



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



**METHIONINE, CYSTEINE ve BHT İLAVE EDİLMİŞ  
TRIS-YUMURTA SARISI İLE DONDURULAN KOÇ SPERMASININ  
IN-VITRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**MEHMED BERK TOKER**

**(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN:  
Prof. Dr. İbrahim DOĞAN**

**BURSA-2018**

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

**ETİK BEYANI**

Doktora tezi olarak sunduğum “Methionine, Cysteine ve BHT ilave edilmiş Tris-Yumurta sarısı ile dondurulan koç spermasının in-vitro olarak değerlendirilmesi” 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**

Mehmed Berk TOKER

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Doktora öğrencisi M.Berk TOKER tarafından hazırlanan “Methionine, Cysteine ve BHT ilave edilmiş Tris-Yumurta sarısı ile dondurulan koç spermasının in-vitro olarak değerlendirilmesi” konulu Doktora tezi 21.12.2018 günü, 11.00-13.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

|                      | <u>Adı-Soyadı</u>       | <u>İmza</u> |
|----------------------|-------------------------|-------------|
| <b>Tez Danışmanı</b> | Prof. Dr. İbrahim DOĞAN |             |
| <b>Üye</b>           | Doç. Dr. Burcu ÜSTÜNER  |             |
| <b>Üye</b>           | Prof. Dr. Ümit POLAT    |             |
| <b>Üye</b>           | Prof. Dr. Mithat EVECEN |             |
| <b>Üye</b>           | Doç. Dr. Recai KULAKSIZ |             |

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı toplantısında alınan ..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali AYDOĞDU  
Enstitü Müdürü

## TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

21/12/2018

**Adı Soyadı:** Mehmed Berk TOKER

**Anabilim Dalı:** Veteriner – Dölerme ve Suni Tohumlama

**Tez Konusu:** Methionine, Cysteine ve BHT ilave edilmiş Tris-Yumurta sarısı ile dondurulan koç spermasının in-vitro olarak değerlendirilmesi

| <u>ÖZELLİKLER</u>          | <u>UYGUNDUR</u>          | <u>UYGUN DEĞİLDİR</u>    | <u>AÇIKLAMA</u> |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|
| Tezin Boyutları            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                 |
| Dış Kapak Sayfası          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                 |
| İç Kapak Sayfası           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                 |
| Kabul Onay Sayfası         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                 |
| Sayfa Düzeni               | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                 |
| İçindekiler Sayfası        | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                 |
| Yazı Karakteri             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                 |
| Satır Aralıkları           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                 |
| Başlıklar                  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                 |
| Sayfa Numaraları           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                 |
| Eklerin Yerleştirilmesi    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                 |
| Tabloların Yerleştirilmesi | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                 |
| Kaynaklar                  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                 |

### DANIŞMAN ONAYI

**Unvanı, Adı Soyadı:** Prof. Dr. İbrahim DOĞAN

**İmza:**

## İÇİNDEKİLER

|                                                           |      |
|-----------------------------------------------------------|------|
| Dış Kapak                                                 |      |
| İç Kapak                                                  |      |
| ETİK BEYAN                                                | II   |
| KABUL ONAY                                                | III  |
| TEZ KONTROL BEYAN FORMU                                   | IV   |
| İÇİNDEKİLER                                               | V    |
| TÜRKÇE ÖZET                                               | VII  |
| İNGİLİZCE ÖZET                                            | VIII |
| 1.GİRİŞ                                                   | 1    |
| 2.GENEL BİLGİLER                                          | 3    |
| 2.1.Sperma Alma Yöntemleri                                | 4    |
| 2.2. Spermatolojik Muayene                                | 6    |
| 2.3. Makroskobik Muayene                                  | 6    |
| 2.3.1. Spermanın Miktarı (Hacmi)                          | 6    |
| 2.3.2. Spermanın Rengi                                    | 7    |
| 2.3.3. Spermanın Viskozitesi (Kıvamı, Akışkanlığı)        | 7    |
| 2.3.4 Spermanın Kokusu                                    | 7    |
| 2.4. Mikroskobik Muayene                                  | 8    |
| 2.4.1. Spermanın Kitle Hareketi (Mass Aktivite)           | 8    |
| 2.4.2. Spermatozoon Motilitesi                            | 8    |
| 2.4.3. Spermatozoon Yoğunluğu                             | 10   |
| 2.4.4. Morfolojik Muayene                                 | 10   |
| 2.4.5. Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST)                  | 12   |
| 2.5. Spermanın Saklanması                                 | 12   |
| 2.6. Antioksidanlar                                       | 14   |
| 2.6.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)                      | 15   |
| 2.6.1.1. Radikal Reaktif Oksijen Türleri                  | 15   |
| 2.6.1.2. Radikal Olmayan Reaktif Oksijen Türleri          | 16   |
| 2.6.1.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Neden Olduğu Hasarlar | 17   |
| 2.6.1.4. Reaktif Oksijen Türlerinin DNA Üzerine Etkileri  | 18   |

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6.2. Antioksidanların Sınıflandırılması .....                  | 19 |
| 2.6.2.1. Endojen Antioksidanlar .....                            | 19 |
| 2.6.2.2. Eksojen Antioksidanlar .....                            | 20 |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEM .....                                          | 23 |
| 3.1. Hayvan Materyali, Bakım ve Besleme .....                    | 23 |
| 3.2. Koçlardan Sperma Alınması ve Spermatolojik Muayeneler ..... | 23 |
| 3.2.1. Makroskobik Spermatolojik Muayeneler .....                | 24 |
| 3.2.2. Kitle Hareketi Muayenesi .....                            | 24 |
| 3.2.3. Motilite Muayenesi .....                                  | 24 |
| 3.2.4. Yoğunluk Tayini .....                                     | 25 |
| 3.2.5. Morfolojik Muayene .....                                  | 25 |
| 3.2.6. Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST) .....                   | 26 |
| 3.3. Sperma Örneklerinin Sulandırılması ve Soğutulması .....     | 26 |
| 3.4. Sperma Örneklerinin Dondurulması ve Çözdürülmesi .....      | 28 |
| 3.5. İstatistiksel Analiz .....                                  | 28 |
| 4.BULGULAR .....                                                 | 30 |
| 4.1. Taze Sperma Bulguları .....                                 | 30 |
| 4.2. Sulandırma Sonrası Spermatolojik Bulgular .....             | 32 |
| 4.3. Ekilibrasyon Sonrası Spermatolojik Bulgular .....           | 32 |
| 4.4. Çözdürme Sonrası Spermatolojik Bulgular .....               | 33 |
| 5.TARTIŞMA ve SONUÇ .....                                        | 39 |
| 6.KAYNAKLAR .....                                                | 57 |
| 7.SİMGELER ve KISALTMALAR .....                                  | 66 |
| 8.TEŞEKKÜR .....                                                 | 68 |
| 9.ÖZGEÇMİŞ .....                                                 | 69 |

## ÖZET

Bu çalışmada TRIS-sitrik asit yumurta sarısı (%20) temel sulandırıcısına 2,5mM, 5mM metiyonin, 1mM, 2mM sistein, 1mM, 2mM bütül hidroksitolüen (BHT) eklenerek sulandırılan ve dondurulan koç spermasında çözüm sonrası bazı spermatolojik parametreler üzerine antioksidanların etkileri ve karşılaştırılması amaçlandı. Sperma, beş baş Kıvrıcık ırkı koçtan üreme sezonunda, elektro-ejakülatör ile haftada iki kez alındı ve birleştirildi. Pooling sonrası ortalama hacim (ml), motilite (%), yoğunluk ( $\times 10^9/\text{ml}$ ), plazma membran bütünlüğü (HOST, %), akrozomal (%), diğer morfolojik (%) ve toplam morfolojik (%) bozukluk oranları sırasıyla 3,92, 84,0, 1,96, 93,8, 5,60, 0,4 ve 6,0 bulundu. Sulandırılan sperma örnekleri bir saat içinde 5°C'a indirildi ve %6 gliserol eklendikten sonra iki saat boyunca ekilibrasyona tabi tutuldu. Sperma, payette (0,25ml)  $200 \times 10^6$  spermatozoon olacak şekilde çekildi ve dondurma cihazıyla dondurularak (-120 °C) analize kadar sıvı azotun içinde saklandı.

Çözdürme sonrası motilite, HOST, akrozomal bozukluk, diğer ve toplam morfolojik bozukluk muayeneleri yapıldı. Motilite ve HOST oranları, kontrol ile tüm antioksidan grupları arasında fark ( $P<0,05$ ) ve pozitif korelasyon tespit edildi ( $r=0,880$ ). Akrozomal bozukluk oranlarında kontrol ile 2,5mM, 5mM metiyonin ve 1mM, 2mM sistein grupları arasında fark saptandı ( $P<0,05$ ). Ayrıca metiyonin ve sistein grupları kendi dozları arasında da farklıydı ( $P<0,05$ ). Diğer morfolojik bozukluk oranlarında ise fark yalnızca 1mM sistein ile 2mM BHT grupları arasında tespit edildi ( $P<0,05$ ). Toplam morfolojik bozukluk oranlarında ise 1mM, 2mM BHT ve 1mM sistein grupları hariç, kontrol ve diğer deneme grupları arasında fark görüldü ( $P<0,05$ ).

Sonuç olarak, koç sperma sulandırıcısına çeşitli dozlarda eklenen antioksidanların çözüm sonrası incelenen spermatolojik parametreler üzerine koruyucu etkilerde bulunduğu kanaatine varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Koç sperması, dondurma, metiyonin, sistein, BHT

## SUMMARY

“In-vitro evaluation of ram sperm, frozen in Tris-Egg yolk extender supplemented with Methionine, Cysteine and BHT”

The aim of this research is to study the effects and comparison of the antioxidants [2,5mM, 5mM methionine, 1mM, 2mM cysteine, 1mM, 2mM butylhydroxytoluene (BHT)] for semen parameters on freeze-thawed ram sperm that diluted in TRIS-citric acid and egg yolk (%20) sperm extender. Sperm was collected from five Kivircik rams twice a week with electro-ejaculator in breeding season and pooled. After pooling the mean of the volume (ml), motility (%), sperm number ( $\times 10^9/\text{ml}$ ), plasma membrane integrity (HOST, %), acrosomal, other morphologic and total morphologic defects (%) was found 3,92, 84,0, 1,96, 93,8, 5,60, 0,4 ve 6,0 respectively. The diluted sperm samples were cooled to 5°C within an hour and equilibrated for another two hours after adding %6 of glycerol.  $200 \times 10^6$  sperm cells were placed into 0,25ml french straws and frozen with a programmable freezing device (-120 °C) and plunged into liquid nitrogen tanks until spermatological analyses.

After thawing of the sperm straws, the motility, HOST also acrosomal, other morphologic and total morphologic defects parameters were investigated. All antioxidant added study groups were statistically different ( $P < 0,05$ ) from antioxidant-free control group in terms of motility and HOST parameters and also were in a positive correlation between these parameters ( $r = 0,880$ ). In terms of acrosomal defects, there was a statistical difference among control group with the 2,5mM, 5mM methionine and 1mM, 2mM cysteine groups ( $P < 0,05$ ). Also there was a difference between the doses of methionine and cysteine groups ( $P < 0,05$ ). The difference between 1mM cysteine and 2mM BHT groups was statistically significant ( $P < 0,05$ ). The statistical difference for the total morphologic defects was found among control group and 2mM cysteine, 2,5mM and 5mM methionine groups ( $P < 0,05$ ).

The study had reached the conclusion that the effects of antioxidants that added to ram sperm diluents with different doses had protective effects on spermatological parameters.

**Key words:** Ram sperm, cryopreservation, methionine, cysteine, BHT



## 1. GİRİŞ

Koyun yetiştiriciliği, Dünya’da olduğu gibi Türkiye için de son derece önemli bir sektördür. Koyunlar insanların beslenmesi ve diğer ihtiyaçlarını karşılamasının yanı sıra, mera ve otlaklardan daha fazla faydalanması sayesinde, buraların yenilenmesini ve bu alanların tekrar kullanılmasını sağlamaktadırlar (Günaydın, 2009). Ülkemiz, sosyo-kültürel ve coğrafi olarak koyun yetiştiriciliği bakımından avantajlı bir durumdadır (Kaymakçı ve ark., 2000).

Hayvan başına elde edilen verimlerin istenilen düzeylere getirilmesinin, ülke ekonomisine katkısı yadsınamaz bir gerçektir. 2017 yılı istatistiklerine göre, ülkemizde toplam 33.677.636 baş koyun bulunmaktadır. Bu popülasyondan elde edilen et miktarı 100,058 ton, süt miktarı 1.344.779 ton ve deri üretimi ise 5.134.338 adettir (TÜİK, 2017). Ülkemizdeki koyun sayısının ve bunlardan elde edilen ürün miktarının, gittikçe artan nüfusun ihtiyaçlarını karşılaması olası değildir. Koyun yetiştiriciliğinin halk elinde, geleneksel ve bilimsel yöntemlerden uzak yollarla yapılması, bu yetersizliğin başlıca sebeplerindendir. Koyun ırklarının ıslah çalışmalarında reproduktif biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması, verimi artırmasının yanında nesillerin korunması ve sayılarının artırılması açısından da önemlidir (Birler ve ark., 2002). Koyunlardan elde edilen verim miktarının artırılması amacıyla, koç spermasının çeşitli yöntemlerle dondurulması ve suni tohumlama çalışmaları Türkiye ve Dünya’da yıllardan beri yapılmaktadır (İleri ve ark., 1996; Foote, 2002).

Koç spermasının dondurulmasında; çeşitli tamponlayıcı maddeler, farklı molekül ağırlığına sahip şekerler ve kriyoprotektan maddeler, membran koruyucuları ve stabilizatörleri içeren çeşitli sulandırıcılar denenerek başarılı sonuçlar elde edilmesine karşın, kimi sorunlar ise hala devam etmektedir (Molinia ve ark., 1994; Aisen ve ark., 2005; Ceylan ve ark., 2013; Alcaay ve ark., 2016; Toker ve ark., 2016).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, spermanın uzun veya kısa süreli saklanması esnasında lipid peroksidasyonu olayının meydana geldiği, bu durumun motilitenin düşmesine ve spermatozoonun çeşitli membranlarında hasara neden olduğu buna bağlı olarak da döl veriminde düşüşler yaşandığı gözlenmiştir (Ceylan ve ark., 2013; Toker ve ark., 2016).

Sunulan bu çalışma, koç spermasının TRIS-sitrik asit ve yumurta sarısı (%20) temel sulandırıcısına 2,5mM ya da 5mM metiyonin, 1mM ya da 2mM sistein, 1mM ya da, 2mM bütıl hidroksitolüen (BHT) eklenen altı deneme ve bu antioksidanları içermeyen bir de kontrol grubu olacak şekilde sulandırılarak dondurulması planlandı. Eritme sonrası koç spermasında bazı spermatolojik parametreler üzerine antioksidanların etkilerinin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması amaçlandı. Çalışmada kullanılan antioksidan dozlarının tespitinde, literatür taraması sonucu koç spermasının saklanması az kullanılmış ve karşılaştırılması yapılmamış dozlar tercih edildi.

Bu alanda yapılan ve yapılacak çalışmalar, arzu edilen genetik özelliğe sahip koç spermasının dondurulmasına imkân tanıyarak, koyunculuk alanında genetik ıslaha destek sağlayabilecektir. Bu sayede koyun sayısının artmasının yanında, koyunlardan elde edilen ürünlerin miktarlarının artması, artan hayvan sayısı ile istihdam edilecek birey sayısında artış, dondurulan spermalar ile yapılacak suni tohumlalar ve çiftleşme ile bulaşacak hastalıkların önüne geçerek tedavi masraflarının azaltılması, ayrıca yüksek verimli sürüler sayesinde ekonomi ve sosyo-kültürel yapıya destek sağlanabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Koyun yetiştiriciliği, ülkemiz tarihi boyunca gerek ekonomik gerek ise sosyal olarak insanların hayatlarında bulunan önemli bir yetiştiricilik alanıdır ve geçmişten bu yana önemli bir geçim ve yaşam kaynağı olarak önemini ispat etmiştir. 1980 yılından sonra çeşitli sebeplerle mevcut koyun sayısında bir azalma görülse de, 2010 yılından bu yana ülkemiz koyun varlığında belirgin bir artış gözlenmektedir. Bu artışta şüphesiz ki; bilinçli yetiştiricilik, gerçekleştirilen bir takım projeler ve uygulanan bilimsel yöntemler, rol oynamıştır (TİGEM, 2016).

Koyun (*Ovis aries*) eti, sütü, yünü ve derisi için ilk evcilleştirilen hayvanlardan birisidir. Sezona bağlı olarak östrus gösteren koyun, üreme mevsiminde ortalama 16-17 günlük bir östrus siklus uzunluğuna sahiptir. Kuzey yarım kürede görülen östrusların birçoğu, sonbahar ve kış mevsiminin başlangıç dönemlerinde gözlenir. Daha sıcak iklime sahip bölgelerde ise üreme sezonu, daha uzun olabilir ve koyunlar sezona bağlı olmaksızın östrus gösterebilirler. Üreme sezonunun en önemli düzenleyicisi, kuzey yarım kürede 21 Haziranda başlayan ve günlerin kısalması süreciyle artmaya başlayan ve koyunlar için gonadotropik etkiye sahip melatonin salgısıdır. Ayrıca, koyunların yaşadıkları ortam sıcaklığı, beslenme ve koç varlığı, östrus gözlenme zamanlarına etki edebilecek faktörlerdendir (McDonald ve Pineda, 1989; Hafez, 1993).

Koçların pubertaya erişme yaşı ırka bağlı olmakla beraber, mevsim ile de alakalıdır. Kuzulama sezonunun başlarında doğan erkek yavrular cinsel olgunluğa, dört ay içinde ulaşabilirken, sezonun sonunda doğan yavrularsa, bir sonraki üreme sezonuna kadar cinsel olgunluğa erişemeyebilirler (McDonald ve Pineda, 1989). Cinsel olgunluğa erişme ile birlikte tubulus seminiferus contorti içerisinde bulunan germinatif epitel hücreleri olan spermatogoniumlar, gonadotropik (FSH, LH) hormonların etkisi ile çoğalırlar ve bu olaya spermatogenezis adı verilir.

Spermatogenezis üç evreye ayrılır; FSH etkisi altında gerçekleşen (I) spermasitogenezis ve (II) mayosis, testosteron etkisi ile gerçekleşen (III) spermiogenezisdir (McDonald ve Pineda, 1989; Hafez, 1993; Sönmez, 2013). Oluşum evrelerinden sonra epididimise taşınan spermatozoonlar, buraya taşınmasına yardımcı olan sıvı kısımların epitel hücreleri tarafından rezorbe edilmesi ile yoğunlaşırlar. Ardından, epididimise taşınmadan önce mevcut olan protoplazmik damlacık kaybolmaya başlar ve spermatozoonlar hareket yeteneği kazanırlar. Son olarak ise, olgunlaşan spermatozoonlar epididimisin en distal bölgesi olan kauda epididimiste metabolizma faaliyetleri en düşük seviyede depolanırlar (İleri ve ark., 1996).

## **2.1. Sperma Alma Yöntemleri**

Günümüzde koçlardan en yaygın olarak iki yöntemle sperma alınmaktadır. Bu yöntemlerden ilki, suni vajina yardımı ile spermanın alınmasıdır. Suni vajina; sert lastikten dış boru, iç lastik, irtibat hunisi ve sperma toplamak için dereceli kadehten oluşan bir yapıya sahiptir. Suni vajinanın boyu 19-20 cm, iç çapı ise 5 cm'dir. Suni vajinada aranan koşulların en önemlisi, suni vajinanın sıcaklığıdır. Koçlar suni vajina sıcaklığı konusunda duyarlı hayvanlardır ve bu sebeple sperma almadan önce suni vajinanın iç sıcaklığı 41-44°C arasında olacak şekilde ayarlanmalıdır. Gerekli basınç hava üfleyerek ayarlanmalı ve suni vajinanın penis ile temas edeceği tarafına kayganlığı sağlamak amacıyla kayganlaştırıcı (vazelin) sürülmelidir. Tüm bunlar hazırlandıktan sonra, sperma alınacak ortama getirilecek koçun libidosunu artırmak ve sperma almayı kolaylaştırmak için östrustaki bir koyuna ihtiyaç vardır. Daha sonra koyun, bir travayda zapt-ı rapt altına alınmalı ve koçun serbestçe gezerek tipik çiftleşme hareketlerini gerçekleştirmesine izin verilmelidir. Aşıma hazır olan koç koyunun üzerine atlarken, spermayı alacak kişi prepusyumdan penisi suni vajinaya yönlendirerek spermayı almalı ve koçun, koyunun üzerinden kendisinin inmesine imkân tanınmalıdır. Bu aşamada suni vajina, mümkün miktarda penis ile aynı doğrultuda tutulmalı ve koçun penisinin yaralanması engellenmelidir. Koçlardan en uygun ve doğala en yakın sperma toplama yöntemi suni vajina yöntemidir. Yapılan çalışmalarda, bu yöntem kullanılarak alınmış spermanın gerek saklanması gerekse yapılacak suni tohumlamalarda elde edilecek sonuçların diğer yöntemlerden daha

başarılı olduğu belirtilmektedir. Anılan faydaların yanında, yöntemin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Koçların işleme alıştırılması ve sperma toplama esnasında kızgın dişi bulunması gerekliliği gibi durumlar, yöntemin dezavantajlı yanları olarak sıralanabilir (İleri ve ark., 1996; Gordon, 1999; Sönmez, 2013).

Koçlardan sperma almanın diğer bir yolu ise, elektro-ejakülatör yöntemidir. Yaşlanma, libido eksikliği, hayvanın aşım yapmasına engel olan eklem rahatsızlıkları gibi hastalıkların bulunduğu ve suni vajina ile sperma alınması mümkün olmayan koçlardan elektro-ejakülatör kullanılarak sperma alınabilir (İleri ve ark., 1996). Elektro-ejakülatör yardımı ile sperma alma işlemi, bu amaçla yapılmış birkaç kısımdan oluşan mekanik bir donanıma ihtiyaç duymaktadır. İlki, anüsten girişi kolaylaştırmak amacıyla uygun boyutta, ucu yuvarlatılmış ve sert plastikten yapılmış içi dolu rektal bir probtur. Probun üzerinde elektrik akımını ileten bir polar metal plakalar bulunmaktadır. Bu probun bağlandığı ve uyarıları sağlayan elektriği kontrollü bir şekilde üreten ve bu amaçla pil veya şehir elektriği kullanan kontrol ünitesi ise elektro-ejakülatörün diğer bölümüdür. Elektro-ejakülatörler sabit veya değişen akım değerlerinde elektrik uyarımı üretebilen (0-12 V) ve bu akımı istenilen sürelerde verebilen ünitelerdir. Elektro-ejakülatörün işlevi, hayvanın bel ve sağrı bölümlerinden köken alan ve üreme organlarına iletilecek uyarıları sağlayan sinirleri belirli oranlarda ve sürelerde elektrik akımına maruz bırakarak ampulla ductus deferens'in uyarılması sonucu ereksiyon sağlanması ve ejakülatın alınmasıdır (İleri ve ark., 1996; Marco-Jiménez ve ark., 2008). Yüksek değerlerde kullanılsa da mukozaya uygulanacak elektrik akımı hayvanda kuvvetli tepkilere sebep olacağından, sperması toplanacak hayvanın tespiti son derece önemlidir. Tespit işlemi yapıldıktan sonra, rektal prob fizyolojik tuzlu su veya vazelin gibi bir madde ile kayganlaştırılır ve rektuma yerleştirilir. Uygulanacak elektrik akımı, (2-12 V arası) aşamalı olarak düşük olan değerden yükseğe doğru 1-2 saniyelik sürelerle uygulanır. Uygulanma sıklığı ve hayvana bağlı bireysel farklılıklar olmakla birlikte, normalde 5-7 uyarım sonrasında ejakülat elde edilebilmektedir (İleri ve ark., 1996; Varışlı ve ark., 2009; Sönmez, 2013). Elektro-ejakülatör yöntemi ile suni vajina yöntemi karşılaştırıldığında, fantoma ihtiyaç duyulmaması ve alıştırma periyodunun bulunmaması, yöntemin avantajlı taraflarındandır. Bu yöntemin dezavantajlarının

başında ise, elde edilen sperma kalitesinin suni vajina yöntemine göre daha düşük olması ve ayrıca hayvanın duyacağı rahatsızlık ile hayvanın tespiti için insan gücüne duyulan ihtiyaçtır (McDonald ve Pineda, 1989; İleri ve ark., 1996; Sönmez, 2013).

## **2.2. Spermatolojik Muayene**

Spermanın saklanması, yapılacak tohumlama işlemleri, damızlık seçimi ve seleksiyonu ve hayvanlardan elde edilecek verimin artırılması amacıyla spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi önem arz etmektedir (Aksoy ve ark., 1994a; İleri ve ark., 1996; Sönmez, 2013). Androlojik muayeneler sonucunda elde edilen değerler normal olsa da, spermatolojik parametrelerden kaynaklanabilecek sorunlar döl veriminde düşüslere sebep olabilmektedir (Aksoy ve ark., 1994b; Sönmez, 2013). Spermatolojik muayene yöntemleri koçlarda bireysel fertilitite potansiyelinin belirlenmesine ışık tutar. Bu yöntemler sayesinde döl verimi başarısına dair son derece kuvvetli tahminler yapılabilse de, değerlendirme gerçekleştirilirken hayvanın türü, yaşı, beslenmesi ve bakım şartları da göz önünde bulundurulmalıdır (Hafez, 1993; Gündoğan ve ark., 2002; Sönmez, 2013). Uygulanacak yöntemlerin güvenilirliğini artırmak amacıyla, testlerin periyodik olarak birden fazla tekrarlanması sonuçların doğruluk oranını yükseltecektir (İleri ve ark., 1996).

## **2.3. Makroskobik Muayene**

Spermanın makroskobik muayenesi amacıyla; sperma miktarı (hacmi), rengi, viskozitesi (kıvam, akışkanlık) ve kokusu gibi bir takım parametreler değerlendirilmektedir.

### **2.3.1. Spermanın Miktarı (Hacmi)**

Sperması alınacak erkek hayvanın bir ejakülasyonda verdiği toplam sperma miktarının hacim cinsinden (mililitre) ifade edilmesidir (McDonald ve Pineda, 1989; Hafez, 1993; İleri ve ark., 1996; Sönmez, 2013). Sperma miktarı; hayvan ırkına, yaşına, sperma alma sıklığına, seksüel uyarım derecesine, sperma alma yöntemine, beslenme durumuna ve bireysel farklılıklara göre değişiklikler göstermektedir (Hafez, 1993; Sönmez, 2013). Ergin bir koçun sperma hacmi ortalama 1 ml olmakla birlikte, 0,7-2,0 ml arasında değişmektedir. Koçların seçiminde spermanın miktarı

önemli olsa da diğer spermatolojik parametrelerin de değerlendirilmesi gerekmektedir (Sönmez, 2013). Bir ejakülat hacmini öncelikle testisler ve eklenti üreme bezlerinden gelen sıvılar ile spermatozoonlar oluşturmaktadır.

### **2.3.2. Spermanın Rengi**

Koç spermasının rengi normal olarak açık kremden koyu krem rengine doğru değişiklik göstermektedir. Sağlıklı ve normal değerlerde bulunan koçların sperması koyu krem rengindedir. Spermanın rengi içersindeki spermatozoon sayısı ile doğru orantılıdır (Sevinç, 1977). Genital organların bir bölümündeki yangı veya ejakülate yabancı bir madde karışması spermanın rengini değiştirir. Normal renk dışında görülen renkler genel olarak; pembe-kırmızı, kahverengi, kirli sarı veya yeşil olarak sıralanabilir. Bunlardan pembe yeni oluşan bir kanamadan (hemospermie), kahverengi ise eski bir kanamadan meydana gelmektedir. Sadece sarı renk idrarın (urospermie), sarı-yeşil renk ise irinin (pyospermie) spermaya karışmış olabileceğini gösterir. Diğer yabancı maddeler ise spermada tortu ve partiküller olarak görülmektedir (Sevinç, 1977; Hafez, 1993; İleri ve ark., 1996; Sönmez, 2013).

### **2.3.3. Spermanın Viskozitesi (Kıvamı, Akışkanlığı)**

Ejakülattaki sıvıların akmaya karşı direncini ifade etmek amacıyla kullanılan terime, viskozite denmektedir (Sönmez, 2013). Spermanın viskozitesi içerisinde bulunan spermatozoon sayısı ile doğru orantılıdır (İleri ve ark., 1996; Sönmez, 2013).

### **2.3.4 Spermanın Kokusu**

Erkek hayvanlar için bir sağlık belirtici olan sperma kokusu, herhangi bir patoloji veya fiziksel normallığı etkileyecek bir etkene maruz kalmadığı sürece kendine has aromatik bir kokuya sahiptir. Ejakülatta karşılaşılabilecek anormal kokular hayvanın sağlığı ile alakalı önemli bilgiler vereceğinden, spermanın kokusu dikkate alınması gereken bir parametredir (İleri ve ark., 1996; Sönmez, 2013).

## **2.4. Mikroskopik Muayene**

Spermanın kalitesi ve fertilizasyon yeteneğinin tespiti bakımından önemli olacak mikroskopik muayeneler başlığı altında; spermanın kitle hareketi, spermatozoon motilitesi, birim hacimde bulunan spermatozoon yoğunluğu, spermatozoonların morfolojik muayenesi ve dayanıklılık testlerinden biri olan hypo-osmotic swelling test (HOST) sıralanabilir.

### **2.4.1. Spermanın Kitle Hareketi (Mass Aktivite)**

Çeşitli yöntemlerle toplanmış, herhangi bir sperma sulandırıcısı ile sulandırılmamış, alınmasının üzerinden kısa zaman geçmiş sperma örnekleri “taze sperma” olarak adlandırılır (Sönmez, 2013). Taze spermanın kitle muayenesi 10x objektif ile vücut sıcaklığına ayarlanmış (37°C) ısıtıcı tablası bulunan faz-kontrast mikroskop kullanılarak gerçekleştirilir (Sevinç, 1977; İleri ve ark., 1996). Vücut sıcaklığındaki lam üzerine bir damla sperma damlatılıp üzerine lamel kapatmadan girdap hareketi incelenir. Mikroskoptaki kitle hareketi rüzgârın başaklı bir buğday tarlasında yarattığı dalgalanma gibi bir hareket olup, hücrelerin tek tek değil bir bütün olarak hareketlerinin incelenmesi şeklinde gerçekleşir (Sevinç, 1977; Sönmez, 2013). Kitle hareketi; motilite oranı yüksek, hücre sayısı fazla olan hayvan ırklarında (koç, teke, boğa) görülmekle beraber, genel olarak dört veya beşlik derecelendirme ile gerçekleştirilir ve değerlendirmesi çoğu araştırmacı tarafından; (+) kötü, (++) vasat, (++++) normal ve (+++++) yüksek olacak şekilde ifade edilir (İleri ve ark., 1996; Çoyan ve ark., 2002).

### **2.4.2. Spermatozoon Motilitesi**

Sperma hücreleri bir ovumu fertilize etmek için tasarlanmış son derece özel hücrelerdir. Ancak bu işlevi gerçekleştirebilmek için öncelikle fertilizasyon bölgesine giderek ovuma ulaşmaları gerekmektedir. Dişi genital kanaldaki çeşitli engellere karşı başarılı olabilmek adına spermanın herhangi bir yönde hızlı ve güçlü hareket edenlerinin hareketsiz veya diğer hareket biçimlerini gösteren hücrelere karşı oranına verilen ve motilite olarak tanımlanan özelliğe sahip olması gerekmektedir (Hafez, 1993; Çoyan ve ark., 2002). Motilite dişi genital kanala aktarıldığı noktadan



fekondasyon noktasına kadar spermatozoonlar için önemli bir özellik olsa da, özellikle serviks ve utero-tubal bölgenin geçilmesinde ve zona pellusida penetrasyonunda hayati değere sahip olduğu bilinmektedir (Çoyan ve ark., 2002). Bununla beraber, motilite her ne kadar sağlıklı sperma için bir gösterge ise de, her zaman fertilizasyon başarısının kanıtı olmamaktadır. Bazı durumlarda, yapı bozukluğuna sahip ve fertilite yeteneği olmayan hücreler de güçlü bir motilite gösterebilmektedirler (Hafez, 1993). Motilite muayenesi ısıtıcı tablası (37°C) bulunan faz-kontrast mikroskop aracılığıyla 40x objektif altında, vücut sıcaklığında bir lam üzerine damlatılan toplu iğne başı miktarı kadar sperma örneğinin lamel ile üstünün kapatılması sonrası incelenir. Bu muayene gerçekleştirilirken kullanılan cam malzemelerin ve pipet gibi ekipmanların temiz olmasına dikkat edilmelidir (Sevinç, 1977; Çoyan ve ark., 2002). Motilite muayenesi taze, sulandırılmış veya dondurulmuş-çözdürülmüş spermada gerçekleştirilebilir. Taze sperma ile gerçekleştirilecek ve birim hacimde yoğunluğu fazla olan koç, teke ve boğa gibi türlerde, motilite muayenesinde önceden ısıtılmış lam üzerine ilk olarak yoğunluğu azaltmak ve sonuç tayinini kolaylaştırmak amacıyla tamponlayıcı solüsyonlar (%0,9 izotonik sodyum klorür çözeltisi veya sodyum-sitrat buffer solüsyonu gibi) damlatılır. Ardından sperma damlatılarak inceleme gerçekleştirilir. (Çoyan ve ark., 2002; Sönmez, 2013).

Motilite muayenesinde spermatozoon hareketleri temel olarak dört grup altında incelenebilir; bir yönde hızlı ve güçlü hareket eden, yerinde sallanarak veya çok yavaş hareket eden, kendi eksenini etrafında dönen ve hareketsiz spermatozoonlar (Sevinç, 1977; Çoyan ve ark., 2002). Motilite muayenesinin sonucunu tayin etmek amacıyla, yaklaşık 30 hücrenin bulunduğu en az üç, en fazla beş farklı alan gezilerek hücre hareketleri incelenir ve motilite yüzdelik oran olarak ifade edilir (Sevinç, 1977). Taze koç spermasında motilite oranı %80-90 aralığındadır (Sönmez, 2013).

### 2.4.3. Spermatozoon Yoğunluğu

Birim hacimde bulunan spermatozoon sayısına verilen isimdir. Adı anılan birim hacim kimi araştırmacılara göre ml, kimi araştırmacılara göre ise  $\mu$ l olabilmektedir (Çoyan ve ark., 2002). Spermatozoon yoğunluğu, özellikle damızlık olarak kullanılan hayvanlar için periyodik aralıklar ve suni tohumlama dozunu belirlemek amacıyla yapılacak hesaplamalarda kullanılır (Sevinç, 1977).

Birim hacimde spermatozoon yoğunluğunun tespiti için kullanılan üç yöntem mevcuttur. Bunlar; hemositometrik yöntem, fotolemetrik yöntem ve elektronik sayaç yöntemidir. Hemositometrik yöntem, kırmızı kan hücrelerinin sayımında da kullanılan yöntemin bir benzeridir. Sodyum klorür veya hayem çözeltisi ile belirli oranda (1/200) sulandırılan ejakülat örneğindeki hücrelerin thoma sayma lamı aracılığıyla sayılarak birim hacimdeki hücre sayısının elde edilmesi şeklinde gerçekleştirilir (Sevinç, 1977; Hafez, 1993). Fotolemetrik yöntem ise tekniğe uygun sulandırıcılar ile sulandırılan spermanın, bir okuyucu aracılığıyla değerlendirilmesi ve birim hacimdeki spermatozoon miktarının belirlenmesi şeklinde uygulanır (İleri ve ark., 1996). Son yöntem olan elektronik sayaç yöntemi ise önceden hazırlanan sperma çözeltisinde bulunan partiküllerin sayı ve büyüklüğünün iki elektrot arasında bulunan elektrik akımından faydalanarak tespit edilmesine dayanan bir ölçümdür (Çoyan ve ark., 2002). Birim hacimde yoğunluk göz önüne alındığında tür olarak koç diğer çiftlik hayvanlarına oranla daha yüksek spermatozoon sayısına sahiptir. Erişkin bir koça spermatozoon yoğunluğu  $1-6 \times 10^9$ /ml arasında değişmekle birlikte ortalama olarak  $3,5 \times 10^9$ /ml'dir (Alaçam ve ark., 1990, Sönmez, 2013).

### 2.4.4. Morfolojik Muayene

Spermanın morfolojik muayenesi, ejakülatta bulunan anormal spermatozoonların tespitinde kullanılır. Belirli bozukluk miktarlarının üzerinde fertiliteye doğrudan etkisi olan son derece önemli bir muayene türüdür (Sönmez, 2013). Taze spermada belirli oranda anormal spermatozoon oranı bulunur. Bu oran, akrozomal ve başa bağlı bozukluklarının %5'i ve toplam bozukluğun %20'yi aşması halinde, fertilizasyon yeteneğinin düşük olabileceğini anlatmaktadır (Hafez, 1993; Çoyan ve ark., 2002). Bu sebeple, suni tohumlamada kullanılacak koç spermasının

belirli aralıklarla morfolojik yönden test edilmesi, elde edilecek gebelik oranlarının yüksek olmasına yardımcı olmaktadır (Sevinç, 1977). Bu amaçlar doğrultusunda morfolojik muayeneyi gerçekleştirmek için bazı tespit ve boyama yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlar, rose-bengal, çini mürekkebi, metilen mavisi, karras ve giemsa gibi boyama yöntemlerinin yanı sıra, hancock tespit yöntemi olarak sıralanabilir. Bu yöntemlerin kendi içlerinde boyama prosedürleri farkları olsa da, her biri ya sürme froti hazırlanarak ya da hazırlanan sperma solüsyonunun lam üzerine damlatılıp üzerine lamel kapatılarak incelenmesi sonucu gerçekleştirilir. Adı geçen yöntemlerde hücrelerin bütün yapılarının incelenmesi gerektiğinden 40x veya 100x büyütme oranları kullanılmaktadır. Yöntemlerin tamamında üç veya daha fazla froti sahasında en az 200'er hücre sayılarak bozukluk oranları tespit edilmektedir (Sevinç, 1977; İleri ve ark., 1996; Çoyan ve ark., 2002; Sönmez, 2013). Morfolojik muayenenin gerçekleştirileceği frothin hazırlanmasında hücrelerin kaliteli bir muayeneye müsaade edecek kadar sulandırılmış olması ve hücrelerin tek tek bulunması, froti kaynaklı uygulama hataları nedeniyle sonucun etkilenmesinin önüne geçecektir (Sönmez, 2013).

Yapılan değerlendirmelerde, fertilizasyon ile yakından ilişkisi olan akrozomal bozuklukların dikkatlice incelenmesi elde edilecek gebelikleri etkilemesi sebebiyle son derece önemlidir (Hafez, 1993). Spermatozoonlarda görülen bozukluklar akrozom ile başa ait, orta kısım ve bunun bağlantı bozuklukları, kuyruğa ait ve yapısal anomaliler olarak ayrılabilir. Akrozoma ait bozukluklar; dejenere akrozom, granüllü akrozom veya akrozom yokluğu gibi özetlenebilir. Başa ait bozukluklar ise; dar baş, armut baş, kopuk baş ve mızrak baş olarak sıralanabilir. Orta kısımda, protoplazmik damlacık, kısa, uzun veya ince boyun gibi yapısal bozukluklar ile baş ile kuyruğun bağlanmasındaki bozukluklar olan çeşitli eksen kaymaları ile seyreden bağlanma bozuklukları sayılabilir. Kıvrılmış kuyruk, kırılmış kuyruk ve fibrilli kuyruk gibi bir takım bozukluklar kuyrukta görülürken, tek baş-çift kuyruk veya çift baş-tek kuyruk gibi morfolojik bozukluklar da yapısal anomaliler olarak isimlendirilir (Hafez, 1993; İleri ve ark., 1996; Sönmez, 2013).

#### **2.4.5. Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST)**

Hypo-osmotic swelling test, spermatozoon membran yapılarının fonksiyonel bütünlüğünü değerlendirmek üzere kullanılan bir yöntemdir (Sönmez, 2013). Son derece ekonomik olan ve az miktarda kimyasal ihtiyacının yanında, spermanın potansiyel fertilitésine dair önemli ip uçları sunabilen bir test olarak kullanılmaktadır (Hafez, 1993). Sperma osmotik basıncı normal şartlar altında 290-310 mOsm aralığındadır. Bu kapsamda, 250 mOsm altındaki değerler hipotonik, 350 mOsm üzerindeki değerler ise hipertonik ortamları ifade etmektedir (Sönmez, 2013). HOS testinin temel mantığı, hipotonik ortamlar hazırlanarak spermanın 37°C sıcaklıktaki su banyosu içerisine 30-60 dakika süre ile inkübasyonudur. Sürenin sonunda membran bütünlüğüne sahip hücreler hipoozmotik ortama tepki vermektedir. Bu esnada hücrelerin baş kısımları şişmekte, kuyruklar ise kıvrılarak deforme olmaktadır. Bu reaksiyonu gösteren hücreler hesaplanarak değerlendirme yapılmaktadır (Hafez, 1993; Sönmez, 2013). Genel olarak araştırmacılar bu testin uygulanmasında, sodyum-sitrat ve fruktozu belirli oranlarda karıştırarak 100 mOsm değerinde hazırlanmış solüsyonları da kullanmışlardır (Uysal ve Bucak, 2007; Bucak ve ark., 2008; Gündoğan, 2009; Kulaksız ve ark., 2010) . Bunun yanında hipotonik ortam için 75 mOsm (Cirit ve ark., 2013) veya 150 mOsm (Hafez, 1993) değerindeki çözeltileri kullanan araştırmacılar da bulunmaktadır. HOS testin sonucunun tayin edilmesi amacıyla ısıtıcı tablalı (37°C) faz-kontrast mikroskopta 40x veya 100x büyütme altında 200 hücre değerlendirilmekte ve oran yüzdelik olarak belirlenmektedir (Kulaksız ve ark., 2010).

#### **2.5. Spermanın Saklanması**

Spermasının saklanması, geçen yüzyılın ortalarından günümüze kadar uzanan önemli bir bilim konusudur. Öncelikle kısa süreli daha sonrasında ise uzun süreli saklama tekniği geliştirilmiştir (Holt, 2000). Genetik çeşitliliği sağlamak ve bunu koruyarak istenilen üstün genetik özellikleri yakalamak amacıyla, bazı infertilite problemlerinin önüne geçmek ve insan ile hayvan sağlığını korumak ihtiyacıyla spermanın saklanması gündeme gelmiştir (Walters ve ark., 2009). Güncel araştırmalar incelendiğinde, spermanın 5°C'ta kısa süreli saklanması, dondurularak

ve liyofilize edilerek saklanması öne çıkan yöntemlerdir. Adı geçen yöntemlerin tamamında çok çeşitli kimyasal içerikler ve birtakım farklı prosedürler kullanılmaktadır (Yoshida, 2000).

Spermanın sıvı olarak saklanması, genel olarak 5°C gibi düşük sıcaklıklarda kısa süreliğine saklanma prensibine dayanır (Bucak ve Tekin, 2007; Çoyan ve ark., 2010). Anılan yöntemin temel amacı taze spermanın sulandırılarak birden fazla dişinin tohumlanması sağlamak olabileceği gibi (Maxwell ve Stojanov, 1996), spermayı kısa süreli saklamanın etkilerini çeşitli yöntemlerle araştırmak da olabilir (López-Sáez ve ark., 2000; Bucak ve Tekin, 2007; Çoyan ve ark., 2010; La Falci ve ark., 2011).

Virüsler, bakteriler ve mantarlar gibi organizmaların saklanmasında ve taşınmasında daha önce kullanılan liyofilizasyon yöntemi spermanın saklanmasında, nispeten yeni kullanılmaya başlanmıştır (Liu ve ark., 2004). Yöntem, spermanın liyofilizatör adı verilen cihaz aracılığıyla, basınç altında bünyesinde bulunan sıvıdan tamamen arındırılarak kurutulması şeklinde gerçekleştirilmektedir (Gil ve ark., 2014). Bu yöntem kullanıldıktan sonra kurutulan sperma, buzdolabı koşullarında uzun süre saklanabilmesine karşın, hareket ve doğal yollarla fertilite yeteneğini yitirmektedir. Bununla beraber, genetik materyal korunduğundan, intrasitoplazmik sperma enjeksiyonu gibi çeşitli biyoteknolojik yöntemlerle gebelik elde edilmektedir (Keskintepe ve ark., 2002).

Spermanın çok düşük sıcaklıklarda dondurularak saklanması günümüzde en çok kullanılan yöntemdir. Bu amacı gerçekleştirmek için yıllar boyunca çeşitli paketleme yöntemleri denenmiştir. Bu paketleme yöntemleri ampül, pellet ve payet olarak sınıflandırılabilir (İleri ve ark., 1996; Sönmez, 2013). Payet yöntemi diğer iki yönteme göre spermanın sıvı azot içerisinde daha uzun süre başarıyla saklanmasına imkân tanımasından dolayı daha pratik ve uygulanabilir hale gelmiştir (Sönmez, 2013). Spermanın dondurularak saklanması, üstün genetik özelliklerdeki erkek materyalin Dünya genelinde yaygınlaştırılmasına olanak sağlamıştır. Bu gelişme, veneral hastalıkların kontrolü, fertilite kontrol programları, genetik hastalıkların önüne geçilmesi, genetik çeşitlilik gibi birçok konuda olanaklar sunmuştur (Hafez,

1993; Sönmez, 2013). Sperma dondurma prosedürü, spermanın alınması, makroskopik ve mikroskopik muayenelerden sonra sulandırma, soğutma, dondurma ve saklanma aşamalarını kapsar (Woods ve ark., 2011). Sperma hücreleri her aşamada, fiziksel ve biyokimyasal etkenlere maruz kalır ve bu etkenler sonucunda spermatozoonların viabilitesi, hareket kabiliyeti ve fertilite oranları etkilenecek düşer (Salamon ve Maxwell, 1995). Olası dış etkileri azaltabilmek için sulandırıcılara çeşitli kimyasal bileşenler eklenerek ve bazı dondurma yöntemleri geliştirilerek denemeler yapılmıştır. Geliştirilen yöntemler içerisinde, çeşitli pH tamponlayıcı maddeler (Aisen ve ark., 2000), kriyoprotektanlar (Alcay ve ark., 2016), temel sulandırıcılar (Alcay ve ark., 2015; Üstüner ve ark., 2016; Gökçe ve ark., 2017), farklı dondurma yöntemleri (Salamon ve Maxwell, 1995) ve dondurma hızları (Üstüner ve ark., 2015) denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu uygulamaların dışında, özellikle son yıllarda sperma sulandırıcılarına katılan antioksidan maddeler bir başka çalışma alanıdır.

## **2.6. Antioksidanlar**

Spermatozoon membranı %70 oranında fosfolipit, %25 oranında doğal lipitler ve %5 oranında ise glikolipit yapıdan oluşmaktadır. Fosfolipit katmanının ise %70'i doymamış yağ asitlerinden oluşmaktadır (Bucak ve ark., 2015). Yoğun miktarda doymamış yağ asidi ve kolesterol nedeniyle, spermanın soğutma, dondurma ve çözündürme işlemleri sırasında spermatozoa plazma membranlarında lipit peroksidasyonu (LPO) sonucu radikal veya radikal olmayan oksijen türlerine bağlı olarak reaktif oksijen türleri (ROS) oluşmakta ve bu türlerin ortaya çıkmasıyla hücre üzerinde fiziksel ve kimyasal stres oluşmaktadır. Normal şartlar altında oluşan ROS ile hücrelerin detoksifiye etme becerisi arasında bir denge bulunmaktadır. Bu dengenin çeşitli nedenlerle bozulması; motilite, canlılık ve elde edilecek fertilitenin düşmesi ile seyretmektedir (Sariözkan, 2008; Türk, 2015). Reaktif oksijen türlerinin ortamda artmasıyla bulunduğu hücrelere hasar vermesi durumuna, oksidatif stres adı verilmektedir. Sperma sulandırıcılarına eklenen antioksidanlar, stres altındaki hücrelerde bu dengeyi tekrar sağlamak amacıyla kullanılmaktadırlar (Bucak ve ark., 2015).

### 2.6.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

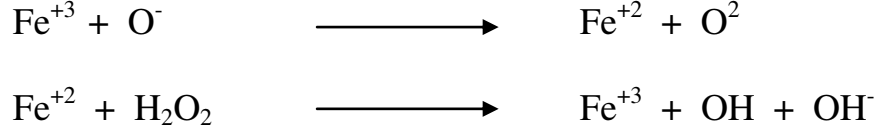
Reaktif oksijen türleri; radikal olan ve radikal olmayan oksijen moleküllerini kapsayan, buna bağlı olarak tüm oksijen radikallerinin ROS, fakat tüm ROS'un da oksijen radikali olmadığı geniş bir kümeyi kapsayan tanıma sahiptir (Halliwell, 2006; Türk, 2015). Spermada bulunan reaktif oksijen türleri, motilite, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, fertilizasyon ve spermatozoonun oosite füzyonunda rol oynadığından belirli oranda hücrede bulunması gerekmektedir (Maneesh ve Jayalekshmi, 2006; Demirtas ve Untan, 2011; Bucak ve ark., 2015; Türk, 2015). Testisler, spermatogenezis sırasında saniyede yaklaşık 1000 hücre üretme kapasitesine sahip olduğundan, yüksek miktarda aktivite barındırır ve oksijene ihtiyaç duyarlar. Bu sebeple hem spermatogenezis işlemi hem de leydig hücreleri oksijene olan ihtiyaçtan ötürü radikallerin saldırılarına açık durumdadır (Türk, 2015).

#### 2.6.1.1. Radikal Reaktif Oksijen Türleri

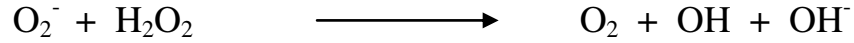
Radikal reaktif oksijen türleri başlıca; süperoksit ( $O_2^-$ ), hidroksiperoksil ( $HO_2$ ), hidroksil ( $OH$ ), alkoksil ( $RO$ ) ile peroksil ( $ROO$ ) radikallerden oluşmaktadır (Türk, 2015).

$O_2^-$  radikali, moleküler oksijenin bir elektron transferi sonucu indirgenmesi sonucunda oluşan ve kararsız bir yapıdır. Bir takım bileşikler ve geçiş metalleri ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan süperoksit radikali; spermanın hiperaktivasyonu, kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonunda rol oynayan enzimatik faaliyetlerin sonucunda da oluşmaktadır.  $O_2^-$  radikali hücre içine su kadar kolay girdiğinden, spermatozoa üzerine toksik etkisi son derece kuvvetli olmaktadır (Bucak ve ark., 2015).  $HO_2$  radikali,  $O_2^-$  radikalının düşük pH altında protonlanması sonucu oluşan kuvvetli bir oksidandır (Çaylak, 2011).  $OH$  radikali, moleküler oksijene üç elektron transfer ederek oluşan çok güçlü bir ROS olarak öne çıkmaktadır (Türk, 2015). Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve  $O_2^-$  bir veya birden fazla çiftlenmemiş elektron taşıyan ve serbest radikal karakterli geçiş metalleri ile reaksiyona girerek veya diğer etkilerle  $OH$  radikali oluşturur. Bu radikalın oluşmasında birkaç yol bulunmaktadır (Çaylak, 2011).

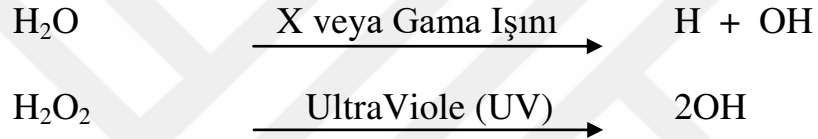
Fenton reaksiyonu sonucu  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  veya benzeri geçiş metalleriyle (Cu, Zn, Mn, Cr) indirgenerek OH radikalini oluşturlar (Bucak ve ark., 2015).



Haber-Weiss reaksiyonu sonucu  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$  ile reaksiyona girerek ( $\text{Fe}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  katalizi ile) hidroksil radikali oluşturmaktadır (Kehrer, 2000).



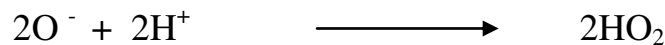
Suyun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalmasıyla veya  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin UV ışığına maruz kalmasıyla da hidroksil radikali oluşabilmektedir (Çaylak, 2011).



RO,  $\text{Fe}^{+2}$  gibi geçiş metallerinin lipid hidroperoksidi indirgemesi ile oluşmaktadır. Okside düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oluşturarak hücre ölümüne yol açmaktadır (Çaylak, 2011). ROO ise, lipid ve protein gibi organik bazlı maddelerin bozulması esnasında şekillenen radikallerdendir ve kısa bir yarılanma ömrüne sahiptir (Türk, 2015).

#### 2.6.1.2. Radikal Olmayan Reaktif Oksijen Türleri

Singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), hipokloröz asit ( $\text{HOCl}$ ) ve ozon ( $\text{O}^3$ ) radikal olmayan bazı ROS çeşitleri olarak sıralanabilir (Türk, 2015).  $^1\text{O}_2$ , dönme yönü farklılığından dolayı oksijenin yüksek reaktif formudur. Elektron dönme yönleri zıt olan singlet oksijenin, elektron yörüngeleri oluşturdıkları forma göre aynı yörüngede ise delta, farklı yörüngede ise sigma olarak isimlendirilirler (Bucak ve ark., 2015). Bağışıklık sistemine ait fagositik özellikli nötrofiller içerdikleri enzimler aracılığıyla  $\text{O}_2^-$  dismutasyonu sonucu oluşan  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan  $\text{HOCl}$ 'ye dönüştürürler (Çaylak, 2011).





Nitrik oksit ve  $O_2^-$ 'nin geçiş metalleri varlığındaki reaksiyonu sonucunda güçlü bir oksidan olan  $ONOO^-$  oluşmaktadır. Bu ROS varlığında nitrit ve nitratlar oluşmakta, buna bağlı olarak da protein yapıları bozularak fonksiyon kayıpları ortaya çıkmaktadır (aylak, 2011; Türk, 2015).  $H_2O_2$ , ROS olmadığı halde  $Fe^{++}$  veya diğer geçiş metalleri varlığında Fenton reaksiyon ile  $O_2^-$  varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu aracılığıyla çok reaktif ve zararlı OH radikalini oluşturmaktadır. Yüksüz, zar geçirgen ve yağda çözünen bir molekül olduğundan hücre üzerindeki tüm zarlara etki edebilen hidrojen peroksit, fagositoz mekanizmasının da en büyük salgı ürünlerindendir. Oksijene bir elektron transferi (süperoksit dismutasyonu) veya oksijene iki elektron eklenmesi (indirgenme) sonucunda da meydana gelebilmektedir (aylak, 2011; Bucak ve ark., 2015; zcan ve ark., 2015; Türk, 2015). Atmosferde oksijene göre az da olsa bulunan  $O_3$ , tepkimelerde yüksek yoğunlukta bulunduğunda son derece kararsızdır. Nitrik oksit ile reaksiyona girerek nitrojen dioksit ( $NO_2$ ) oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca doymamış yağ asitlerinde oksidasyona sebep olduğundan varlığı ROS oluşumu sebebiyle önem arz etmektedir (Bucak ve ark., 2015; Türk, 2015).



#### 2.6.1.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Neden Olduğu Hasarlar

Reaktif oksijen türleri, yüksek aktiviteleri ve hasara yol açma eğilimlerinden dolayı son derece toksik, mutajenik veya karsinojeniktir (Nordberg ve Arnr, 2001). Lipid peroksidasyonu olayı farklı yollarla hücrelerde hasara yol açmaktadır. Bu hasarların başlangıç aşamalarında serbest oksijen grupları çok etkin şekillere dnşrlr ve hücrelerdeki lipidler, proteinler ve karbonhidratlar gibi makromoleküllere hasar verirler. Ayrıca hidroperoksitlerin zehirleyici etkileri ile hücre zarlarındaki bozulmalara ve çeşitli yollarla hücre pH'sında değişmelere neden olurlar. Reaktif oksijen türlerinin lipidler üzerine hasarları, biyolojik sistemlerdeki en büyük etkilerin başında gelmektedir (Yarsan, 1998). ROS, biyolojik membranda bulunan ve bu işleme son derece duyarlı poliansatüre yağ asitlerine (PUFA) etki ederek lipit peroksidasyonunu başlatmaktadır.

Temel olarak bu süreç yüksek aktiviteye sahip radikallerin hücre membranlarında bulunan PUFA'ya saldırarak bir hidrojen atomunu metilen gruptan koparması sonucu başlamaktadır. Bu süreç sonucunda zincirleme peroksidasyon reaksiyonları başlamakta ve oluşan ürünlerin etkileri artarak hücre içi antioksidan maddeler tükenene kadar devam etmektedir. Antioksidan maddelerin bitişi ile birlikte membranların akışkanlığında ve geçirgenliğinde bozulmalar meydana gelmektedir (Özcan ve ark., 2015). Bu olaylar dizisi genel olarak başlangıç aşaması, zincir aşaması ve son olarak da yıkım aşaması şeklinde gelişmektedir. Hücrenin kendi ve organellerinin membranlarında meydana gelen yıkımlar sonucu oluşan ürünler hücreyi ölüme götüren süreci hızlandırmaktadır (Yarsan, 1998). Proteinlerin ROS ile oksidasyonu sonucu çok geniş aralıkta stabil veya reaktif ürün meydana gelmektedir. Geçiş metallerinin etkisiyle aktif hidroperoksitler buna ek radikaller de üretebilmektedir ve tüm bu radikallerin etkisiyle protein fonksiyonlarında değişiklikler meydana gelebilmektedir (Kehrer, 2000; Karabulut ve Gülay, 2016). Hidroksil gibi radikaller hücrelerdeki karbonhidratlar ile reaksiyona girerek karbon atomlarının birinden bir hidrojen atomu çıkartma yolu ile karbon merkezli radikallerin üretilmesine sebep olabilirler. Bu radikaller de hyaluronik asit gibi önemli moleküllerde zincir kırılmalarına sebep olmaktadır (Yarsan, 1998; Karabulut ve Gülay, 2016).

#### **2.6.1.4. Reaktif Oksijen Türlerinin DNA Üzerine Etkileri**

Yüksek aktiviteye sahip hidroksil gibi radikaller, lipit ve proteinlerde olduğu gibi DNA ile de etkileşime girmektedir. DNA bazlarındaki çift bağlara H atomu ekleyerek veya 2-deoksiribozun C-H bağlarından ve timin yapısındaki metil gruplarından H atomu çıkararak DNA molekülü ile reaksiyona girmesiyle bir takım indirgemeler sonucunda oksidasyon ürünleri ortaya çıkmaktadır (Nordberg ve Arnér, 2001; Özcan ve ark., 2015). Reaktif oksijen türleri, pürin ve pirimidin bazlarındaki bağlara ve yapılara etki ederek çok çeşitli hasar ürünleri meydana getirmektedir (Karabulut ve Gülay, 2016). Pürin bazlarından guanin, oksidasyona özellikle hassas bir yapıdadır. Saldırıları sonucunda oluşan 8-hidroksi deoksiguanozin gibi ürünler biyolojik işaretçiler olarak kullanılmakta ve tespit işleminde sıklıkla bu moleküle başvurulmaktadır (Kehrer, 2000; Guthrie ve Welch, 2012).

Demir, bakır, kadmium ve krom gibi geçiş metalleri de oksidatif yolda önemli roller oynayarak DNA hasarına yol açmaktadırlar (Hemnani ve Parihar, 1998).

### **2.6.2. Antioksidanların Sınıflandırılması**

Antioksidanlar, vücutta olumsuz etkiye sahip fazla ROS'u temizleyerek metabolizmanın sahip olduğu hassas oksidan-antioksidan dengesini korumaya sağlayan ajanlardır (Agarwal ve ark., 2012). Vücudun oksidatif strese karşı ürettiği (endojen) veya dışardan edindiği (eksojen) antioksidanlar bulunmaktadır (Yehye ve ark., 2015).

#### **2.6.2.1. Endojen Antioksidanlar**

Hücrelerdeki endojen antioksidanlar enzimatik ve non-enzimatik olarak sınıflandırılabilir. ROS üretimine sebep olabilecek olayların başlangıç aşamalarında ilk müdahaleyi yapan enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon reduktaz (GR) olarak sıralanabilir (Gupta ve ark., 2014). Non-enzimatik antioksidanlara ise lipoik asit, glutatyon, L-arjinin, koenzim Q10, melatonin ve ürik asit gibi örnekler verilebilir (Yehye ve ark., 2015). SOD, vücutta taşıdığı metale göre adlandırılan beş farklı formda bulunabilmektedir. Manganez içeren Mn-SOD, bakır ve çinko içeren CuZn-SOD, demir içeren Fe-SOD, nikel içeren Ni-SOD ve bakır içeren Cu-SOD olarak adlandırılmaktadır. SOD, süperoksit anyonuna bir elektron verip  $H_2O_2$ 'ye çevirerek görevini gerçekleştirmektedir. SOD'un antioksidan etkisi süperoksit ile  $Fe^{+3}$ 'ün,  $Fe^{+2}$ 'ye indirgenmesi şeklindedir (Çaylak, 2011). Bir selenoprotein olan GPx enzimi ise SOD'un  $H_2O_2$ 'ye çevirdiği molekülü su ve oksijen molekülüne çevirmektedir. Bu olayı gerçekleştirebilmek için glutatyonu okside etmektedir. Sonrasında ise okside glutatyonun eski haline dönüşmesi için glutatyon redüktaz enzimi devreye girerek işlemi tersine çevirmektedir (Çaylak, 2011; Gupta ve ark., 2014). Diğer bir enzimatik antioksidan olan CAT ise GPx gibi  $H_2O_2$ 'yi su ve atomik oksijene indirgeyerek görevini yerine getirmektedir (Amidi ve ark., 2016).

Koenzim Q10, testislerde endojen olarak üretilen, lipofilik ve non-enzimatik bir antioksidan olarak göze çarpmaktadır. Peroksidasyon sürecinde, koenzim Q10'un tam olarak indirgenmiş hali olan ubiquinol bir antioksidan olarak görev yapmaktadır ve lipid peroksil radikallerini ortadan kaldırmaktadır (Ramadan ve ark., 2002; Yousefian ve ark., 2014).

#### **2.6.2.2. Eksojen Antioksidanlar**

Eksojen antioksidanlar vücutta üretilemeyen ve mutlaka dışardan alınması gereken antioksidanlar olarak tanımlanabilir. Genel olarak yeterli beslenmesi sağlanan ve destekleyici gıdalar alan canlılarda ROS üretimini engelleyen ve oksidatif stresi azaltan antioksidanlar bulunmaktadır (Yehye ve ark., 2015). Bunların bazıları; vitamin E, vitamin C, sistein, hipotaurin, bütıl hidroksitoluen (BHT) ve taurin olarak sıralanabilir (Bucak ve Tekin, 2007; Memon ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2012). Vitamin C (askorbik asit), suda çözülebilen, zincir kırıcı, düşük toksisite ve yüksek potansiyele sahip bir antioksidandır. Zincir kırma özelliği ile peroksidaz türevlerin yayılması esnasında devreye girerek süreci durdurmaktadır (Zhang ve ark., 2012). Epididimal sıvıda ve seminal plazmada yüksek oranda bulunan vitamin C, sperma hücrelerini  $H_2O_2$  gibi ROS'a karşı savunarak DNA hasarını engellemekte ve genetik bütünlüğün korunmasını sağlamaktadır (Sönmez ve ark., 2005). Vitamin E, hayvan hücrelerinde yağda çözünen ve membran lipidlerinde bulunan yağ asitleri ile ROS'un arasındaki kovalent bağları bozan kuvvetli bir antioksidandır. Bu özelliği sayesinde hücre membran yapılarının ROS ürünlerinden etkilenmesini engellemektedir (Zhang ve ark., 2012). Vitamin E'nin aktivitesi bir radikal tarafından yok edilse bile, başka antioksidanlar olan askorbat ve retinol sayesinde yeniden aktif hale gelebilmektedir (Yehye ve ark., 2015). Vitamin E'nin epididimiste oluşan lipid peroksidasyonu oluşumunu engellediğine, SOD aktivitesini artırdığına ve testisleri oksidatif strese karşı koruduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Hong ve ark., 2010). Taurin, çoğu hayvanda fazla miktarda bulunan düşük moleküler ağırlıklı organik bir sulfonik asittir. Yarı-esansiyel amino asit olması sebebiyle birçok dokuda bulunmakta ve çoğunda da sentezlenebilmektedir. Reprodüktif sistemde; leydig hücreleri ve vasküler endotelial hücreler gibi yerlerde tespit edilmiştir (Yang ve ark., 2010).

Taurin, bir antioksidan olarak davranıp spermatozoon plazma membranından geçerek lipid peroksidasyonunu engellemekte ve hücreyi korumaktadır (Shiva ve ark., 2010). Sisteamin, tiyol bileşiği olarak da bilinen geniş bir aileye üye antioksidanlardandır (Sarıözkan ve ark., 2014). Sisteamin, hücreler tarafından sistein alımını artırarak glutatyon sentezini artırmakta ve dolayısıyla da ROS'a karşı savunma mekanizmalarını güçlendirmektedir (Güngör ve ark., 2016). Sisteaminin aynı zamanda çözündürme sonrası koç spermasında motilite oranını artıran, spermada antioksidan kapasiteyi yükselten ve embriyonik gelişimi destekleyen son derece etkin bir antioksidandır (Bucak ve ark., 2009).

Metiyonin, glutatyon için öncü bir amino asit olarak davranan ve çeşitli dokulardaki oksidatif hasarı engellediği bilinen bir antioksidandır (Çoyan ve ark., 2010). Ayrıca, sülfür içeren bölümleri de şelat yaparak uzaklaştırdığından dolayı detoksifikasyon işinde önemli bir rol oynamaktadır (Patra ve ark., 2001; Tuncer ve ark., 2010b). Sperma sulandırıcılarına değişik dozlarda metiyonin ekleyen pek çok çalışmada, eritme sonrası spermatolojik parametreleri koruduğu yönünde sonuçlar mevcuttur (Tuncer ve ark., 2010b; Omur ve Coyan, 2016; Toker ve ark., 2016;). Sistein tiyol grubu bir antioksidan olup, düşük molekül ağırlığına sahiptir (Uysal ve Bucak, 2007). Seminal plazma ve spermatozoon nükleik asitinde doğal olarak bulunmasıyla, DNA bütünlüğünü korumakta ve hücrede meydana gelen ROS kaynaklı etkilere karşı antioksidan olarak görev yapmaktadır (Ansari ve ark., 2016). Glutatyon için temel yapı taşlarından biri olan sistein, hücrede meydana gelen lipid peroksidasyonunu engellemektedir (Topraggaleh ve ark., 2014). Çoğu hayvan türünde sperma dondurulmasında kullanılmış olan sisteinin, dondurma-çözündürme işlemleri sonrası motilite, viabilite ve kromatin bütünlüğü üzerine pozitif etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur (Uysal ve Bucak, 2007; Bucak ve ark., 2008; Anghel ve ark., 2010; Kulaksız ve Daskin, 2010; Beheshti ve ark., 2011; Sarıözkan ve ark., 2014; Sharafi ve ark., 2015). BHT, vitamin E'nin sentetik bir analogu olup, peroksi radikallerinin hidroperoksitlere dönüştürülmesini başlatır (Naijian ve ark., 2013). Birçok hayvan türünde spermanın sıvı olarak saklanması veya dondurulması işlemlerinde sulandırıcılara eklenmiş ve pek çok çalışmada spermatozoonları soğuk şokuna karşı koruduğu kanıtlanmış bir antioksidandır (Roca ve ark., 2004; Farshad

ve ark., 2010; Memon ve ark., 2012; Naijian ve ark., 2013). BHT'nin spermatozoonları soğuk şokuna karşı koruması, membranda bulunan lipidlere etki ederek membran geçirgenliğini azaltmasıyla gerçekleşmektedir (Khalifa ve ark., 2008).



### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Hayvan Materyali, Bakım ve Besleme**

Tez çalışması, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Sağlığı ve Hayvansal Üretim ve Uygulama Merkezi Koyunculuk Ünitesi'nde (enlem 29° 04' Doğu, boylam 40° 11' Kuzey, rakım 100 m) gerçekleştirildi. Bu çalışmada, 2-4 yaşlarında ve 60-80 kg canlı ağırlık aralığındaki beş baş Kıvırcık ırkı koç kullanıldı. Sağlık kontrolünden geçirilerek çalışmaya dâhil edilen koçlar, çalışma öncesi ve süresince ayrı olarak barındırıldı. Koçlar deney süreci boyunca eşit şartlarda bakıldı. Serbest miktarda kuru çayır otu ve günlük bir kilogram konsantre yem ile beslenen koçlara su ve yalama taşı, ad-libitum olarak verildi. Tez çalışması, Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (03.02.2015 tarihli ve 2015-02/01 numaralı etik kurul kararı) onayı alınarak gerçekleştirildi.

#### **3.2. Koçlardan Sperma Alınması ve Spermatolojik Muayeneler**

Sperma toplama işlemi, sıfat sezonu içinde (Eylül-Ekim), haftada iki kez olacak şekilde toplam beş kez gerçekleştirildi. Sperma, koçlardan elektro-ejakülasyon yöntemiyle alındı. Alınan sperma örneklerinden 0,5 ml hacim, (+++) mass aktivite, %70 motilite ve  $1,5 \times 10^9$  spermatozoon/ml yoğunluğa sahip ejakülat örnekleri alınarak birleştirildi (Toker ve ark., 2016). Elektro-ejakülatör yardımı ile sperma almak amacıyla ilk olarak hayvanlar zapt-ı rapt altına alındı. Prepüsial bölgenin kılları temizlendi, serum fizyolojik ile bölgenin temizliği sağlandı ardından bölge tamamen kurutuldu. Elektro-ejakülatörün (Ruakura koç probu, Hamilton, Yeni Zelanda) koç için üretilmiş, 12 cm boyunda, 2,5 cm çapında ve 12 volt elektrik kapasitesi olan probun ucuna ve bölgeye kayganlaştırıcı uygulayarak rektuma yerleştirildi. Bu işlemin ardından, prepüsyum manipüle edilerek penis dışarı çıkartıldı. Takip eden süreçte koça, 1-2 saniyelik aralıklar ile 5-7 uyarım olacak şekilde elektrik akımı uygulandı.

Uyarım aralarında penise masaj yapılarak tüm ejakülatın alınması sağlandı. Sperma örnekleri önceden ısıtılmış dereceli sperma toplama kadehlerine bir huni yardımıyla alındı ve işlem tamamlandıktan sonra vakit kaybetmeden, önceden 30-32°C'a ayarlanmış bir su banyosuna sperma toplama kadehi aktarıldı (İleri ve ark., 1996; Nur ve ark., 2010). Elde edilen taze sperma örneklerinin değerlendirilmesi amacıyla; makroskopik (hacim, renk, koku) muayenelerin yanında, mikroskopik muayeneler (kitle hareketi, motilite, yoğunluk, morfolojik muayene) ve plazma membran bütünlüğü yönünden (HOS test) incelendi. Motilite, morfolojik muayene ve HOS testi kapsayan mikroskopik muayeneler, spermanın dondurulma aşamaları olan sulandırma sonrası, ekilibrasyon sonrası ve çözündürme sonrası zamanlarda da uygulandı (Nur ve ark., 2010). Tez çalışması boyunca kullanılan tüm sarf malzemelerinin steril ve sperma ile aynı sıcaklıkta olmasına, uygulanacak yöntemlerdeki solüsyonların taze hazırlanmasına her zaman dikkat edildi.

### **3.2.1. Makroskopik Spermatolojik Muayeneler**

Sperma hacmine, alınan örneklerin toplama kadehlerinde bulunan derecelere göre mililitre (ml) cinsinden ölçülmesiyle ulaşıldı. Sperma örneklerinde kendine has aromatik koku ve koyu krem rengi arandı (Hafez, 1993).

### **3.2.2. Kitle Hareketi Muayenesi**

Taze spermada kitle hareketi vakit kaybetmeden değerlendirildi. Isıtıcı tablalı (37°C) faz-kontrast mikroskop (Olympus BX51-TF - Olympus Optical Co., Ltd., Japonya) üzerinde bulunan lama bir damla taze sperma uzunlamasına damlatılarak, üzerine lamel kapatmadan x100 büyütme altında değerlendirildi. Kitle hareketi (+) kötü, (++) vasat, (+++) normal ve (+++++) yüksek olacak şekilde girdap hareketi puanlanarak sonuç tayin edildi (Sönmez, 2013).

### **3.2.3. Motilite Muayenesi**

Motilite muayenesi ısıtıcı tablalı faz-kontrast mikroskopunda gerçekleştirildi. Önceden 37°C'a ısıtılmış lam üzerine bir damla tamponlayıcı solüsyon (%0,9 izotonik sodyum klorür çözeltisi) ve bir damla sperma örneği sırasıyla; damlatıldı. Lamel kapatılarak x400 büyütme altında, üç farklı alanı kapsayacak şekilde



gerçekleştirilen muayene sonucunda, herhangi bir yönde güçlü ve hızlı hareket eden spermatozoonların, hareketsiz veya diğer hareket biçimlerini gösteren hücrelere oranı göz önüne alınarak yapılan hesaplama sonucunda yüzdelik (%) bir değer verildi (Hafez, 1993).

#### **3.2.4. Yoğunluk Tayini**

Elde edilen ejakülattaki spermatozoon yoğunluğunu tayin etmek amacıyla hemositometrik yöntem kullanıldı (İleri ve ark., 1996). Eritrosit sayma pipetinin 0,5 çizgisine kadar sperma, 101 çizgisine kadar ise sodyum klorür çözeltisi çekilerek 200 katlı sulandırma işlemi gerçekleştirildi. Nazıkçe karıştırılan sperma çözeltisi önceden hazırlanmış Thoma sayma lamına damlatıldı. Dört köşeden ve bir adet ortadan olmak üzere beş adet büyük sayma alanı (toplamda 80 küçük kare) içindeki spermatozoonlar ışık mikroskobuyla (Nikon Eclipse E100 - Nikon Co. Japonya) değerlendirilerek x100 büyütme altında sonuca ulaşıldı ve değer kısaca  $10^7$  ile çarpılarak, bir mililitredeki yoğunluk değerine ulaşıldı.

#### **3.2.5. Morfolojik Muayene**

Spermanın morfolojik muayenesi amacıyla Gimza boyası kullanıldı (Merck-Millipore - 1.09204). Boya, stok boya solüsyonunun her on damlası için beş mililitre distile su karışımıyla taze olarak hazırlandı. Hazırlanan sürme frotiler iyice kuruduktan sonra 10 dakika süre ile metil alkol (Tekkim – TK.911022) dolu bir boyama kutusunda bekletilerek tespit edildi. Ardından başka bir boyama kutusuna frotileri tamamen kaplayacak kadar Gimza boyası koyularak 30 dakika boyunca beklendi. Boyama esnasında, içinde frotiler bulunan boyama kutularını sıcak suda ( $37^{\circ}\text{C}$ ) bekleterek, boyanın sıcak kalması sağlandı. Süre sonunda frotiler distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Sayımlar ışık mikroskobunda x100 büyütmede ve 200 hücrede akrozom, baş, orta kısım ve kuyruk değerlendirilerek gerçekleştirildi. Sayım esnasında, her spermatozoon baş, orta, kuyruk öncelik sıralamasıyla incelendi ve tek bir bozukluk kaydedildi (İleri ve ark., 1996).

### 3.2.6. Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST)

Plazma membran bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla yapılan HOS testi çalışmanın tüm aşamalarında kullanıldı. 100 mOsm değerinde sodyum sitrat (Sigma-Aldrich – W302600) – fruktoz (Merck-Millipore – 1.04007) solüsyonu hazırlandı. Sıcaklığı 37°C'a ayarlanmış bir su banyosuna reaksiyon tüpleri yerleştirilerek, içlerine 200 µl HOST solüsyonu ve 20 µl sperma örneği koyuldu. Bir saatlik inkübasyon süresinden sonra, önceden 37°C'a ısıtılmış bir lam üzerine bir damla örnek pipet yardımıyla alındı ve üzerine lamel kapatıldı. Isıtıcı tablalı faz-kontrast mikroskop ile x100 büyütme altında 200 hücre sayılarak yöntemin sonucu yüzde olarak belirlendi. Kuyruk kısmı şişmiş ve kıvrılmış olan hücrelerin yüzde değerleri tespit edilerek sonuç tayin edildi (Alcay ve ark., 2015).

### 3.3. Sperma Örneklerinin Sulandırılması ve Soğutulması

Tez çalışmasında TRIS-sitrik asit fruktoz sperma temel sulandırıcısı kullanıldı (Aisen ve ark., 2005). Sulandırıcı formülünde küçük değişiklikler yapılarak modifiye edilen yöntem, iki aşamalı sulandırma tekniği uygulandı. Kullanılan sulandırıcıların içerikleri aşağıdaki tabloda verildi.

| <b><u>Sulandırıcı A</u></b>      | <b><u>Miktar</u></b> | <b><u>Marka-Katalog Numarası</u></b> |
|----------------------------------|----------------------|--------------------------------------|
| (Tris(hidroksimetil)aminometane) | 27,1 gr/l            | Sigma-Aldrich – T6791                |
| Sitrik asit                      | 14,0 gr/l            | Merck-Millipore – 100242             |
| D - fruktoz                      | 10,0 gr/l            | Merck-Millipore – 104007             |
| Penisilin G                      | 0,3 gr/l             | Sigma-Aldrich – P7794                |
| Dihidrostreptomisin              | 0,4 gr/l             | Sigma-Aldrich – S1277                |
| Yumurta Sarısı                   | %20                  |                                      |

| <b><u>Sulandırıcı B</u></b>      | <b><u>Miktar</u></b> | <b><u>Marka-Katalog Numarası</u></b> |
|----------------------------------|----------------------|--------------------------------------|
| (Tris(hidroksimetil)aminometane) | 27,1 gr/l            | Sigma-Aldrich – T6791                |
| Sitrik asit                      | 14,0 gr/l            | Merck-Millipore – 100242             |
| D- fruktoz                       | 10,0 gr/l            | Merck-Millipore – 104007             |
| Penisilin G                      | 0,3 gr/l             | Sigma-Aldrich – P7794                |
| Dihidrostreptomisin              | 0,4 gr/l             | Sigma-Aldrich – S1277                |
| Yumurta Sarısı                   | %20                  |                                      |
| Trehaloz                         | 38 gr/l              | Sigma-Aldrich – T0167                |
| EDTA                             | 1,5 gr/l             | Fisher Scientific – BP118            |
| Gliserol                         | %6                   | Sigma-Aldrich – S5516                |

Hazırlanan sulandırıcılar, 7 eşit gruba bölündü;

1. Grup: Kontrol (Antioksidan bulunmayan)
2. Grup: 2.5 mM Metiyonin (Sigma-Aldrich – M5308)
3. Grup: 5 mM Metiyonin
4. Grup: 1 mM Sistein (Sigma-Aldrich – C7352)
5. Grup: 2 mM Sistein
6. Grup: 1 mM Bütil Hidroksitoluen (BHT) (Sigma-Aldrich – B1378)
7. Grup: 2 mM Bütil Hidroksitoluen (BHT)

Yukarda verilen gruplar, antioksidanların belirtilen oranlarda sperma sulandırıcılarına eklenmesiyle taze olarak, çalışma günlerinde hazırlandı. Gliserol içermeyen sulandırıcı A grupları, 30-32°C'a ayarlanmış bir su banyosuna koyularak alınan sperma örnekleri ile aynı sıcaklıkta olacak şekilde önceden ısıtıldı.

Sulandırıcı B grupları ise sperma örneklerinin soğutulacağı 5°C sıcaklıktaki yatay buzdolabına yerleştirildi. Alınan sperma örneklerinin çalışma kriterlerine uygun olanları birleştirildikten sonra, yoğunluk tayini hızlı bir biçimde gerçekleştirildi. Bulunan yoğunluk değerine göre, dondurma sonrası 0,25 ml hacimdeki bir payette 200 milyon spermatozoon olacak şekilde hesaplama yapılarak sulandırma gerçekleştirildi. Sulandırma işlemi gerçekleştirilen sperma gruplarının bulunduğu tüpler 30-32°C sıcaklıkta su içeren bir kaba koyuldu ve 5°C sıcaklıktaki yatay buzdolabına aktarılarak soğutma işlemi başlatıldı. Örneklerin bulunduğu tüplere temas etmeyecek şekilde, buz kalıpları aşamalı olarak atılarak suyun sıcaklığı bir saat içerisinde 5°C'a indirildi. Bu aşamadan sonra sulandırıcı B, bir saat içinde eşit aralıklarla (10 dakikada bir) ve miktarlarda aşamalı olarak sulandırıcı A içeren sperma gruplarına eklendi. Sulandırma işlemi tamamlandıktan sonra, ekilibrasyon amacıyla 5°C'ta iki saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

#### **3.4. Sperma Örneklerinin Dondurulması ve Çözdürülmesi**

Elde edilen sperma örnekleri ekilibrasyon süresi sonunda, 0,25 ml hacimli mini payetlere otomatik payet doldurma ve kapatma cihazı (IMV, Fransa) yardımıyla çekilerek dondurma işlemine hazır hale getirildi. Programlanabilir gamet dondurma cihazının (Nicool Plus PC Freezing Machine, Air Liquide, Fransa) işlem süreleri çalışma gününden önce ayarlandı. Payetler; 5°C'tan -20°C sıcaklığa dakikada 0,5°C hızda ve -20°C sıcaklıktan -120°C'a ise dakikada 25°C hızda soğutularak donduruldu. Dondurma cihazında, payetleri -120°C'a dondurulduktan sonra doğrudan sıvı azot içerisine (-196°C) nakledildi. Payetler, sıvı azot konteynerinde, spermatolojik muayene zamanına kadar tutuldu ve konteynere periyodik aralıklarla sıvı azot takviyesi yapıldı. Sperma muayenesi için, payetler, 37°C'a ayarlanmış sıcak su banyosunda 30 sn'de çözdürüldü (Ustuner ve ark., 2015).

#### **3.5. İstatistiksel Analiz**

Elde edilen sonuçların analizini gerçekleştirmek için IBM SPSS İstatistik 20 (Chicago, IL, ABD) isimli program kullanıldı. Spermatolojik parametrelerin; ortalamaları alındı, normalite testleri gerçekleştirildi ve elde edilen sonuca göre gerekli test uygulandı. Parametrik olan ve homojen dağılım gösteren değerler için

One-Way ANOVA uygulandı ve Post hoc test olarak Tukey tercih edildi. Parametrik olmayan değerler için Kruskal-Wallis testi uygulandı ve devamında ikili karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi ile değerlendirmeleri yapıldı. Tüm değerlendirmeler için,  $P < 0,05$  anlamlılık düzeyinin istatistiki farkı temsil ettiği kabul edildi. Sonuçların temsil edilmesinde Microsoft Office (Redmond, WA, ABD) programlarından yararlanıldı.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Taze Sperma Bulguları

Elektro-ejakülasyon yöntemiyle, beş adet koçtan toplanan ejakülat örnekleri spermatolojik muayeneler yönünden değerlendirildi ve taze sperma bulguları Tablo-1’de sunuldu. Pooling yapılan taze sperma örneklerinde ortalama hacim, motilite, yoğunluk, plazma membran bütünlüğü, akrozomal, diğer morfolojik ve toplam morfolojik bozukluk değerleri sırasıyla; 3,92 ml, %84,0,  $1,96 \times 10^9/\text{ml}$ , %93,80, %5,60, %0,40 ve %6,0 olarak saptandı.

**Tablo-1. Pooling Sonrası Taze Spermatolojik Parametreler ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ )**

| Çalışma<br>Günü | Spermatolojik Parametreler |                   |                  |                                  |                  |                 |                 |                 |
|-----------------|----------------------------|-------------------|------------------|----------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                 | Hacim (ml)                 | Kitle<br>Hareketi | Motilite (%)     | Yoğunluk<br>( $\times 10^9$ /ml) | HOST (%)         | Akrozom (%)     | DMB (%)         | TMB (%)         |
| 1               | 2,8                        | ++++              | 75               | 2,05                             | 93               | 6               | 0               | 6               |
| 2               | 4,2                        | ++++              | 85               | 1,80                             | 92               | 5               | 0               | 5               |
| 3               | 4,2                        | ++++              | 90               | 1,85                             | 92               | 7               | 0               | 7               |
| 4               | 3,5                        | ++++              | 90               | 1,83                             | 95               | 4               | 1               | 5               |
| 5               | 4,9                        | +++               | 80               | 2,28                             | 97               | 6               | 1               | 7               |
| Ortalama        | 3,92 $\pm$ 0,79            |                   | 84,00 $\pm$ 6,52 | 1,96 $\pm$ 0,20                  | 93,80 $\pm$ 2,17 | 5,60 $\pm$ 1,14 | 0,40 $\pm$ 0,55 | 6,00 $\pm$ 1,00 |

**Akrozom** - Akrozomal bozukluklar

**DMB** - Diğer morfolojik bozukluklar

**TMB** - Toplam morfolojik bozukluklar

#### 4.2. Sulandırma Sonrası Spermatolojik Bulgular

Sulandırma sonrası kontrol ve deneme grupları arasında istatistikî karşılaştırma yapıldı ve sonuçlar Tablo-2’de verildi. Kontrol ve deneme grupları arasında motilite, HOS test ve akrozomal bozukluklar arasında fark bulunmadı. Diğer morfolojik bozukluklar incelendiğinde, kontrol grubu ile 5mM metiyonin, 1mM ve 2mM BHT grupları arasında önemli bir fark bulundu ( $P<0,05$ ). Ayrıca bu fark 5mM metiyonin grubu ile 2mM sistein grubu arasında da görüldü ( $P<0,05$ ). Toplam morfolojik bozukluk oranı değerlendirildiğinde ise, kontrol grubu ile tüm antioksidan grupları arasında ve 5mM metiyonin grubu ile 2mM sistein grubu arasında da önemli farklar tespit edildi ( $P<0,05$ ).

**Tablo-2. Sulandırma Sonrası Spermatolojik Parametreler ( $\bar{X}\pm s\bar{X}$ )**

| Grup            | n | Motilite (%)      | HOST (%)         | Akrozom (%)     | DMB (%)                       | TMB (%)                       |
|-----------------|---|-------------------|------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Kontrol         | 5 | 73,00 $\pm$ 11,51 | 89,80 $\pm$ 3,49 | 7,60 $\pm$ 1,14 | 1,40 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>  | 9,00 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>  |
| Metiyonin 2,5mM | 5 | 75,00 $\pm$ 11,73 | 85,60 $\pm$ 8,26 | 5,40 $\pm$ 1,14 | 0,60 $\pm$ 0,55 <sup>ab</sup> | 6,00 $\pm$ 1,22 <sup>bc</sup> |
| Metiyonin 5mM   | 5 | 72,00 $\pm$ 10,37 | 89,40 $\pm$ 4,51 | 5,00 $\pm$ 0,71 | 0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>        | 5,00 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup>  |
| Sistein 1mM     | 5 | 78,00 $\pm$ 10,37 | 88,80 $\pm$ 5,63 | 5,60 $\pm$ 1,14 | 0,40 $\pm$ 0,55 <sup>ab</sup> | 6,00 $\pm$ 1,41 <sup>bc</sup> |
| Sistein 2mM     | 5 | 78,00 $\pm$ 9,08  | 89,00 $\pm$ 5,15 | 5,40 $\pm$ 0,55 | 0,80 $\pm$ 0,45 <sup>ac</sup> | 6,20 $\pm$ 0,45 <sup>c</sup>  |
| BHT 1mM         | 5 | 77,00 $\pm$ 9,08  | 87,80 $\pm$ 2,86 | 5,80 $\pm$ 1,30 | 0,20 $\pm$ 0,45 <sup>bc</sup> | 6,00 $\pm$ 1,58 <sup>bc</sup> |
| BHT 2mM         | 5 | 77,00 $\pm$ 9,08  | 88,60 $\pm$ 5,50 | 5,20 $\pm$ 0,84 | 0,20 $\pm$ 0,45 <sup>bc</sup> | 5,40 $\pm$ 0,55 <sup>bc</sup> |

**a, b, c:** Aynı sütünde farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasında istatistiki fark vardır ( $P<0,05$ )

**Akrozom** - Akrozomal bozukluklar

**DMB:** Diğer morfolojik bozukluklar

**TMB:** Toplam morfolojik bozukluklar

#### 4.3. Ekilibrasyon Sonrası Spermatolojik Bulgular

Ekilibrasyon sonrası incelenen spermatolojik parametrelere ait bulgular Tablo-3’te sunuldu. Kontrol ve deneme gruplarında motilite, HOS test ve diğer morfolojik bozukluklar arasında fark bulunmadı. Akrozomal ve toplam morfolojik bozukluk oranları göz önüne alındığında, kontrol ve tüm antioksidan grupları arasında önemli bir fark saptandı ( $P<0,05$ ).



**Tablo-3. Ekilibrasyon Sonrası Spermatolojik Parametreler ( $\bar{X} \pm S\bar{X}$ )**

| Grup            | n | Motilite (%)     | HOST (%)         | Akrozom (%)                   | DMB (%)         | TMB (%)                       |
|-----------------|---|------------------|------------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| Kontrol         | 5 | 68,00 $\pm$ 5,70 | 82,80 $\pm$ 7,69 | 11,40 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup> | 1,40 $\pm$ 0,55 | 12,80 $\pm$ 1,48 <sup>a</sup> |
| Metiyonin 2,5mM | 5 | 72,00 $\pm$ 5,70 | 80,60 $\pm$ 9,74 | 8,00 $\pm$ 1,00 <sup>b</sup>  | 0,80 $\pm$ 0,84 | 8,80 $\pm$ 0,84 <sup>b</sup>  |
| Metiyonin 5mM   | 5 | 71,00 $\pm$ 4,18 | 86,60 $\pm$ 1,95 | 7,20 $\pm$ 1,64 <sup>b</sup>  | 0,60 $\pm$ 0,55 | 7,80 $\pm$ 1,64 <sup>b</sup>  |
| Sistein 1mM     | 5 | 71,00 $\pm$ 7,42 | 84,40 $\pm$ 5,13 | 7,40 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>  | 1,20 $\pm$ 1,10 | 8,60 $\pm$ 1,52 <sup>b</sup>  |
| Sistein 2mM     | 5 | 72,00 $\pm$ 5,70 | 81,40 $\pm$ 8,99 | 6,60 $\pm$ 1,52 <sup>b</sup>  | 0,80 $\pm$ 0,84 | 7,40 $\pm$ 1,67 <sup>b</sup>  |
| BHT 1mM         | 5 | 72,00 $\pm$ 5,70 | 80,80 $\pm$ 6,91 | 7,60 $\pm$ 1,14 <sup>b</sup>  | 1,40 $\pm$ 1,14 | 9,00 $\pm$ 1,87 <sup>b</sup>  |
| BHT 2mM         | 5 | 71,00 $\pm$ 2,24 | 83,80 $\pm$ 4,49 | 7,40 $\pm$ 1,52 <sup>b</sup>  | 1,00 $\pm$ 0,70 | 8,40 $\pm$ 1,52 <sup>b</sup>  |

a, b: Aynı sütünde farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasında istatistiki fark vardır (P<0,05)

**Akrozom** - Akrozomal bozukluklar

**DMB:** Diğer morfolojik bozukluk

**TMB:** Toplam morfolojik bozukluklar

#### 4.4. Çözdürme Sonrası Spermatolojik Bulgular

Dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik parametreler Tablo-4'te sunuldu. Motilite ve plazma membran bütünlüğü (Şekil-1) incelendiğinde, kontrol ve tüm antioksidan deneme grupları arasında önemli farklar saptandı (P<0,05). Akrozomal bozukluk oranı kontrol ile metiyonin (2,5mM ve 5mM) ve sistein (1mM ve 2mM) deneme grupları arasında farklı bulundu (P<0,05). Ayrıca akrozomal bozukluk oranı metiyonin ve sistein gruplarında farklı dozlar açısından da farklıydı (P<0,05). İncelenen diğer morfolojik bozukluklar oranı yalnızca 1mM sistein ile 2mM BHT grupları arasında fark önemli bulundu (P<0,05). Toplam morfolojik bozukluk (Şekil-2) oranının, kontrol grubu ile 2,5mM, 5mM metiyonin ve 2mM sistein grupları arasında önemli derecede farklı ayrıca her iki metiyonin ve sistein grubunun, 1mM ve 2mM BHT gruplarından önemli derecede farklı olduğu görüldü (P<0,05). Çözdürme sonrası, motilite ile HOST arasında pozitif (r= 0,880) ve ayrıca motilite (r= -0,243) ve HOST (r= -0,225) ile akrozomal bozukluk arasında negatif korelasyon bulundu (Tablo-5).

**Tablo-4. Çözdürme Sonrası Spermatolojik Parametreler ( $\bar{X} \pm s\bar{X}$ )**

| Grup            | n  | Motilite (%)                  | HOST (%)                      | Akrozom (%)                    | DMB (%)                       | TMB (%)                        |
|-----------------|----|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Kontrol         | 15 | 45,00 $\pm$ 1,29 <sup>a</sup> | 51,60 $\pm$ 1,40 <sup>a</sup> | 16,93 $\pm$ 0,42 <sup>af</sup> | 6,47 $\pm$ 0,52 <sup>ab</sup> | 23,40 $\pm$ 2,29 <sup>bc</sup> |
| Metiyonin 2,5mM | 15 | 53,67 $\pm$ 1,65 <sup>b</sup> | 61,80 $\pm$ 1,49 <sup>b</sup> | 13,93 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>  | 5,87 $\pm$ 0,60 <sup>ab</sup> | 19,80 $\pm$ 2,51 <sup>a</sup>  |
| Metiyonin 5mM   | 15 | 55,67 $\pm$ 1,45 <sup>b</sup> | 64,53 $\pm$ 1,69 <sup>b</sup> | 12,40 $\pm$ 0,49 <sup>cd</sup> | 7,27 $\pm$ 0,64 <sup>ab</sup> | 19,67 $\pm$ 3,81 <sup>a</sup>  |
| Sistein 1mM     | 15 | 56,00 $\pm$ 1,63 <sup>b</sup> | 62,20 $\pm$ 1,33 <sup>b</sup> | 15,27 $\pm$ 0,57 <sup>b</sup>  | 5,40 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>  | 20,67 $\pm$ 3,31 <sup>ac</sup> |
| Sistein 2mM     | 15 | 53,33 $\pm$ 1,74 <sup>b</sup> | 61,67 $\pm$ 2,02 <sup>b</sup> | 12,20 $\pm$ 0,38 <sup>cd</sup> | 5,60 $\pm$ 0,51 <sup>ab</sup> | 17,80 $\pm$ 2,91 <sup>a</sup>  |
| BHT 1mM         | 15 | 53,33 $\pm$ 1,93 <sup>b</sup> | 61,87 $\pm$ 2,12 <sup>b</sup> | 18,67 $\pm$ 0,85 <sup>af</sup> | 6,80 $\pm$ 0,53 <sup>ab</sup> | 25,47 $\pm$ 4,00 <sup>b</sup>  |
| BHT 2mM         | 15 | 52,00 $\pm$ 1,75 <sup>b</sup> | 61,87 $\pm$ 1,36 <sup>b</sup> | 17,87 $\pm$ 0,51 <sup>af</sup> | 6,87 $\pm$ 0,32 <sup>bc</sup> | 24,73 $\pm$ 2,52 <sup>b</sup>  |

**a, b, c, d:** Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasında istatistiki fark vardır (P<0,05)

**Akrozom** - Akrozomal bozukluklar

**DMB:** Diğer morfolojik bozukluk

**TMB:** Toplam morfolojik bozukluklar

**Tablo-5. Çözdürme Sonrası Spermatolojik Parametrelere ait Korelasyon (r)**

|                    | HOST (+)            | Akrozomal Bozukluk   | DMB   | TMB                 |
|--------------------|---------------------|----------------------|-------|---------------------|
| Motilite           | 0,880 <sup>**</sup> | -0,243 <sup>*</sup>  | 0,186 | -0,92               |
| HOST (+)           |                     | -0,225 <sup>**</sup> | 0,132 | -0,129              |
| Akrozomal Bozukluk |                     |                      | 0,157 | 0,859 <sup>**</sup> |
| DMB                |                     |                      |       | 0,641 <sup>**</sup> |

<sup>\*\*</sup> Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır

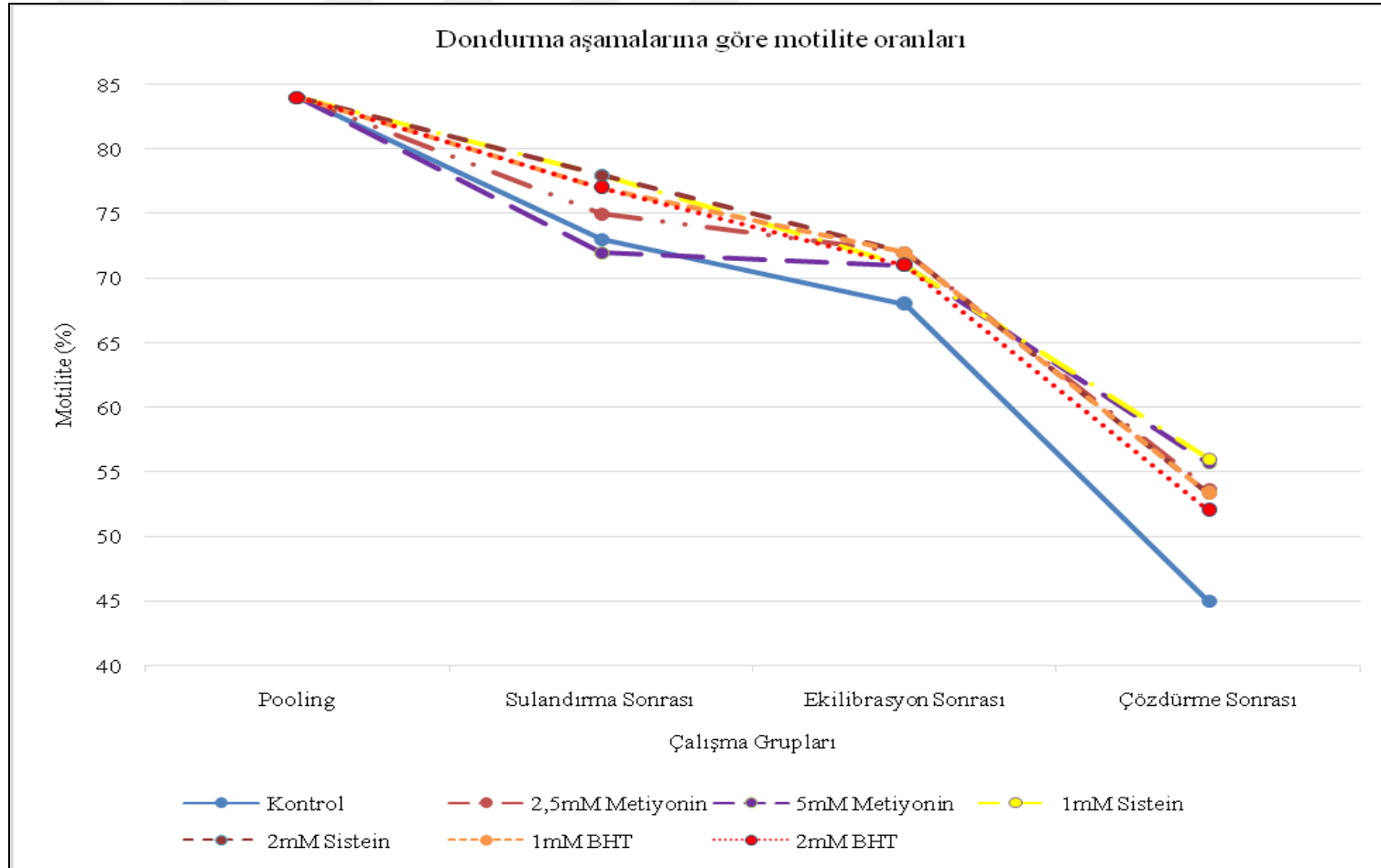
<sup>\*</sup> Korelasyon 0,05 düzeyinde anlamlıdır



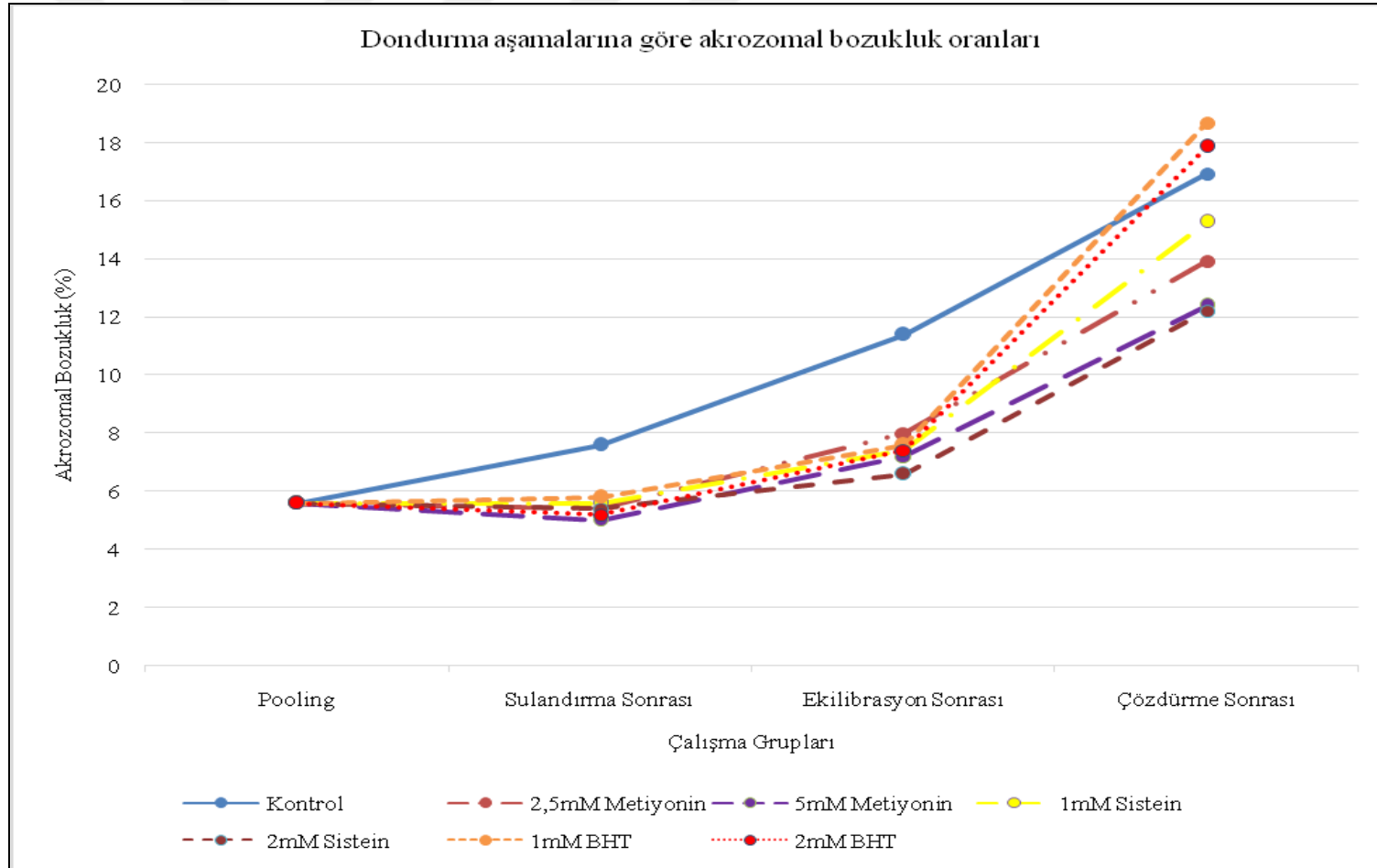
**Şekil-1. HOST sonrası plazma membran bütünlüğü gösteren sağlıklı spermatozoonlar (Hücreler şişmiş ve kuyruklar kıvrılmış)**



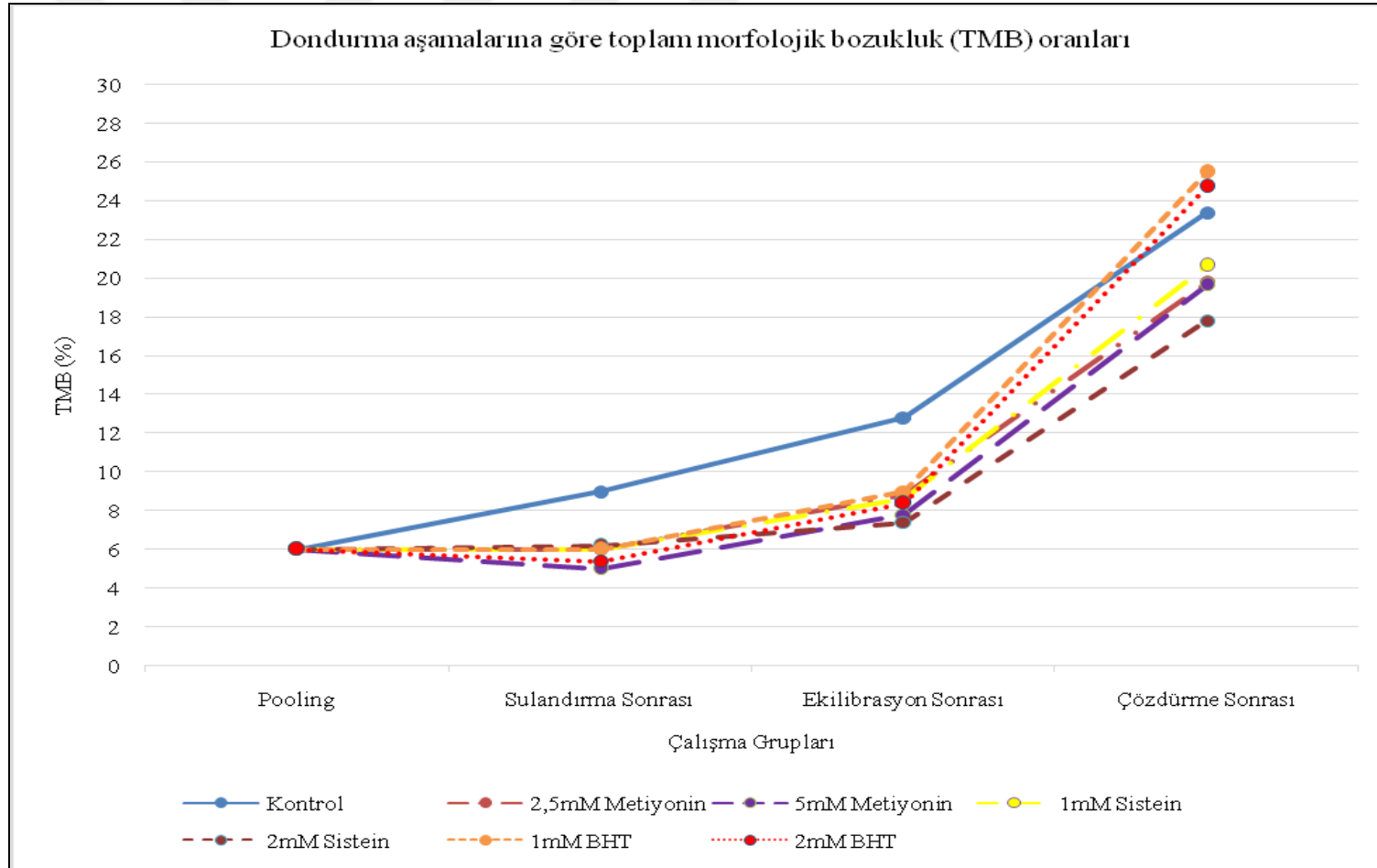
**Şekil-2. Gimza boyama sonrası çeşitli morfolojik bozukluklar**



**Şekil-3. Dondurma aşamalarına göre motilite oranları**



Şekil-4. Dondurma aşamalarına göre akrozomal bozukluk oranları



**Şekil-5. Dondurma aşamalarına göre toplam morfolojik bozukluk (TMB) oranları**

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülkemizin giderek artan nüfusuna paralel olarak yükselen et ihtiyacını karşılamak amacıyla, hayvanların verimlerini artırmaya yönelik olarak gerçekleştirilecek reprodüktif ıslah çalışmaları büyük önem arz etmektedir. Hayvancılık alanında kullanılan üreme biyoteknolojisi yöntemlerinin geliştirilmesi, ülke ihtiyaçlarını karşılama konusunda özellikle küçükbaş hayvancılık açısından büyük yer tutmaktadır. Koç sperması membran yapısı gereği, dondurularak saklama işlemine duyarlıdır. Bu alanda geliştirilecek yeni sulandırıcı bileşenleri, koç spermasının dondurma başarısını artırılmasını sağlayabilecektir. Elde edilecek dondurulmuş sperma örnekleri ile gerçekleştirilecek intraservikal tohumlama yöntemiyle, gebelik oranlarında artış sağlanarak ülkemizin ihtiyacı olan kırmızı et alanındaki eksiklerin giderilmesi söz konusu olabilecektir. Bu tez çalışmasında; sperma sulandırıcısına eklenen antioksidan maddelerin, dondurma - eritme sonrası bazı spermatolojik parametreler üzerine olan etkileri araştırıldı. Beş baş Kıvrıcık ırkı koçtan elde edilen ve en az 0,5 ml hacim, (+++) mass aktivite, %70 motilite ve  $1,5 \times 10^9$  spermatozoon/ml yoğunluğa sahip sperma örnekleri birleştirilerek kullanıldı (pooling). Pooling sonrası elde edilen spermatolojik parametreler Tablo-1’de sunuldu.

Tez çalışmasında, ortalama sperma hacmi ve spermatozoon yoğunluğu sırasıyla; 3,92 ml ve  $1,96 \times 10^9$ /ml olarak tespit edildi. Üreme sezonunda Merinos ırkı koçlardan suni vajina ile sperma toplayan Günay ve ark. (2003), sperma hacim ve yoğunluk değerini sırasıyla; 1,01 ml ve  $3,30 \times 10^9$ /ml olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışma ile tez çalışması karşılaştırıldığında sperma hacminin düşük olmasına karşın spermatozoon yoğunluğunun daha fazla olduğu bulunmuştur. Üreme sezonu içinde üç gün ara ile bir ay boyunca koçlardan elektro-ejakülatör ile sperma toplayan Sönmez ve Demirci (2003) hacim ve yoğunluk sonuçlarını sırasıyla; 1,02 ml ve 2,67

x 10<sup>9</sup>/ml saptamışlardır. Araştırmacıların elde ettikleri spermatozoon yoğunluğu değeri yüksek olmasına karşın, sperma hacmi düşük bulunmuştur. Elektro-ejakülatör ile sperma toplayan Aral ve Aral (2004) iki koça ait sperma hacmini ve spermatozoon yoğunluğunu sırasıyla; 1,22 ile 1,42 ml ve 2,25 ile 2,92 x 10<sup>9</sup>/ml saptamışlardır. Araştırmacıların elde ettikleri değer ile tez çalışması karşılaştırıldığında sperma hacminin düşük olmasına rağmen, yoğunluğunun ise yüksek olduğu görülmüştür. Yöntemin aynı olmasına karşın, sonuçların değişken olması, bireysel farklılıklardan kaynaklanmış olabilir. Elektro-ejakülasyon yöntemiyle koçlardan sperma toplayan Marco-Jiménez ve ark. (2005) çalışmalarında sperma hacmini 1,0 ml olarak tespit etmişlerdir. Diğer bir çalışmalarında Marco-Jiménez ve ark. (2008), sperma hacmini 1,0 ml, yoğunluğunu ise 5,2 x 10<sup>9</sup>/ml olarak bulmuşlardır. Araştırmacıların bulguları tez çalışması ile karşılaştırıldığında; araştırmacıların buldukları hacim değerinin çalışmamızdakinden daha düşük, ancak spermatozoon yoğunluğunun daha yüksek olduğu görülmüştür. Kıvırcık ırkı koçlardan elektro-ejakülasyon yöntemi ile sperma toplayan Alçay ve ark. (2014), sperma hacmini ve spermatozoon yoğunluğunu sırasıyla; 1,34 ml ve 1,90 x 10<sup>9</sup> /ml elde etmişlerdir. Araştırmacıların elde ettikleri hacim değeri, tez çalışmasından daha düşük olmasına karşın, spermatozoon yoğunluğu benzerdir. Anılan çalışmalar ile tez çalışması arasındaki farkın olası nedenleri düşünüldüğünde; ırk, yaş, sezon, vücut ağırlığı, skrotal çevre, yöntemin uygulama şekli, sperma alma sıklığı ve hayvana bağlı etkenlerden kaynaklandığını düşünmek olasıdır (Hafez, 1993; İleri ve ark., 1996).

Elektro-ejakülasyon yöntemi ile koçlardan sperma toplayan Aral ve Aral (2004)'ın bulduğu %83,75 motilite değeri tez çalışmasında elde edilen %84,00 motilite değeriyle benzerdir. Aynı yöntem ile sperma toplayarak motilite değerini ölçen Sönmez ve Demirci (2003) %80,70, Marco-Jiménez ve ark. (2005) %71,90, García-Álvarez ve ark. (2009) %74,17 ve Alçay ve ark. (2014) ise %72,59 olarak buldukları değerlerin tez çalışmasına göre düşük olduğu görülmüştür. Elde edilen bu değerlerin tez çalışmasından farklı olması; motilitenin subjektif bir değerlendirme olması, sperma alma yöntemi, sezon etkisi ve bireysel farklılıklardan kaynaklanabileceği düşüncesini akla getirmektedir.



Taze spermada akrozoma bağlı, diğer morfolojik ve toplam morfolojik bozukluklar ortalamaları sırasıyla; %5,60, %0,40 ve %6,00 olarak saptandı. Akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranını Sönmez ve Demirci (2003) %2,13, Aral ve Aral (2004) ise %3,75 bularak, tez çalışmasına göre daha düşük değer elde etmişlerdir Alçay ve ark. (2014) ise, anormal akrozomal spermatozoon oranını %13,16 ile sunulan tez çalışmasından daha yüksek bulmuşlardır. Taze ko spermasında, akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranını Günay ve ark. (2003) %5,80, toplam morfolojik bozukluk oranını ise, Günay ve ark. (2003) %15,50 ve Marco-Jiménez ve ark. (2005) ise %8,10 olarak bulmuştur. Tez alışması ile anılan her iki çalışma karşılaştırıldığında akrozoma bağlı anormal spermatozoon oranı benzer olmasına rağmen, toplam morfolojik bozukluk oranı, çalışmamızdaki değerden (5,60) daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılığın olası nedenleri olarak, kullanılan değişik boyama yöntemleri, sezon, ırk, yaş, sperma alma yöntemi ve çevresel faktörler olarak düşünölebilir (Gordon, 1999; Günay ve ark., 2003; Aral ve Aral, 2004).

Suni tohumlamanın etkin başarısı, arzu edilen genetik kapasiteye sahip koçların kullanılmasıyla mümkündür. Bu amaca hizmet etmesi açısından sperma saklama yöntemleri geliştirilmiştir. Sperma, kısa süreliğine sıvı olarak veya uzun süreliğine dondurulmuş olarak saklanabilmektedir (oyan ve ark., 2010). Spermatozoon hücre membranları, yoğun miktarda doymamış yağ asidi barındırdığından, oksidatif strese karşı son derece hassaslardır. Dondurma-özdürme gibi işlemler esnasında ortaya çıkan serbest radikaller, sperma hücresine fiziksel ve kimyasal hasar vermektedir (Toker ve ark., 2016). Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak amacıyla kullanılan antioksidanlar, spermanın motilitesini ve membran bütönlüğünü korumak suretiyle dondurulabilirliğine katkı sağlamaktadır (Tuncer ve ark., 2010b).

Sunulan hipotezi desteklemek amacıyla, tez çalışmasında sperma sulandırıcısına antioksidan özelliği bilinen metiyonin, sistein ve BHT çeşitli dozlarda eklendi. 2,5mM ve 5mM oranlarında metiyonin ilave edilmiş grupta eritme sonrası motilite değerleri sırasıyla; %53,67 ve %55,67 olarak tespit edildi. Metiyoninin motilite üzerine etkisi incelendiğinde, kendi arasında ve diğer

antioksidan grupları arasında istatistiksel bir fark olmamasına karşın, metiyoninin her iki grubunun, kontrol grubuyla arasında önemli bir fark olduğu görüldü ( $P<0,05$ ). Merinos ırkı koç spermasına 1mM, 2mM ve 4 mM oranlarda metiyonin ekleyen Ömur ve Çoyan (2016), dondurma-çözdürme sonrası motilite değerlerini kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %45,00, %58,70, %51,20 ve %53,10 olarak tespit etmişlerdir. Anılan araştırmacılar deneme grupları arasında fark bulamazken, kontrol grubu ile deneme grupları arasında istatistikî fark bulmuşlardır ( $P<0,05$ ). Tez çalışmasında metiyoninin motilite üzerine gözlenen pozitif etkisi Ömur ve Çoyan (2016)'ın yapmış olduğu çalışmayla uyumludur. Lesitin temelli sulandırıcıya 5mM metiyonin ekleyerek koç spermasını donduran Toker ve ark. (2016), eritme sonrası kontrol ve deneme gruplarında motilite oranını sırasıyla; %46,20 ve %52,20 olarak tespit etmiş ve gruplar arasında önemli fark bulmuşlardır ( $P<0,05$ ). Tez çalışmasında kullanılan 5mM metiyonin ile kontrol grubu motilite değerleri arasındaki istatistikî fark, Toker ve ark. (2016)'nın bulgularıyla aynı doğrultuda gerçekleşmiştir.

Metiyonin, koçlarda olduğu kadar diğer hayvan türlerinde de sperma sulandırıcılarına eklenen bir antioksidan olarak kullanılmıştır. Teke spermasını TRIS-sitrik asit ve yumurta sarısıyla sulandıran ve 2,5mM, 5mM ile 10mM metiyonin ekleyen Tuncer ve ark. (2010a), çözdürme sonrası kontrol ve deneme gruplarında motilite değerlerini sırasıyla; %50,60, %56,00, %59,00, %56,00 bulmuşlardır. Anılan araştırmada, deneme grupları kendi arasında ve deneme gruplarının kontrol grubu ile arasında fark olmadığı saptanmıştır. Tez çalışmasında metiyoninin motilite üzerine olan pozitif etkisi, Tuncer ve ark. (2010a)'nın çalışmasında görülmemiştir. Bu sonucun farklı olmasının olası nedeninin, tür farkı ve seminal plazmanın biyokimyasal yapısından ileri gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Boğa spermasını TRIS-sitrik asit ve yumurta sarısıyla sulandıran ve 2,5mM ve 7,5mM metiyonin ekleyen Bucak ve ark. (2010), çözdürme sonrası motilite oranını kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %39,40, %41,30 ve %45,60 olarak bulmuşlardır. Anılan araştırmada metiyonin içeren kontrol ve deneme grupları arasında istatistikî bir fark saptanmamıştır. Diğer bir çalışmada, TCM-199 sulandırıcısına 2mM metiyonin ekleyerek boğa spermasını donduran ve çözdürme sonrası kontrol ile deneme grubunda motilite oranını sırasıyla; %27,67 ve %23,25

bulan Sariözkan ve ark. (2014), da gruplar arasında istatistikî fark tespit etmemişlerdir. Sunulan çalışmada eritme sonrası motilite yönünden kontrol grubuna göre metiyonin grubunun üstünlüğü, Bucak ve ark. (2010) ve Sariözkan ve ark. (2014)'nın yapmış oldukları çalışmalarda tespit edilmemiştir. Bu farklılığın sebebi, kullanılan sulandırıcının içeriğinin farklı olması ve daha da önemlisi boğa spermasının dondurmaya olan yüksek toleransı olabilir.

Tez çalışmasında 2,5mM ve 5mM metiyonin eklenmiş gruplarda, plazma membran bütünlüğü sırasıyla; %61,80 ve %64,53 oranında bulundu. Bu değerler, kontrol grubuna (%51,60) göre farklı olmasına rağmen ( $P<0,05$ ), kendi aralarında ve diğer antioksidan grupları arasında herhangi bir fark saptanamadı. Koç spermasına 1mM, 2mM ve 4 mM değerlerde metiyonin ekleyen Ömür ve Çoyan (2016), eritme sonrası plazma membran bütünlüğünü kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %52,00, %64,20, %57,10 ve %58,50 oranlarında tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, 1mM metiyonin grubu ile kontrol grubu arasında istatistikî fark bulmuşlardır ( $P<0,05$ ). Tez çalışmasında kontrol ve deneme grupları arasında istatistikî farkın bulunması, Ömür ve Çoyan (2016)'ın yaptığı çalışma ile uyumludur. Koç spermasına 5mM metiyonin ekleyen Toker ve ark. (2016)'nın yapmış oldukları bir çalışmada, dondurma-çözdürme sonrası plazma membran bütünlüğünü kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %61,00 ve %67,00 oranında belirleyerek, gruplar arasında istatistiksel fark tespit etmişlerdir. Anılan çalışmalarla tez çalışmasının kontrol ve deneme grupları karşılaştırıldığında, bulunan istatistikî fark açısından uyumlu olduğu görülmüştür.

Diğer bir çalışmada, boğa spermasına 2mM metiyoninin ekleyen Sariözkan ve ark. (2014), eritme sonrası plazma membran bütünlüğünü kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %41,40 ve %62,40 oranında tespit ederek farkı istatistikî açıdan önemli bulmuşlardır. Her ne kadar yürütülen çalışma boğa sperması üzerine yapılmış olsa da istatistikî farkın bulunması, tez çalışması ile bu konuda benzer olduğunu göstermektedir. Elde edilen bulgular ışığında, metiyoninin koç sperma plazma membran bütünlüğünü koruduğunu düşünmek olasıdır.

Sunulan tez çalışmasında, metiyoninin koç spermasında eritme sonrası akrozomal, diğer morfolojik ve toplam morfolojik bozuklukları üzerine etkisi incelendi. Yürütülen çalışmada 2,5mM ve 5mM oranında metiyonin eklenen gruplarda dondurma-çözdürme sonrası akrozomal bozuklukların oranı sırasıyla; %13,93 ve %12,40 olarak saptandı. Metiyoninin deneme grupları ve bunların kontrol grubu (%16,93) ile arasında önemli bir fark bulundu ( $P<0,05$ ). Ayrıca, 2,5mM metiyonin grubu 1mM sistein hariç ve 5mM metiyonin grubu 2mM sistein dışında tüm deneme grupları ile arasında önemli fark gösterdi ( $P<0,05$ ). 2,5mM ve 5mM metiyonin gruplarında diğer morfolojik bozukluklar sırasıyla; %5,87 ve %7,27 oranında saptandı. Metiyonin gruplarının kendi aralarında, kontrol grubuyla ve ayrıca diğer deneme grupları ile arasında istatistikî fark bulunamadı. Toplam morfolojik bozukluklar 2,5mM ve 5mM metiyonin gruplarında sırasıyla; %19,80 ve %19,67 olarak tespit edildi. Kontrol ile metiyonin grupların arasında ve ayrıca, metiyonin ile BHT grupları arasında önemli farklar saptandı ( $P<0,05$ ). Koç spermasına 1mM, 2mM ve 4mM metiyonin ekleyen Ömür ve Çoyan (2016), eritme sonrası akrozomal bozukluk oranını kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %45,60, %41,20, %47,00 ve %43,50 olarak bulmuşlardır. Anılan araştırmada, kontrol ile deneme grupları arasında önemli fark bulunmasına rağmen, deneme gruplarının kendi aralarında fark görülmemiştir. Tez çalışması ile anılan araştırma değerlendirildiğinde, deneme grupları ile kontrol grubu arasında farkın önemli bulunması, tez çalışmasını destekler niteliktedir. Buna karşın, tez çalışmasında deneme grupları arasında görülen istatistikî fark, Ömür ve Çoyan (2016)'ın yürüttüğü çalışmada saptanamamıştır. Benzer bir çalışmada, koç spermasına 5mM metiyonin ekleyen Toker ve ark. (2016), dondurma-çözdürme sonrası kontrol ve deneme gruplarında akrozomal bozukluk oranlarını sırasıyla; %35,60 ve %24,40 olarak gözlemlemişlerdir. Tez çalışmasında kontrol ile metiyonin grupları arasında saptanan istatistikî farkın, Toker ve ark. (2016) tarafından da ortaya konması tez çalışmasını destekler niteliktedir.

Teke spermasına 2,5mM, 5mM ve 10mM oranlarında metiyonin ekleyen Tuncer ve ark. (2010b), eritme sonrası akrozomal bozukluk oranını kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %13,00, %7,80, %7,20 ve %9,20 olarak rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, kontrol ile metiyonin grupları arasında istatistikî fark

bulmalarına rağmen, metiyonin grupları arasında benzer farkı ortaya koyamamışlardır. Tuncer ve ark. (2010)'nın kontrol ve deneme grupları arasında bulunduğu fark tez çalışmasına benzer olmasına karşın, metiyonin grupları arasında farkın bulunmaması ise tez çalışmasını desteklememektedir. Tez çalışmasında elde edilen bulgular ışığında metiyoninin koç spermatozoon akrozomal bütünlüğü üzerine pozitif katkı sağladığı düşünülebilir. Diğer bir çalışmada Bucak ve ark. (2010), 2,5mM ve 7,5mM metiyonin eklenen boğa spermasında eritme sonrası kontrol ve deneme gruplarında toplam morfolojik bozukluk oranı sırasıyla; %26,30, %18,40 ve %20,40 olarak bulunmuştur. Anılan çalışmada metiyonin grupları arasında istatistikî fark bulunmamasına karşın, kontrol grubu ile metiyonin grupları arasında fark ortaya konmuştur. Bucak ve ark. (2010)'nın yürüttüğü çalışma ile tez çalışmasının kontrol ve deneme grupları arasında tespit edilen istatistikî farklılık uyum göstermektedir. Boğa spermasında yapılmış başka bir çalışmada, sulandırıcıya 2mM metiyonin ekleyen Sariözkan ve ark. (2014), dondurma-çözdürme sonrası toplam morfolojik bozukluk oranında kontrol (%15,60) ve deneme grupları (%9,20) arasındaki farkı önemli bulmuşlardır ( $P<0,001$ ). Anılan çalışmanın istatistik yönüyle karşılaştırıldığında, tez çalışmasıyla benzer nitelikte olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalar ve tez çalışması göz önünde bulundurulduğunda, sulandırıcıya metiyonin eklenmesinin dondurma-çözdürme sonrası toplam morfolojik bozukluk oranını azaltma açısından pozitif yönde katkı yaptığı görülmektedir.

Dondurma-çözdürme sonucunda oluşan lipid peroksidasyonu, spermatozoon üzerinde yapısal hasara sebep olduğu bilinmektedir. Bu hasarın, motilite ve canlılığın azalmasına, sonuç olarak da fertilitede düşmelere neden olduğu bilinmektedir. Araştırmacılar, sperma sulandırıcılarına antioksidan eklemenin, spermanın lipid peroksidasyonuna karşı olan direncini artırdığını bildirmiştir (Sariözkan ve ark., 2009; Memon ve ark., 2012). Antioksidan kapasitesi kuvvetli olan sistein, glutatyon sentezini uyarak hücrede glutatyon seviyesinin artmasına ve bu sayede reaktif oksijen türlerinin bertaraf edilmesine yardımcı olmaktadır. Bu etkiye ek olarak sistein, spermanın kısa ya da uzun süreli saklanma sürecinde hücrenin fonksiyonunun azalmasını engelleyerek, spermatolojik parametrelerin pozitif yönde artışına yardımcı olmaktadır (Tuncer ve ark., 2010a).

Tez çalışmasında, koç spermasına 1mM ve 2mM sistein eklenen deneme gruplarında dondurma-çözdürme işlemleri sonrası motilite değerleri sırasıyla; %56,00 ve %53,33 olarak tespit edildi. Bu değerler göz önüne alındığında kontrol grubu ile fark bulunmasına karşın ( $P<0,05$ ), sistein ile diğer deneme grupları arasında istatistikî fark tespit edilmedi. Koç sperma sulandırıcısına 5mM, 10mM ve 20mM sistein ekleyen Uysal ve Bucak (2007), eritme sonrası motilite oranlarını kontrol ve deneme gruplarını sırasıyla; %39,50, %45,00, %59,00 ve %39,50 olarak kaydetmişlerdir. Anılan araştırmada 10mM sistein grubunun kontrol ve diğer deneme gruplarından farklı olduğu bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Tez çalışmasında sistein ve kontrol grupları arasında bulunan bu önemli farklılığın, Uysal ve Bucak (2007)'ın yaptığı çalışmada 10mM sistein içeren grupta da görülmesi, tez çalışmasının bulgularını destekler yöndedir. TRIS temelli sperma sulandırıcısına 5mM sistein ekleyerek koç spermasını donduran Bucak ve ark. (2008), eritme sonrası kontrol ve sistein gruplarında motiliteyi %47,50 ve %61,00 oranında elde etmişlerdir. Araştırmacıların kontrol ve deneme grupları arasında buldukları istatistikî fark, tez çalışmasında bulunan fark ile benzerlik göstermektedir. Merinos ırkı iki ayrı koçun spermasını, TRIS temelli sulandırıcıyla 5mM ve 10mM sistein ekledikten sonra donduran Anghel ve ark. (2009), eritme sonrası motilite oranını kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; birinci koçta; %51,42, %60,00, %62,14 ve ikinci koçta ise; %59,16, %69,15 ve %72,50 oranında saptamışlardır. Araştırmacıların yalnız iki deneme grubu (5mM ve 10mM) arasında tespit ettikleri istatistikî fark, tez çalışmasının bulguları ile uyumlu değildir. Bu farkın anılan çalışmada kullanılan sistein dozları ile tez çalışmasında kullanılan dozların aynı olmamasından kaynaklandığı düşünülebilir. Diğer bir çalışmada, iki farklı koçun sperma sulandırıcısına 10mM sistein ekleyen Anghel ve Zamfirescu (2010), kontrol ve deneme gruplarında motilite değerini birinci koçta %49,79, %60,20 ve ikinci koçta ise aynı sırayla; %55,83, %63,33 oranında bulmuşlardır. Araştırmacılar kontrol ve deneme grupları arasında istatistikî farkın olmadığını saptamışlardır. Sistein grupları ile kontrol grubu arasında tez çalışmasında bulunan fark, Anghel ve Zamfirescu (2010)'nın yapmış olduğu çalışmada gözlenmemiştir. Bu farkın olası nedeni anılan çalışmanın yalnızca iki koç üzerinden gerçekleştirilmesinden kaynaklanabilir. 1mM ve 2mM dozlarda koç

sperma sulandırıcısına sistein ekleyen Çoyan ve ark. (2011), dondurma-çözdürme sonrası kontrol ve deneme (1mM ve 2mM sistein) gruplarında motilite oranını sırasıyla; %50,90, %63,10 ve %44,10 tespit etmişlerdir. Tez çalışmasına benzer oranlarda sistein ekleyen Çoyan ve ark. (2011), kontrol ile deneme grupları arasında fark bulamamasına rağmen, deneme gruplarının kendi arasında fark bulmuşlardır. Anılan çalışma ile tez çalışmasının motilite bulguları istatistikî açıdan karşılaştırıldığında, sonuçların farklı olması motilitenin subjektif değerlendirilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. TRIS-sitrik asit ve lesitin içeren sulandırıcısına, 5mM ve 10mM sistein ekleyen Sharafi ve ark. (2015), kontrol ve deneme gruplarında motilite oranını sırasıyla; %47,14, %49,14 ve %55,86 bulmuşlardır. Araştırmacılar, 5mM ile 10mM sistein içeren gruplarında ve kontrol ile 10mM sistein grupları arasında istatistikî farkın olduğunu saptamışlardır. Tez çalışmasının istatistik bulgularıyla anılan çalışma karşılaştırıldığında, yalnızca kontrol ile 10mM sistein içeren gruplar arasındaki farkın benzer olduğu sonucuna varıldı. TRIS sulandırıcısına 5mM sistein ekleyerek koç spermasını donduran Pradieé ve ark. (2016), eritme sonrası kontrol ve deneme gruplarında motilite oranını sırasıyla; %31,30 ve %23,90 bularak, istatistiksel farkın olmadığını ortaya koymuşlardır. Tez çalışmasında kontrol ve deneme grupları arasında bulunan istatistikî farkın anılan araştırmada bulunmamasının olası nedeni ırk, sezon ve motilitenin subjektif değerlendirmesinden kaynaklanabilir.

Ateşşahin ve ark. (2008) 5mM, 10mM ve 15mM dozlarda sistein ekleyerek dondurdıkları teke spermasında çözdürme sonrası motilite değerlerini kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %51,88, %50,00, %55,00 ve %61,43 bulmuşlardır. Yalnız 5mM ve 15mM sistein içeren gruplar arasında istatistiksel fark bulmaları, kontrol ve 10mM gruplarında farklılığın tespit edilememesi, çalışmanın teke spermasında gerçekleştirilmesinden kaynaklanmış olabilir. TRIS temelli sulandırıcıya 5mM ve 10mM sistein ekledikten sonra üç ayrı Alp ırkı tekenin bireysel sperma özelliklerini incelemek için donduran Anghel ve ark. (2010), eritme sonrası kontrol ve deneme gruplarında motilite oranlarını sırasıyla; birinci tekede %50,62, %53,50, %59,37 ikinci tekede, %42,50, %49,50, %54,37 ve üçüncü tekede, %47,81, %48,50, %51,31 olarak tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada birinci tekede,

kontrol ve 5mM sistein grubu ve ikinci tekede ise 5mM ve 10mM sistein grupları arasında istatistiksel fark bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Tez çalışması Anghel ve ark. (2010)'nın gerçekleştirdiği çalışma ile karşılaştırıldığında, istatistikî açıdan bir numaralı tekenin bulgularının uyumlu olduğu, ikinci tekenin bulgularının ise benzerlik göstermediği görülmüştür. Tez çalışmasında pooling yapılması, anılan çalışmanın aynı şartlar altında üç tekede yapılmasına rağmen sonuçların tekelerin bireysel farkını göstermesi ve doz farklılığı, çalışmalar arasında alınan farklı sonuçların nedeni olabilir.

Aynı şekilde teke spermasında çalışan Kulaksız ve Daşkin (2010), TRIS temel sulandırıcısına 5mM sistein ekledikten sonra dondurdukları sperma örneklerinde eritme sonrası kontrol (%19,50) ve deneme (%24,50) gruplarında motilite oranlarını farklı bulmuşlardır ( $P<0,01$ ). Ayrıca sonuçlar tez çalışmasıyla uyumludur. Diğer bir çalışmada, TRIS temel sulandırıcısına 0,5mM, 1mM, 2mM ve 3mM sistein ekleyerek boğa spermasını donduran Ansari ve ark. (2011), eritme sonrası yalnızca kontrol ve 1mM sistein grupları arasında motilite oranının farklı olduğunu saptamışlardır ( $P<0,05$ ). Bu bulgu tez çalışmasıyla benzer niteliktedir. Boğa spermasını TRIS-yumurta sarısı temel sulandırıcısına 1mM, 2,5mM, 5mM ve 7,5mM dozda sistein ekledikten sonra donduran Beheshti ve ark. (2011), dondurma-çözdürme sonrası motilite oranlarını kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %45,86, %52,95, %57,90, %58,20 ve %59,10 olarak elde etmişlerdir. Araştırmacılar kontrol ile tüm deneme grupları arasında ve 1mM sistein grubu ile diğer deneme grupları arasında farkı ortaya koymuşlardır ( $P<0,05$ ). Beheshti ve ark. (2011)'nin kontrol ve deneme grupları arasında bulduğu istatistikî fark, tez çalışmasının sonuçlarıyla uyumludur. Genel olarak, sperma sulandırıcısına sistein eklemenin, eritme sonrası motilite üzerine olumlu katkı sağladığı görülmüştür.

Tez çalışmasında plazma membran bütünlüğü kontrol, 1mM ve 2mM sistein gruplarında sırasıyla; %51,60, %62,20 ve %61,67 elde edildi. Ayrıca kontrol ile sistein deneme grupları arasında fark bulunmasına karşın ( $P<0,05$ ), sistein ile diğer antioksidan deneme grupları açısından herhangi bir fark görülmedi. Bu sonuçların, motilite oranları ile paralellik taşıdığı görüldü. Koç sperma sulandırıcısına 5mM, 10mM ve 20mM dozlarda sistein ekleyen Uysal ve Bucak, (2007) plazma membran



bütünlüğünü eritme sonrası kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %36,90, %42,70, %40,70 ve %32,40 oranında tespit ederek gruplar arasında istatistiksel farkın olmadığını bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada da, koç spermasını 5mM sistein ekledikten sonra donduran Bucak ve ark. (2008), plazma membran bütünlüğünü kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %44,00 ve %42,00 oranlarında tespit ederek farkın önemli olmadığını rapor etmişlerdir. Bahsi geçen bu çalışmaların istatistikî bulguları ile tez çalışmasının sonuçları uyumlu değildir.

İki farklı koçun spermasına 5mM ve 10mM dozlarda sistein ekleyerek donduran Anghel ve ark. (2009) ise, plazma membran bütünlüğünü kontrol ve çalışma (5mM ve 10mM sistein) gruplarında sırasıyla; birinci koçta %52,55, %60,88 %64,20 ikinci koçta ise %53,50, %61,66 ve %68,33 oranlarda bulmuşlardır. Her iki koçta, yalnızca deneme grupları arasında istatistikî fark bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Bu istatistikî bulgular tez çalışmasının sonuçlarıyla benzer değildir ve bunun olası nedeninin koçların bireysel olarak değerlendirilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. İki farklı koç spermasına 10mM sistein ekleyen Anghel ve Zamfirescu (2010), eritme sonrası plazma membran bütünlüğünü, kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; birinci koçta; %53,02, %62,67 ve ikinci koçta ise, %57,87 ve %64,89 oranında saptayarak gruplar arasında istatistiksel farkın olmadığını bildirmiştir. Adı geçen çalışmanın istatistiksel bulguları açısından karşılaştırıldığında tez çalışmasıyla uyumlu olmadığı görülmektedir. Bunun olası nedeninin de, koçların bireysel incelenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çoyan ve ark. (2011), 1mM, 2mM ve 4mM dozlarda sistein ekleyerek dondurdukları koç spermasında plazma membran bütünlüğünü eritme sonrası kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %60,40, %67,60, %72,80 ve %60,70 olarak bulmuşlardır. Anılan çalışmanın, 2mM sistein grubu ile kontrol ve diğer deneme grupları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ( $P<0,001$ ). Tez çalışmasında kontrol ve 2mM sistein grupları arasında bulunan fark, Çoyan ve ark. (2011)'nin istatistikî bulgularıyla uyumludur. Diğer bir çalışmada 5mM dozda sistein ekleyerek koç spermasını donduran Pradić ve ark. (2016), plazma membran bütünlüğü yönünden kontrol (%42,30) ve deneme (%38,90) grupları arasında istatistiksel farkın olmadığını tespit etmişlerdir. Anılan çalışmanın istatistikî bulguları ile tez çalışması paralel değildir.

Teke spermasına 5mM, 10mM ve 15mM sistein ekleyerek donduran Ateşşahin ve ark. (2008), plazma membran bütünlüğü açısından kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %34,43, %35,71, %41,28 ve %42,00 değerleri elde etmiş ve değerler arasında istatistikî farkın olmadığını bildirmişlerdir. Tez çalışması ile anılan çalışmanın istatistikî bulgularının uyumlu olmadığı tespit edilmiştir. Yine teke spermasını kullanarak çalışan Anghel ve ark. (2010), üç farklı tekenin spermasını TRIS ve 5mM ile 10mM dozlarında sistein ekleyerek sulandırmış eritme sonrası plazma membran bütünlüğünü kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; birinci tekede %50,35, %52,07, %55,50, ikinci tekede %39,40, %48,21, %51,67, üçüncü tekede %46,18, %47,57 ve %50,25 olarak saptamışlardır. Birinci tekede kontrol ile 5mM sistein, ikinci tekede ise 5mM ve 10mM sistein içeren gruplar arasında istatistikî farkın gözlemlendiği belirtilmiştir. Anghel ve ark. (2010)'nın istatistik bulguları, tez çalışmasıyla karşılaştırıldığında bazı bulgular uyumlu iken, bazı bulguların uyumsuz olduğu görüldü. Yine teke spermasında eritme sonrası plazma membran bütünlüğünü araştıran Kulaksız ve Daskin (2010), kontrol (%26,03) ve 5mM sistein (%29,47) grupları arasındaki farkın önemli olmadığını ortaya koyarak tez çalışması ile uyumlu olmayan bir sonuç elde etmişlerdir. Tez çalışmasında sisteinin plazma membran bütünlüğünü koruduğu yönündeki bulgu, anılan çalışmaların çoğunda görülmemiştir.

Tez çalışmasında kontrol, 1mM ve 2mM sistein içeren gruplarda sırasıyla; akrozomal bozukluk oranı %16,93, %15,27 ve %12,20; diğer morfolojik bozukluk oranı; %6,47, %5,40 ve %5,60; toplam morfolojik bozukluk oranı ise; %23,40, %20,67 ve %17,80 olarak tespit edildi. Kontrol ile her iki sistein deneme grubu ve her iki sistein grubunun kendi arasında akrozomal bozukluk oranlarında fark bulundu ( $P<0,05$ ). Ayrıca, 1mM sistein grubu ile 2,5mM metiyonin grubu ve 2mM sistein grubu ile 5mM metiyonin grubu hariç diğer antioksidan deneme grupları arasında akrozomal bozukluk oranlarındaki farkın önemli olduğu saptandı ( $P<0,05$ ). Yalnızca 1mM sistein ve 2mM BHT grupları arasında diğer morfolojik bozukluk oranı önemli bulundu ( $P<0,05$ ). Toplam morfolojik bozukluk oranları göz önüne alındığında, kontrol ve 2mM sistein grubu arasında, ayrıca 1mM ve 2mM sistein grubuyla, 1mM ve 2mM BHT grupları arasında önemli fark tespit edildi ( $P<0,05$ ). Koç spermasına

5mM, 10mM ve 20mM dozlarda sistein ekleyen Uysal ve Bucak (2007), eritme sonrası kontrol ve deneme gruplarında akrozomal bozukluk oranını sırasıyla; %13,40, %11,70, %2,90 ve %8,10, toplam morfolojik bozukluk oranını ise; %30,10, %19,20, %9,80 ve %14,20 olarak bildirmişlerdir. Anılan çalışmada yalnızca, 10mM sistein grubuyla kontrol ve 5mM sistein grupları arasında fark olduğu saptanmıştır. Uysal ve Bucak (2007)'in istatistikî bulgularının bazılarının tez çalışmasıyla uyumlu yönde olduğu görüldü. Toplam morfolojik bozukluk oranı incelendiğinde, kontrol grubu ile tüm deneme grupları ve 5mM sistein ile 10mM sistein grupları arasında farkın önemli olduğu anılan çalışmada ortaya koyulmuştur. Tez çalışmasında kontrol ile 2mM sistein grubu arasında ortaya konan farkı Uysal ve Bucak (2007)'in çalışması destekler yöndedir. Bucak ve ark. (2008), dondurdukları koç spermasında eritme sonrası kontrol ve 5mM sistein grubunda sırasıyla; akrozomal bozukluk %9,75, %6,40; toplam morfolojik bozukluk oranlarını ise %30,25 ile %27,00 saptayarak gruplar arasında farkın önemli olmadığını ortaya koymuşlardır. Tez çalışmasında kontrol ile 2mM sistein grubu arasındaki farkın önemsiz olması anılan çalışmanın bulgularını destekler niteliktedir. Koç spermasında akrozomal bozukluk oranını eritme sonrası inceleyen Pradieé ve ark. (2016), kontrol (%59,10) ve 5mM sistein (%55,90) grupları arasında önemli bir fark tespit edememişlerdir. Bu bulgu tez çalışmasının benzer gruplarındaki sonuçlarıyla paralel değildir.

Diğer bir çalışmada eritme sonrası toplam morfolojik bozukluk oranı kontrol, 5mM ve 10mM sistein gruplarında sırasıyla; birinci tekede; %11,47, %8,16, %13,10; ikinci tekede; %14,80, %9,96, %10,56 ve üçüncü tekede; %11,18, %10,16, %12,15 oranlarıyla Anghel ve ark. (2010) tarafından bulunmuştur. Anılan çalışmada toplam morfolojik bozukluk oranı birinci tekede, kontrol ve 10mM sistein, ikinci tekede ise 5mM ile 10mM sistein grupları arasında farkın önemli olduğu bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Bu sonuç, tez çalışmasında kontrol ile 2mM sistein grupları arasında gözlenen fark ile uyumludur. Kulaksız ve Daskin (2010), eritme sonrası teke spermasında kontrol ve 5mM sistein gruplarında akrozomal (%47,04 ve %44,59) ve toplam morfolojik bozukluk oranları (%69,34 ve %65,75) arasında farkın önemli olmadığını ortaya koymuşlardır. Bu istatistikî sonuçlar tez çalışmasıyla uyumlu değildir. Boğa spermasına 0,5mM, 1mM, 2mM ve 3mM sistein ekleyerek donduran Ansari ve ark.

(2011), dondurma-çözdürme sonrası akrozomal bütünlük oranını, 1mM sistein grubu ile kontrol ve diğer deneme grupları arasında farklı bulmuşlardır ( $P<0,05$ ). Anılan çalışmada kontrol ve 1mM sistein grubu arasındaki istatistikî farkın, tez çalışmasıyla uyumlu olduğu görülmektedir. Bir başka çalışmada boğa spermasına 1mM, 2,5mM, 5mM ve 7,5mM dozlarında sistein ekleyerek donduran Beheshti ve ark. (2011), dondurma-çözdürme sonrası akrozomal bozukluk oranını kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %31,62, %31,90, %32,02, %31,54 ve %32,15 oranında ve istatistiksel farkın önemli olmadığını saptamışlardır. Bu çalışmanın istatistik bulguları, tez çalışmasının bulgularıyla paralel değildir. Tez çalışmasında kontrol ve sistein içeren gruplar göz önüne alındığında, akrozomal bütünlük oranını koruduğu yönündeki bulgu yukarıda anılan pek çok çalışma tarafından desteklenmiştir. Diğer morfolojik bozukluklar dikkate alındığında ise sisteinin bu etkisi gözükmemesine karşın toplam morfolojik bozukluklarda ise yalnızca 2mM sistein içeren grupta pozitif bir katkı olduğu bazı araştırmacılar (Uysal ve Bucak, 2007; Bucak ve ark., 2008; Kulaksız ve Daskin, 2010; Ansari ve ark., 2011; Beheshti ve ark., 2011) tarafından da ortaya konmuştur.

Sperma dondurma işlemlerinde kullanılan diğer bir antioksidan olan BHT, E vitamininin sentetik bir analogudur. BHT'nin antioksidan özelliğinden faydalanmak amacıyla, farklı araştırmacılarca bufalo, sığır, koç ve teke sperma sulandırıcısına çeşitli dozlarda eklenmiştir (Khalifa ve ark., 2008; Shoaie ve Zamiri, 2008; Ijaz ve ark., 2009; Palomo ve ark., 2017). Tez çalışmasında, 1mM ve 2mM BHT eklenerek dondurulan koç spermasında eritme sonrası motilite oranları kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %45,00, %53,33 ve %52,00 olarak bulundu. 1mM ve 2mM BHT gruplarının kendi arasında fark olmamasına karşın, kontrol grubu ile istatistikî olarak farklı bulunmuştur ( $P<0,05$ ).

Tez çalışmasına benzer sulandırıcı içeriğine 1mM ve 2mM BHT ekledikten sonra koç spermasını donduran Farshad ve ark. (2010), dondurma-çözdürme sonrası kontrol ve deneme gruplarında motiliteyi sırasıyla; %38,30, %42,60 ve %52,30 olarak saptamıştır. Anılan araştırmada, kontrol ile deneme grupları ve her iki deneme grubu arasında istatistikî fark bulunmuştur. Tez çalışmasıyla karşılaştırıldığında ise yalnızca kontrol ile deneme grupları arasında istatistikî farkın bulunması benzerdir.

Teke spermasına 0,5mM, 1mM, 2mM ve 3mM BHT ekleyen Memon ve ark. (2011), dondurma-çözdürme sonrası kontrol ve deneme gruplarında motilite oranını sırasıyla; %57,10, %57,60, %61,40, %63,20 ve %57,40 olarak tespit etmişlerdir. Anılan çalışmada kontrol ile 1mM ve 2mM BHT grupları arasında, 0,5mM ile 1mM ve 2mM arasında ve 3mM ile 1mM ve 2mM BHT grupları arasında istatistikî fark bulmuşlardır. Tez çalışmasında kontrol ile 1mM ve 2mM BHT grupları arasında bulunan fark, Memon ve ark. (2011) tarafından da bulunmuştur ( $P<0,05$ ).

TRIS-sitrik asit ve yumurta sarılı sulandırıcıya, 0,5mM, 1mM, 2mM ve 4mM dozlarda BHT ekledikten sonra teke spermasını donduran Naijian ve ark. (2013), eritme sonrası kontrol ve deneme gruplarında motilite oranını sırasıyla; %54,40, %54,85, %60,22, %55,37 ve %50,12 bularak istatistikî fark olmadığını rapor etmişlerdir. Tez çalışmasında, BHT gruplarının motilite yönünden kontrol grubuna göre üstünlüğü Naijian ve ark. (2013) tarafından tespit edilmemiştir. Diğer bir çalışmada teke spermasına 2mM ve 5mM dozlarda BHT ekleyen Iqbal ve ark. (2015), eritme sonrası motilite oranlarını kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %36,00, %34,00 ve %32,50 bulmuşlardır. Tez çalışmasında kontrol ve 2mM BHT grupları arasında bulunan fark, Iqbal ve ark. (2015) tarafından yalnızca kontrol ve 5mM BHT içeren gruplar arasında ( $P<0,05$ ) bulunmuştur. Boğa spermasını 0,5mM, 1mM, 2mM ve 4mM dozlarda BHT içeren sodyum sitrat ve yumurta sarısı sulandırıcısıyla sulandırdıktan sonra donduran Shoaie ve Zamiri (2008), eritme sonrası motilite oranlarını kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %33,30, %32,90, %44,20, %32,90 ve %32,90 bulmuşlardır. Anılan çalışmada 1mM dozda BHT içeren grup ile kontrol ve diğer deneme grupları arasında istatistiksel fark tespit edilmiştir. Tez çalışmasında kontrol ve 1mM dozda BHT grupları arasında bulunan fark Shoaie ve Zamiri (2008) tarafından da ortaya konmuştur. Boğalardan suni vajina ile sperma topladıktan sonra ticari bir sulandırıcıya 1,75mM, 2mM ve 2,25mM dozlarda BHT ekleyerek sulandıran Wadood ve ark. (2016), dondurma-çözdürme sonrası motilite oranlarını kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %43,33, %36,67, %46,33 ve %38,00 tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, 2mM BHT ile 1,75mM ve 2,25mM BHT grupları arasında istatistikî fark ortaya konmuştur. Tez çalışmasında kontrol ve deneme grupları arasında bulunan istatistikî fark Wadood ve ark. (2016) tarafından

saptanmamıştır. Koç spermasına eritme sonrası motilite oranına BHT'nin pozitif etkisi pek çok çalışmayla da ortaya konmuştur.

Tez çalışmasında çözündürme sonrası kontrol ile 1mM ve 2mM BHT gruplarında plazma membran bütünlüğü sırasıyla; %51,60, %61,87 ve %61,87 oranlarında bulundu. Deneme grupları arasında fark olmamasına karşın, kontrol ile deneme grupları arasında istatistikî fark ortaya koyuldu ( $P<0,05$ ).

Başka bir çalışmada 0,5mM, 1mM, 2mM ve 3mM dozlarda BHT ile koç spermasını donduran Farshad ve ark. (2010), eritme sonrası kontrol ve deneme gruplarında plazma membran bütünlüğünü sırasıyla; %38,30, %38,60, %39,50, %54,40 ve %48,40 oranlarında rapor etmişlerdir. Anılan çalışmada kontrol ile 2mM ve 3mM dozda BHT içeren gruplar arasında, 2mM BHT grubu ile diğer deneme grupları arasında ve 3mM BHT grubu ile diğer deneme grupları arasında istatistikî fark bulunduğu ortaya konmuştur. Tez çalışmasında kontrol ve 2mM BHT grubu arasında bulunan istatistikî fark Farshad ve ark. (2010) tarafından da ortaya konmuştur.

Teke spermasında eritme sonrası plazma membran bütünlüğünü inceleyen Naijian ve ark. (2013), kontrol (%46,20) ile 1mM BHT (%47,60) ve 2mM BHT (%45,40) grupları arasında istatistiksel fark tespit edememişlerdir. Anılan çalışmanın bulguları, yürütülen tez çalışmasının istatistik bulgularıyla benzer değildir. Memon ve ark. (2011), teke spermasında eritme sonrası plazma membran bütünlüğünü kontrol ve 0,5mM, 1mM, 2mM ve 3mM dozlarda BHT içeren deneme gruplarında sırasıyla; %54,10, %58,20, %59,90, %59,40 ve %55,40 olarak tespit etmişlerdir. Anılan çalışmada kontrol grubunun, 3mM dozda BHT içeren grup hariç diğer deneme gruplarından istatistiksel olarak daha düşük olduğu tespit edilmiştir ( $P<0,05$ ). Tez çalışmasında kontrol ve deneme grupları arasında görülen istatistikî fark, Memon ve ark. (2011)'nin çalışma sonuçlarıyla uyumludur. Teke spermasına 2mM ve 5mM dozda BHT ekleyerek donduran Iqbal ve ark. (2015), eritme sonrası plazma membran bütünlüğünü kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %39,50, %42,30 ve %42,80 oranında saptayarak farkın önemli olmadığını ifade etmişlerdir. Bu bulgular, tez çalışmasında elde edilen istatistik bulgular ile uyumlu değildir. Boğa spermasında

eritme sonrası plazma membran bütünlüğünü inceleyen Wadood ve ark. (2016), kontrol (%52,55), 1,75mM (%50,62), 2mM (%57,76) ve 2,25mM (%47,94) dozlarda BHT ekledikten sonra yalnızca 2mM ile 2,25mM BHT arasında istatistikî farkı tespit etmişlerdir ( $P<0,05$ ). Anılan çalışmanın istatistikî bulgularıyla tez çalışmasının bulguları uyumlu değildir. Tez çalışmasında elde edilen bulgular ışığında, BHT'nin eritme sonrası plazma membran bütünlüğünü koruduğu yönündeki bulgu diğer araştırmaların çoğunluğu tarafından da desteklenmektedir.

Tez çalışmasında eritme sonrası kontrol, 1mM ve 2mM BHT gruplarında sırasıyla; akrozomal bozukluk oranı %16,93, %18,67 ve %17,87; diğer morfolojik bozukluk oranı %6,47, %6,80 ve %6,87; toplam morfolojik bozukluk oranı %23,40, %25,47 ve %24,73 oranlarında tespit edildi. Anılan parametreler göz önüne alındığında kontrol ile BHT grupları arasında istatistikî fark bulunmadı ( $P>0,05$ ).

Teke spermasını 0,5mM, 1mM, 2mM ve 4mM dozlarda BHT ile sulandırdıktan sonra donduran Najjian ve ark. (2013), eritme sonrası akrozomal bozukluk oranını kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %22,26, %23,30 %26,30, %27,78 ve %23,60 olarak istatistikî anlamda farkın önemli olmadığını ortaya koymuşlardır. Elde ettikleri istatistikî bulgular, tez çalışmasıyla uyumludur. Diğer bir çalışmada teke spermasına 0,5mM, 1mM, 2mM ve 3mM dozlarda BHT ekledikten sonra donduran Memon ve ark. (2011), eritme sonrası akrozomal bozukluk oranını kontrol ve deneme gruplarında sırasıyla; %31,10, %28,70, %26,60, %26,30 ve %27,60 bulmuşlardır. Kontrol ile deneme grupları arasında istatistikî farkı ortaya koyan Memon ve ark. (2011)'nin bulguları tez çalışmasının sonuçlarıyla benzer değildir. Teke spermasında akrozomal bozukluk oranını eritme sonrası kontrol, 2mM ve 5mM BHT gruplarında sırasıyla; %79,40, %73,00 ve %72,30 oranında bulan Iqbal ve ark. (2015), kontrol ve deneme grupları arasında istatistikî farkın olduğunu rapor etmişlerdir. Anılan çalışmanın istatistikî bulguları tez çalışmasıyla uyumlu değildir. Tez çalışmasında kullanılan BHT'nin, eritme sonrası akrozomal, diğer morfolojik ve toplam morfolojik bozukluk oranı üzerine bir etkisinin olmadığı görüldü.

Sonuç olarak; dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik bulgular incelendiğinde;

- Koç sperma sulandırıcısına eklenen metiyonin (2,5mM ve 5mM), sistein (1mM ve 2mM) ve BHT'nin (1mM ve 2mM) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında motilite ve plazma membran bütünlüğü oranları arasındaki farklar önemli bulundu. Ayrıca, motilite ve plazma membran bütünlüğü oranları arasında pozitif ( $r=0,880$ ) korelasyon ( $P<0,01$ ) da saptandı.
- Akrozomal bozukluk oranları incelendiğinde, kontrol ile metiyonin ve sistein grupları arasında ve ayrıca her iki metiyonin ve sistein dozlarının kendi aralarında istatistiki fark olduğu görüldü ( $P<0,05$ ).
- Diğer morfolojik bozukluk oranları göz önüne alındığında, yalnızca 1mM sistein ile 2mM BHT grupları arasında anlamlı bir fark bulundu ( $P<0,05$ ).
- Toplam morfolojik bozukluk oranları araştırıldığında, kontrol ile 2,5mM, 5mM metiyonin ve 2mM sistein grupları arasında ve ayrıca antioksidan grupları kendi arasında değerlendirildiğinde ise metiyonin ve sistein deneme gruplarının BHT gruplarından anlamlı derecede farklı olduğu tespit edildi ( $P<0,05$ ).

Koç sperma sulandırıcısına çeşitli dozlarda eklenen antioksidanların eritme sonrası incelenen spermatolojik parametreler üzerine koruyucu etkilerde bulunduğu kanaatine varıldı.



## 6. KAYNAKLAR

1. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ (2012) The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology* 1–31, <http://www.rbej.com/content/10/1/49/abstract>, (07.11.2018).
2. Aisen E, Alvarez H, Venturino A et al (2000) Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053–1061.
3. Aisen E, Quintana M, Medina V et al (2005) Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with Trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology* 50(3): 239–249, doi:10.1016/J.CRYOBIOL.2005.02.002.
4. Aksoy M, Ataman MB, Karaca F et al (1994a) Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'ne ait çeşitli ırklardan koçların spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar. *Vet. Bil. Derg.* 10 (1–2): 111–112.
5. Aksoy M, Ataman MB, Karaca F et al (1994b) Merinos koçlarda testisin morфометrik ölçüleri ve sperma kalitesi arasındaki ilişkinin araştırılması. *Vet. Bil. Derg.* 10 (1–2): 127–129.
6. Alaçam E, Deveci H, Dinç DA et al (1990) Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Sun'ı Tohumlama Obstetrik ve İnfertilite, Nurol Matbaacılık A.Ş., Ankara, s:60
7. Alçay S, Toker MB, Gokce E et al (2015) Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology* 71(2): 29–333, doi:10.1016/j.cryobiol.2015.08.008.
8. Alçay S, Toker MB, Ustuner B et al (2014) Investigation of relationships between dna integrity and fresh semen parameters in rams. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 20(5): 793–798, doi:10.9775/kvfd.2014.11144.
9. Alçay S, Ustuner B, Nur Z (2016) Effects of low molecular weight cryoprotectants on the post-thaw ram sperm quality and fertilizing ability. *Small Ruminant Research* 136: 59–64, doi:10.1016/j.smallrumres.2016.01.009.
10. Amidi F, Azar P, Maryam S et al (2016) The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and Tissue Banking* 17(4): 745–756, doi:10.1007/s10561-016-9566-5.
11. Anghel A, Zamfirescu S (2010) Role of antioxidant additives in the protection of the cryopreserved semen against free radicals. *Romanian Biotechnological Letters* 15(3): 33–41.
12. Anghel A, Zamfirescu S, Coprean D et al (2009) The effects of cystein, bovine serum albumin and vitamin E on the calitative parameters of frozen-thawed ram semen. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology* 14(2): 97–103, doi:10.1016/j.aim.2006.12.002.

13. Anghel A, Zamfirescu S, Dragomir C et al (2010) The effects of antioxidants on the cytological parameters of cryopreserved buck semen. *Romanian Biotechnological Letters* 15(3): 26–32.
14. Ansari MS, Rakha BA, Malik MF et al (2016) Effect of cysteine addition to the freezing extender on the progressive motility, viability, plasma membrane and DNA integrity of Nili-Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Journal of Applied Animal Research* 44(1): 36–41, doi:10.1080/09712119.2014.987292.
15. Ansari MS, Rakha BA, Ullah N et al (2011) Effect of L-cysteine in TRIS-citric egg yolk extender on post-thaw quality of Nili-Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Pakistan Journal of Zoology* 43(1): 41–47.
16. Aral F, Aral S (2004) Merinos koçlarda sperma alma yöntemlerinin karşılaştırılması. *Turkish J Vet Ani Sci* 28: 47–53.
17. Ateşşahin A, Bucak MN, Tuncer PB et al (2008) Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research* 77(1): 38–44, doi:10.1016/j.smallrumres.2008.03.002.
18. Beheshti R, Aiden A, Behrad E et al (2011) The effect of cysteine on post-thawed Buffalo Bull (*Bubalus Bubalis*) sperm parameters. *Advances in Environmental Biology* 5(6): 1260–1263, doi:10.1007/978-1-4419-1148-3.
19. Birler S, Pabuççuoğlu S, Atalla H et al (2002) In vitro üretilen koyun embriyolarının transferi. *Turk J Vet Anim Sci* 26: 1421–1426.
20. Bucak MN, Tekin N (2007) Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research* 73(1–3): 103–108, doi:10.1016/j.smallrumres.2006.12.001.
21. Bucak MN, Tuncer PB, Sariozkan S et al (2009) Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora Goat semen. *Research in Veterinary Science* 87(3): 468–472, doi:10.1016/j.rvsc.2009.04.014.
22. Bucak MN, Ateşşahin A, Yüce A (2008) Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research* 75(2–3): 128–134, doi:10.1016/j.smallrumres.2007.09.002.
23. Bucak MN, Güngör Ş, Sariozkan S et al (2015) Spermanın dondurulmasında antioksidanların etkisi. *Türkiye Klinikleri* 1(3): 39–47.
24. Bucak MN, Tuncer PB, Sariozkan S et al (2010) Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology* 61(3): 248–253, doi:10.1016/j.cryobiol.2010.09.001.
25. Ceylan A, Aksoy M, Serin I et al (2013) Farklı antioksidanlarla kısa süreli saklanan Kıvrıcık koç spermasının In-vitro ve In-vivo değerlendirilmesi. *Animal Health Prod and Hyg* 2(2): 216–220.

26. Cirit Ü, Bağış H, Demir K et al (2013) Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose and cysteamine on ram semen. *Animal Reproduction Science* 139(1–4): 38–44, doi:10.1016/j.anireprosci.2013.03.010.
27. Çaylak E (2011) Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 9(1): 73–83.
28. Çoyan K, Başpınar N, Bucak MN et al (2010) Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Research in Veterinary Science* 89(3): 426–431, doi:10.1016/j.rvsc.2010.03.025.
29. Çoyan K, Başpınar N, Bucak MN et al (2011) Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. *Cryobiology* 63(1): 1–6, doi:10.1016/j.cryobiol.2011.04.001.
30. Çoyan K, Karaca F, Ataman B, Kaya A (2002) Evcil Hayvanlarda Dölerme ve Sun'i Tohumlama. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Konya, s:15-43.
31. Demirtaş A, Untan I (2011) Antioxidants and oxidative stress in seminal fluid and sperm. *Türk Üroloji Seminerleri/Turkish Urology Seminars* 2(1): 24–30, doi:10.5152/tus.2011.05.
32. 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, doi:10.5713/ajas.2010.90590.
33. Foote RH (2002) The history of artificial insemination: selected notes and notables. *J. Anim Sci.* 80(2): 1–10, doi:10.2527/animalsci2002.80E-Suppl\_21a.
34. García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Martínez-Pastor F et al (2009) Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: electroejaculation and postmortem collection. *Theriogenology* 72(2): 160–168, doi:10.1016/j.theriogenology.2009.02.002.
35. Gil L, Olaciregui M, Luno V (2014) Current status of freeze-drying technology to preserve domestic animals sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 49(s4): 72–81, doi:10.1111/rda.12396.
36. Gordon I (1999) Controlled reproduction in sheep and goats. 2nd edition, CABI publishing, pp: 351-359.
37. Gökçe E, Alçay S, Gül Z (2017) Positive effect of BSA supplemented soybean lecithin based extender on liquid storage of ram semen at 5°C. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 64(14): 313–320, doi:10.1501/Vetfak\_0000002816.
38. Gupta RK, Patel AK, Shah N et al (2014) Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP* 15(11): 4405–4409, doi:10.7314/APJCP.2014.15.11.4405.
39. Guthrie HD, Welch GR (2012) Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology* 78(8): 1700–1708, doi:10.1016/j.theriogenology.2012.05.002.

40. Günay Ü, Nur Z, Doğan İ et al (2003) Sıfat sezonuna geçiş döneminde ve sıfat sezonunda koç spermasının dondurulabilirliğinin araştırılması. Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med. 22(1-2-3): 81-85.
41. Günaydın G (2009) Koyun yetiştiriciliğinin ekonomi politiği. Journal of Agricultural Faculty of Uludağ University 23(2): 15-32.
42. Gündoğan M (2009) Koç spermasının farklı sulandırıcılar ile kısa süre saklanması. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 15(3): 429-435, doi:10.9775/kvfd.2009.033-A.
43. Gündoğan M, Uçar M, Tekerli M (2002) Afyon koşullarında yetiştirilen koçlarda testislerin morfolometrik ölçümleri ve spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar. Vel. Bil. Derg. 18(1-2): 63-67.
44. 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): 88-96, doi:10.5578/kvj.23105.
45. Hafez ESE (1993) Reproduction in farm animals, 6th edition, Philadelphia, pp: 330-343, 405-423.
46. Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamantel theme of aerobic life. Plan Physiol 141: 312-322, doi:10.1104/pp.106.077073.312.
47. Hemnani T, Parihar MS (1998) Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. Indian Journal of Physiology and Pharmacology 42(4): 440-452, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10874342>, (07.11.2018).
48. Holt WV (2000) Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology 53(1): 47-58, doi:10.1016/S0093-691X(99)00239-3.
49. Hong Z, Hailing L, Hui M et al (2010) Effect of vitamin E supplement in diet on antioxidant ability of testis in boer goat. Animal Reproduction Science 117(1-2): 90-94, doi:10.1016/j.anireprosci.2009.03.016.
50. Ijaz A, Hussain A, Aleem M et al (2009) Butylated hyroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology 71: 1326-1329.
51. Iqbal Z, Ijaz A, Aleem M et al (2015) Effect of butylated hydroxytoluene on post-thawed semen quality of Beetal Goat buck, *Capra hircus*. Pakistan Journal of Zoology 47(1): 119-124.
52. İleri İK, Ak K, Pabuççuoğlu S et al (1996) Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama, Ders notu 59, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, İstanbul, s:75-90.
53. Karabulut H, Gülay MŞ (2016) Antioksidanlar. MAE Vet Fak Derg 1(1): 65-76.

54. Kaymakçı M, Eliçin A, Tuncel E et al (2000) Türkiye’de küçükbaş hayvan yetiştiriciliği. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, Ankara, s: 2765–2793.
55. Kehrer JP (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149(1): 43–50, doi:10.1016/S0300-483X(00)00231-6.
56. Keskintepe L, Pacholczyk G, Machnicka A et al (2002) Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biology of Reproduction* 67(2): 409–415, doi:10.1095/biolreprod67.2.409.
57. Khalifa TAA, Lymberopoulos AG, El-Saidy BE (2008) Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of Goat semen. *Reproduction in Domestic Animals* 43(5): 525–530, doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00947.x.
58. Kulaksız R, Çebi Ç, Akçay E et al (2010) The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka Ram semen. *Small Ruminant Research* 88(1): 12–15, doi:10.1016/j.smallrumres.2009.11.014.
59. Kulaksız R, Daskin AD (2010) In vitro evaluation of Saanen Buck semen frozen in different extenders supplemented with various antioxidants. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 57: 151–156, doi:10.1501/Vetfak\_00000002369.
60. La Falci VS, Yrjö-Koskinen AE, Fazeli A et al (2011) Antioxidant combinations are no more beneficial than individual components in combating ram sperm oxidative stress during storage at 5°C. *Animal Reproduction Science* 129(3–4): 180–187, doi:10.1016/j.anireprosci.2011.12.006.
61. Liu JL, Kusakabe H, Chang CC et al (2004) Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in Rabbits. *Biology of Reproduction* 70(6): 1776–1781, doi:10.1095/biolreprod.103.025957.
62. López-Sáez A, Ortiz N, Gallego L et al (2000) Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 44(2): 155–164, doi:10.1080/014850100262335.
63. Maneesh M, Jayalekshmi H (2006) Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 21(2): 80–89, doi:10.1007/BF02912918.
64. Marco-Jiménez F, Puchades S, Gadea J et al (2005) Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra Ram spermatozoa. *Theriogenology* 64(8): 1756–1765, doi:10.1016/j.theriogenology.2005.04.006.
65. Marco-Jiménez F, Vicente JS, Viudes-De-Castro MP (2008) Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra Ram. *Reproduction in Domestic Animals* 43(4): 403–408, doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00923.x.
66. Maxwell WMC, Stojanov T (1996) Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development* 8(6): 1013–1020, doi:10.1071/RD9961013.

67. McDonald LE, Pineda MH (1989) *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Lea&Febiger Philadelphia, London, s:428-447.
68. Memon AA, Wahid H, Rosnina Y et al (2011) Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of boer goat semen in tris egg yolk extender. *Animal Reproduction Science* 129(1–2): 44–49, doi:10.1016/j.anireprosci.2011.10.004.
69. Memon AA, Wahid H, Rosnina Y (2012) Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of boer goat spermatozoa in TRIS egg yolk glycerol extender. *Animal Reproduction Science* 136(1–2): 55–60, doi:10.1016/j.anireprosci.2012.10.020.
70. Molinia FC, Evans G, Quintana Casares PI et al (1994) Effect of monosaccharides and disaccharides in TRIS-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 36(1–2): 113–122, doi:10.1016/0378-4320(94)90058-2.
71. Naijian HR, Kohram H, Shahneh AZ et al (2013) Effects of various concentrations of BSA on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi Goat semen following the freeze-thaw process. *Small Ruminant Research* 113(2–3): 371–375, doi:10.1016/j.smallrumres.2013.03.015.
72. Nordberg J, Arnér ESJ (2001) Reactive Oxygen Species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system this review is based on the licentiate thesis “thioredoxin reductase—interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg. *Free Radical Biology and Medicine* 31(11): 1287–1312, doi:10.1016/S0891-5849(01)00724-9.
73. 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, doi:10.1016/j.theriogenology.2009.12.007.
74. Omur AD, Cayan K (2016) Protective effects of the antioxidants curcumin, ellagic acid and methionine on motility, mitochondrial transmembrane potential, plasma membrane and acrosome integrity in freeze-thawed Merino Ram Sperm. *Veterinari Medicina* 61(1): 10–16, doi:10.17221/8677-VETMED.
75. Özcan O, Erdal H, Çakırca G et al (2015) Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 6(3): 331–336, doi:10.5799/ahinjs.01.2015.03.0545.
76. Palomo MJ, García W, Tabarez A (2017) Effect of seminal plasma and butylated hydroxytoluene (BHT) concentration on ram sperm freezability. *Small Ruminant Research* 153: 66–70, doi:10.1016/j.smallrumres.2017.05.010.
77. Patra RC, Swarup D, Dwivedi SK (2001) Antioxidant effects of  $\alpha$  tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology* 162(2): 81–88, doi:10.1016/S0300-483X(01)00345-6.

78. Pradieé J, Cardoso TF, Silva EF et al (2016) Effect of  $\beta$ -mercaptoetanol and cysteine on post-thawing quality and oxidative activity of ram sperm and on the viability of vitrified sheep embryos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 68(5): 1309–1315, doi:10.1590/1678-4162-8479.
79. Ramadan LA, Adb-Allah AR, Aly HA et al (2002) Testicular toxicity effects of magnetic field exposure and prophylactic role of coenzyme Q10 and L-carnitine in mice. *Pharmacological Research* 46(4): 363–370, doi:10.1016/S1043-6618(02)00171-8.
80. Roca J, Gil MA, Hernandez M et al (2004) Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology* 25(3): 397–405, doi:10.1308/003588406X106324.
81. 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, doi:10.1016/0378-4320(94)01327-I.
82. Sariözkan S (2008) Spermada lipid peroksidasyon ve antioksidanların rolü. *Vet. Hekim Der. Derg.* 79(4): 19–22.
83. Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB et al (2014) Influence of various antioxidants added to TCM-199 on post-thaw bovine sperm parameters, DNA integrity and fertilizing ability. *Cryobiology* 68(1): 129–133, doi:10.1016/j.cryobiol.2014.01.007.
84. Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB et al (2009) The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology* 58(2): 134–138, doi:10.1016/j.cryobiol.2008.11.006.
85. Sevinç A (1977) Dölerme ve Sun'i Tohumlama Ders Kitabı 5. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Elazığ, s:180-188.
86. Sharafi M, Zhandi M, Sharif AA (2015) Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. *Cell and Tissue Banking* 16(2): 261–269, doi:10.1007/s10561-014-9458-5.
87. Shiva SRN, Mohanarao GJ, Atreja SK (2010) Effects of adding taurine and trehalose to a TRIS-based egg yolk extender on Buffalo (*Bubalus Bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 119(3–4): 183–190, doi:10.1016/j.anireprosci.2010.01.012.
88. Shoaie 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, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.07.009.
89. Sönmez M (2013) Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Elazığ, s:237-287.

90. Sönmez M, Demirci E (2003) Koçlarda sperma kalitesi üzerine kas içi vitamin C uygulamalarının etkisi. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi 17(3): 195–201.
91. Sönmez M, Türk G, Yüce A (2005) The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. Theriogenology 63(7): 2063–2072, doi:10.1016/j.theriogenology.2004.10.003.
92. 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).
93. 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, doi:10.1016/j.cryobiol.2016.05.001.
94. Topraggaleh TR, Shahverdi A, Rastegarnia A et al (2014) Effect of cysteine and glutamine added to extender on post-thaw sperm functional parameters of Buffalo bull. Andrologia 46(7): 777–783, doi:10.1111/and.12148.
95. Tuncer PB, Bucak MN, Büyükleblebici S et al (2010a) The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. Cryobiology 61(3): 303–307, doi:10.1016/j.cryobiol.2010.09.009.
96. Tuncer PB, Bucak MN, Sariözkan S et al (2010b) The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora Buck (*Capra Hircus Ancryrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. Cryobiology 61(1): 89–93, doi:10.1016/j.cryobiol.2010.05.005.
97. Türk G (2015) Reaktif oksijen türlerinin spermatozoon fonksiyonları üzerindeki fizyolojik ve patolojik etkileri. Türkiye Klinikleri 1(3): 26–34.
98. Türkiye İstatistik Kurumu (2017) Hayvansal üretim istatistikleri. [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1002](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002), (07.11.2018).
99. Üstüner 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, doi:10.1016/j.anireprosci.2015.11.017.
100. Üstüner B, Nur Z, Alcay S et al (2015) Effect of freezing rate on goat sperm morphology and DNA integrity. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 39(1): 110–114, doi:10.3906/vet-1407-70.
101. Uysal O, Bucak MN (2007) Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. Acta Veterinaria Brno 76(3): 383–390, doi:10.2754/avb200776030383.



- 102.**Varışlı O, Uguz C, Agca C et al (2009) Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Animal Reproduction Science* 110(3–4): 256–268, doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.012.
- 103.**Wadood F, Aleem M, Ijaz A et al (2016) Effect of extender osmolality and butylated hydroxytoluene supplementation on post thaw quality and fertility of Nili Ravi Buffalo bull (*Bubalus bubalis*) semen. *Journal of Animal and Plant Sciences* 26(3): 605–611.
- 104.**Walters EM, Benson JD, Joods J et al (2009) The history of sperm cryopreservation. Cambridge University Press 1: 1–10, doi:10.1016/j.rbmo.2010.10.018.
- 105.**Woods EJ, Thirumala S, Han X et al (2011) Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues: concepts and misconceptions. *Principles and Practice of Fertility Preservation* 48: 129–144, doi:10.1017/CBO9780511921896.014.
- 106.**Yang J, Wu G, Feng Y et al (2010) Effects of taurine on male reproduction in rats of different ages. *Journal of Biomedical Science* 17: 1–8, doi:10.1186/1423-0127-17-S1-S9.
- 107.**Yarsan E (1998) Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg* 9(912): 89–95.
- 108.**Yehye WA, Rahman NA, Ariffin A et al (2015) Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): a review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 101: 295–312, doi:10.1016/j.ejmech.2015.06.026.
- 109.**Yoshida M (2000) Conservation of sperms: current status and new trends. *Animal Reproduction Science* 60–61: 349–355, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00125-1.
- 110.**Yousefian I, Zare-Shahneh A, Zhandi M (2014) The effect of coenzyme Q10 and  $\alpha$ -tocopherol in skim milk-based Extender for preservation of Caspian Stallion semen in cool condition. *Journal of Equine Veterinary Science* 34(8): 949–954, doi:10.1016/j.jevs.2014.04.002.
- 111.**Zhang W, Yi K, Chen C et al (2012) Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 132(3–4): 123–128, doi:10.1016/j.anireprosci.2012.05.009.

## 7. SİMGELER VE KISALTMALAR

°C → Derece santigrat

µl → Mikrolitre

BHT → Bütil hidroksitoluen

CAT → Katalaz

cm → Santimetre

Cr → Krom

Cu → Bakır

DMB → Diğer morfolojik bozukluklar

DNA → Deoksiribo nükleik asit

Fe → Demir

FSH → Folikül stimule edici hormon

GPx → Glutasyon peroksidaz

gr → Gram

GR → Glutasyon redüktaz

H → Hidrojen

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → Hidrojen peroksit

HOST → Hypo-osmotic swelling test

HO<sub>2</sub> → Hidroksiperoksil

HOCl → Hipokloröz asit

kg → Kilogram

l → Litre

LDL → Düşük yoğunluklu lipoprotein

LPO → Lipit peroksidasyon

m → Metre

ml → Mililitre

mM → Milimolar  
Mn → Manganez  
mOsm → Miliosmol  
NO<sub>2</sub> → Nitrojen dioksit  
O → Oksijen  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> → Süperoksit  
O<sub>3</sub> → Ozon  
OH → Hidroksil  
ONOO<sup>-</sup> → Peroksinitrit  
P → İstatistiki anlam düzeyi  
PUFA → Poliansatüre yağ asidi  
RO → Alkoksil  
ROO → Peroksil  
ROS → Reaktif oksijen türleri  
SOD → Süperoksit dismutaz  
TMB → Toplam morfolojik bozukluklar  
V → Volt  
Zn → Çinko

## 8. TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamda elinden gelen tüm desteği benden esirgemeyen, yönlendirici ve destekleyici tutumunu eksik etmeyen danışman hocam Prof. Dr. İbrahim DOĞAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarında bilimsel ve kişisel önerilerini benimle paylaşan hocalarım Prof. Dr. M. Kemal SOYLU ve Prof. Dr. Ülgen GÜNAY'a teşekkürlerimi sunarım. Akademik ve özel hayatıma olan desteklerinden dolayı yaşantıma ışık tutan hocalarım Prof. Dr. Hakan SAĞIRKAYA ve Prof. Dr. Zekariya NUR'a teşekkür ederim. Sevgili ablam, sayın hocam Doç. Dr. Burcu ÜSTÜNER'e elinde olan tüm imkânlar ile her zaman yanımda olduğu için ve kıymetli kardeşim, iş ve görüş ortağım Doç. Dr. Selim ALÇAY'a bu günlere gelmemde yardımları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tanıştığımız günden beri saygı, sevgi ve iyi niyetlerini içtenlikle hissettiğim, her durumda yanımda olan Elif GÖKÇE ve N.Tekin ÖNDER'e çok teşekkür ederim. Biricik eşim, Baldan'ım ve hayat arkadaşım Eda Baldan TOKER'e karşılıksız desteği, bana olan ilgisi ve kalp çarpıntım olduğu için sonsuz teşekkür ederim. Hayatım boyunca desteğini esirgemeyen, beni ben yapan ve her koşulda arkamda olan annem, babam ve kardeşime ucu bucağı olmayan sevgilerimle minnet duyar ve teşekkür ederim. Benliğime katkıda bulunan, hayatıma renk katan ve yön veren tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Akademik ve İdari personeline, burada geçirdiğim sürede tüm yardımları ve destekleri için teşekkürü bir borç bilirim.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Ankara’da doğmuştur. Muğla’nın Bodrum ilçesinde ilk ve orta öğretimimi tamamlamıştır. Liseden mezun olduğu 2005 yılında Lisans eğitimi için Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazanmış ve 2012 yılında buradan mezun olmuştur. Mezuniyetle beraber, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başlamıştır. 24.12.2013 tarihinde aynı Anabilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atanmış ve 24.09.2018 tarihine kadar birçok akademik ve idari çalışmalar gerçekleştirmiştir. 2014-2016 yılları arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrenci temsilciliği, 2017-2018 arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma Görevlisi temsilciliği, 2016-2018 yılları arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Motor Sporları Topluluğu Danışmanlığı görevlerini üstlenmiştir. Evli ve Bursa’da ikamet etmektedir.

## BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

## TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

|                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Yazar Adı Soyadı               | Mehmed Berk TOKER                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Tez Adı                        | Methionine, Cysteine ve BHT ilave edilmiş TRIS-yumurta sarısı ile dondurulan koç spermasının In-vitro olarak değerlendirilmesi.                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Enstitü                        | Sağlık Bilimleri Enstitüsü                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Anabilim Dalı                  | Veteriner – Dölerme ve Suni Tohumlama                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Bilim Dalı                     | Klinik Bilimler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Tez Türü                       | Doktora                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Tez Danışman(lar)ı             | Prof. Dr. İbrahim DOĞAN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Çoğaltma (Fotokopi Çekim) İzni | <input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum<br><input type="checkbox"/> Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum<br><input checked="" type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum                                                                                      |
| Yayımlama İzni                 | <input checked="" type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum<br><input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasının ertelenmesini istiyorum<br>1 yıl <input type="checkbox"/><br>2 yıl <input type="checkbox"/><br>3 yıl <input type="checkbox"/><br><input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin vermiyorum |

Hazırlamış olduğum tezimin yukarıda belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Bursa Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih: 21.12.2018

İmza: