının morfolojisini, biyokimyasını ve fonksiyonunu olumsuz yönde etkiler. Bu olumsuz değişiklikler motilitenin düşmesine, spermanın dişi genital kanalda ilerleme yeteneğinin azalmasına ve servikal tohumlama sonrası fertilitite oranının düşmesine neden olur.⁷

Birincil öneme sahip suni tohumlama başarısını etkileyen donmuş spermanın kalitesini arttırmak için; spermanın dondurulması amacıyla kullanılan sulandırıcıların içine birçok katkı maddesi eklenmiştir. Bu anlamda birçok antioksidan, kriyoprotektif madde ve seminal plazma katkısı spermanın dondurulması amacıyla kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır.^{8,9}

Kollajen omurgalıların birincil yapısal malzemesidir ve toplam vücut proteinlerinin yaklaşık % 20-30'unu oluşturan en bol memeli proteindir. Esas olarak mekanik fonksiyona sahip dokularda bulunur. Toplam vücut kollajenin yaklaşık yarısı deridedir ve derm ve tendonun dermisinde bulunan su dışındaki materyalin yaklaşık % 70'i kollajendir. Kollajen, doku ve organların oluşumunda ve hücrelerin çeşitli fonksiyonel ifadelerinde önemli rol oynar.¹⁰

Kollajenin biyouyumluluk göstermesinin başlıca sebebi; kendi kendini birleştirme ve çapraz bağlama yoluyla ekstra güç ve stabiliteye sahip lifler oluşturabilmesidir.¹⁰ Teke spermasının dondurma-eritme sonrası sperm kalitesinin düşmesinin sebebi sperm plazma membran hasarının artışıdır.⁷ Balık derisinden elde edilen özütte yüksek oran-

da kollajen varlığının tespit edilmesinden dolayı; kollajenli özütün, sulandırıcı içine katılmasıyla dondurma-eritme sonrası spermatozoa membran dayanıklılığının artırılması ve teke spermasının daha başarılı dondurulabileceği hipotezi düşünüldü. Bu çalışmada, Sazan Balığı (*Cyprinus carpio*) pullu derisinden elde edilen kollajen içerikli sıvı özütün teke spermasının dondurulabilirliği üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

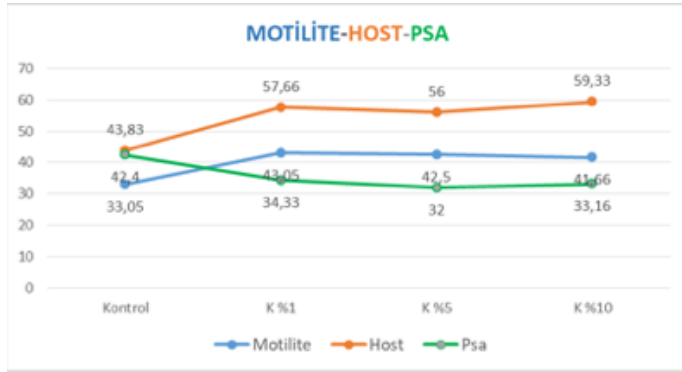
Çalışmada, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde aynı bakım ve besleme koşullarında barındırılan toplam 6 baş Saanen ırkı teke kullanıldı (Etik Kurul No:2019-10/08).

Bu çalışmada kollajenin elde edilmesi amacıyla, *Cyprinidae*/familyasının en yaygın üyesi olan Sazan balığının (*Cyprinus carpio*) derisinden elde edilen özüt kullanıldı. Bu özütün yapılan proteomik analizinde; kollajen α prekürsörü'nün (77903,39) diğer proteinlere göre oldukça yüksek olduğu saptandı. 100 mL saf su içerisine 100 gr Sazan Balığı (*Cyprinus carpio*) pullu derisi konularak 5 dk boyunca kaynatıldı. Sık örgülü süzgeçten 5 kez geçirilerek atık pul ve partiküllerden arındırılarak saf haline en yakın özüt elde edildi.

Her tekeden sperma gün aşırı elektro-ejakülatör yöntemiyle toplam 6 kez alındı. En az +++ mass aktivite, %70 motilite ve 2×10^9 spermatozoon/mL özelliğe sahip sperma örnekleri birleştirilerek 4 eşit gruba bölündü. Aisen ve ark.¹¹'nin araştırmalarında kullandıkları % 20 yumurta sarısı içeren temel Tris-sitrat sulandırıcısı (Tris 27.1 g/L, sitrik asit 14.0 g/L, fruktoz 10.0 g/L); kollajen içermeyen (kontrol; K) ve farklı oranlarda kollajen (%1, %5 ve %10; K1, K5 ve K10) katılan toplam 4 sulandırıcı grubu olarak hazırlandı. Sperma grupları iki aşamalı sulandırma methodu ile final yoğunluğu 1/5 (sperma/sulandırıcı) olacak şekilde; K, K1, K5 ve K10 sulandırıcıları (sulandırıcı A) ile yarı hacimde sulandırıldı.

Sulandırılmış sperma içinde 30°C su bulunan bir kaba yerleştirilerek 5°C'a ayarlı soğuk vitrine yerleştirildi. Kaptaki suya buz kalıpları atarak suyun ısısı aşamalı olarak 1 saat içinde 5°C'ye indirildi. Ardından soğutulmuş sperma finalde %6 gliserol ihtiva eden K, K1, K5 ve K10 içeren sulandırıcı B (temel Tris-sitrat sulandırıcısına 76 g/L trehaloz ve 1.5 g/L EDTA ilave edilmiş) ile tekrar 1:1 oranında sulandırıldı. Eklenen sulandırıcı B miktarı 5 eşit hacme bölünerek her 10 dakikada bir hacim eklendi. İkinci sulandırma 50 dakikada tamamlandı. Ekilibrasyon sonrası sperma 0.25 mL'lik payetlere çekilerek, Nicool Plus PC programlanabilir dondurma makinasında (Air Liquide, Marne-la-Vallée Cedex 3, Fransa) +5°C'den -8°C'ye 3°C/dak. hızda ve -8°C'den -120°C'ye 25°C/dak hızda donduruldu ve sıvı

azot içine aktarıldı. Her gruptan en az 3 payet 37°C/30sn'de eritilerek eritme sonrası değerlendirilmeler yapıldı. Sperma taze aşamada ve eritme sonrası aşamalarda; motilite, plazma membran bütünlüğü Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST) ile ve akrozom hasarı yönünden FITC-Pisum sativum agglutinin (FITC-PSA) boyama ile değerlendirildi. Motilite: ıstıcı tablalı faz kontrast mikroskopta (Olympus BX 51, Japonya) (400x) sperma değerlendirilerek motil hücre sayısı % olarak belirlendi.⁷



Grafik 1. Eritme sonrası motilite, plazma membran bütünlüğü ve akrozom hasar oranının sulandırıcı gruplarına göre değişimi

HOST: Sperma numunesinden 20 µl alındı ve içinde vücut ısısında 1 mL 100 mOsm HOST medyumunu bulunan tüplere aktarılarak 37°C'ye ayarlı su banyosunda 1 saat bekletildikten sonra HOST incelemeleri yapıldı. İnkübasyon sonrası lam üzerine bir damla örnek aktarılarak üzeri lamel ile kapatıldı. Hazırlanan preparat faz kontrast mikroskopta (Olympus BX 51, Japonya) (x1000) büyütmede incelendi. İncelemelerde kuyruk kısmı şişmiş ve kıvrık kuyruğa sahip olan hücreler, plazma membran bütünlüğüne sahip olarak değerlendirildi. Her preparattan toplam 200 hücre sayılarak yüzde değerleri kaydedildi.⁷

(FITC-PSA): Akrozomal yapının belirlenmesi Kawakami ve ark.¹² tarafından bildirildiği gibi yapıldı. Kısaca metod açıklanacak olursa; spermadan frotiler hazırlanarak havada kurutuldu. Daha sonra kurutulmuş frotiler, 4°C ısıda aseton ile 10 dakika tespit edildikten sonra karanlıkta 30 dakika FITC-PSA (50 µg/mL fosfat buffer solüsyonu) ile boyandı. Boyama işleminden sonra fosfat buffer solüsyonu ile yıkanıp gliserol ile kaplanarak floresan mikroskop altında incelendi. Akrozomunun tamamı yeşil görünen spermatozoitler sağlam olarak kabul edildi. Her bir preparattan 200 spermatozoa incelenerek sağlam akrozoma sahip spermatozoa oranı (%) olarak belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Sonuçlar SPSS (Windows için SPSS 23.0; SPSS, Chicago, IL, ABD) kullanılarak analiz edildi ve ortalama ± standart sapma olarak sunuldu. Normallik testi olarak Shapiro Wilk testi kullanıldı. Semen parametrelerinden motilite ve plazma membran bütünlüğü (HOST) tek yönlü ANOVA ve

ardından Tukey kullanılarak, akrozomal bozukluk (PSA) parametresi Kruskal Wallis kullanılarak analiz edildi. P <0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 1. Farklı konsantrasyonda kollajen içeren (%1, %5 ve %10) sulandırıcıların eritme sonrası sperm parametreleri üzerine etkisi (x ±Sx).

Grup	n	Motilite (%)	Plazma Membran Bütünlüğü (%)	Akrozom Hasarı (%)
Kontrol	6	33,06±1,57	43,83±1,64 ^a	42,50±3,64
K%1	6	43,06±1,00	57,67±2,51 ^b	34,33±2,38
K%5	6	42,50±1,41	55,67±1,65 ^b	32,00±2,05
K%10	6	41,67±1,07	59,33±2,44 ^b	33,17±1,82

Aynı sütünde farklı karakterler taşıyan değerler arasında istatistiksel fark bulunmaktadır (P<0.05)

Bulgular

Çalışmada elde edilen taze spermaya ait ortalama motilite, plazma membran bütünlüğü ve akrozomal hasar oranı sırasıyla; %72 %76 ve %17 olarak belirlendi. Taze sperma değerleri eritme sonrası değerler ile karşılaştırıldığında teke spermasının dondurma işleminden olumsuz yönde etkilendiği tespit edildi (P<0.05).

Farklı sulandırıcılarla dondurulan teke spermasının eritme sonrası motilite, plazma membran bütünlüğü ve akrozomal hasar oranlarını Tablo 1'de sunulmuştur.

Eritme sonrası sulandırıcı gruplarının motilite değerleri karşılaştırıldığında, kollajen içeren grupların motilitelerinin kollajen içermeyen kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi (P<0.05). K1, K5 ve K10 grupları kendi içinde karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel fark görülmedi (P>0.05). Motilite ile paralellik gösteren plazma membran bütünlüğünün, kollajen ilave edilen gruplarda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edildi (P<0.05).

Eritme sonrası akrozom hasar oranları değerlendirildiğinde; akrozom hasarının sayısal olarak en yüksek kontrol grubunda olduğu gözlemlenmesine rağmen gruplar arasında istatistiksel bir fark tespit edilmedi (P>0.05).

Sonuç ve Tartışma

Teke sperması diğer evcil hayvanların sperması gibi dondurma prosedüründen olumsuz yönde etkilenmektedir.^{13,14} Spermatozoa yapısı üzerine çalışmalar göstermektedir ki; dondurma işlemi spermatozoanın plazma membran bütünlüğüne, akrozom, mitokondri ve kuyruk yapısına geri dönüşümü olmayan zarar vermektedir.¹⁵ Çalışmamızda, taze spermaya göre eritme sonrası sperma motilitesinin ve plazma membran bütünlüğünün azalması ve akrozom hasarının artışı daha önce yapılan çalışmalarla uyumluluk

göstermektedir.^{5,16}

Motilite spermatozoonun fonksiyonelliğini belirlemede kullanılan en önemli muayenedir. Motil olan spermatozoon, dişi genital kanalda doğrusal olarak ileri giderek oositi fertilize edebilir. Çalışmamızda elde edilen K, K1, K5 ve K10 gruplarına ait eritme sonrası sperm motiliteleri sırasıyla %33,06, %43,06, %42,50 ve %41,67 olarak belirlendi. Kontrol grubunun motilitesi istatistiksel olarak kollajen içeren gruplara göre oldukça düşük tespit edildi ($P<0.05$). Bezerra ve ark.'nın¹⁷ eritme sonrası motilite değeri, çalışmamızın kontrol grubunun motilitesi ile benzerlik gösterirken, kollajen gruplarından oldukça düşük olduğu gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar Kulaksız ve ark.'nın³ %5 ve %7 gliserol içeren yağsız süt ile dondurulan Saanen ırkı teke spermasının eritme sonrası değerlerinden düşük olduğu belirlendi. Aynı zamanda Büyükleblebici ve ark.'nın⁴ Ankara keçilerinde %6 gliseol kullanarak dondukları spermanın eritme sonrası motilite değerlerinin çalışmamızdaki değerlerden daha yüksek olduğu fakat aynı araştırmacıların etilen glükol ve dimetil sulfoksit gruplarında ise aynı başarının elde edilemediği kollajen gruplarındaki motilite değerlerimizin daha yüksek olduğu tespit edildi. Tür, ırk, bireysel farklılıklar, coğrafi konum, kullanılan sperma sulandırıcısı içeriği, soğutma hızı ve dondurma tekniği gibi faktörler spermanın dondurulma başarısını etkileyen ve bu konuda yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar arasındaki varyasyonun ana sebepleridir. Plazma membran bütünlüğü spermatozoonun dişi genital kanalda fonksiyonelliğini sürdürdürebilmesi için gereklidir. Dondurma işlemi sperm plazma ve akrozom membranının yapısını değiştirmektedir. Bu değişiklik membran yapısını temelden etkileyerek hasarlı ve apoptotik hücre sayısının artmasına neden olarak spermatozoonun dondurma sonrası fertilizasyon yeteneğinin azalmasına neden olmaktadır.¹⁸ Ayrıca koç ve teke sperması, diğer evcil memeli hayvanların spermasına göre membran yapıları daha hassas olup donma prosedüründen daha çok etkilenmektedir.⁷ Balık derisinden elde edilen kollajen içeriği olan jelatinin oldukça esnek film oluşturma özelliği çalışmanın hipotezini oluşturmaktaydı.^{19,20} Sunulan çalışmada da kollajen gruplarında elde edilen plazma membran bütünlüğü kontrol grubuna göre oldukça yüksek tespit edildi ($P<0.05$). Kollajenin dondurma amaçlı sperma sulandırıcılarında ilk defa sunulan çalışmada kullanılıyor olması; çalışmanın bu kategoride mevcut araştırmalarla karşılaştırılmasını sınırlandırmaktadır. Çalışmamızda kollajen gruplarında elde edilen plazma membran bütünlük oranlarının (%) Sharma ve Sood'un²¹ bulgularından oldukça yüksek olduğu, kontrol grubumuzun sadece benzerlik gösterdiği tespit edildi. Aynı şekilde Büyükleblebici ve ark.'nın⁴ eritme sonuçlarına göre sunduğumuz çalışmanın eritme sonrası motilite

değerlerinin daha düşük fakat plazma membran bütünlük oranının yüksek olması, kollajenin sperm plazma membran yapısının korunmasında pozitif etkisi olduğu sonucunu göstermektedir.

Spermatozoonun ayrıntılı yapısının incelenmesi, dondurma prosedürünün akrozom, mitokondri ve kuyruk gibi çeşitli sperm organellerine zarar verdiğini göstermektedir.² Çalışmanın akrozomal hasara ait veriler değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel bir fark olmamasına rağmen kontrol grubunun kollajen içeren gruplara göre sayısal olarak daha yüksek olduğu gözlemlendi. Sun ve ark.'nın¹⁸ eritme sonrası elde ettikleri akrozom hasarının (%46) kontrol grubumuzla (%42.5) benzer olduğu fakat K1 (%34.3), K5 (%32.0) ve K10 (%33.1) gruplarından yüksek olduğu gözlemlendi. Benzer şekilde çalışmamızın kollajen içeren gruplarının, Üstüner ve ark.'nın (2015) sonuçları ile kıyaslandığında akrozom hasar oranın çalışmamızda daha düşük olduğu tespit edildi. Kollajenin esnek film yapısını oluşturarak membran hasarını düşürmüş olabileme ihtimali daha sonra yapılacak çalışmalara temel teşkil etmektedir. Sonuç olarak; teke spermasının dondurulmasında kullanılan sulandırıcılara %1, %5 ve %10 oranında kollajen içeren özütün ilave edilmesi motilite ve plazma membran bütünlüğü üzerine olumlu etkisi gözlemlendi. Sperma dondurmak amacıyla sulandırıcıya %10 oranından daha fazla özütün ilave edilmesi durumunda spermatolojik parametrelerin ne yönde etkileyeceği ve hangi oranda katılmasının toksik etki yaratacağı, ileride yapılacak çalışmalarda ele alınacaktır. Bu çalışmanın Dünyada ve Türkiye'de ilk defa yapılıyor olması ve kontrol grubuna göre kollajen içeren gruplarda eritme sonrası motilite ve plazma membran bütünlüğünün daha üstün olması sonuçları daha da anlamlı kılmaktadır.

Kaynaklar

1. Özkoca A. Çiftlik hayvanlarında reproduksiyon ve suni tohumlama: İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları. 1984.
2. Lebouf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Anim Reprod Sci. 2000; 62: 113-141.
3. Kulaksız R, Arı UÇ, Daşkın A, et al. The effect of different glycerol concentrations on freezability of semen from Angora, Kilis and Saanen goats. Slovak J Anim Sci. 2013; 46(2): 39-44.
4. Büyükleblebici S, Tuncer PB, Taşdemir U, et al. The comparison of three different cryoprotectants in cryopreservation of Angora goat semen. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2014; 20(4): 613-619.
5. Ustuner B, Nur Z, Alcay S, et al. Effect of freezing rate on goat sperm morphology and DNA integrity. Tur-

- kish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 2015; 39: 110-114.
6. Gororo E, Prince TZ, Fungayi P, et al. Effects of different extenders and storage temperatures on longevity of small East African goat (*Capra hircus*) semen. *Small Rumin Research*. 2019; 175: 83-89.
 7. Hafez ESE. Semen evaluation, Reproduction in farm animals. 6th ed. Lea and Fabiger, Philadelphia; 1993.
 8. Toker MB, Alcay S, Gokce E, et al. Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. *Cryobiology*. 2106; 72: 205-209.
 9. Ustuner B, Gokce E, Toker MB, et al. Effect of sperm pooling with seminal plasma collected in breeding or nonbreeding season on Saanen goat sperm cryosurvival. *Andrologia*. 2018; 50(4) DOI: 10.1111/and.12968.
 10. Alfaro A da T, Balbinot E, Weber CI, et al. Fish gelatin: characteristics, functional properties, applications and future potentials. *Food Eng Rev*. 2015; 7:33-44
 11. Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, et al. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 2000; 53(5): 1053-1061.
 12. Kawakami E, Morita Y, Hori T, et al. Lectin-binding characteristics and capacitation of canine epididymal spermatozoa. *J Vet. Med. Sci*. 2002; 64: 543-549.
 13. Roth T, Bush LM, Wildt DE, et al. Scimitar Horned Oryx (*Oryx dammah*) spermatozoa are functionally competent in a heterologous bovine in vitro fertilization system after cryopreservation on dry ice, in a dry shipper, or over liquid nitrogen vapour. *Biology of Reproduction*. 1999; 60: 493- 498.
 14. Ustuner B, Günay U, Nur Z. Effect of seminal plasma, egg yolk, and season on the freezability of Saanen buck semen. *Bulletin of The Veterinary Institute In Pulawy*. 2009; 53: 369-374.
 15. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 2000; 60: 481- 492.
 16. Ritar AJ, Salamon S. Effects of seminal plasma and its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen thawed spermatozoa of the Angora goat. *Australian Journal of Biological Sciences*. 1982; 35: 305- 312.
 17. Bezerra F, Brilhante S, Castelo T de S, et al. Assessment of the interaction between straw size and thawing rate and its impact on in vitro quality of post-thaw goat semen. *R. Bras. Zootec*. 2012; 41(3), <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982012000300016>.
 18. Sun L, Wenhua F, Caifeng W, et al. Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation. *Cryobiology*. 2020; 92: 146-150.
 19. Go ´mez-Guille ´n MC. Role of lignosulphonate in properties of fish gelatin films. *Food Hydrocolloid*. 2012; 27(1):60-71.
 20. Hosseini FS, Rezaei M, Zandi M, et al. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chem*. 2013; 136(3-4):1490-1495.
 21. Sharma A, Sood P. Cryopreservation and fertility of frozen thawed Chegu goat semen *Indian J. Anim. Res*. 2019; 53(11): 1414-1419.