



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



BÜTİL HİDROKSİTOLÜEN KONSANTRASYONUNUN SAANEN TEKE SPERMİNİN DONMASINA ETKİSİ

Doktora Tezi

Ahmed Fathy Hassan SEIOUDY

Zootekni Anabilim Dalı

İzmir
2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

BÜTİL HİDROKSİTOLÜEN KONSANTRASYONUNUN SAANEN TEKE SPERMINİN DONMASINA ETKİSİ

Ahmed Fathy Hassan SEIOUDY

Danışman: Prof. Dr. Nedim KOŞUM

Zootečni Anabilim Dalı
Hayvan Yetiştirme Doktora Programı

İzmir
2023

KABUL ONAY SAYFASI

Ahmed Fathy Hassan SEIOUDY tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Bütil Hidroksitolüen Konsantrasyonunun Saanen Teke Sperminin Donmasına Etkisi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 19.06.2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Nedim KOŞUM

.....

Raportör Üye : Prof. Dr. Turgay TAŞKIN

.....

Üye : Prof. Dr. Harun UYSAL

.....

Üye : Prof. Dr. Mehmet KOYUNUCU

.....

Üye : Prof. Dr. Murat YILMAZ

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Bütil Hidroksitolüen Konsantrasyonunun Saanen Teke Sperminin Donmasına Etkisi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

19/06/2023

Ahmed Fathy Hassan SEIOUDY

ÖZET**BÜTİL HİDROKSİTOLÜEN KONSANTRASYONUNUN
SAANEN TEKE SPERMINİN DONMASINA ETKİSİ**

SEIOUDY, Ahmed Fathy Hassan

Doktora Tezi, Zootečni Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nedim KOŞUM

Haziran 2023, 86 sayfa

Bu çalışma, Tris-sitrik asit-glikoz yumurta sarısı gliserol (TCGYG) bazlı sulandırıcıda bütıl hidroksitolüen'in (BHT) farklı konsantrasyonlarının (0,6 mM, 2,0 mM ve 5,0 mM) Saanen teke sperminin kriyoprezervasyonunun sperma kalitesi üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Ayrıca, kriyoprezervasyon öncesinde santrifüleme yoluyla yıkanmış ve yıkanmamış sperm etkisi incelenmiştir. Bununla birlikte, başarılı bir teke spermi kriyoprezervasyonunun geliştirilmesinde optimal bir BHT konsantrasyonu bulunması amaçlanmıştır. Tez çalışması, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Küçükbaş Hayvan ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, 1-2 yaş arasında ve 50-60 kg canlı ağırlık aralığındaki 4 baş Saanen ırkı teke kullanılmıştır. Sperma toplama işlemi tekelerden çiftleşme mevsiminde (Kasım-Ocak) haftada 2 kez gerçekleştirilmiştir. Sperma, dişi varlığında yapay vajına yöntemiyle alınmıştır. Alınan sperma test tüplerinde birleştirilerek karışım elde edildikten sonra, 2 eşit ana gruba ayrılarak örnekler oluşturulmuştur. Bir kısım, tris-sitrik asit-glikoz (TCG) solüsyonunda (1:5) oranında seyreltilmiş ve iki kez 600 x g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek yıkanmış, diğer kısım yıkanmadan tutulmuştur.

Yıkadıktan sonra süpernatant dikkatlice çıkarılmış ve elde edilen tortu dört eşit parçaya bölünmüştür. Yıkanmamış sperma ise iki eşit parçaya bölünmüştür. Yıkanmış ve yıkanmamış sperma, muamelelere göre farklı konsantrasyonlarda BHT takviyesi ile desteklenmiş farklı TCG (%5 gliserol ve %15 yumurta sarısı) birinde yeniden süspanse edilmiştir: 1) yıkanmış sperma; 2) yıkanmış sperma + 0,6 mM BHT; 3) yıkanmış sperma + 2,0 mM BHT; 4) yıkanmış sperma + 5,0 mM BHT; 5) yıkanmamış sperma ve 6) yıkanmamış sperma + 5,0 mM BHT. Sulandırılan sperma

6 farklı 0,25 ml'lik payetlere çekildikten sonra, +4°C'de 2 saat ekilibrasyona bırakılmıştır. Ekilibrasyondan sonra payetler sıvı azot seviyesinin 4 cm üzerinde sıvı azot buharında 15 dakikada dondurulmuş ve sıvı azota daldırılarak saklanmıştır. Dondurma işlemi toplamda 20 kez tekrarlanmıştır. Alınan spermanın elde edilen karışık ejakulat miktarı (ml) ve sperm yoğunluğu ($\times 10^9/\text{ml}$) değerlendirilirken dondurma-çözdürme sonrası toplam, progresif, lokal spermatozoa motilitesi (%) ve ölü spermatozoa (%) parametreleri Bilgisayar Destekli Sperma Analizi (CASA) ile belirlenmiştir.

Sperma miktarı en yüksek miktar 2,5 ml, en düşük miktar 1,0 ml ve ortalama $1,75 \pm 0,39$ ml olarak kaydedilmiştir. Spermanın yoğunluğu ortalama $2,320 \times 10^9/\text{ml}$ olarak tespit edilmiştir. Çözüldürme sonrası TCGYG sulandırıcısına toplam ve progresif motilitesi bakımından, BHT antioksidan hem yıkanmış sperma hem de yıkanmamış sperma muamelesinde kontrol grubundan farkının önemli olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). Yıkanmış sperma muamelesinde yalnızca 2,0 mM BHT grupları arasında en yüksek toplam ve progresif motilite oranı sırasıyla; % 71,65 ve % 42,44 ile kaydedilirken en düşük oran kontrol grubunda bulunmuştur. Ayrıca, yıkanmış sperma grubunun yıkanmamış sperma grubundan farkının önemli olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). BHT ilavesinin yıkanmış sperma grubunda yıkanmamış sperma grubundan önemli bir ölçüde ($P < 0,05$) daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Ancak BHT antioksidan ilavesinin, TCGYG sulandırıcısı ile sulandırılan deneme grubunda lokal spermatozoa motilitesi bakımından farkının hem yıkanmış sperma hem de yıkanmamış sperma muamelesinde kontrol grubundan istatistik bakımından önemli değildir ($P > 0,05$). Lokal motilite bakımından yıkanmış ve yıkanmamış sperma grupları arasındaki fark önemli bulunmamıştır ($P > 0,05$). Diğer taraftan TCGYG sulandırıcısında, ölü spermatozoa oranı bakımından, BHT antioksidan ilavesinin hem yıkanmış sperma hem de yıkanmamış sperma muamelesinde, kontrol grubuna göre fark önemli olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). Yıkanmış sperma grubunda 2,0 mM BHT grupları arasında en düşük değer olarak % 28,34 ile kaydedilirken genelde en yüksek değer kontrol grubunda bulunmuştur. Ayrıca, ölü spermatozoa oranı bakımından yıkanmış sperma grubunun yıkanmamış sperma grubundan farkının önemli olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). Buna göre BHT ilavesinin yıkanmış sperma grubunda yıkanmamış sperma grubuna göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, Saanen tekelerde BHT önemli bir ölçüde hem sperm motilite oranını hem de sperm canlılığını artırmıştır. Bu sonuçla Saanen teke spermasının dondurulması için 0,6 ile 2,0 mM/mL arasında değişen BHT konsantrasyonunun optimum olabileceğini göstermektedir. Çözündürme sonrası yıkanmış spermada hem en yüksek motilite oranı hem de en düşük ölü spermatozoa oranı TCGYG sulandırıcısına 2 mM BHT ilavesi içeren grupta kaydedilmiştir. Bunun sonucu olarak, toz yumurta sarısı bazlı ortamda kriyoprezerve edilmiş yıkanmış ve yıkanmamış spermaların kalite parametrelerinin çoğunu iyileştirmek için 2.0 mM konsantrasyonda BHT ilavesi önerilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada hem en yüksek motilite oranı hem de en düşük ölü spermatozoa oranı yıkanmış sperma grubunda kaydedilmiştir. Bununla birlikte, kriyoprezervasyon öncesi spermanın ilk santrifüjlenmesiyle yıkanması ve spermin dondurularak saklanması canlılık oranının iyileştirilmesi önerilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Teke, sperma, yıkama, kriyoprezervasyon, BHT.

ABSTRACT**EFFECT OF BUTYLATED HYDROXYTOLUENE CONCENTRATION ON
SAANEN BUCK SPERM FREEZABILITY**

SEIOUDY, Ahmed Fathy Hassan

Ph.D in Department of Animal Science

Supervisor: Prof. Dr. Nedim KOŞUM

June 2023, 86 pages

The main objective of this study was to define the effect of cryopreservation with different concentrations of butyl hydroxytoluene (BHT) at 0.6 mM, 2.0 mM, and 5.0 mM in Tris-citric acid-glucose egg yolk glycerol (TCGYG) based extender on semen quality of Saanen buck. Also, the effect of washed and unwashed sperm by centrifugation before cryopreservation was examined. Therefore, an optimal concentration of BHT could be found to develop a successful cryopreservation of buck sperm. The study was carried out at Ege University, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, Small Animals Unit. A total number of 4 Saanen bucks with 1-2 years old and 50-60 kg body weight were used in this study. Semen was collected twice a week during the mating season (November-January) using an artificial vagina in the presence of a female goat. The collected semen was mixed in test tubes and the mixture was divided into two equal main groups. One portion was diluted in tris-citric acid-glucose (TCG) solution (1:5) and washed twice by centrifugation at 600 x g for 10 minutes, while the other portion was kept unwashed.

The supernatant was carefully removed after washing and the residue was divided into four equal parts, while the unwashed semen was divided into two equal parts. Afterwards, washed and unwashed semen were re-suspended in one of the different TCG-based media with 5% glycerol and 15% powdered egg yolk supplemented or not with different concentrations of BHT according to the treatments: 1) washed semen; 2) washed semen + 0.6 mM BHT; 3) washed semen + 2.0 mM BHT; 4) washed semen + 5.0 mM BHT; 5) unwashed semen and 6) unwashed semen + 5.0 mM BHT. Following supplementation or not with BHT, semen treatments were packed into 6

different 0.25 ml straws then were left to equilibrate at +4°C for 2 hours. After equilibration, the straws were kept in liquid nitrogen vapor at 4 cm above the liquid nitrogen level for 15 minutes and frozen by storing them in liquid nitrogen. The total number of the freezing process was repeated 20 times. The amount of mixed ejaculate (ml) and spermatozoa concentration ($\times 10^9/\text{ml}$) obtained by mixing the collected semen were recorded, while the evaluation of total, progressive, local sperm motility (%) and dead spermatozoa (%) was determined by Computer Assisted Semen Analysis (CASA).

The obtained results showed that the maximum amount of semen was 2.5 ml; the minimum amount was 1.0 ml, and the average was 1.75 ml. The average of sperm concentration was $2,320 \times 10^9/\text{ml}$. In terms of total and progressive sperm motility in TCGYG extender after thawing, BHT groups were significantly ($P < 0.05$) different than the control group in both washed and unwashed semen treatments. The highest percentages of total and progressive sperm motility were recorded with 2.0 mM of BHT with an average of 71.65 and 42.44 %, respectively in washed semen, while the lowest percentages were recorded in the control group. Moreover, the difference between the washed and unwashed semen was significant ($P < 0.05$). The washed semen was significantly ($P < 0.05$) higher in the percentages of total and progressive sperm motility compared to unwashed semen.

In the term of local sperm motility in TCGYG extender, there was no significant ($P > 0.05$) difference between the control group and BHT groups in both washed and unwashed semen. The difference between the washed and unwashed semen was also insignificant ($P > 0.05$). On the other hand, the percentage of dead spermatozoa in TCGYG extender, was significantly ($P < 0.05$) different in BHT groups than the control group in both washed and unwashed semen. The lowest percentage of dead spermatozoa was recorded with 2.0 mM of BHT with an average of 28.34 % in washed semen, while the highest percentage was recorded in the control group. Moreover, the difference between the washed and unwashed semen was significant ($P < 0.05$). The washed semen was significantly ($P < 0.05$) lower in the percentage of dead spermatozoa compared to unwashed semen.

In conclusion, BHT increased significantly ($P < 0.05$) both sperm motility and viability in Saanen bucks. This study showed that BHT concentration ranging from 0.6 to 2.0 mM/mL could

be the optimum concentration for freezing semen of Saanen buck. The highest percentages of sperm motility and viability were recorded after thawing of washed semen in TCGYG extender containing 2 mM of BHT. Consequently, the addition of BHT with a concentration of 2.0 mM could be recommended as an optimum concentration to improve many parameters of washed and unwashed sperm cryopreserved in an egg yolk-based medium. Also, the highest sperm motility and viability were recorded in washed semen compared to unwashed semen in this study. Therefore, it could be recommended to make sperm washing before cryopreservation by initial centrifugation of the semen to improve sperm cryosurvival.

Keywords: Buck, semen, washing, cryopreservation, BHT.

ÖNSÖZ

Tarım Türkiye'nin ekonomik ve sosyal gelişmesinde çok önemli görevler üstlenmiş ve bu görevini günümüze kadar sürdürmüştür. Tarımın önemli bir parçası olan hayvancılık ekonomide vazgeçilmez bir sektördür çünkü ülke nüfusunun beslenmesi, sağlanması, milli gelire ve istihdama katkı sağlaması, sanayi sektörünün hammadde ihtiyacını karşılaması, sanayiye sermaye aktarması, ve ihracata doğrudan ve dolaylı katkıda bulunmaktadır. Türkiye gibi gelişme yolundaki ülkelerde ise tarımın önemi bir kat daha fazladır. Tarım oluşturan bitkisel üretim ve hayvancılık sadece sektörü değil, ürettiği temel ürünler nedeniyle tüm ülkeyi doğrudan etkilemektedir. Bugün Türkiye'nin 80 milyonu aşan nüfusunun beslenme ihtiyacını karşılayarak nesillerin devam etmesini sağlaması nedeniyle çok önemli bir konumdur. Diğer yandan ülke ekonomisine ve istihdama da büyük katkı sağlamaktadır.

Türkiye'de keçi popülasyonunun çeşitli nedenlerle yıllar içinde azalmasına rağmen birçok bölgemizde keçi genotipinin popülasyon içindeki ağırlığı sabit bir durumdur. Türkiye'nin tüm bölgelerinde yetiştirilen keçiler, hele orman kenarlarında ve yüksek köylerinde ekonomik seviyesi düşük çiftliklerin temel besin ve geçim kaynağıdır. Ankara, Malta, Kilis ve Saanen gibi süt keçisi ırkları, keçi popülasyonunun küçük bir bölümünü oluşturmaktadır. Ülke hayvancılık potansiyelinde önemli süt, et, ve kıl gibi ürünler bakımından iyileştirmeye ihtiyacı vardır. Keçi üretiminin artırılması, çevre koşullarının iyileştirilmesi ve keçi ırklarının genotiplerinin geliştirilmesi ile mümkündür ve ıslah araştırmalarında suni tohumlama en önemli araçtır. Keçilerde suni tohumlamada başarıyı artırmak ve doğurganlığı sağlamak için teke sperminin dondurulması ve çözülmesinde yeni yöntemler geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, Saanen teke sperminin dondurulmasında kullanılan TCGYG sulandırıcısına katılan BHT antioksidanın çözündürme sonrası spermatolojik parametrelere etkisinin belirlenmesi çalışmalarına yönelik olmuştur.

İZMİR

19/06/2023

Ahmed Fathy Hassan SEIOUDY

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK	ii
KABUL ONAY SAYFASI	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	xi
ÖNSÖZ	xv
İÇİNDEKİLER	xvi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xxii
RESİMLER DİZİNİ.....	xxiii
TABLolar DİZİNİ	xxi
ŞİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiv
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
2.1. Saanen Keçi Irkının Özellikleri	5
2.1.1. Morfolojik özellikler	5

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.1.2. Performans özellikleri	6
2.2. Tekelerde Üreme	6
2.2.1. Üreme organları ve fonksiyonları	6
2.2.1.1. Primer üreme organları	6
2.2.1.2. Ek üreme bezleri	7
2.2.1.3. Dış genital organlar	8
2.2.2. Tekelerde eşeyssel olgunluk (Pubertas)	8
2.2.3. Tekelerde eşeyssel davranışlar	8
2.2.4. Üreme (çiftleşme) mevsimi	9
2.2.5. Spermatozoon üretimi (spermatogenezis)	9
2.2.6. Sperma üretimi ve spermatolojik özellikler	9
2.2.7. Tekelerde dölermenin hormonal mekanizması	10
2.3. Teke Spermasının Kriyoprezervasyonu (Uzun Süreli)	11
2.3.1 Teke spermasının dondurulması için uzatıcılar ve kriyoprotektanlar	11
2.3.2. Teke spermasının dondurulmasında başarıyı etkileyen faktörler	15

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.3. Teke spermasının sulandırılması ve sulandırma oranı	15
2.3.4. Teke spermasını dondurma yöntemleri	16
2.3.5. Teke spermasının çözündürülmesi	17
2.4. Çiftlik Hayvanlarında Bütil Hidroksitolüen ve Spermatozoa Fonksiyonları	17
2.4.1. Bütil hidroksitolüen (BHT) ve teke spermatozoa fonksiyonları	23
2.4.2. Bütil hidroksitolüen (BHT) ve koç spermatozoa fonksiyonları	25
2.4.3. Bütil hidroksitolüen (BHT) ve manda boğası spermatozoa fonksiyonları	27
2.4.4. Bütil hidroksitolüen (BHT) ve boğa spermatozoa fonksiyonları	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1. Materyal	31
3.1.1. Hayvan materyali	31
3.1.2. Çalışma alanı	31
3.1.3. Hayvanların bakım ve beslenmesi	32
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Spermanın alınması	33

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.2. Kullanılan seyreltici ve antioksidanın bileşim	34
3.2.3. Saanen teke spermasının seyreltilmesi ve dondurulması	35
3.2.4. Spermanın çözündürülmesi	38
3.2.5. Spermatolojik parametrelerin değerlendirilmesi	39
3.2.6. Spermatolojik değerlendirme parametreleri	39
3.2.6.1. Makroskopik muayene	39
3.2.6. 2. Mikroskopik muayene	39
3.2.6.2.1. Sperm motilitesi	39
3.2.6.2.2. Ölü-canlı sperm oranı	40
3.3. İstatistiksel Analiz	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	41
4.1. Taze Spermanın Spermatolojik Parametreleri	41
4.2. Çözündürme Sonrası Spermatolojik Parametreleri	41
4.2.1. Toplam spermatozoa motilitesi	41
4.2.2. Progresif spermatozoa motilitesi	43

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.2.3. Lokal spermatozoa motilitesi	44
4.2.4. Ölü spermatozoa oranı	48
5. TARTIŞMA	51
5.1. Taze Spermanın Spermatolojik Parametreleri	51
5.2. Çözüm Sonrası Spermatolojik Parametreleri	52
5.2.1. Sperm motilitesi oranı	52
5.2.2. Ölü spermatozoa oranı	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR DİZİNİ	63
TEŞEKKÜR	82
ÖZGEÇMİŞ	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Çalışma içindeki grupların oluşturulması BHT takviyesi ile	36
4.2. Dondurma-çözdürme sonrası yıkanmış sperm grubunda motilite oranları	46
4.3. Dondurma-çözdürme sonrası yıkanmamış sperm grubunda motilite oranları	46
4.4. Dondurma-çözdürme sonrası yıkanmış sperm grubunda toplam motilite oranları: BHT eklemeyen ile % 45 (a), 0,6 mM BHT ile % 78 (b), 2.0 mM BHT ile % 85 (c), 5.0 mM BHT ile % 65 (d)	47
4.5. Dondurma-çözdürme sonrası yıkanmış sperm grubunda ölü spermatozoa oranları	50
4.6. Dondurma-çözdürme sonrası yıkanmamış sperm grubunda ölü spermatozoa oranları	50

RESİMLER DİZİNİ

<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Küçük Baş Hayvan Ünitesi	31
3.2. Çalışma alanı	32
3.3. Saanen teke sperması ve sperma alma aşamaları	33
3.4. Çalışmada kullanılan sulandırıcı ve farklı konsantrasyonlarda BHT antioksidan	34
3.5. Teke spermasının sulandırılmasında santrifüjlere yıkanmış sperma ...	35
3.6. Teke spermasını seyreltmek için kullanılan ekipmanlar: spermanın paketlenmesinde kullanılan payetler (a), altı farklı grup için hazırlanmış payetler (b), payetlerin açık uçlarının kapatılmasında kullanılan ateş (c), +4°C’de 2 saat ekilibrasyona bırakılan payetler (d)	37
3.7. Saanen teke sperminin sıvı nitrojen buharında dondurulması (a), donmuş Saanen teke sperminin sıvı nitrojen tankına aktarılması (b), spermatolojik inceleme için sıvı nitrojen tankında saklanması (c), spermin su banyosunda çözülmesi (d).....	38

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo

Sayfa

4.1	Tris-sitrik asit-glikoz (TCG) sulandırıcına bütıl hidroksitolüen (BHT) antioksidanın, çözündürme sonrası toplam sperm motilitesi oranı farkının önemliliğı	42
4.2	Tris-sitrik asit-glikoz (TCG) sulandırıcına bütıl hidroksitolüen (BHT) antioksidanın, çözündürme sonrası progresif sperm motilitesi oranı farkının önemliliğı	44
4.3	Tris-sitrik asit-glikoz (TCG) sulandırıcına bütıl hidroksitolüen (BHT) antioksidanın, çözündürme sonrası lokal sperm motilitesi oranı farkının önemliliğı	45
4.4	Tris-sitrik asit-glikoz (TCG) sulandırıcına bütıl hidroksitolüen (BHT) antioksidanın, çözündürme sonrası ölü sperm oranı farkının önemliliğı..	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
ALH	Lateral head displacement
BCF	Beat-Cross Frequency
BHT	Bütil hidroksitolüen
CASA	Bilgisayar destekli sperma analizi
DMSO	Dimetilsülfoksit
FSH	Follicle-stimulating hormone
Gn-RH	Gonadotropin-releasing hormone
HOST	Hipoosmotik şişme testi
LH	Luteinizing hormone
ml	Mililitre
mM	Milimol
°C	Santigrat derece
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
ROS	Reaktif oksijen türleri

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
STR	Straightness coefficient
TCG	Tris-sitrik asit-glikoz
TCFGL	Lesitin
TCFYG	Tris-sitrat-fruktoz yumurta sarısı gliserol
TCGYG	Tris-sitrik asit-glikoz yumurta sarısı gliserol
VCL	Curvilinear velocity

1. GİRİŞ

Keçiler çok dayanıklı hayvanlar olup, sıcaklık, nem, kötü bakım ve besleme gibi zorlu çevre koşullarına kolay sağlayabilmektedir (Gall, 1981). Daha az girdi, kolay yönetim, uygulanabilirlik ve hepsinden önemlisi, en az yem mevcudiyeti ile hayatta kalma ve üretme yeteneği, onları dünyanın tropikal ve subtropikal bölgelerinde tercih edilen hayvanlar haline getirmektedir. Bu nedenle, belki de dünyadaki toplam keçi popülasyonunun %60'ı Asya'da, özellikle gelişmekte olan ülkelerde yetiştirilmektedir (FAO, 2007). Bu şekilde keçiler, düşük gelirli insanların sosyo-ekonomik standartlarının yükseltilmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Yardımcı üreme teknolojileri laboratuvarlarında yaygın ve önemli bir prosedür olarak sperm kriyoprezervasyonu, yardımcı üreme teknikleri alanında önemli bir seçenek sunmaktadır (O'Connell et al., 2002). Üreme için dondurulmuş/çözülmüş spermanın büyük pratik faydaları olmasına rağmen, soğutma, dondurma ve çözme içeren kriyoprezervasyon işleminin sperm fonksiyonlarında önemli zararlı değişikliklere neden olduğu yaygın olarak bildirilmektedir (Colas et al., 2009; Raheja et al., 2018). Soğutma, dondurma, çözme veya bir sulandırıcıya kriyoprotektan ilavesi, sperm kriyoprezervasyon başarısını etkilemektedir (Salamon and Maxwell, 2000).

Yukarıda sayılan işlemler, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve spermde termal şokun bir sonucu olarak sperm hücre zarında oksidatif hasara neden olmaktadır (Raheja et al., 2018). Bu yapay tohumlama için hazırlanan payetlerde sperm hücrelerinin canlı kalması ve dölleme kapasitesini azalmaktadır (Maxwell and Watson, 1996). Sperma dondurma ve çözme işleminin sadece membran lipid kompozisyonunda, akrozom durumunda, sperm hareketliliğinde ve canlılığında olumsuz değişikliklere neden olmadığı, aynı zamanda sperm hücrelerinin DNA hasarında bir artışa neden olduğu iyi bilinmektedir (Thomson et al., 2009; Zribi et al., 2010).

Dondurulmuş spermanın kalitesi, oksijensiz oosit radikallerinden etkilenmektedir (Agarwal et al., 2003). Bu radikaller, sperm kalitesini ve oosit dölleme kapasitesini azalmaktadır (Mammoto et al., 1996). Sperm DNA'sı ve erkek pronükleus gelişimi üzerinde zararlı özelliklere sahiptir (Aitken et al., 1993). Ayrıca bu radikaller, esas olarak lipid

peroksidasyonu nedeniyle spermin motilitesini, akrozom reaksiyonunu ve kapasitasyonunu inhibe etmektedir (Aitken, 1995).

Aslında, bir ejakulattaki spermelerin yaklaşık %50'si donma ve çözülme sürecini takiben hayatta kalmaktadır (Bailey et al., 2008). Kriyo-hasar ozmotik stres, soğuk şoku, hücre içi buz kristali oluşumu, aşırı ROS üretimi (Chatterjee and Gagnon 2001), antioksidan savunma sistemlerinde bir değişiklik (Bilodeau et al., 2000) ve bu koşulların birkaçı veya hepsinin kombinasyonları ile ilişkili olabilmektedir. Kriyoprezervasyon sırasında, ozmotik stres, suyun ve çözünenlerin sperm plazma zarı boyunca hareketinden kaynaklanan hücre hacmindeki değişiklikler tarafından indüklenir ve ROS oluşumunu sağlar (Ball, 2008). Ayrıca soğuk şoku, oksidatif stres ve ROS üretimi ile ilişkilidir (Gadea et al., 2011). Hidrojen peroksit gibi ROS'ların fizyolojik miktarlarda üretilmesi, sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve zona pellusidaya bağlanma sırasındaki sperm fonksiyonlarında ciddi bir rol oynamaktadır (Agarwal et al., 2006).

Sulandırıcılara antioksidan bileşiklerin eklenmesi, ROS oluşumunu ve etkilerini azaltmak için sperm kriyopreservasyonu protokollerinde yüksek bir yönelik olarak haline gelmiştir. Antioksidanlar, oksidatif stresi azaltarak donmuş sperma özelliklerini iyileştirmektedir (Bucak et al., 2008). Sperma dondurma sperma antioksidanlarını azaltır ve spermatozoa oksidatif hasara yatkın hale gelir. Sperma seyrelticilerinde antioksidanların eklenmesi, dondurma sırasında sperm durumu korumaktadır. Kullanılan farklı antioksidan bileşikler arasında, bir fenolik organik antioksidan olan bütül hidroksitolüen (BHT), koç (Farshad et al., 2010), boğa (Patel et al., 2015), teke (Alcay et al., 2016; Dewry et al., 2020) ve manda boğası (Wadood et al., 2016) gibi çeşitli türler için sperm hücre zarını koruyarak dondurma sırasında sperm kriyo-hasarını önemli ölçüde azaltan, sperma korunmasına yönelik olarak farklı konsantrasyonlarda test edilmiştir.

Bütül hidroksitolüen (BHT), E vitamininin enzimatik olmayan, sentetik bir analogudur. BHT, sperm hücrelerinin lipid çift tabakasının ve membranının otooksidasyonunu durdurmak için kullanılan organik çözünür bir moleküldür (Hammerstedt et al., 1978). BHT'nin çeşitli işlevleri vardır, bunlar arasında; antioksidan koruyucu, antiviral ve antimikrobiyal ajandır. Kimyasal olarak fenolden türetilen lipofilik bir organik bileşik olan BHT çeşitli şekillerde kullanılmıştır. Örneğin, gıda katkı maddeleri, ev, endüstriyel, kozmetik ürünleri, tıbbi ve veterinerlik araştırmalarında kullanılmıştır (Baluja et al., 2014). Doymamış yağ asidi

sonuçlarının uzun süreli depolanması, BHT'nin eklenmesiyle önlenebilen acılaşıma ile sonuçlanabilir (Thangamani et al., 2018).

Üreme açısından BHT, spermi soğuk şokundan korumak için sperm zarlarına sızma yeteneğine sahiptir (Anderson et al., 1994). Spermatozoa, ROS için yüksek hedefler olduğundan, serbest radikallerin temizlenmesindeki rolü nedeniyle BHT'nin eklenmesi faydalı olabilmektedir (Killian et al., 1989). Çeşitli sperma sulandırıcıların takviye olarak, kullanılması biyolojik zarlarda lipit peroksidasyonunu engellemeye yardımcı olur ve bu durum sperm kalitesini artırmaktadır (Alcay et al., 2016). BHT bir antiviral ajan görevi görür, bu nedenle yapay tohumlama sırasında viral hastalıkların hayvanlara bulaşma riskini azaltır (Thangamani et al., 2018). Anderson et al. (1994), BHT'nin muhafaza sırasında spermin akışkanlığını artırarak sperm canlılığını iyileştirdiğini ve dolayısıyla spermi soğuk şokuna daha az duyarlı hale getirdiğini bildirmiştir. Sulandırılmış spermaya BHT eklenmesi motiliteyi iyileştirmiş ve spermleri soğuk kaynaklı şoktan korumuştur (Hammersted and Graham, 1992). Korunmuş spermaya sırasıyla hindi, manda ve köpeklerde BHT eklenmesinden sonra sperm kalite parametrelerinde iyileşme rapor edilmiştir (Memon et al., 2011).

BHT'nin lipofilik özellikleri, sperm sitoplazmasının kolayca çözünmesini sağlar, böylece intrasitoplazmik akışkanlığı artırır ve ardından da lipofilik etkilerini sperm hücresinin içinden ve dışından gösterir (Hammerstedt et al., 1978). BHT, sperm hücreleri üzerinde çift etkili koruma gerçekleştirebilmektedir. Bu, sperm membranının ROS tarafından tahrip edilmesini engelleyerek, lipit radikale bir hidrojen molekülü vermek suretiyle otooksidasyon zincir reaksiyonuna müdahale eder ve böylece stabil bir ürün üretmiş olur (Papas, 1993). Aynı zamanda, BHT, ROS ile reaksiyona girer ve onu hidroperoksitlere dönüştürmektedir (Merino et al., 2015). Nitekim hindilerde, dondurulmadan uygun koşullarda saklanan spermaya BHT eklenmesinin, 48 saatlik depolamadan sonra sperm canlılığını, hareketliliğini ve membran bütünlüğünü iyileştirdiği bildirilmiştir (Uysal and Bucak, 2007).

BHT'nin boğa sperm hücreleri üzerindeki koruyucu etkileri değerlendirilmiştir (Asadpour et al., 2012). Patel et al. (2015), dondurma ortamına BHT eklenmesinin boğa spermasının çözülme sonrası kalitesi üzerinde olumlu etkileri olduğunu bildirmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda BHT takviyesi Malondialdehit konsantrasyonlarını azaltarak donmuş çözölmüş boğa sperm kalitesinin iyileşmesine neden olmuş ve onları DNA hasarına

karşı korumuştur (Khumran et al., 2015). Farshad et al. (2011), kriyoprezervasyon sırasında koç sperminin optimum korunması için gereken optimal BHT konsantrasyonunun 2-3 mM BHT olduğunu göstermiştir.

Sperma muhafazası için gereken optimal BHT konsantrasyonu, hayvan türlerine göre 0,05-2,0 mM arasında değişebilmektedir (Bamba and Cran, 1992). Daha yüksek BHT konsantrasyonlarının dondurulmuş çözölmüş sperm özelliklerini olumsuz yönde etkilediği kesindir, ancak mekanizması belirsizliğini korumaktadır (Farshad et al., 2010). Mandalarda 0,5 ve 2,0 mM/mL'lik BHT konsantrasyonları, sulandırıcılara ve dondurma aşamasına bağlı olarak sperma muhafazası için en iyi koruyucu dozlardır (Mostafa et al., 2019; Nain et al., 2023). BHT'nin bir antioksidan olarak kullanımının donmuş spermanın kalitesini iyileştirdiği bildirilmiştir (Lalramdintluanga, 2012), ancak antioksidanın etkisi konsantrasyonuna bağlıdır (Priyadharsini et al., 2011).

Antioksidanlar daha yüksek seviyelerde kullanıldığında bazı hayati metabolik fonksiyonlar bozulabilmektedir. Bu nedenle çalışmamız, Tris-sitrik asit-glikoz yumurta sarısı gliserol (TCGYG) bazlı sulandırıcıda bütül hidroksitoluen'in (0,6 mM, 2,0 mM ve 5,0 mM) farklı konsantrasyonlarının Saanen teke sperminin kriyoprezervasyonunun çeşitli sperma parametreleri üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Ayrıca, kriyoprezervasyon öncesinde santrifüjleme yoluyla yıkanmış ve yıkanmamış sperm etkisi incelenmiştir. Böylece Saanen tekelerde başarılı bir sperm kriyoprezervasyonu yöntemi geliştirilmesinde optimal bir konsantrasyonun bulunmasına çalışılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Hayvancılığın temeli, insanların başka türlü kullanamayacakları olanakların, insan beslenmesi için önemli rol oynayan hayvansal proteine dönüştürülmesidir. Keçiler bu şekilde en belirgin türlerden biridir. Bunun nedeni, keçilerin diğer birçok evcilleştirilmiş türün hayvansal ürünlere dönüştürmediği veya dönüştüremediği yiyecekleri yemesidir. Bu bağlamda keçiye çoğu ülkede "fakirin ineği" denmektedir (Şengonca ve Koşum, 2015).

Türkiye'deki keçiler için genetik ıslah stratejilerinin araştırılması gerekmektedir. Kıl keçi yetiştiriciliğinde kıl keçi sayısının azaltılması, kıl keçi yerine melez süt keçilerinin yaygınlaştırılmasına yönelik tedbirlere hızla devam edilmelidir. Bu konularda yapılan araştırmalar başarılı olmuştur. Keçi yetiştiriciliğinde reproduktif büyüme sorununun çözülmesi gerekmektedir. Burası yoğun bir yer. Saanen ırkının süt genotipleri keçi yetiştiriciliğinde damızlık gereksinimlerin karşılanması için gereklidir. Bu durumda donmuş keçi spermi ile suni tohumlamanın faydası daha da yükselmektedir. Yapay tohumlamanın yaygınlaşmasında en önemli faktör spermin dondurularak uzun bir süre korunmasıdır (Kulaksız, 2009).

Tekelerde donmuş sperma ile tohumlamada hayvanların gebe kalma oranı sığırların tohumlanmasına göre daha düşüktür. Bunun nedeni, kullanılan sulandırıcıların, spermin dondurulması ve döllemesinin iyi gelişmemiş olmasıdır. Optimum hareketlilik ve doğurganlığı sağlamak için teke sperminde kullanılan spermelerin yıkanması, çözülmesi ve dondurulması yöntemlerini geliştirmeye yönelik araştırmalar devam etmektedir.

2.1 Saanen Keçi Irkının Özellikleri

2.1.1 Morfolojik özellikler

Saanen keçileri renkleri beyazdan krema rengine değişen, kısa tüylü hayvanlardır ve genelde boynuz yoktur. Deri ince, esnek ve açık pembedir. Parlak, kısa ve yoğun kıllara sahiptir. Genellikle dişilerin boyunlarında tek veya çift küpeler bulunmaktadır. Dişiler küçük bir baş yapısına, iri ve parlak gözlere, ince ve hafif kıvrık veya delinmiş kulaklara sahiptir. Sabit bir

kemik yapısına sahiptir ve pozisyonu düzenlidir. Meme iyi gelişmiş koltuk meme olup, karın altına ve arka bacaklara doğru uzanmaktadır. Tekeler iyi gelişmiş sakallara sahiptir. Keçilerde canlı ağırlık 50 kg, tekelerde ise 65-70 kg'dır (Kaymakçı ve Aşkın, 1997).

2.1.2 Performans özellikleri

Saanen keçisi farklı iklim ve çevre koşullarına esnek bir şekilde uyum sağlayabilmektedir. Yüksek süt üretimi bu ırkın en önemli özelliklerinden biridir. İyi bakım ve besleme koşullarında ortalama 280 günlük sağım durumunda 750 kg ulaşmaktadır. İyi bakım koşullarında süt üretimi 1 tonu aşmaktadır (Kaymakçı ve Aşkın, 1997; Yükçü ve Bahşı, 2019).

Keçi sütünün yağ içeriği %3-4 arasındadır. Süt üretimlerinin yanı sıra besinleri kullanma yetenekleri de oldukça yüksektir. Saanen keçileri hızlı büyüme gösterir ve eşeyssel olgunluğa daha erken ulaşmaktadır. Keçilerin doğurganlığı yüksek olduğu için genellikle ikiz veya üçüz doğurur ve ortalama yavru sayısı 1,8 ile 1,9 arasında değişmektedir (Yükçü ve Bahşı, 2019).

2.2. Tekelerde Üreme

2.2.1. Üreme organları ve fonksiyonları

Tekelerde üreme organları 3 gruba ayrılmaktadır.

2.2.1.1 Primer üreme organları

Testisler: Sağlıklı bir ergin tekede her testis yaklaşık 100-150 gram ağırlığındadır. Çiftleşme döneminde testislerin çapı maksimuma ulaşmaktadır. Bu, çiftleşme mevsimi boyunca artan sperm üretimi ile ilgilidir. Testislerin iki ana işlevi vardır; Biri gametlerin (sperm) üretimi, ikinci ise üreme hormonlarının üretimidir. Testis tüplerinde sperm üretimi gerçekleşmektedir. Ayrıca androjenler interstisyel dokudaki Leydig hücreleri tarafından da üretilmektedir. Seminifer tübüllerin epitelinde bulunan sertoli hücreleri, sperm gelişimi sırasında bu hücrelerin beslenmesini ve gelişmesini desteklemektedir (Herman ve ark. 1994).

Epididimis: Üç ana bölümden oluşmaktadır, baş (caput), gövde (corpus) ve kuyruk (cauda). Epididimisin kanalının uzunluğu türlere göre değişir, tekelerde 60 m'ye ulaşmaktadır. Epididimisin temel işlevleri spermin depolanması, yoğunlaşması, olgunlaşması ve ejakulasyon sırasında taşınmasıdır. Kuyruk kısmında 12-16 milyar sperm depolanmaktadır (Herman et al. 1994).

Vas deferens: Duktus deferensler, spermi kauda epididimisinden üretraya taşıyan uzun tübüler yapılardır. Kauda epididimisi terk ettikten sonra vas deferens epididimal başlıktan kan, lenf ve sinirlerle birlikte göç ederek spermatik kordon (funiculus spermaticus) oluşturmaktadır. Bu yapı kasık kanalından karın boşluğuna geçmektedir. veziküloüretalisin (idrar kesesi) iki üst tarafından başlayan duktus deferens giderek kalınlaşır ve duktus deferens ampullasını oluşturmaktadır. Bu iki ampulün çapı orijinal baloncuklardan çok daha küçüktür. Ancak baloncuklara göre daha kalın bir duvar yapısına sahiptir. Her iki ampul de prostat bezinin altından geçer ve mesanenin boşaltım kanalına katılır (bu durumda kanala boşalma kanalı denmektedir) ve idrara boşalmaktadır (Herman et al. 1994).

2.2.1.2. Ek üreme bezleri

Tekelerde ek üreme bezleri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

Prostat: ufak ve yaygındır. Üretrayı çevreleyen prostat iki bölümden oluşmaktadır. Bu iki parçaya korpus prostat ve prostat parsi diffüz denmektedir. İdrar yolu ve vajinanın asidik ortamını nötralize ederek alkali bir salgı oluşturmaktadır.

Veziküler bezler: Veziküler bezler (Glandulae vesiculares) eskiden tohumların depolandığı yer olarak biliniyordu. Bu yanlış anlaşılmadan dolayı seminal tohum kesesi denilmiştir. Veziküllerin yüksek bir konsantrasyonda sitrik asit, potasyum ve birçok enzim içerdiği bulunmuştur. Flavon içeriğinin yüksek olması nedeniyle, geniş getiren hayvanlarda dışkısının bileşimi yeşil renklidir. İçeriğin pH'ı 5,2 ile 6,2 değişik göstermektedir.

Cowper bezleri (Bulboüretal bezler): Üretranın pelvik boşluktan çıktıkları kısmında bulunmaktadır. Ejakülasyon sırasında spermin taşınmasında rol oynamaktadır. Bu, çiftleşmeden

önce idrarı temizlemekten sorumlu bezdir. Alkali içerikli (pH 7,5-8,2) berrak bir salgı üretmektedir. Önceden hazırlık yapılmadan (ısı/sıcaklık) yapay vajinalardan toplanan spermelerde bol miktarda bulunmaktadır (Herman et al., 1994).

2.2.1.3. Dış genital organlar

Dış genital organlar, penis, skrotum ve prepisyumdan oluşmaktadır. Penis, spermin dışı üreme organına salınmasıyla ilgilidir. Penisin ucunda yer alan glans, boşalma refleksinin uyarılmasında rol oynayan ana organdır. Prepisyum derisi, penisi koruyan deriden yapılmış bir yapıdır. Skrotum, testisleri içeren bir yapıdır ve en önemli işlevi; testis sıcaklığını düzenleyerek, spermatogenezin vücut sıcaklığının altında sabit bir sıcaklıkta düzenli olarak gerçekleşmesini sağlamaktır (Herman et al., 1994).

2.2.2. Tekelerde eşeyssel olgunluk (Pubertas)

Oğlaklarda eşeyssel olgunluk; bu, spermin üretildiği, dölleme yeteneği kazandığı ve eşeyssel istek (libido) gösteren bir durumdur. Tekelerde olgunluk yaşı, ırk, sıcaklık, beslenme ve ışık gibi faktörlere göre değişmektedir. Tekelerde puberte spermatogenezin başlangıcı olarak kabul edilse de pratikte eşeyssel olgunluk ilk spermin ejakulatta görünmesi olarak tanımlanmaktadır (Bilaspuri and Singh, 1992).

2.2.3. Tekelerde eşeyssel davranışlar

Yaşlı olmayan tekelerde eşeyssel davranış yaşı (aşım, flehmen, sürtünme davranışları ve koklama) ırklara göre birkaç ay (Avrupa ırkı) ve bir yıl (Şam ve Ankara tekeleri) arasında değişmektedir. Özellikle çiftleşme mevsimde boynuzun tabanında keçinin özel aromatik bezleri harekete geçer ve bu da koku salınımının artmasına neden olur. Libido veya cinsel istek, eşeyssel olgunluktan önce gelişmeye başlar, eşeyssel olgunluk ile birlikte ortaya çıkar ve yaşam boyunca devam eder. Ancak yaş ilerledikçe yoğunluğu azalır. Libido düzeyi bakım ve besleme ile doğrudan ilişkidir.

Eşeyssel istek genetik faktörlere bağlı olmakla birlikte daha çok testosteron hormonunun sentezi ve salgılanması ile ilgilidir. Libido, flehmen veya koku refleksi ile kendini göstermektedir. Genellikle kızgın bir dişinin vajinası veya idrarını kokladıktan sonra olmaktadır. Tekelerde, eşeyssel davranış, testis boyutu ve sperm üretimi, gün uzunluğundaki mevsimsel değişikliklerden etkilenmektedir (Walkden-Brown et al., 1994).

2.2.4. Üreme (çiftleşme) mevsimi

Teke, her mevsim üreme faaliyeti gösterse de gün uzunluğuna bağlı olarak sperma miktar ve kalitesinde değişiklikler gözlenmektedir. Normal döneminde ışık azaldığında kandaki testosteron, LH seviyeleri, testis ağırlığı ve dolayısıyla spermatolojik aktivite artmaktadır (Muduuli et al. 1979; Kaymakçı, 2022). Mevsime bağlı ırkların çiftleşme mevsimi genellikle sonbahar ve kış başıdır.

2.2.5. Spermatozoon üretimi (spermatogenezis)

Spermatogenez süreci fetal yaşamda başlamaktadır. Fetal yaşamın erken dönemlerinde, seminifer tübüllerin duvarındaki progenitor hücrelerden spermatogonia adı verilen kök hücreler gelişmektedir. Gelişen spermatogonia, ergenliğe kadar uykuda kalır, ardından spermatozoa üretmek için bölünmektedir. Kök hücresi spermatozoaları diploid sayıda kromozom içerir ($2n:60$) ve daha fazla sperm üretmek amacıyla yetişkinliğe kadar mitotik bölünmeye uğramaktadır.

Bölündükten sonra yeni oluşan spermatogonia kök hücrelerden farklılaşır ve son aşamada birincil spermatositlere farklılaşmaktadır. Birincil spermatositler mayoz bölünmeyle, ikincil spermatositlere ve bunların mayoz bölünmesi ile de spermatidlere dönüşmektedir. Spermatitler, spermiyogenez sürecinde bazı morfolojik değişikliklere uğrar ve spermatozoa haline gelir. Bu süreç ortalama 22 güne kadar sürmektedir (Evans and Maxwell, 1987).

2.2.6. Sperma üretimi ve spermatolojik özellikler

Yapılan araştırmalara göre tekelerin günlük ürettiği sperm sayısı 2,76 ile 7,23 milyar arasında değişmektedir. Bu fazlalığın nedeni; mevsimler veya türler arasındaki farklılıklardır (Walkden-Brown et al., 1994).

Tekelerde sperma verimi ve kalitesinde mevsim, yaş, ırk ve bireysel ayrımlar gibi faktörler rol oynamaktadır. Tekelerde sperma üretimi yıl boyunca sabit olmakla birlikte mevsim farklılıklarından etkilenebilmektedir (Devendra and Burns, 1983). Yaz aylarında sperma üretimi ve seksüel istek en düşük ve bu zamanda gün uzunluğu gibi uyarıcı faktörlerle eşleştirilebilmektedir. Sperm motilitesi kışın daha düşükken, sperma üretimi ve sperm motilitesi sonbaharda daha yüksek ve yazın nispeten daha düşüktür. Gün uzunluğu azaldıkça üreme verimliliği yaz sonu ve sonbaharda en yüksek düzeyine ulaşmaktadır. Belirtilen dönemlerde testosteron salgısı en üst düzeye ulaşmaktadır (Copland 1984; Hafez 1993).

Diğer türlere göre tekelerde ejakulat miktarı az olmakla birlikte sperma yoğunluğu yüksektir. Spermanın kıvamı, sperm sayısına bağlı olarak suludan yoğun kıvama kadar değişmektedir. Tekelerde spermanın rengi beyaz, krem veya açık sarıdır. Bazı araştırmacılar koçlarda spermanın 0,7-2,0 ml olduğunu belirtirken, bazıları 0,5 ile 1,5 ml arasında olduğunu bildirmiştir (Evans and Maxwell, 1987). Sperm yoğunluğu 1,5 ile 5,0 milyar/ml arasındadır. Sperm hareketliliği genellikle %75'dan daha yüksektir. Teke spermi donmaya koçtan daha fazla dayanabilir (Ak, 1996).

2.2.7. Tekelerde dölermenin hormonal mekanizması

Testis işlevleri; sperma ve androjen üretimi, hipofiz bezi tarafından kontrol edilmektedir. Hipotalamusun aktivitesi, ergenlik döneminde merkezi sinir sisteminin çevresel, psikolojik, metabolik ve diğer endojen faktörleri tarafından uyarılmaktadır. Uyarılan hipotalamus, Gn-RH'yi sentezler ve salıverir. Hipotalamik-hipofiz portalına damar yoluyla uygulanan Gn-RH, adenohipofizin gonadotropik kompleks hormonlar üretmesine ve salmasına neden olmaktadır. Salgılanan gonadotropik hormonlardan biri olan FSH, seminifer tübülün bazal kısmını kaplayan ve gonadları destekleyen hücrelerin sertoli hücrelerine dönüşümünü sağlar ve LH ile spermatojenik aktiviteyi başlatmaktadır. FSH salgılanmasındaki artış, seminifer tübüllerde sentezlenen ve salgılanan bir "androjenik olmayan hormon" olan inhibin'in olumsuz etkisi ve hipotalamus ile hipofiz bezi üzerindeki etkileri ile düzenlenmektedir (Houp and Wolski, 1982).

FSH ile LH, Leydig hücrelerini etkileyerek testosteron üretiminin, salınımının artmasında ve spermatogonial döngüde yani sperm farklılaşmasında rol oynamaktadır. Testosteron salınımı, hipofiz bezini ya da hipotalamusu olumsuz etkileyerek LH salınımını kontrol etmektedir (Muduuli et al., 1979). Mevsim dışında gün uzunluğuna bağlı olarak gonadotropin salgısı azalsa da sperm ve androjen üretimi için yeterli gonadotropin üretimi sağlanmaktadır. Ancak bu dönemde testis boyutu, sperm üretimi ve doğurganlık azalmaktadır (Evans and Maxwell, 1987).

2.3. Teke Spermasının Kriyoprezervasyonu (Uzun Süreli)

Dondurulmuş spermin pratik uygulama için yetersiz olduğunu bulan Smith and Polge (1950) ve Barker (1957) tarafından teke sperminin ilk kez dondurulmasından bu yana birçok araştırmalar yapılmıştır. Teke sperminin dondurulması hakkında ilk günlerde, esas olarak boğalar için geliştirilen sulandırıcılar kullanılarak spermlerin dondurulması için girişimlerde bulunmuştur. İlk zamanlarda dölleme raporu ve tohumlama sonuçları yetersiz (%3-15), orta (%20-48) ve güvenilebilir (%70) olarak saptanmıştır.

Teke sperminin dondurulması, spermde biyokimyasal, yapısal ve fonksiyon olarak hasara neden olmaktadır. Sonuç olarak, hareketlilik ve canlılık kaybı gözlenmektedir. Hareketlilik ve canlılık kaybı doğurganlığı etkilemektedir. Bu nedenle donmuş sperma ile yapılan tohumlamalarda gebelik oranı taze sperma ile yapılanlara göre daha düşüktür. (Maxwell and Watson, 1996; Purdy, 2006).

2.3.1 Teke spermasının dondurulması için uzatıcılar ve kriyoprotektanlar

Doğal olarak normal koşullar altında sperma uzun süre canlı kalamayacağı için ilave maddelerin belli temel özelliklere sahip olması gerekmektedir. Buna göre sulandırıcılar;

- Laktik asit oluşumunun neden olduğu pH değişikliklerini dengelemek için tampon görevi görmesi,
- Elektrolit dengesini ve ortamın optimal ozmotik basıncını koruması,

- Sperm için besin ve enerji sağlayan bir madde olması,
- Patolojik dahil zararlı tüm mikroorganizmaların büyümesini durdurması,
- Hızlı soğutma ve soğuk şokuna karşı koruması.

Bu temel faktörlerin dışında çözücüler ekonomik olmalı ve normal koşullar altında nispeten kolay üretilmeli ve çözücüyü oluşturan maddeler sıradan laboratuvarlardan veya kimya otoritelerinden temin edilmelidir (Hafez, 1993). Spermin metabolik aktivitesi, hidrojen iyonlarının salınmasına yol açmaktadır. Serbest kalan bu iyonlar için bir taşıma mekanizmasının olmaması, çözeltinin pH'ında bir azalmaya ve dolayısıyla hareketlilik ve üretkenlikte bir azalmaya yol açmaktadır. Bu nedenle sperma seyrelticilerde tampon çözeltilerin kullanılması zorunludur (England, 1993).

Sperma genelde pH değişiklikleri için dar bir tolerans aralığına sahip olduğundan, çözücüler tamponlanmalıdır. Soğutulmuş spermde metabolik aktivite önemli kaldığından, tamponlar özellikle spermin dondurmadan önceki soğutma aşamalarında önemlidir (Arthur et al., 1996). Sperma sulandırıcıların ozmotik basıncı, pH'ı, izotonik veya izo-ozmotik olmalı, seminal ve kan plazması ve vücut sıvıları gibi nötre yakın veya hafif asidik olmalıdır (Herman et al., 1994).

Sitrat, tris, sitrik asit ve fosfat gibi tamponlar, ozmotik basıncı ve hidrojen iyonu konsantrasyonunu ayarlamak için çözücülerde sıklıkla kullanılmaktadır. Tris, en yaygın olanlarından biridir. Tris'in hücreye giren potasyum alımını azalttığı ve dolayısıyla yüksek potasyum seviyelerinin soğutma sırasında sperm üzerindeki olumsuz etkileri azalttığı da kabul edilmektedir. Yağsız süt ürünleri ayrıca çözücüler için bir tampon görevi görmektedir. Süt sulandırıcılarında bulunan laktoz, sperm tarafından önemli ölçüde metabolize edilmemektedir. Bununla birlikte, çözücülerde laktoz kullanıldığında tamponlama gerekli değildir (Arthur et al., 1996).

Birçok hacim artırıcı ajana, spermin hayatta kalması için ihtiyaç duyduğu enerjiyi sağlayan fruktoz veya glikoz gibi şekerler eklenmektedir. Şekerlerin mevcudiyeti türler arasında değişir, ancak sperm genellikle glikoz, fruktoz kullanır, mannoz ve arabinoz gibi monosakkaritler kolayca temin edilebilmektedir (Arthur et al., 1996). Glikoz, hücre zarlarına fruktozdan daha iyi nüfuz eder ve genellikle seyreltici olarak kullanılmaktadır. Glikoz gibi basit şekerlerin yokluğunda, sperm hücrelere zarar vermemek için hücreler arası fosfolipitleri kullanmaktadır (Klemn, 1993).

Dondurulmuş spermde, metabolik aktivitenin geçici olarak kesilmesi nedeniyle enerji temini nispeten önemsizdir. Bunun nedeni, spermilerin dondurulmadan önce genellikle sadece birkaç saat aktif olmasıdır. Bununla birlikte, soğutulmuş spermada, sperm metabolizması birkaç gün boyunca yenilenme gerektirdiğinden enerji temini daha önemli hale gelmektedir (Arthur et al., 1996).

Spermi soğutmanın zararlı etkilerinden korumanın en iyi yolu yumurta sarısı, süt veya benzeri yüksek moleküler ağırlıklı lipoproteinler, lesitinler, sefalinler ve proteinler gibi bileşikler yapılarına eklemektedir. Yumurta sarısı fosfolipid bir yapıya sahip ve koruyucu olduğu söylenmektedir. Sperm soğuk şokundan alınmalı ve sulandırıcıya düzenli olarak eklenmelidir. Gerekli konsantrasyon türlere göre değişir, ancak genellikle seyrelticiye %3-25 seviyelerinde eklenmektedir.

Yumurta sarısının soğuk şokuna karşı koruyucu etkileri tam olarak anlaşılmasa da yumurta sarısı 2 özel etkide rol oynayabilmektedir: Bu etkiler, hücreleri soğuk şokundan korur (direnc faktörü), kısmen spermin hayatta kalmasını destekler (koruyucu faktör) (Pace and Graham, 1974; Foulkes, 1977). Yumurta sarısı fosfolipitleri direnc faktörleri olarak hareket eder ve lipoprotein kompleksleri hem direnc hem de bakım faktörleri olarak hareket etmektedir (Bergeron and Manjunath, 2006).

Spermi dondurmak için antifriz olmalıdır. Kriyoprotektanlar (soğuk şokuna karşı koruma sağlayan maddeler) hücrelerin soğuması, donması ve çözülmesinin neden olduğu fiziksel, kimyasal ve oksidatif stresin yanı sıra ortaya çıkan ısı şoku, ozmotik değişim, hücre içi kristallerin oluşumunu azaltmak ve spermatolojiyi doğrudan etkilemek için kullanılmaktadır (Chen et al., 1993; Ball et al., 2001; Funahashia and Sao, 2005). Sperm dondurma için intrinsik

özelliklere sahip birçok kriyoprotektan (gliserol, dimetil sülfoksit, glikol) denenmiş, ancak en çok kullanılanı çözüldükten sonra en iyi koruyan gliserol olduğu saptanmıştır. Seyreltme katılım oranları % 4 ile 7 arasında değişmektedir. 37°C'de tek adımda gliserol eklenmesi, diğer ekleme yöntemlerine kıyasla en uygun sonuçları vermektedir. Gliserol, DMSO, 1,2-propandiol gibi hücreye nüfuz eden kriyoprotektanlar sadece hücresel su kaybını ve çözünen madde hasarını azaltmakla kalmaz, aynı zamanda buz kristallerinin oluşmaması için su tutarak donmanın etkilerini de azaltmaktadır.

Teke spermi dondurmak için seyreltme sıvılarına gliserol eklenmesinin amacı, buz kristallerinin oluşumunu önlemektir. Buz kristallerinin oluşumunu tamamen önlemek için seyrelticilere %30'dan fazla gliserol eklenmelidir. Etilen glikol ve propilen glikol, teke spermine gliserolden daha az koruyucudur. Bu nedenle, gliserol, seminal sıvıyı dondurmak için kullanılan birincil kriyoprotektandır (Leboeuf et al., 2000; Purdy, 2006).

Teke sperminin dondurulması için birçok farklı hacim artırıcı denenmiştir. En yaygın olarak kullanılanlar, temel bileşenler olarak süt, yumurta sarısı veya ikisinin bir kombinasyonunu içeren seyrelticilerdir. Özel yumurta sarısı ve süt spermi soğuk şokundan koruduğu için tercih edilmektedir (Memon et al. 1985). Sperma kalitesi ve fertilitesi göz önüne alındığında, en etkili ideal sperma sulandırıcı yoktur, ancak modifiye süt, sodyum sitrat glikoz yumurta sarısı, laktoz, rafinoz yumurta sarısı, spermazol-sarısı IVT (Illini Değişken Sıcaklık) – yumurta sarısı, teke spermini dondurmak için çalışılmıştır. Çözülme sonrası canlılık ve doğurganlık değerlendirmesi, seyrelticiler arasında önemli bir farkla sonuçlanmamıştır. En yaygın olarak kullanılan hacim artırıcı maddeler, yağsız süt-glikoz (Corteel, 1977) ve trisitat-glikoz yumurta sarısıdır (Salamon and Ritar, 1982).

Teke spermi dondurulurken, yumurta sarısı ve ilave edilen sütün sperm üzerinde zararlı bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu etki; yumurta sarısındaki lesitin, seminal plazmadaki fosfolipaz A2 enzimi ve sütün seyreltici bileşeni ile ve ayrıca SBUIII adı verilen bulbourethral bazın bir protein fraksiyonu ile spermin donma ve donmadan hayatta kalmasını önlediği rapor edilmiştir. Akrozom reaksiyonuna ve hücre kromatin ayrışmasına neden olmaktadır (Pellicer et al., 1997). Gözlenen olumsuz etkileri ortadan kaldırmak için spermin yıkama yoluyla plazmadan ayrılması gerektiği bildirilmiştir (Leboeuf et al. 2000). Ancak bazı

araştırmacılar, yıkamanın vakit alıcı bir işlem olduğunu, yıkama sırasında bazı faydalı seminal plazma bileşenlerinin kaybolduğunu ve yıkamadan çözdürdükten sonra dondurmanın diğer uygulamalara kıyasla sperm kalitesinde bir fark olmadığını iddia etmektedir (Ritar and Salomon, 1983; Villemure et al., 2003).

2.3.2. Teke spermasının dondurulmasında başarıyı etkileyen faktörler

Teke spermasının dondurulmasını etkileyen çok faktör vardır. Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

- a) Sperm dondurma işlemi sırasında steril veya reproduktif erkeklerin kullanımı,
- b) Seminal plazma izolasyonu, yıkama yöntemi, yıkama sırasında kullanılan yıkama solüsyonunun bileşimi, yoğunluğu, yıkama,
- c) Dondurma sırasında, çözücünün bileşimi ve yumurta sarısının varlığı,
- d) Gliserin yeniden oluşturma yöntemi, ilavesi ve konsantrasyonu,
- e) Süresi dondurmadan önce dengeleme,
- f) Saman veya pelet kullanarak mini (0.25 ml) veya orta (0.50 ml) dondurma yöntemleri,
- g) Donmuş spermin çözülmesi (Leboeuf et al., 2000).

2.3.3. Teke spermasının sulandırılması ve sulandırma oranı

Sperm bir veya iki adımda sulandırılabilir. Bifazik seyreltmede sperm erkekten alındıktan sonra kriyoprotektansız sulandırıcı ile solüsyonun son hacminin yarısı karıştırılır ve ardından 5°C'de kriyoprotektanlı sulandırıcı birinci hacme eklenmektedir. Çözelti hazırlama ve tohum seyreltme kolaylığı için tek aşamalı seyreltme tercih edilmektedir (Evans and Maxwell, 1987).

Optimum dölleme dozunu elde etmek için sperm seyreltme hızı önemlidir. Seyreltme işlemi 1:1 ile 1:23 (sperm:seyreltici) oranında gerçekleştirilebilmektedir (Purdy, 2006). Bazı araştırmacılar, ml başına 80×10^6 ile 500×10^6 sperm içeren örneklerden dondurma ve başarılı dölleme oranları bildirmişlerdir (Ritar and Salomon, 1983; Ritar et al., 1990). Servikal tohumlama için kullanılan donmuş spermin, tohumlama dozu başına yaklaşık 200×10^6 milyon hareketli sperm, serviks yoluyla intrauterin tohumlamada 60×10^6 milyon ve intrauterin tohumlamada (laporoskop) 20×10^6 milyon hareketli sperm içerdiği söylenmektedir (Evans and Maxwell, 1987).

2.3.4. Teke spermasını dondurma yöntemleri

Sperma (1,5-4,0 saat) $4-5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ekilibrazyondan sonra pelet şeklinde dondurma işlemi yapılmaktadır. Standart şartlarda sperma içeren peletler sıvı nitrojen buharında sıvı nitrojenden 4-5 cm yukarıda 7 ile 8 dakika yatay olarak tutulur ve bu süre sonunda sıvı nitrojene yerleştirilmektedir. Fransa'da pipetlerin önce sıvı nitrojenin 16 cm üzerinde 2 dakika, ardından 4 cm sıvı nitrojen üzerinde 3 dakika tutulması tavsiye edilmektedir. Donma hızı, payetlerin sıvı nitrojen seviyesinden uzaklığına ve payetlerin boyutuna bağlı olarak değişebilmektedir (Evans and Maxwell, 1987; Leboeuf et al., 2000).

Yöntemde peletler kuru buz üzerinde (-79°C 'de) dondurulduktan sonra sıvı nitrojene aktarılmaktadır. -79°C 'de dondurma hızı, pelet hacmine bağlı olarak değişebilmektedir. Payet veya peletteki sperm hacmi, pıhtılaşma hızı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Ancak, donma ve çözülme sonrasında canlılık etkilenmemiştir. Pipetlerin önceden soğutulmuş bir ızgara veya delikli metal yüzeyinde dondurulmasının, yalnızca 2 noktalı temas sağlayan bir yöntemden daha etkili sonuçlar gösterdiği söylenmektedir.

Bu durumda çok noktalı teması sağlayan rafın ani donmayı önleyerek veya azaltarak sıcaklık dalgalanmalarını önlemesinden kaynaklandığı söylenmektedir (Ritar et al., 1990). Pelet yönteminin payetten daha iyi olmasına ve payet yönteminin daha fazla vakit gerektirmesine rağmen, çözülme sonrası kapasite ve doğurganlık düzeyi göz önüne alındığında, payet dondurma tercih edilen yöntemdir (Corteel, 1981).

2.3.5. Teke spermasının çözündürülmesi

Çözöldükten sonra en etkili verimi elde etmek için farklı çözölme süreleri ve sıcaklıkları önerilmektedir. Dondurulmuş spermin payet formunda 37°C'de 30 saniye çözölmesi kabul edilebilir doğurganlık bulguları vermiştir (Salamon and Ritar, 1982). Deka and Rao (1987) yaptıkları araştırmada en etkili sonuçları 37°C'de 30 saniyede elde etmişlerdir. Tuli et al. (1991), Boer tekeleri ile yaptığı bir çalışmada, payetin 70°C'de 7 saniye eritilmesinin, 37°C'de 2 dakika ve 0°C'de 20 saniyeden daha iyi olduğunu bulmuştur. Ancak saha koşullarında suni tohumlama için 37°C'de 30 saniyede çözöürmenin daha uygun olduğu unutulmamalıdır. Bu, çözölen spermin aşırı ısınmasını önlemektedir.

2.4. Çiftlik Hayvanlarında Bütil Hidroksitolüen ve Spermatozoa Fonksiyonları

Günümüzde tüm evcil hayvanlarda yapay tohumlama daha fazla önem kazanmaktadır. Genetik olarak üstün erkekler, yoğun yapay tohumlama programları yoluyla türün genetik potansiyelini geliştirmek için kullanılabilir. Keçi yetiştiriciliğinde artan süt, kıl ve et talebini karşılamak için büyük ölçekli yapay tohumlama programı şarttır. Yapay tohumlamanın seleksiyon tepkisini optimize etmede ve üstün tekelerin genlerini yaymada çok faydalı olduğu kanıtlanmış ve özellikle yoğun üretim sistemlerinde kullanılmıştır. Spermatozoa, ortam sıcaklıklarında üreme sistemi dışında yalnızca kısa bir hayatta kalma süresine sahiptir; bununla birlikte, büyük ölçekli bir yapay tohumlama programı için spermatozoanın uzun süre korunması arzu edilmektedir. Bu da kriyoprezervasyon tekniğinin geliştirilmesi ve tanıtılmasıyla sağlanabilir (Khalifa et al., 2008).

Yapay tohumlamanın başarısı, donmuş spermanın kalitesine bağlıdır ve bu da sperm dondurma için kullanılan sulandırıcıya bağlıdır. Gebe kalma oranı, spermanın uygun şekilde toplanmasına ve korunmasına bağlı olduğundan (Leboeuf et al., 2000) ve kriyoprezervasyona bağlı lipid peroksidasyonundan etkilendiğinden, keçi yapay tohumlamada başarı sınırlıdır (Bailey et al., 2000; Khalifa et al., 2008; Raheja et al., 2018). Dondurulmuş sperma ile yapay tohumlamada doğurganlığın azalmasına neden olan en önemli faktörlerden biri dondurma ve çözme işlemleri sırasında spermilerin oksidatif hasarıdır.

Tekelerde sperm hücresi plazma zarı özellikle çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengindir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin bu baskınlığı, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi nedeniyle spermleri peroksidasyona karşı oldukça duyarlı hale getirmektedir (Raheja et al., 2018). Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyon (O_2^-) ve hidroksil radikali (OH^-) dahil olmak üzere reaktif oksijen türlerinin, metabolizma sırasında canlı hücrelerde fizyolojik olarak üretildiği iyi bilinmektedir (Alvarez and Storey, 1992; Lasso et al., 1994).

Spermatozoa zayıf antioksidanlara sahiptir ve kriyoprezervasyon işlemi lipid peroksidasyonuna duyarlılığı artırmaktadır (Foote et al., 2002). Serbest radikallerin lipid peroksidasyonunda rol aldığı, ayrıca sperm motilitesinin azalmasına veya hücre ölümüne yol açabilecek DNA ve sperm membran hasarlarında rol oynadığı bilinmektedir (Uysal et al., 2007). Ancak kriyoprezervasyonun boğa spermi glutatyonunu ve süperoksit dismutaz aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (Aitken, 1994; Bailey et al., 2000).

Hidrojen peroksit ve lipid peroksil radikalleri, plazma membranlarını serbestçe geçme yeteneğine sahip, enzimatik aktiviteleri ve hücresel fonksiyonları inhibe eden, dolayısıyla spermatozoanın antioksidan savunmasını azaltan öldürücü oksijen türleridir (Aitken, 1994). Spermanın dondurularak saklanması, lipid peroksidasyonu nedeniyle spermatozoa için zararlı olan reaktif oksijen türleri ürettiği (Watson, 2000) iyi bilinmektedir (Chatterjee and Gagnon, 2001). Spermadaki fazla miktarda reaktif oksijen türünün sperm motilitesini durdurduğu, sperm-yumurta füzyonunu engellediği ve sperm DNA hasarına neden olduğu açıkça gösterilmiştir (Kessopoulou et al., 1995).

Dondurularak saklanan spermanın kalitesi genellikle taze teke spermasından daha düşüktür (Ritar and Salamon, 1983) ve taze boğa spermiyle karşılaştırıldığında eşdeğer döllenme oranına ulaşmak için tohumlama dozunda sekiz kat daha fazla spermatozoa sayısı gerektirmektedir (Shannon and Vishwanath, 1995). Önceki çalışmalarda kriyoprezervasyon prosedürünün spermatozoanın morfoloji, biyokimyasında kafa boyutunu küçültme, membran yapısını ve lipid kompozisyonunu değiştirme gibi bazı değişikliklere yol açabileceği belirtilmiştir (Gravance et al., 1998).

Alvarez and Storey (1992), çözündürülmüş spermatozoanın kalitesinin reaktif oksijen türleri gibi oksidanlardan etkilendiğini belirtmişlerdir. Ayrıca bu maddeler, solunum sırasında canlı hücrelerde fizyolojik olarak (Bamba and Cran, 1992), anormal veya ölü sperm ve hem ejakulat hem de dişi üreme sisteminin fagositik hücreleri tarafından üretilmektedir (Killian et al., 1989). Dondurma ve çözme işlemleri, reaktif oksijen türlerinin üretimi nedeniyle spermatozoaya zarar verebilir ve bu da sperm zarının lipid peroksidasyonuna yol açarak spermin hareketliliğini, canlılığını ve doğurganlığını kaybetmesine neden olabilir (Bucak et al., 2007).

Reaktif oksijen türleri (ROS), sperm kalitesini düşürmekte ve oositi dölleyemez hale getirmektedir (Mammoto et al., 1996). Sperm DNA'sı ve erkek pronükleuslarının dölleme sonrası gelişimi üzerinde zararlı etkileri vardır (Aitken et al., 1993). Ayrıca, ROS spermde motilite, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu engellediği ve inhibitör etkilere esas olarak spermatozoal membranın lipid peroksidasyonu için aracılık ettiği gösterilmiştir (Aitken, 1995). Koç ve boğa spermatozoasının ölümünü takiben aromatik bir amino asit oksidazın aktivasyonu, bu hayvanların spermasında ROS'in üretiminin ana kaynağı olarak tanımlanmıştır (Upreti et al., 1998).

Spermada reaktif oksijen türlerinin üretimini engelleyen seminal plazmadaki doğal antioksidanlar aracılığıyla antioksidan kalitesini düşürse de spermanın uzaması nedeniyle donmuş spermanın fonksiyonel antioksidan seviyesi azalmaktadır. Bu durum, donmuş sperma teknolojisinde sulandırıcılara ek antioksidanların dahil edilmesini gerektirmektedir. Bu nedenle, dondurarak saklamada sperma sulandırıcıya sentetik antioksidanların eklenmesi, genellikle spermatozoon fosfolipitlerinin, özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu inhibe etmek için uygulanmaktadır.

Antioksidanlar, bağımsız radikaller sebebiyle oksidatif streslere karşı asıl koruma faktörlerden biridir (Silva et al., 2011). Antioksidanlardan iki tür vardır: enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar (Kefer et al., 2009). Doğal antioksidanlar olarak da bilinen enzimatik antioksidanlar arasında glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (Alvarez and Storey, 1989) yer almaktadır. Bunların tümü, spermin doğal antioksidan savunma sistemine katılmaktadır (Partyka et al., 2012).

Sentetik antioksidanlar ya da enzimatik olmayan antioksidanlar arasında ürat, E vitamini (a-tokoferol), askorbik asit, karotenoidler, ubikinonlar, taurin ve hipotaurin, selenyum, çinko bulunmaktadır (Therond et al., 1996). Bu nedenle, koruma sürecine bir antioksidan dahil edilirse, bu tür antioksidan ajanların eklenmesinden sonra sperma kalitesinin artması beklenmektedir. Vitamin, katalaz, taurin, hipotaurin dimetilsülfoksit, Nasetilsistein ve bütül hidroksitoluen gibi antioksidan ajanların insan (Alvarez and Storey, 1992), boğa (Bilodeau et al., 2001), aygır (Ball et al., 2001) ve tavşan (Abd-El-Salaam, 2002) spermasında bazı tartışmalı etkinlik ve başarı sonuçları ortaya çıkarmıştır.

Memelilerde seminal plazma, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi bir dizi antioksidan bileşen ve C ve E vitaminleri, hipotaurin, taurin ve albümin gibi serbest radikal süpürücüler içermektedir (Zini et al., 2002). Yapay tohumlamadaki ilerlemeyle birlikte, sperma tek bir ejakülattan maksimum sayıda doz üretecek şekilde seyreltilir, ancak bu uygulama spermadaki doğal antioksidan bileşenlerin konsantrasyonunu azaltarak spermi daha savunmasız hale getirmektedir. Bu, sperm kriyoprezervasyon sırasında hasara maruz kaldığında durumu kötüleştirmektedir. Bu nedenle, spermada normal antioksidan seviyelerini eski haline getirmek zorunlu hale gelmektedir.

Sulandırıcıya alfatokoferol gibi doğal antioksidanların dahil edilmesi, kriyoprezerve edilmiş boğa sperminin metabolik aktivitesi ve hücresel canlılığı üzerinde koruyucu bir etkiye sahiptir (Beconi et al., 1993). Vitamin E (a-tokoferol), hücre zarında bulunan ve membran lipidlerindeki yağ asidi yan zincirleri arasında reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu kovalent bağları kırabilen, oldukça güçlü zincir kırıcı lipofilik bir antioksidandır (Jeong, 2009). A-tokoferol, hem kriyoprezervasyonundan önce hem de sonra Ghezel ırkı koçların ileri yönlü hareketliliğini ve canlılığını iyileştirmiştir (AminiPour et al., 2013).

A-tokoferol, lipid radikallerini nötralize eden, E vitamininin en güçlü yağda çözünen antioksidan bileşimidir. Bu nedenle, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu etkilemeden, reaktif oksijen türleri ve lipid peroksidasyonuna karşı ana membran koruyucu ajanlardan biridir (Jeong, 2009). A-tokoferol, hücreleri hem in vivo hem de in vitro oksidatif hasardan koruyabilir (Wu et al., 1990). A-tokoferolün tavşan, at, sığır, yaban domuzu ve koç gibi çeşitli memelilerde sperma kalitesini iyileştirmeyi amaçlayan ilavesi tutarsız sonuçlara yol açmıştır (Hatamoto et al., 2006).

E vitamini, boğa spermatozoasının derin dondurulması sırasında (O'Flaherty et al., 1997) ve ayrıca 19°C'de muhafaza edilen sıvı domuz spermasında (Cerolini et al., 2000) plazma zarı bütünlüğü üzerinde koruyucu bir etki göstermiştir. Kalthur et al. (2011), kriyoprotektif ortama E vitamini (5.0 mM) ilavesinin, çözülme sonrası sperm hareketliliğini artırdığını ve normozoospermik ve astenozoospermik ejakulatlarda sperm DNA bütünlüğünü koruduğunu ve nihayetinde yardımcı üreme teknolojisi döngülerinde gebelik oranının artmasına yol açtığını göstermiştir.

Askari et al. (1994), E vitamininin hipo ozmotik şişme skorlarını ve çözülme sonrası motiliteyi hafifçe iyileştirdiğini göstermiştir. Ayrıca, 200 IM konsantrasyonda a-tokoferol takviyesi, lipid peroksidasyonunu azaltarak ve DNA parçalanmasını azaltarak, apoptoz genlerinin ekspresyonunu azaltarak spermi oksidatif strese karşı koruyabilir (Jeong, 2009). A-tokoferolün etkisi konsantrasyonuna göre değişebilir. Yüksek konsantrasyonlarda bir antioksidandan ziyade oksidasyon uyarıcısı olarak hareket edebilir (Minaei, 2012).

E vitamininin sentetik bir analogu olan bütil hidroksitolüen (BHT), peroksi radikallerini hidroperoksitlere dönüştürerek oto-oksidasyon reaksiyonunu kontrol etmektedir. BHT, hem hindide sıvı spermayı korumak için (Donoghue and Donoghue, 1997), hem de koçta (Watson and Anderson, 1983), domuzda (Roca et al., 2004), boğalarda (Shoae and Zamiri, 2008) ve teke spermatozoası (Khalifa et al., 2008) soğuk şoku hasarını en aza indirmek için başarıyla test edilmiştir. Spermatozoa, donma ve çözülmenin neden olduğu oksidatif stres nedeniyle lipid peroksidasyonuna duyarlı olan yüksek konsantrasyonlarda çoklu doymamış yağ asitleri içermektedir. Ayrıca, seminal plazmanın antioksidan sistemi ve spermatozoa, sperma işleme sırasında tehlikeye girmektedir (Alvarez and Storey, 1992).

Bu nedenle, eksojen antioksidanların dahil edilmesi, spermanın antioksidan sistemini modüle edebilmektedir. Sperma sulandırıcıya BHT eklenmesinin koç (Watson and Anderson, 1983), hindi (Donoghue and Donoghue, 1997), domuz (Roca et al., 2004), boğa (Shoae and Zamiri, 2008) ve teke (Khalifa et al., 2008; Dewry et al., 2020) spermatozoa kalitesini iyileştirdiği bildirilmiştir. BHT'nin koçta (Watson and Anderson, 1983), domuzda (Roca et al., 2004), tekede (Khalifa et al., 2008), boğada (Shoae and Zamiri, 2008), mandada (Ijaz et al., 2009) ve köpekte (Neagu et al., 2010) donmuş spermlerin korunmasında faydalı etkisinin yanı sıra, teke

spermatozoaları üzerindeki açıklayıcı etkisi hala bir tartışma konusudur. Diğer yandan bugüne kadar Saanen tekelerinde herhangi bir literatür mevcut değildir.

BHT'nin koruyucu mekanizması için iki mekanizma önerilebilir; biri spermatozoal membrana dahil olur ve zarın akışkanlığını arttırarak onu korumaktadır. Alternatif olarak, lipit peroksil radikallerini hidroperoksitlere dönüştürerek zarar verici aktivitesini önlemektedir (Aitken and Clarkson, 1988). Sulandırıcı bileşenler ve antioksidanlar arasındaki etkileşim, bir antioksidanın etkinliğini değerlendirirken göz önünde bulundurulması gereken bir diğer önemli faktördür. Lipitte çözünür olan daha fazla BHT'nin yumurta sarısı lipidleriyle ilişkili kalması ve sperm plazma zarına nüfuz edebilen düşük konsantrasyonda serbest BHT molekülü bırakması mümkündür (Killian et al., 1989).

Graham and Hammerstedt (1992), BHT analoglarının ilave edilmesinin, yumurta sarısı olmayan seyrelticilerde saklanan spermlerin hareketliliğini, yumurta sarılı seyrelticilerde saklananlara kıyasla azalttığını bildirmiştir. Bu, BHT veya analoglarının spermatozoayı kriyohasardan korumada yumurta sarısı ile sinerjistik olarak etkileşime girdiğini göstermektedir. Bu gerçek, optimal dondurularak teke sperması saklanması için yumurta sarısı bazlı sperma seyrelticilerde 5,0 mM BHT konsantrasyonunda ve yumurta sarısı içermeyen seyrelticilerde 0,3 mM BHT konsantrasyonunda sağlandığını belirten Khalifa et al. (2008) tarafından da desteklenmektedir.

Ijaz et al. (2009), daha yüksek BHT konsantrasyonunun (3,0 mM) spermatozoa kalitesini düşürdüğünü bildirmiştir. Daha yüksek BHT konsantrasyonlarının insan (Aitken and Clarkson, 1988), domuz (Roca et al., 2004), boğa (Shoae and Zamiri, 2008) ve teke (Khalifa et al., 2008) spermatozoası için toksik olduğu gösterildiğinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Fizyolojik sınırlar içinde ROS üretimi, hiperaktivasyon, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi spermlerin fizyolojik fonksiyonları ile ilişkilidir (Aitken, 1995). Bununla birlikte, antioksidanların daha yüksek konsantrasyonlarda ilave edilmesi, ROS ile indüklenen oksidatif strese karşı koyabilir ve böylece spermatozoanın ROS ile ilişkili fonksiyonlarını engelleyebilmektedir (Roca et al., 2004). Ek olarak, daha yüksek BHT konsantrasyonları, plazma zarının akışkanlığını istenen noktanın üzerine çıkarabilir ve spermleri akrozomal hasara daha yatkın hale getirebilmektedir (Shoae and Zamiri, 2008).

BHT konsantrasyonu, seyrelticilere dahil edilirken dikkate alınması gereken bir diğer önemli faktördür. BHT'nin farklı konsantrasyonları (0,5-3,0 mM) test edilmiş ve boğa spermine 1,0-2,0 mM BHT'nin eklenmesiyle optimal sonuçlar elde edilmiştir (Ijaz et al., 2009). Optimal BHT konsantrasyonunun hayvan türlerine bağlı olduğu görülmektedir. Örneğin, optimal BHT konsantrasyonu domuz sperması için 0,05-2,0 mM (Bamba and Cran, 1992) ve 0,2-1,6 mM (Roca et al., 2004) ve boğalar için 0,5-1,0 mM (Shoae and Zamiri, 2008) idi. Ijaz et al. (2009) tarafından, boğa sperması için önerilen düşük BHT konsantrasyonu, bu çalışmada kullanılan spermatozoa konsantrasyonuna (40 milyon/mL) atfedilebilir.

2.4.1. Bütil hidroksitolüen (BHT) ve teke spermatozoa fonksiyonları

Dewry et al. (2015), 2,0 mM E vitamini içeren Tris sulandırıcıda, 0,0, 5,0 ve 7,0 mM E vitamini içerene göre hem ekilibrazyondan sonra hem de dondurmadan sonra sperm motilitesi ve canlı sperm oranlarının önemli ölçüde ($P<0,01$) yüksek olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, 5,0 ve 7,0 mM E vitamini dozlarında kontrol grubundan daha düşükken, ekilibrazyondan sonra canlı sperm oranı 5,0 mM E vitamini ve kontrol arasında önemli ölçüde farklılık göstermemiştir. Lalramdintluanga (2012) tarafından teke spermasında da benzer sonuçlar bildirilmiştir. Sulandırıcıdaki 3,5 ve 4,5 mM E vitamini ile teke spermasında çözülme sonrası sperm motilitesinde önemli bir gelişme de söz konusudur (Saraswat et al., 2012).

Iqbal et al. (2015), BHT inklüzyonlarının sperm motilitesini olumsuz etkilediğini ($P<0,05$) bildirmiş ve maksimum sperm motilitesine 0,0 mM BHT ilavesi (kontrol grubu) ile ulaşılmıştır. Bununla birlikte, çözülme sonrası progresif motilitedeki bu fark istatistiksel olarak önemli değildir, ancak canlılık yanıtı, 2,0 ve 5,0 mM BHT konsantrasyonu içeren spermelerin canlılığının (%) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla; 59,00, 59,90 ve 54,40 olduğu belirlenmiştir.

Kontrol grubuna göre Akeel et al. (2011), sperm motilitesi, membran bütünlüğü, akrozom bütünlüğü ve canlılığının, muamele edilen tüm BHT gruplarında (0,5, 1,0, 2,0 ve 3,0 mM) önemli ölçüde ($P<0,05$) daha yüksek olduğunu göstermiş, ancak gruplar arasında morfoloji özelliklerinde önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Sperma sulandırıcıya 2,0 mM BHT eklenmesi, diğer gruplarla karşılaştırıldığında, sperm özelliklerinde genel bir gelişme göstermiştir. Khalifa et al. (2008), Damascus tekelerinin sperma sulandırıcılarına artan konsantrasyonlarda (0,6, 2,0 ve 5,0

mM) BHT eklenmesiyle saklanan spermilerin canlılık indekslerinin önemli ölçüde ($P<0,01$) iyileştiğini göstermiştir. Canlılık indeksinin maksimum değerine ($114,51\pm4,25$) spermatozoanın 5 mM BHT'ye maruz bırakılmasından sonra ulaşılmıştır. Ayrıca, seyrelticilere 0,3 veya 0,6 mM BHT eklenmesiyle korunmuş spermilerin canlılık indeksleri önemli ölçüde ($P<0,01$) artmıştır. Canlılık indeksinin yüksek değeri ($106,17\pm2,41$) spermanın 0,3 mM BHT ile muamelesinden sonra elde edilmiştir (Khalifa et al., 2008). Aksine, seyrelticilere depolama öncesi 5,0 veya 8,0 mM BHT ilavesi önemli ölçüde ($P<0,01$) korunmuş spermatozoanın canlılık indekslerinde açık bir azalmaya yol açmıştır. Ayrıca, 0,6 mM BHT ilave edilen spermilerin ortalama çözülme sonrası motilite oranı, kontrol ve 0,3 veya 0,9 mM BHT ile muamele edilen spermierinkinden önemli ölçüde ($P<0,05$) daha yüksektir. Ayrıca, 5,0 mM BHT ile yumurta sarısı bazlı sulandırıcıların eklenmesi, çözülme sonrası sperm motilitesinde dikkate değer bir ($P<0,05$) artışa neden olmuştur.

Dewry et al. (2015), 2,0 mM E vitamini içeren Tris sulandırıcıda, ekilibasyon ve dondurma sonrası canlı-bozulmamış akrozom yüzdesinin, 0,0, 5,0 ve 7,0 mM E vitamini içerenlere göre yüksek ölçüde ($P<0,05$) olduğunu bildirmiştir. Ayrıca 7,0 mM E vitamini için elde edilen sonuç (değer) kontrol ve 5,0 mM E vitamini için olduğundan daha düşüktür. Kontrol grubuyla kıyasla 2,0 mM E vitamini ilavesi ile kaydedilen önemli oranda daha yüksek canlı-bozulmamış akrozom yüzdesi, Lalramdintluanga'nın (2012) teke spermasında elde ettiği daha önceki bulgularıyla doğrulanmıştır. Benzer sonuçlara Saraswat et al. (2012), teke sperması için 4,5 mM E vitamini ile daha önceki bulgulara göre, çözülme sonrası bozulmamış akrozom insidansında önemli bir iyileşme bildirmiştir. E vitamininin akrozomal bütünlük üzerindeki etkisindeki farklılıklar, farklı çalışmalarda kullanılan E vitamini konsantrasyonu, sulandırıcının bileşenleri, muamele, dondurma ve çözme prosedürlerinin farklı olmasından kaynaklanabilmektedir. Bu, Tris bazlı sperma sulandırıcıya BHT (0,0, 2,0 ve 5,0 mM) ilave edilerek akrozomal bütünlüğün iyileştirildiği ($P<0,05$) Iqbal et al. (2015)'in sonuçlarıyla uyumludur. Akrozom bütünlüğündeki bu gelişme kademeliydi ve kontrole kıyasla Tris bazlı sperma sulandırıcıda hem 2,0 ($27,00\pm0,47$) hem de 5,0 ($27,70\pm1,76$) mM BHT'nin artan konsantrasyonlarının eklenmesiyle iyileştirilmiştir ($P<0,05$) ($20,30\pm1,05$) (Iqbal et al., 2015).

Ekilibasyon ve dondurmadan sonra hipoototik şişme testi (HOST) ile reaksiyona giren ortalama sperm, 2,0 mM E vitamini içeren Tris sulandırıcıda, diğer E vitamini ve kontrol grubu konsantrasyonlarını içerenlere göre önemli ölçüde ($P<0,05$) daha yüksek ve E vitamini

konsantrasyonları arasında önemli ölçüde ($P<0,05$) farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Dewry et al., 2015). Kontrol grubuna ($39,50\pm3,68$) göre 2,0 mM ($42,30\pm3,74$) ve 5,0 mM ($42,80\pm2,78$) BHT ilavesinde pozitif HOST yanıtı bildiren Iqbal et al. (2015) tarafından da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Öte yandan, Lalramdintluanga (2012) ve Saraswat et al. (2012) tarafından, E vitamini ilavesinin teke spermasındaki HOST ile reaksiyona giren spermin, çözülme sonrası yüzdesi üzerinde önemli bir etkisi olmadığı rapor edilmiştir. Khalifa et al. (2008), 0,6 mM BHT içeren, ancak yumurta sarısı içermeyen sulandırıcılarla elde edilen doğum oranının (%53,75), yumurta sarısı bazlı sulandırıcılarla elde edilenden (%38,57) daha yüksek olduğunu belirtmiştir.

2.4.2. Bütil hidroksitolüen (BHT) ve koç spermatozoa fonksiyonları

María Jesús Palomo et al. (2017)'nin bildirdiğine göre, seminal plazmanın varlığına veya yokluğuna bakılmaksızın, 5,0 mM BHT içeren sulandırıcı ile sulandırılan ve korunan yıkanmış spermde diğer muamele gruplarına göre önemli ölçüde daha yüksek sperm kinetik parametre değerleri saptanmıştır. Ayrıca, çözündürülmüş sperm kinetiği üzerinde 5,0 mM BHT ile korunan yıkanmamış nativ spermadan TM, VCL ve STR'de elde edilen değerler dışında ve antioksidan içermeyen yıkanmamış spermada elde edilenlerden farklı olmayan intermedia değerleri tespit edilmiştir. Ayrıca, tüm dondurma işlemleri arasında ALH ve BCF değerlerinde önemli bir fark bulunmamıştır. Çözdürme sonrası sperm örneklerinin akış sitometrik analizleri, hareketlilik analizinde görüldüğü gibi plazma, akrozomal membran bütünlüğü ve mitokondriyal aktivite üzerinde benzer bir eğilim göstermiştir (María Jesús Palomo et al., 2017).

Antioksidan içermeyen yıkanmamış nativ spermada en düşük canlılık oranı gözlenirken, 5,0 mM BHT ilave edilen sulandırıcıda saklanan yıkanmış spermada, eklenen seminal plazmanın varlığı veya yokluğundan bağımsız olarak diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek canlılık saptanmıştır (María Jesús Palomo et al. 2017). Benzer sonuçlar Anghel et al. (2010) tarafından koç spermasında da rapor edilmiştir. Anghel et al. (2009) ve Anghel and Stela (2010) koçlarda E vitamini takviye edilmiş sulandırıcıda dondurulduktan sonra daha yüksek sperm membran bütünlüğü bildirmişlerdir. Bununla birlikte, koç sperması için 0,1 veya 1,0 mM konsantrasyonda E vitamini eklenmesiyle çözülme sonrası akrozomal bütünlükte önemli bir gelişme bildirilmemiştir (Anghel et al., 2009).

Farshad et al. (2010), koç spermasının seyreltilmesinden sonra deneme ve kontrol grubu sulandırıcı arasında önemli bir fark olmadığını göstermiştir. Ancak sonuçlar 2,0 ve 3,0 mM BHT içeren sulandırıcıların diğer BHT konsantrasyonlarından ve kontrol seyrelticişinden biraz daha iyi olduğunu göstermiştir. Soğutmadan sonra BHT seviyelerinin etkileri, sulandırıcılar 2,0 ve 3,0 mM BHT içerdğinde önemli ölçüde ($P<0,01$) daha iyi değerlerin elde edildiğı sulandırıcılara ilave BHT seviyeleri ve artan BHT ile önemli ($P<0,01$) gelişme göstermiştir.

Ayrıca en yüksek sperm motilitesi ($76,25\pm0,85$), progresif motilite ($70,25\pm0,96$), canlılık ($80,31\pm0,84$) ve membran bütünlüğü ($76,47\pm1,34$) 2,0 mM BHT için gözlenirken 0,5 mM BHT konsantrasyonu için en düşük değerler (sırasıyla; $72,28\pm0,75$, $64,56\pm0,88$, $75,39\pm0,72$ ve $72,90\pm1,05$) gözlenmiştir. Ancak 0,5 veya 1,0 mM BHT varlığında anlamlı farklar yoktur ($P>0,05$). Değerlendirilen sperma özellikleri üzerinde dondurulup çözüldükten sonra BHT takviyesinin farklı konsantrasyonları arasında, sonuçlar 0,5 veya 1,0 mM BHT içeren sulandırıcılar arasında önemli ($P<0,05$) fark göstermiştir. En yüksek çözdürme sonrası sperm motilitesi (%) ($52,25\pm1,02$), progresif motilite ($45,37\pm1,05$), canlılık ($59,43\pm1,24$) ve membran bütünlüğü ($54,36\pm1,32$) 2,0 mM BHT'de gözlenirken en düşük değerler (sırasıyla; $41,37\pm0,76$, $33,34\pm0,78$, $47,12\pm0,86$ ve $38,58\pm0,82$) 0,5 mM BHT için gözlenmiştir (Farshad et al., 2010).

Koç spermasının kısa süreli saklanması (72 saat süresince) BHT ilavesinin spermatozoa motilitesi üzerine etkili olmadığı gözlenmiştir. Anormal spermatozoa oranları, antioksidan içeren iki grupta kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Canlı spermatozoa oranı, membran bütünlüğü sağlam spermatozoa ve akrozom reaksiyonuna giren spermatozoa oranları bakımından 0 ile 72. saatler arasında antioksidanların istatistiksel olarak önemli farklılıklar oluşturmadığı saptanmıştır. Bu çalışmada, 5°C'de 24 saat muhafaza edilen sperma örnekleriyle laparoskopik yöntemle intrauterin olarak yapılan tohumlamalardan elde edilen gebelik oranları BHT grubunda %50 kontrol grubunda ise %40 bulunmuştur. BHT'nin ve kontrol grubuna göre gebelik oranları, üzerine oransal olarak olumlu bir katkı sağladığı gözlenmekle birlikte gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Ceylan vd., 2013).

2.4.3. Bütıl hidroksitolüen (BHT) ve manda boğası spermatozoa fonksiyonları

Nain et al. (2023), Murrah manda boğa spermatozoasında sperm motilitesini kontrol (0,0 mM BHT) ile 0,5, 1,0 ve 2,0 mM BHT grupları arasında önemli ($P<0,05$) farklılık olduğunu göstermiş ve 5,0 mM BHT grubunun sperm motilitesi açısından en iyi sonuçları gösterdiğini bildirmiştir. Sperm canlılığı ve zar bütünlüğü için de benzer bir eğilim görülmüştür.

Ijaz et al. (2009), manda sperma sulandırıcısına artan konsantrasyonlarda BHT (0,5, 1,0, 2,0 ve 3,0 mM) eklenmesiyle, çözölmüş spermatozoanın hareketliliğinin ve akrozomal bütünlüğünün iyileştirildiğini ($P<0,05$) göstermiştir. Spermatozoanın maksimum motilitesi ve akrozomal bütünlüğü 1,0 ve 2,0 mM BHT ile elde edilirken spermanın hipo-ozmotik şişme tepkisi ve canlılığı 1,0 ve 2,0 mM BHT'nin eklenmesiyle iyileştirilmiştir ($P<0,05$). Hipo-ozmotik şişme ve canlılık için en yüksek değerler 2,0 mM BHT konsantrasyonunda elde edilmiştir. Aksine, sperma sulandırıcıya 3,0 mM BHT eklenmesi, 1,0 ve 2,0 mM BHT'ye kıyasla spermatozoanın motilitesini, akrozomal bütünlüğünü, hipo-ozmotik şişme tepkisini ve canlılığını azaltmıştır ($P<0,05$) (Ijaz et al., 2009).

Asmaa Mostafa et al. (2019), kontrol grubuna kıyasla 1,0 ve 1,5 mM/mL BHT ile TCFYG sulandırıcıda soğutulan spermada 1,5 mM/mL kullanımıyla daha iyi sonuçlara ulaşarak progresif motilitenin ve sperm canlılığının arttığını ($P<0,05$) belirtmiştir. Ayrıca kontrol ile karşılaştırıldığında, sperm morfolojisi, intakt akrozom ve plazma membran bütünlüğü sırasıyla; 1,0 mM/mL BHT ile iyileştirilmiştir ($P<0,01$). Lecithin (TCFGL) sulandırıcı ile soğutulan sperma, 0,5 mM/mL BHT ile tris-citrate-fructose yumurta sarısı glycerol (TCFYG) sulandırıcı ile karşılaştırıldığında daha iyi sperma kalitesi sergilemiştir (Asmaa Mostafa et al., 2019). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, sırasıyla; 1,0 ve 0,5 mM/mL'lik BHT konsantrasyonlarında, 1,0 mM/mL'de üstün olmak üzere progresif motilite iyileştirilmiştir ($P<0,05$). Kontrol ile karşılaştırıldığında, 0,5 mM/mL BHT ile sperm canlılığı, sperm morfolojisi, sağlam akrozom ve zar bütünlüğü iyileştirilmiştir.

Asmaa Mostafa et al. (2019), TCFYG TCFGL ile, TCFGL TCFYG'de dondurulan numunelerle karşılaştırıldığında, çözölme sonrası sperm kalitesinin daha yüksek BHT seviyelerinde iyileştirildiğini bildirmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sperm progresif

motilitesi 1,5 mM/mL BHT'de düzelmiştir. Ayrıca canlılık, morfoloji, bozulmamış akrozom ve membran bütünlüğü 2,0 mM/mL BHT'de önemli ölçüde ($P<0,01$) iyileştirilmiştir. 2,5 mM/mL BHT kullanımı ile progresif motilitesi, canlılığı, morfolojisi kontrol ile karşılaştırıldığında azalmıştır.

TCFGL'de uzatılan çözülme sonrası kontrol numuneleri ile karşılaştırıldığında, sperm motilitesi, canlılığı ve morfolojisi, 1,5 mM/mL BHT ve ardından 1,0 mM/mL kullanımı ile daha yüksek bulunmuştur ($P<0,01$). Bozulmamış akrozom ve zar bütünlüğü, 0,5 mM/mL'de önemli ölçüde ($P<0,01$) iyileştirilmiştir. Bu üç sperma değişkeni, 1,5 mM/mL'nin üzerindeki BHT konsantrasyonlarındaki artışla büyük ölçüde azalmıştır ($P<0,01$). 0,5 mM/mL konsantrasyonunun kullanılması, kontrole kıyasla hem intakt akrozom hem de plazma membran bütünlüğünü önemli ölçüde artırmış, ancak BHT konsantrasyonları arttıkça azalmıştır (Asmaa Mostafa et al., 2019). Benzer sonuçlar, 0,0 mM BHT hariç dimetilsülfoksit (DMSO) dahil diğer gruplara göre 2,0 mM BHT'de daha yüksek ($P<0,05$) sperm motilitesi kaydeden Wadood et al. (2016) tarafından elde edilmiştir. Bu arada, 2,25 mM BHT'de, spermatozoa canlılığı oranları, daha yüksek BHT seviyesinde iç organellerin zarar görmesi nedeniyle sırasıyla; 1,75 mM ve 2,0 mM BHT'ye göre daha düşüktür ($P<0,05$). Ayrıca, 0,0, 2,0 mM BHT ve DMSO grubuna kıyasla 2,25 mM'de daha yüksek DNA hasarı kaydedilmiştir.

BHT ilave edilen gruplarda DMSO ve 0,0 mM BHT ile karşılaştırıldığında daha düşük bir lipid peroksidasyonu da kaydedilmiştir (Wadood et al., 2016). Bunun nedeni, aşırı antioksidan normal spermatozoa fonksiyonu için gerekli kabul edilen oksidanların fizyolojik seviyesini azalttığı için BHT'nin toksik etkileri olabilir (Roca et al., 2004). Ayrıca, daha yüksek BHT konsantrasyonları, son olarak plazma zarı akışkanlığını artıran çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) spermatozoa zarındaki oksidasyon hızını azaltarak spermleri kriyo-yaralanmaya karşı savunmasız hale getirmektedir (Shoae and Zamiri, 2008).

Shoae and Zamiri (2008), boğa spermasında 0,5-1,0 mM BHT ilavesinin 2,0 mM'den daha yüksek spermatozoa hareketliliği gösterdiğini bildirmiştir. Spermatozoa motilitesindeki bu farklılık, kriyoprezervasyon sırasında boğalara göre manda spermasında daha yüksek lipid peroksidasyonundan sorumlu olan PUFA'nın daha yüksek manda plazma membran içeriğine bağlı olabilir. Antioksidanların, spermatozoa plazma zarının lipid peroksidasyonuna neden olan

ROS moleküllerini temizleyerek spermatozoa hareketliliğini koruduğu ileri sürülmektedir (Bucak et al., 2008). Yüksek ROS'a bağlı membran hasarı ayrıca spermatozoa akrozomu ve mitokondri hasarına neden olur ve motilite, spermatozoa mitokondrilerinin ATP içeriğine bağlı olduğundan, sonuçta spermatozoa hareketliliğini olumsuz etkiler (Perchek et al., 1995).

Spermatozoa zarının gelişmiş akışkanlığı, zardaki iyonik kanalların/ATPazlar'ın işlevini zayıflatır ve bu da besinlerin spermatozoaya girişi bozulduğundan sonuçta spermlere zarar vermektedir. Ayrıca, yüksek PUFA içeriği nedeniyle manda sperması dondurarak saklama sırasında daha yüksek oksidatif stres, DNA hasarına neden olur (Aitken and Krausz, 2001). Spermatozoa kromatininin aşırı sıkışması, DNA zincirlerini kıran oksidatif stres (Lewis and Aitken, 2005) nedeniyle oluşmaktadır (Cordova et al., 2002). Kırık DNA iplikçikleri olan spermatozoa, döllenme sırasında yoğunlaşmadığı için yumurta kanalına bağlanmaz ve bağlanırsa, döllenme başarısızlığına, zayıf embriyo büyümesine ve ölümüne neden olan kusurlu genomu iletmektedir (Sakkas and Alvarez, 2010). Benzer şekilde daha yüksek BHT konsantrasyonlarının toksik etkisi sırasıyla; Ijaz et al. (2009) ve Shoaie and Zamiri (2008) tarafından manda ve sığırlarda rapor edilmiştir.

Manda sperm membranları nispeten daha yüksek membran PUFA konsantrasyonlarına sahiptir ve peroksidatif hasara karşı daha hassastır (Chatterjee and Gagnon, 2001), bu nedenle; antioksidanlar, iyi sperma kalitesi ve doğurganlık ile ilişkili olan lipid peroksidasyonunu azaltmıştır (Chaudhari et al., 2008). BHT'nin çözülme sonrası sperma kalitesi üzerindeki olumlu etkisi, BHT'nin lipid çözünürlüğü nedeniyle plazma zarı akışkanlığını koruması gerçeğinden kaynaklanabilir (Khalifa et al., 2008).

 kincisi, BHT, E vitamininin sentetik bir analogudur ve reaktif oksijen türleri üretim zinciri kırıcısıdır ve temizleyici bir antioksidan değildir, bu nedenle ROS  retim sistemini etkilemeden plazma zarı bütünlüğünü korumaktadır (Sharma and Agarwal, 1996). BHT'nin pozitif etkisinin bir başka olası mekanizması, spermada virüsleri inaktive eden antiviral özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Shoaie and Zamiri, 2008).

2.4.4. Bütıl hidroksitolüen (BHT) ve boğa spermatozoa fonksiyonları

Akhil Patel et al. (2015), Haryana boğa spermatozoasında sperm canlılığının kontrol (0,0 mM BHT) ile 0,5 ve 1,0 mM BHT grupları arasında önemli ($P<0,05$) farklılık olduğunu göstermiş ve 1,0 mM BHT grubunun sperm canlılığı açısından en iyi sonuçları gösterdiğini bildirmiştir. Sperm hareketliliği ve zar bütünlüğü için de benzer bir eğilim görülmüştür.

Kontrole göre hem 0,5 hem de 1,0 mM BHT gruplarının her ikisinde de progresif motilite önemli ölçüde artmıştır ($P<0,05$) ve 1,0 mM BHT grubu, prosedürün üç aşamasının tümünde progresif motilite açısından en iyi sonuçları göstermiştir (sıcaklığın $5^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ 'da 4°C 'den -10°C 'ye, $40^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ 'da -10°C 'den -100°C 'ye, $20^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ 'da -100°C 'den -140°C 'ye düşürülmüştür). Sperm membran bütünlüğü, 1,0 mM BHT grubunda hem kontrol hem de 0,5 mM BHT grubu ile karşılaştırıldığında, sperma dondurmanın her üç aşamasında da önemli ölçüde ($P<0,05$) artmıştır (Akhil Patel et al., 2015).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Hayvan materyali

Tez çalışması, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Küçükbaş Hayvan Yetiştirme Ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, 1-2 yaş arasında ve 50-60 kg canlı ağırlık aralığındaki dört baş Saanen ırkı teke kullanılmıştır (Resim 3.1).



Resim 3.1. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Küçükbaş Hayvan Yetiştirme Ünitesi.

3.1.2. Çalışma alanı

Bornova (Enlem: 38.4333, Boylam: 27.15); İzmir'e 8 km uzaklıkta olup, kuzeyde Manisa ili ve Menemen ilçesiyle, doğuda Kemalpaşa ilçesiyle, batıda Bayraklı ve Konak ilçeleriyle ve güneyde ise Buca ilçesiyle komşudur (Resim 3.2). İlçe, çok eski bir yerleşim yeri olup 1881 yılında belediyeleşmiş, 1957 yılında da ilçe statüsüne kavuşmuştur (Bornova Kaymakamlığı, 2018). Yüzölçümü 220 km² olup yerleşim alanlarının deniz seviyesinden yüksekliği 20 ile 200 m arasında değişmektedir. Dağlık bölgelerde bu yükseklik 600 m ve üzerine çıkmaktadır.

İlçede Akdeniz iklimi hakim olup, ilçe topraklarında Akdeniz bitkilerinin tümüne rastlanmaktadır. 600 m'ye kadar olan yüksekliklerde kızılçam, daha yükseklerde ise karaçam ormanları bulunmaktadır. Ormanlık alanlar su yönünden zengin olup, Manda, Kavaklıdere, Şeytanderesi, Bornova ve Nif Çayı önemli akarsulardandır. Yamanlar Dağı üzerindeki İkizgöl, çam ormanları arasında önemli bir dinlenme alanıdır (Bornova Belediyesi, 2019). Yamanlar Dağı eteğinde kurulmuş olan ilçe merkezi, Ege Üniversitesi yerleşkesinin bulunması, bölgesel kuruluş sayısının artması, yerleşim birimleri ve doğu illerden gelen yoğun göçün yanı sıra hızlı bir sanayileşmeyle birlikte tüm Bornova Ovası geneline yayılmış ve buna bağlı olarak hızla artan nüfus da 500 bine yaklaşmıştır.



Resim 3.2. Çalışma alanı.

3.1.3. Hayvanların bakım ve beslenmesi

Çalışmada kullanılan Saanen tekeleri, çalışma boyunca Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Hayvancılık İşletmesi Küçükbaş Hayvan Ünitesinde sürüden ayrılmış özel bir alanda barındırılmıştır. Denemede kullanılan tekelerin beslenmesinde yaşama payına ilaveten aşım için gerekli besin madde ihtiyacını karşılayacak bir yemleme programı uygulanmıştır. Bu amaçla, tekelere günlük olarak 2 kg mısır silajı, 0,7 kg yonca kuru otu, 0,3 kg saman ve 1 kg keçi süt yemi (%18 ham protein, 2600 kcal/kg ME) verilmiştir. Çalışma öncesi tekeler sağlık kontrolünden geçirilmiş ve sağlıklı tekelerden yararlanılmıştır. Tez çalışması, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Çiftlik Hayvanı Deneyleri Yerel Etik Kurulu (09.08.2021 tarihli ve 2021/005 numaralı etik kurul kararı) onayı alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Spermanın alınması

Çiftleşme mevsimi boyunca (2020/2021 Kasım-Ocak) spermalar düzenli olarak haftada iki kez toplanmıştır. Teke sperması dört baş tekeden canlı dişi varlığında yapay vajina yöntemiyle alınmıştır. Çalışmanın yürütüldüğü Ege Bölgesinde çiftleşme mevsimi genel olarak sonbahar mevsiminin başlangıcı olan Ağustos sonu Eylül ayı başında başlamakla birlikte, çalışmanın yapıldığı yıldaki küresel pandemi; Covid-19 salgını ve BAP sistemindeki teknik sorunlar, sarf malzemelerinin tedariki, özellikle yurt dışında ithalat sorunları nedeniyle denemelere aktif olarak ancak Kasım ayı başında başlamak mümkün olmuştur. İlk olarak, sperma toplamak için yapay vajina kullanılarak hayvanlar kontrol altına alınmıştır. Tekelerden sperma almak için kızgınlığı tespit edilmiş keçiler kullanılmıştır (Resim 3.3).



Resim 3.3. Saanen teke sperması ve sperma alma aşamaları.

3.2.2. Kullanılan seyreltici ve antioksidanın bileşimi

Sperma toplandıktan sonra bir dakika içinde laboratuvara aktarılmış ve incelemek için 37°C'de su banyosunda bekletilmiştir. Normal motilite, morfoloji ve konsantrasyon özellikleri gösteren sperma örnekleri hemen eşit miktarlarda karıştırılmış ve iki ayrı kısma bölünmüştür.

Salamon and Maxwell (2000) tarafından tanımlandığı gibi, Tris-sitrik asit-glikoz (TCG) Tris (0.3M), susuz sitrik asit (94.7 mM) ve D (+)-glikozdan (27.75 mM) oluşmaktadır. Bu solüsyon pH 7.25 ± 0.05 'e ve ozmolarite 333.0 ± 2.8 mOsm'ye ayarlanmıştır. Sonra, gliserol (%5 v/v, final konsantrasyon), toz haline getirilmiş yumurta sarısı (%15 v/v) ve antibiyotikler (1000 UI/mL sodyum penisilin ve 1,0 mg/mL streptomisin sülfat) eklenmiştir. Son pH 7.0-7.17 ve ozmolarite 1327 ± 234 mOsm bu şekilde gerçekleştirilmiştir. María Jesús Palomo (2017) tarafından tanımlandığı gibi, hazırlanan bu sulandırma solüsyonuna farklı konsantrasyonlarda (0,0 mM, 0,6 mM, 2,0 mM ve 5,0 mM) antioksidan olarak bütül hidroksitolüen (BHT) eklenerek 4 farklı grup oluşturulmuştur (Resim 3.4).



Resim 3.4. Çalışmada kullanılan sulandırıcı ve farklı konsantrasyonlarda BHT antioksidan.

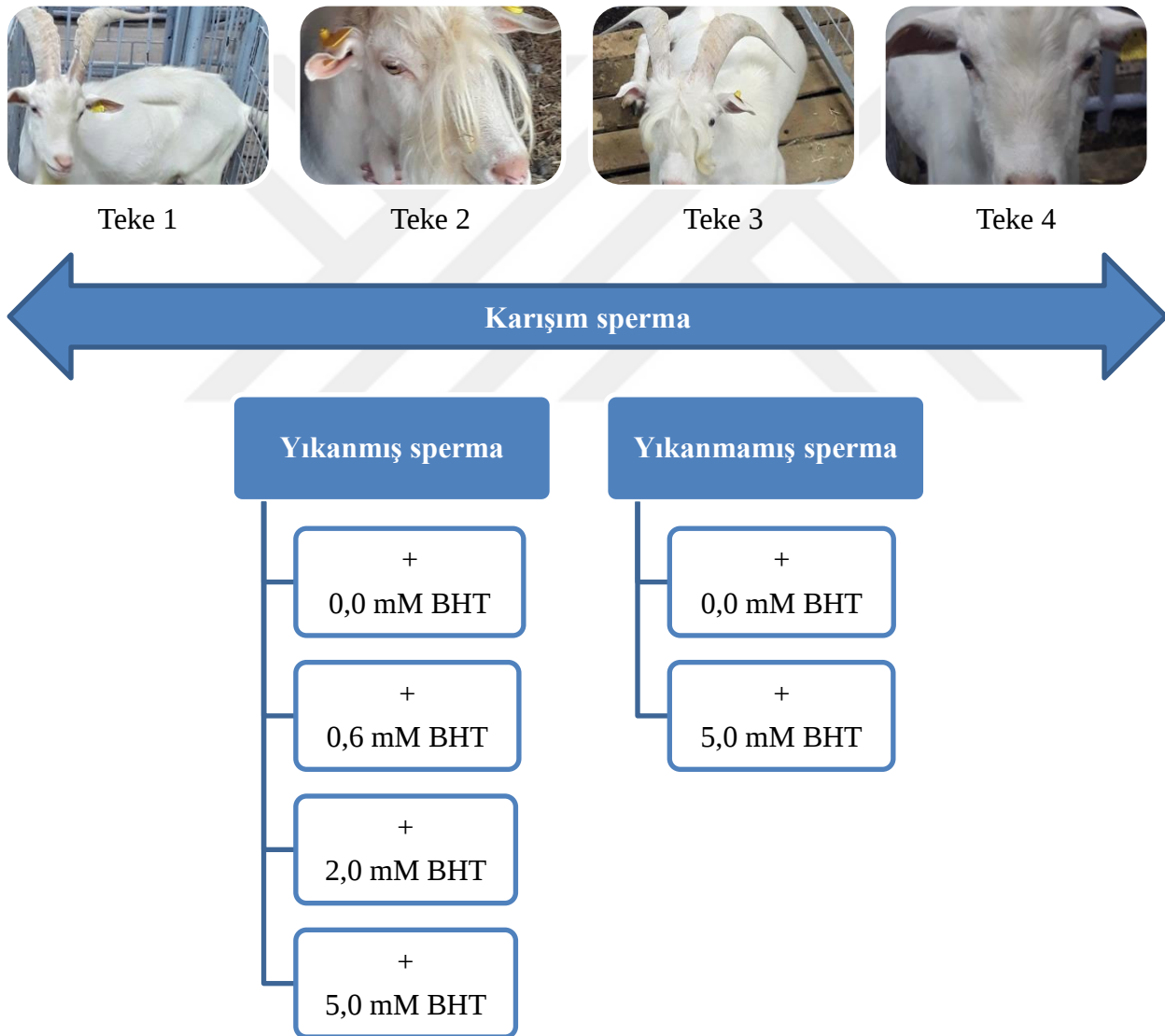
3.2.3. Saanen teke spermasının seyreltilmesi ve dondurulması

Dört farklı Saanen tekeden elde edilen sperma test tüplerinde birleştirilerek karışım elde edildikten sonra, 2 eşit ana gruba ayrılarak sperma örnekleri oluşturulmuştur (yıkanmış ve yıkanmamış sperma). Bir kısım, Tris-sitrik asit-glikoz (TCG) solüsyonunda (1:5) seyreltilmiş ve iki kez 600 x g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek yıkanırken, diğer kısım yıkanmadan tutulmuştur (Resim 3.5).



Resim 3.5. Teke spermasının sulandırılmasında santrifüjlere yıkanmış sperma.

Sperma yıkandıktan sonra süpernatant dikkatlice çıkarılmış ve elde edilen tortu dört eşit parçaya bölünmüştür. Yıkanmamış sperma ise iki eşit parçaya bölünmüştür. Yıkanmış ve yıkanmamış sperma, muamelelere göre antioksidan olarak farklı konsantrasyonlarda bütül hidroksitolüen (BHT) takviyesi ile desteklenmiş farklı TCG'lerden birinde yeniden süspanse edilmiştir (Şekil 3.1). Khalifa et al., (2008) tanımlandığı gibi, sulandırıcıda % 0,25'lik bir son dimetil sülfoksit (DMSO) konsantrasyonu ile DMSO içinde çözülmüş BHT konsantrasyonları (0,6, 2,0 ve 5,0 mM) kullanılarak BHT ilavesi yapılmıştır.



Şekil 3.1. Çalışma içindeki grupların BHT takviyesi ile oluşturulması.

Bilindiği üzere koyun ve keçi gibi küçük ruminantlarda ejakulat hacmi çok düşüktür (Yaklaşık olarak 1,0 - 1,5 ml). Bu nedenle yıkanmamış (nativ spermada) bu doğal fizyolojik kısıtlamadan dolayı sadece 2 grup oluşturulmuştur (Kontrol ve 5 mM BHT). Seyreltme işlemi sırasında sulandırıcı ve sperma sıcaklığının aynı olmasına dikkat edilerek, sulandırıcı kademeli olarak spermaya ilave edilmiştir. Sulandırılmış spermatoza 6 farklı renk 0,25 ml'lik payetlere aldıktan sonra, payetlerin uçları kapatılmış ve +4°C'de 2 saat için ekilibrasyona bırakılmıştır (Resim 3.6). Ekilibrasyondan sonra payetler sıvı nitrojen seviyesinin 4 cm üzerinde sıvı nitrojen buharında 15 dakikada süreyle ön dondurmaya tabi tutulmuş ve daha sonra sıvı nitrojene daldırılarak saklanmıştır (Resim 3.7). Dondurma işlemi toplamda 20 kez tekrarlanmıştır.



Resim 3.6. Teke spermasını seyreltmek için kullanılan ekipmanlar: spermanın paketlenmesinde kullanılan payetler (a), altı farklı grup için hazırlanmış payetler (b), payetlerin açık uçlarının kapatılması (c), +4°C'de 2 saat ekilibrasyona bırakılan payetler (d).



Resim 3.7. Saanen teke sperminin sıvı nitrojen buharında dondurulması (a), donmuş Saanen teke sperminin sıvı nitrojen tankına aktarılması (b), spermatolojik inceleme için sıvı nitrojen tankında saklanması (c), spermin su banyosunda çözülmesi (d).

3.2.4. Spermanın çözündürülmesi

Payetler (0,25 ml), sıvı nitrojen konteynerinde, spermatolojik inceleme zamanına kadar tutulmuş ve konteynere periyodik olarak sıvı nitrojen ilave edilmiştir. Sperma analizi için, payetler, 37°C'a ayarlanmış su banyosunda 30 sn'de çözündürülmüştür (Üstüner vd., 2015).

3.2.5. Spermatolojik parametrelerin değerlendirilmesi

Yapılan çalışmada 4 baş Saanen tekeden alınan spermanın karıştırılmasıyla elde edilen karışık ejakülat miktarı (ml) ve sperm yoğunluğu ($\times 10^9/\text{ml}$) bakımından değerlendirirken dondurma-özdürme sonrasında toplam spermatozoa motilitesi (%), progresif spermatozoa motilitesi (%), lokal spermatozoa motilitisi (%) ve ölü spermatozoa oranı (%) parametreleri değerlendirilmiştir. Dondurulmuş spermalardan toplam 120 payet 37°C 'lik su banyosunda 30 saniyede özdüröldükten sonra (Üstüner vd., 2015) toplam, progresif, lokal spermatozoa motilitesi (%) ve ölü spermatozoa oranı parametreleri bakımından Bilgisayar Destekli Sperma Analizi (CASA) ile değerlendirilmiştir.

3.2.6. Spermatolojik değerlendirme parametreleri

3.2.6.1. Makroskobik muayene

Taze spermanın miktarı dört baş Saanen tekesinden alınan spermalar dereceli bir tüpte birleştirilerek, miktar mililitre (ml) olarak kaydedilmiştir. Ayrıca, spektrofotometre yöntemiyle sperma yoğunluğu ($\times 10^9/\text{ml}$) belirlenmiştir.

3.2.6.2. Mikroskobik muayene

3.2.6.2.1. Sperm motilitesi

Sperm hareketliliği Bilgisayar Destekli Sperma Analizi (CASA) ile belirlenmiştir. Motiliteyi belirlemek için, cam bir lam üzerine küçük bir sperma damlası yerleştirilmiştir, sperma damlası bir lamel ile kapatılmış ve 200X büyütmede sıcak bir sahne ile faz kontrast mikroskobu altında incelenmiştir. Motiliteyi belirlemek için en az üç mikroskop alanında puanlanmış ve motilite, spermin yüzde 'sinin (%) aynı bölgedeki tüm spermlere bir yönde sorunsuz hareket etmesi olarak belirlenerek kaydedilmiştir (Kulaksız, 2009).

3.2.6.2.2. Ölü-canlı sperm oranı

Ölü-canlı sperm oranı Bilgisayar Destekli Sperma Analizi (CASA) ile belirlenmiştir. Ölü-canlı tayini amacıyla, spermadan küçük bir damla lam üzerine konulduktan sonra sperma damlasının üzerine lamel kapatılarak ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta x200 büyütmede muayene edilmiştir. Ölü-canlı oranının belirlenmesine yönelik olarak, en az üç mikroskop alanında değerlendirme yapılarak tüm spermatozoonlara yüzde (%) oranı şeklinde ölü-canlı tespit edilerek kaydedilmiştir (Kulaksız, 2009).

3.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen değerlerin ortalamaları ve standart hatası hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler SAS (2000) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasında bir fark olup olmadığını anlamak için iki yönlü bir varyans analizi (Anova) uygulayarak belirlenmiştir. Analiz sonucunda fark bulunursa, farklılığa neden olan grupları belirlemek için Duncan testi kullanılmıştır. Deneysel çalışmada kullanılan istatistiksel model aşağıdaki gibidir:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + W_j + (B_i \times W_j) + Y_{ijk}$$

Y_{ijk} = spermatozoadan alınan bir örnekten belirlenen bağımlı değişkenin gözlemlenen değeri

μ = genel ortalama

B_i = bir antioksidan olarak BHT'nin sabit etkisi (mM), $i = 0,0, 0,6, 2,0$ ve $5,0$.

W_j = sperma yıkamanın sabit etkisi, $j =$ Yıkanmış ve yıkanmamış sperm.

$B_i \times W_j$ = BHT (mM) ile spermin yıkanması arasındaki etkileşim.

e_{ijk} = hata.

Araştırma denemelerinin ve sperma alma işlemlerinin gerçekleştirildiği Kasım 2020 ve Ocak 2021 tarihli arasında İzmir ili meteorolojik verilerinde, ortalama sıcaklık ve nem değerlerinde aylar arasında önemli farklılıklar bulunmadığı için deneysel çalışmada kullanılan istatistiksel modelde ve istatistik değerlendirmelerde ay ve mevsim etkisi dikkate alınmamıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Taze Spermanın Spermatolojik Parametreler

Taze spermanın spermatolojik özellikleri, suni vajina ile 1 ila 2 yaş arasında dört baş Saanen teke sperması bir ölçüm tüpünde toplanıp karıştırıldıktan sonra değerlendirilmiştir. Sperma miktarı en yüksek 2,5 ml, en düşük 1,0 ml ve ortalama $1,75 \pm 0,39$ ml olarak kaydedilmiştir. Spermanın yoğunluğu ortalama $2,320 \times 10^9/\text{ml}$ olarak tespit edilmiştir.

4.2. Çözündürme Sonrası Spermatolojik Parametreleri

Dondurulmuş spermadan sulandırılan toplam 120 payet 37°C 'lik su banyosunda 30 saniyede çözündürüldükten sonra toplam, progresif, lokal spermatozoa motilitesi (%) ve ölü spermatozoa oranı (%) parametreleri yönüyle değerlendirilmiştir.

4.2.1. Toplam spermatozoa motilitesi

Dondurma-çözündürme sonrası toplam spermatozoa motilitesi Tablo 4.1'de sunulmuştur. Çözündürme sonrası gruplardaki toplam spermatozoa motilitesinin değerine bakıldığında,

Grup 1 (Yıkanmış sperma),

Grup 2 (Yıkanmış sperma + 0,6 mM BHT),

Grup 3 (Yıkanmış sperma + 2,0 mM BHT),

Grup 4 (Yıkanmış sperma + 5,0 mM BHT),

Grup 5 (Yıkanmamış sperma) ve

Grup 6 (Yıkanmamış sperma + 5,0 mM BHT) için sırasıyla; % $48,74 \pm 1,45$, % $65,43 \pm 1,53$, % $71,65 \pm 2,86$, % $57,04 \pm 2,60$, % $40,97 \pm 2,05$ ve % $53,28 \pm 3,44$, olarak saptanmıştır.

Tris-sitrik asit-glikoz sulandırıcısına toplam spermatozoa motilitesi bakımından, BHT antioksidan ilavesinin hem yıkanmış sperma hem de yıkanmamış sperma muamelesinde kontrol grubundan farkının önemli ($P<0,05$) olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1). Yıkanmış sperma muamelesinde yalnızca 2,0 mM BHT grupları arasında en yüksek etki olarak $71,65\pm2,86$ değeri ile kaydedilirken, en düşük değer ($48,74\pm1,45$) kontrol grubunda bulunmuştur (Şekil 4.2). Yıkanmamış sperma muamelesinde ise en yüksek değer ($53,28\pm3,44$) 5,0 mM BHT grubunda kaydedilirken, en düşük değer ($40,97\pm2,05$) kontrol grubu ile bulunmuştur (Şekil 4.3).

Ayrıca toplam spermatozoa motilitesi bakımından, yıkanmış sperma grubunun yıkanmamış sperma grubundan farkının önemli ($P<0,05$) olduğu belirlenmiştir. Yıkanmış sperma grubunda yıkanmamış sperm grubundan daha etkili olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1). Dondurma-çözdürme sonrası yıkanmış sperma grubunda Bilgisayar Destekli Sperma Analizi (CASA) ile bir teke spermasında toplam motilite oranı Şekil 4.4'te temsil edilmiştir. Şekil 4.4'te bir teke spermasında toplam motilite oranı 0,0 mM, 0,6 mM , 2,0 mM ve 5,0 mM BHT ile sırasıyla; % 45, % 78, % 85 ve % 65 olarak saptanmıştır.

Tablo 4.1. Tris-sitrik asit-glikoz (TCG) sulandırıcısına bütül hidroksitolüen (BHT) antioksidanın, çözündürme sonrası toplam sperm motilitesi oranı farkının önemliliği

Muamele	Grup	N	Toplam spermatozoa motilitesi (%)
Yıkanmış sperma	Kontrol	20	$48,74^a\pm1,45$
	+ 0,6 mM BHT	20	$65,43^b\pm1,53$
	+ 2,0 mM BHT	20	$71,65^b\pm2,86$
	+ 5,0 mM BHT	20	$57,04^c\pm2,60$
Genel ortalama			$60,72\pm2,17$
Yıkanmamış sperma	Kontrol	20	$40,97^a\pm2,05$
	+ 5,0 mM BHT	20	$53,28^b\pm3,44$
Genel ortalama			$47,13\pm1,91$

^{a-c} Farklı harf taşıyan antioksidan değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$).

4.2.2. Progresif spermatozoa motilitesi

Çözündürme sonrası gruptaki progresif spermatozoa motilitesinin değerine bakıldığında,

Grup 1 (Yıkanmış sperma),

Grup 2 (Yıkanmış sperma + 0,6 mM BHT),

Grup 3 (Yıkanmış sperma + 2,0 mM BHT),

Grup 4 (Yıkanmış sperma + 5,0 mM BHT),

Grup 5 (Yıkanmamış sperma) ve

Grup 6 (Yıkanmamış sperma + 5,0 mM BHT) için sırasıyla; % 22,45±4,41, % 38,12±4,92, % 42,44±5,29, % 23,46±2,37, % 20,62±2,66 ve % 28,62±2,52, olarak saptanmıştır (Tablo 4.2).

Tris-sitrik asit-glikoz sulandırıcısına progresif spermatozoa motilitesi bakımından, BHT antioksidan ilavesinin hem yıkanmış sperma hem de yıkanmamış sperma muamelesinde kontrol grubundan farkının önemli ($P<0,05$) olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.2). Yıkanmış sperm muamelesinde yalnızca 2,0 mM BHT grupları arasında en yüksek etki olarak 42,44±5,29 değeri ile kaydedilirken, en düşük değer (22,45±4,41) kontrol grubunda bulunmuştur (Şekil 4.2). Yıkanmamış sperma muamelesinde ise en yüksek değer (28,62±2,52) 5,0 mM BHT grubunda kaydedilirken, en düşük değer (20,62±2,66) kontrol grubu ile bulunmuştur (Şekil 4.3). Ayrıca progresif spermatozoa motilitesi bakımından, yıkanmış sperma grubunun yıkanmamış sperma grubundan farkının önemli ($P<0,05$) olduğu belirlenmiştir. Yıkanmış sperma grubunda yıkanmamış sperma grubundan daha etkili olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Tris-sitrik asit-glikoz (TCG) sulandırıcısına bütıl hidroksitolüen (BHT) antioksidanın, çözündürme sonrası progresif sperm motilitesi oranı farkının önemliliği

Muamele	Grup	N	Progresif spermatozoa motilitesi (%)
Yıkanmış sperma	Kontrol	20	22,45 ^a ±4,41
	+ 0,6 mM BHT	20	38,12 ^b ±4,92
	+ 2,0 mM BHT	20	42,44 ^b ±5,29
	+ 5,0 mM BHT	20	23,46 ^a ±2,37
Genel ortalama			31,62±1,34
Yıkanmamış sperma	Kontrol	20	20,62 ^a ±2,66
	+ 5,0 mM BHT	20	28,62 ^b ±2,52
Genel ortalama			24,62±1,28

^{a-b} Farklı harf taşıyan antioksidan değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (P<0,05).

4.2.3. Lokal spermatozoa motilitesi

Dondurma-çözdürme sonrası lokal spermatozoa motilitesi Tablo 4.3'te verilmiştir. Çözündürme sonrası gruplardaki lokal spermatozoa motilitesinin değerine bakıldığında,

Grup 1 (Yıkanmış sperma),

Grup 2 (Yıkanmış sperma + 0,6 mM BHT),

Grup 3 (Yıkanmış sperma + 2,0 mM BHT),

Grup 4 (Yıkanmış sperma + 5,0 mM BHT),

Grup 5 (Yıkanmamış sperma) ve

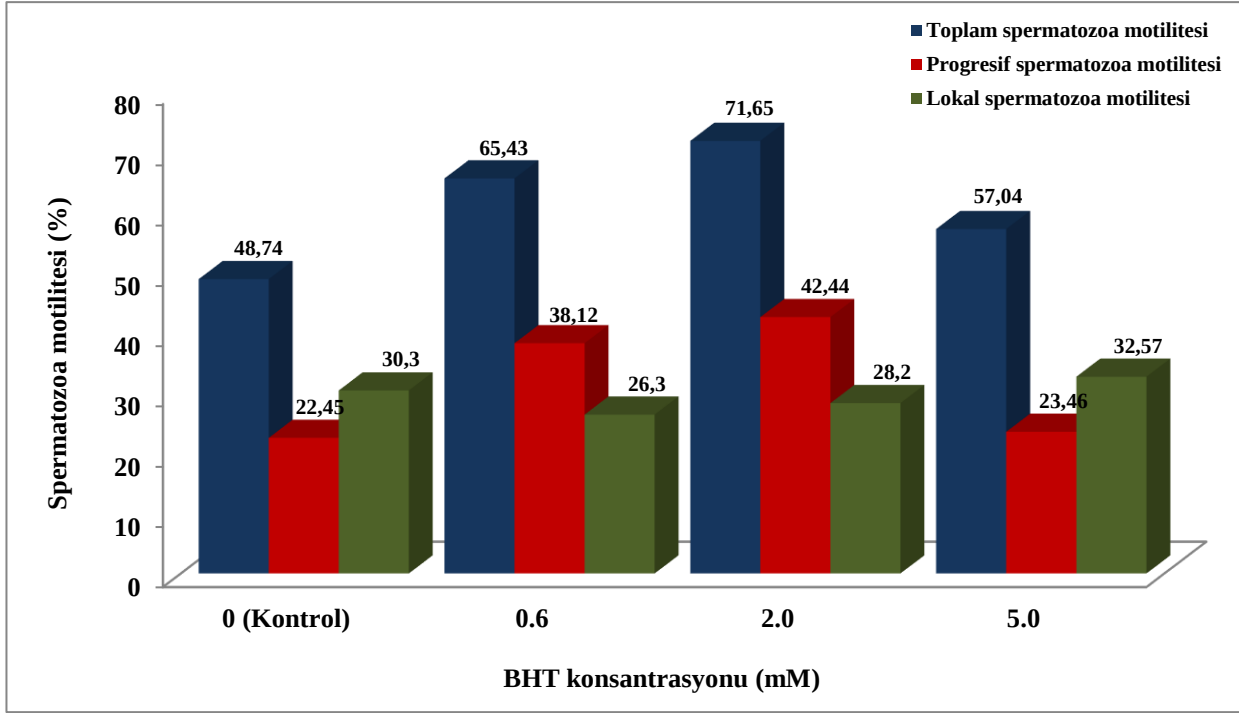
Grup 6 (Yıkanmamış sperma + 5,0 mM BHT) için sırasıyla; % 30,30±2,08, % 26,30±3,41, % 28,20±4,85, % 32,57±3,66, % 22,30±2,82 ve % 23,65±3,89, olarak saptanmıştır.

Tris-sitrik asit-glikoz sulandırıcısına lokal spermatozoa motilitesi bakımından, BHT antioksidan ilavesinin hem yıkanmış sperma hem de yıkanmamış sperm muamelesinde kontrol grubundan farkının önemli ($P>0,05$) olduğu belirlenmemiştir (Tablo 4.3). Ayrıca lokal spermatozoa motilitesi bakımından, yıkanmış sperma grubunda yıkanmamış sperma grubundan farkının önemli ($P>0,05$) olduğu da belirlenmemiştir (Tablo 4.3).

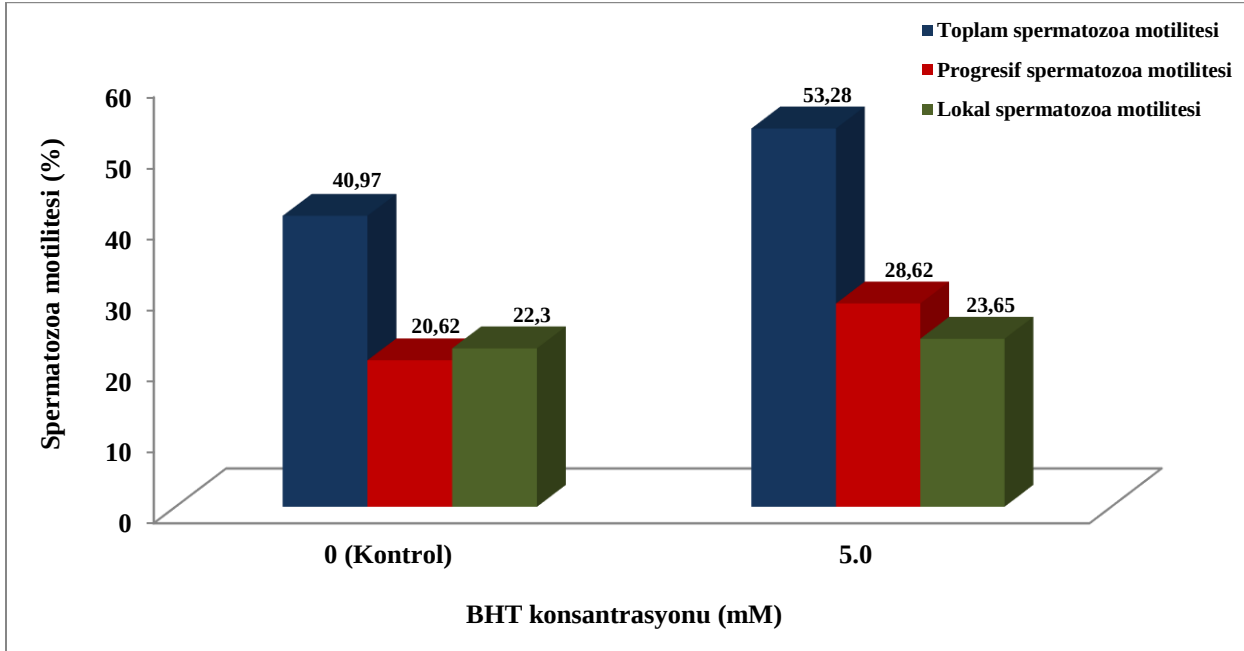
Tablo 4.3. Tris-sitrik asit-glikoz (TCG) sulandırıcısına bütül hidroksitolüen (BHT) antioksidanın, çözündürme sonrası lokal sperm motilitesi oranı farkının önemliliği

Muamele	Grup	N	Lokal spermatozoa motilitesi (%)
Yıkanmış sperma	Kontrol	20	30,30 ^a ±2,08
	+ 0,6 mM BHT	20	26,30 ^a ±3,41
	+ 2,0 mM BHT	20	28,20 ^a ±4,85
	+ 5,0 mM BHT	20	32,57 ^a ±3,66
Genel ortalama			29,34±1,45
Yıkanmamış sperma	Kontrol	20	22,30 ^a ±2,82
	+ 5,0 mM BHT	20	23,65 ^a ±3,89
Genel ortalama			22,98±1,34

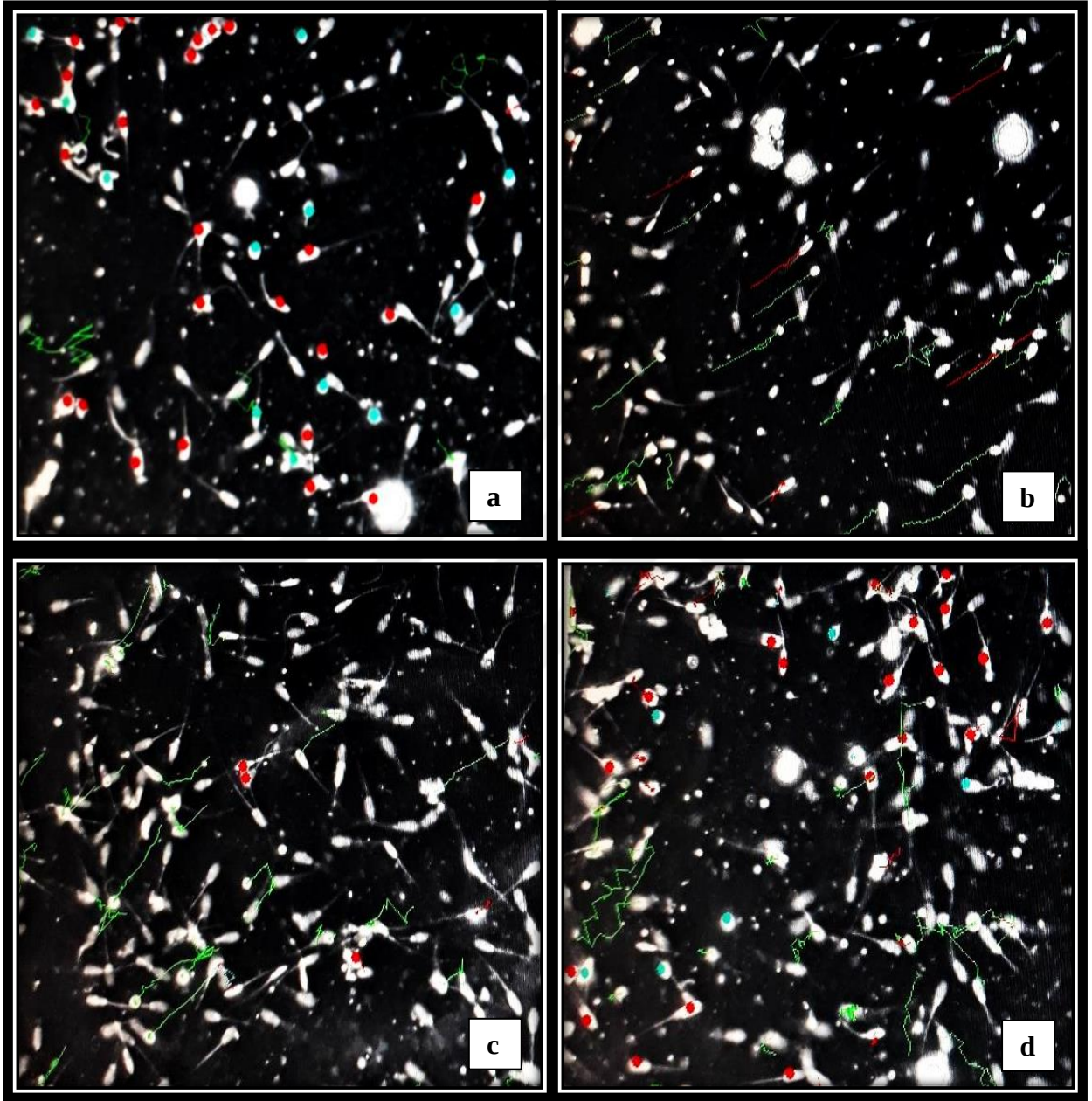
Farklı harf taşıyan antioksidan değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$).



Şekil 4.2. Dondurma-çözdürme sonrası yıkanmış sperma grubunda motilite oranları.



Şekil 4.3. Dondurma-çözdürme sonrası yıkanmamış sperma grubunda motilite oranları.



Şekil 4.4. Dondurma-çözdürme sonrası yıkanmış sperma grubunda toplam motilite oranları: 0,0 mM BHT ile % 45 (a), 0,6 mM BHT ile % 78 (b), 2,0 mM BHT ile % 85 (c), 5,0 mM BHT ile % 65 (d).

4.2.4. Ölü spermatozoa oranı

Dondurma-çözdürme sonrası ölü spermatozoa oranları Tablo 4.4'te verilmiştir. Çözündürme sonrası gruplardaki ölü spermatozoa orana bakıldığında,

Grup 1 (Yıkanmış sperma),

Grup 2 (Yıkanmış sperma + 0,6 mM BHT),

Grup 3 (Yıkanmış sperma + 2,0 mM BHT),

Grup 4 (Yıkanmış sperma + 5,0 mM BHT),

Grup 5 (Yıkanmamış sperma) ve

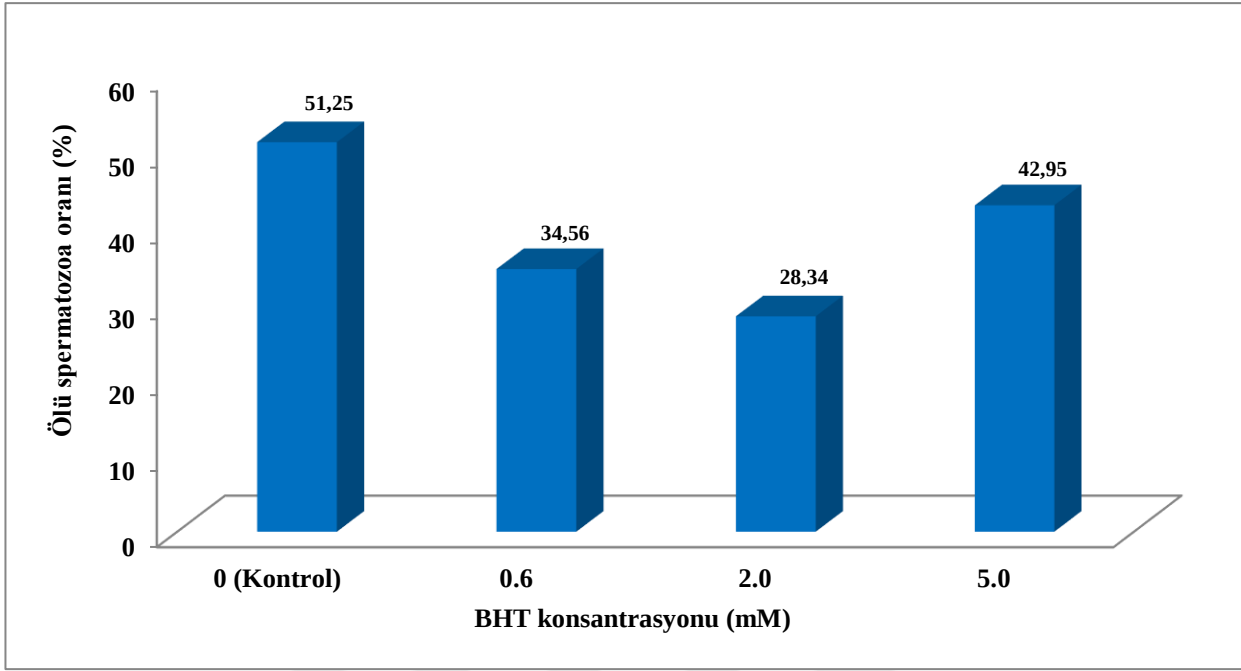
Grup 6 (Yıkanmamış sperma + 5,0 mM BHT) için sırasıyla; % 51,25±1,45, % 34,56±1,53, % 28,34±2,86, % 42,95±2,60, % 59,02±2,05 ve % 46,71±3,44, olarak saptanmıştır.

Tris-sitrik asit-glikoz sulandırıcısına ölü spermatozoa bakımından, BHT antioksidan ilavesinin hem yıkanmış hem de yıkanmamış sperma muamelesinde kontrol grubundan farkının önemli ($P<0,05$) olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.4). Yıkanmış sperm muamelesinde yalnızca 2,0 mM BHT grupları arasında en düşük değer (28,34±2,86) kaydedilirken, en yüksek değer (51,25±1,45) kontrol grubu ile bulunmuştur (Şekil 4.5). Yıkanmamış sperma muamelesinde ise en düşük değer (46,71±3,44) 5,0 mM BHT grubunda kaydedilirken, en yüksek değer (59,02±2,05) kontrol grubu ile bulunmuştur (Şekil 4.6). Ayrıca ölü spermatozoa bakımından, yıkanmış sperma grubunun yıkanmamış sperma grubundan farkının önemli ($P<0,05$) olduğu belirlenmiştir. Yıkanmış sperma grubunda yıkanmamış sperma grubundan daha etkili olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.4).

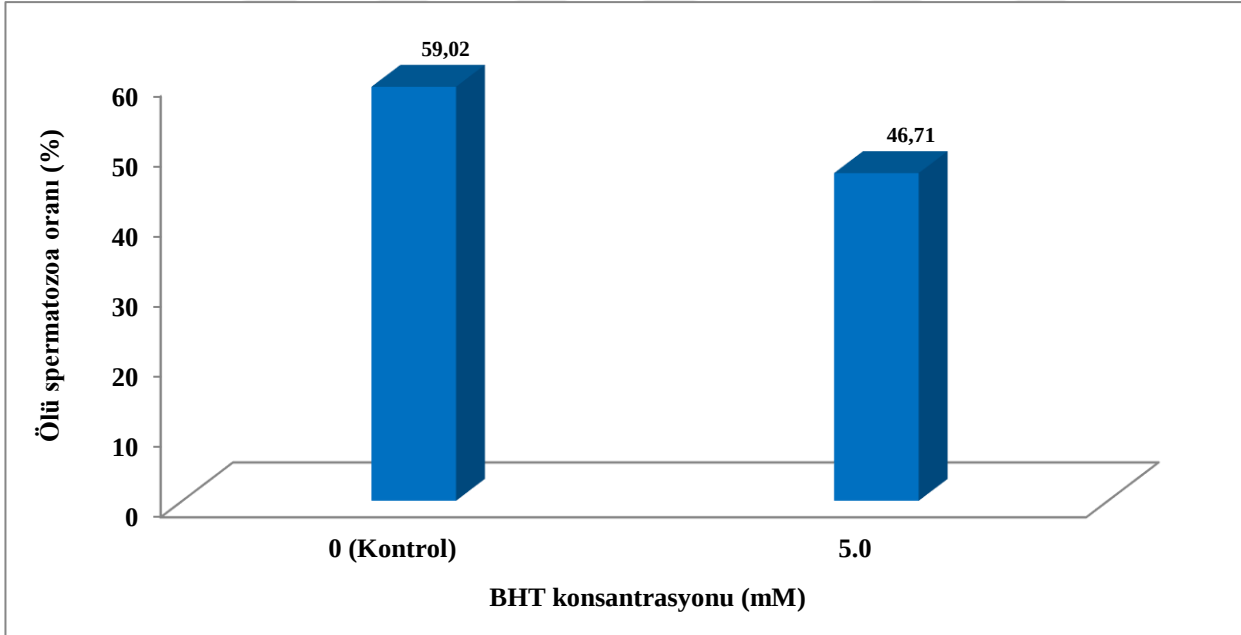
Tablo 4.4. Tris-sitrik asit-glikoz (TCG) sulandırıcısına bütıl hidroksitolüen (BHT) antioksidanın, çözündürme sonrası ölü sperm oranı farkının önemliliği

Muamele	Grup	N	Ölü spermatozoa (%)
Yıkanmış sperma	Kontrol	20	51,25 ^a ±1,45
	+ 0,6 mM BHT	20	34,56 ^b ±1,53
	+ 2,0 mM BHT	20	28,34 ^b ±2,86
	+ 5,0 mM BHT	20	42,95 ^c ±2,60
Genel ortalama			39,28±2,17
Yıkanmamış sperma	Kontrol	20	59,02 ^a ±2,05
	+ 5,0 mM BHT	20	46,71 ^b ±3,44
Genel ortalama			52,87±1,91

^{a-c} Farklı harf taşıyan antioksidan değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (P<0,05).



Şekil 4.5. Dondurma-çözdürme sonrası yıkanmış sperma grubunda ölü spermatozoa oranları.



Şekil 4.6. Dondurma-çözdürme sonrası yıkanmamış sperma grubunda ölü spermatozoa oranları.

5. TARTIŞMA

5.1. Taze Spermanın Spermatolojik Parametreleri

Saanen tekelerden toplanan toplam sperma miktarı maksimum 2,5 ml ve minimum 1 ml olarak kaydedilmiştir. Ortalama sperma miktarı ise $1,75 \pm 0,39$ ml idi. Bu çalışmada Saanen tekelerinden elde edilen sperma miktarı Karatzas et al. (1997) ile 1,1 ml, Karagiannidis et al. (2000) ile 1,27 ml, Kamal et al. (2005) ile 0,77 ml, Türk vd. (2005) Kıl x Saanen tekelerinde 0,89 ml ve Peterson et al. (2007) ile 1,3 ml olarak elde değerleri sperma miktardan yüksek olduğunda; Gacitua and Arav (2005) tarafından elde edilen Saanen tekelerinde ortalama sperma miktarı olan 2,0 ml'den daha düşüktür.

Ankara tekelerinde çalışan bazı araştırmacılar yaptığı çalışmalarda elde edilen ortalama sperma miktarı, Daşkın (1991) ile 0,9 ml, Ritar et al. (1992) ile 0,7 ml, Sungur vd. (1993) ile 0,94 ml, Tekin vd. (1996) ile 0,9 ml, Daşkın and Tekin (1996) ile 1,44 ml, Arı (2006) ile 0,9 ml, Bucak (2007) ile 0,9 ml, Roca et al. (1992) ile Murciano-Granadina tekelerinde 1,05 ml, Perez and Mateos (1996) ile Verata ve Malaguena tekelerinde 1,01 ml, 1,20 ml ve Dorado et al. (2007) ile Florida tekelerinde 1,20 ml olarak elde değerleri sperma miktarlarından yüksektir.

Çalışmada natif spermatozoa yoğunluğu ortalamada $2,320 \times 10^9$ /ml kaydedilmiştir. Bu yoğunluk değerleri Saanen tekelerinde yapılan çalışmalar, Karatzas et al. (1997) ile $3,70 \times 10^9$ /ml, Karagiannidis et al. (2000) ile $3,42 \times 10^9$ /ml, Kamal et al. (2005) ile $2,77 \times 10^9$ /ml, Gacitua and Arav (2005) ile $3,1 \times 10^9$ /ml, Arı (2006) ile $3,03 \times 10^9$ /ml, Peterson et al. (2007) ile $6,2 \times 10^9$ /ml ve Dorado et al. (2007) ile Florida tekelerinde $3,69 \times 10^9$ /ml olarak tayin ettiği değerlerden düşüktür. Bu çalışmada elde edilen spermalar yoğunluğu, Ankara tekelerinde çalışanlardan, Ritar et al. (1992) ile $2,43 \times 10^9$ /ml, Sungur vd. (1993) ile $2,49 \times 10^9$ /ml, Daşkın and Tekin (1996) ile $2,38 \times 10^9$ /ml olarak tayin ettiği değerle uyumlu olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada dondurulmadan önce elde edilen doğal ejakülasyonlarda gözlemlenen temel sperma özelliklerinin değerleri ile diğer araştırmacılar tarafından kaydedilen değerler arasındaki farklar ırk, yaş, sayı, sperma alma aralığı, yoğunluk gibi değişkenlere bağlı olabilmektedir. Bu aynı zamanda besleme ve çevre koşullarındaki farklılıklardan da kaynaklanabilir. Öte yandan sperma toplama ve değerlendirmede kullanılan yöntemlerin farklı olması elde edilen verilerdeki farklılığa katkıda bulunmuş olabilmektedir. Ancak elde edilen spermatolojik göstergelerin araştırmalarda verilen ortalama değerlere karşılık geldiği ve elde edilen spermlerin dondurulmaya uygun olduğu tespit edilmiştir.

5.2. Çözüm Sonrası Spermatolojik Parametreleri

Dondurulmuş/çözdürülmüş spermada antioksidan kapasitenin azalması ve reaktif oksijen radikallerinin oluşumunun artması sperma özelliklerini negatif etkilemektedir. Dondurulmuş/çözdürülmüş sperma peroksidasyona taze spermadan daha duyarlıdır. Son araştırmalar, sperm zarının lipit peroksidasyonunun, spermanın depolanması sırasında infertilitenin ana nedeni olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, dondurulmuş spermin çözülmesinden sonra spermatolojik parametreler üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu düşünüldüğünden, sperm takviyelerine antioksidanlar eklenmektedir (Sinha et al., 1996).

5.2.1. Sperm motilitesi oranı

Araştırmada çözündürme sonrası, 20 denemede kaydedilen toplam sperm motilitesi oranı, Grup 1 (Yıkanmış sperm), Grup 2 (Yıkanmış sperm + 0,6 mM BHT), Grup 3 (Yıkanmış sperm + 2,0 mM BHT), Grup 4 (Yıkanmış sperm + 5,0 mM BHT), Grup 5 (Yıkanmamış sperm) ve Grup 6 (Yıkanmamış sperm + 5,0 mM BHT) için sırasıyla; % 48,74±1,45, % 65,43±1,53, % 71,65±2,86, % 57,04±2,60, % 40,97±2,05 ve % 53,28±3,44, olarak belirlenmiştir. Diğer yandan, grupların elde edilen ortalama progresif spermatozoa motilitesi oranları, sırasıyla; % 22,45±4,41, % 38,12±4,92, % 42,44±5,29, % 23,46±2,37, % 20,62±2,66 ve % 28,62±2,52, olarak saptanmıştır.

Çalışmada çözündürme sonrası yıkanmış spermada en yüksek toplam ve progresif spermatozoa motilitesi oranı sırasıyla; % 71,65±2,86 ve % 42,44±5,29 ile TCG sulandırıcı için 2 mM BHT içeren grupta saptanmıştır. En düşük motilite oranı ise % 48,74±1,45 ve % 22,45±4,41 ile TCG sulandırıcısına BHT ilavesi içermeyen grupta (Kontrol grubu) elde edilmiştir. Diğer yandan, çözündürme sonrası yıkanmamış spermada en yüksek toplam ve progresif spermatozoa motilitesi oranı sırasıyla; % 53,28±3,44 ve % 28,62±2,52 ile TCG sulandırıcısına 5 mM BHT ilavesi içeren gruptadır. En düşük motilite oranı ise % 40,97±2,05 ve % 20,62±2,66 ile TCG sulandırıcısına BHT ilavesi içermeyen grupta (Kontrol grubu) tespit edilmiştir. Ayrıca en yüksek motilite oranı % 50,11±2,17 ile yıkanmış sperma grubunda kaydedilmiştir. En düşük motilite oranı ise 42,20±1,91 ile yıkanmamış sperma grubundadır.

Bu çalışma sonuçları Dewry et al. (2015) bildirdiği sonuçlar ile uyumludur. Tekelerde Dewry et al. (2015), 2,0 mM E vitamini içeren Tris sulandırıcıda, 0,0, 5,0 ve 7,0 mM E vitamini içerene göre hem ekilibrasyondan hem de dondurmadan sonra sperm motilitesi oranları önemli ölçüde ($P<0,01$) yüksek olduğunu bildirmiştir. 5,0 ve 7,0 mM E vitamini ilavesinde ise kontrolden daha düşüktür. Lalramdintluanga (2012) tarafından teke spermasında da benzer sonuçlar bildirilmiştir. Sulandırıcıdaki 3,5 ve 4,5 mM E vitamini ile teke spermanında çözündürme sonrası sperm motilitesinde önemli bir gelişme de rapor edilmiştir (Saraswat et al., 2012). Iqbal et al. (2015), BHT inklüzyonlarının sperm motilitesini olumsuz etkilediğini ($P<0,05$) bildirmiş ve maksimum sperm motilitesine 0,0 mM BHT muamelesi ile ulaşılmıştır. Bununla birlikte, çözündürme sonrası progresif motilitedeki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Anılan çalışmanın istatistiksel bulguları tez çalışmasıyla uyumlu değildir.

Akeel et al. (2011) tarafından yapılan benzer çalışmada Boer tekelerinde kontrol grubuna göre sperm motilitesi, incelenen tüm BHT gruplarında (0,5, 1,0, 2,0 ve 3,0 mM) önemli ölçüde ($P<0,05$) daha yüksek olduğunu göstermiş, ancak gruplar arasında morfoloji özelliklerinde önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Sperma sulandırıcıya 2,0 mM BHT eklenmesi, diğer gruplarla karşılaştırıldığında, sperm özelliklerinde genel bir gelişme göstermiştir. Anılan çalışmanın istatistiksel bulguları tez çalışmasıyla uyumludur. Khalifa et al. (2008) 0,6 mM BHT ile muamele edilen spermaların ortalama çözündürme sonrası motilite oranı, kontrol ve 0,3 veya 0,9 mM BHT ilave edilen spermelerinden önemli ölçüde ($P<0,05$) daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, 5,0 mM BHT'nin yumurta sarısı bazlı sulandırıcılarına eklenmesi,

çözündürme sonrası sperm motilitesinde dikkate değer bir ($P<0,05$) artışa neden olmuştur (Khalifa et al., 2008). Dewry et al. (2020), dondurulmuş/çözölmüş teke spermasında sperm motilitesinin, canlı spermin ve canlı sağlam akrozomun 200 μ M BHT, 200 μ M BHT + 2 mM ve kontrol ile karşılaştırıldığında 2 mM E Vitamini için önemli ölçüde ($P<0,05$) daha yüksek olduğu göstermiştir. Bu çalışma sonuçları Dewry et al. (2020) bildirdiği sonuçlar ile uyumludur.

Nain et al. (2023), Murrah manda sperma sulandırıcısına artan konsantrasyonlarda BHT (0,5, 1,0 ve 2,0 mM) eklenmesiyle çözölmüş spermatozoanın hareketliliğinin ve canlılığının iyileştirdiğini ($P<0,05$) göstermiştir. Spermatozoanın maksimum motilitesi ve canlılığı 5,0 mM BHT'nin eklenmesiyle iyileştirilmiştir ($P<0,05$). Sperma sulandırıcıya 2,0 mM BHT eklenmesi, 0,5 ve 1,0 mM BHT eklenmesine kıyasla spermatozoanın motilitesini azaltmıştır. Benzer bir şekilde Ijaz et al. (2009), manda sperma sulandırıcısına artan konsantrasyonlarda BHT (0,5, 1,0, 2,0 ve 3,0 mM) eklenmesiyle çözölmüş spermatozoanın hareketliliğinin iyileştirdiğini ($P<0,05$) göstermiştir. Spermatozoanın maksimum motilitesi 1,0 ve 2,0 mM BHT'nin eklenmesiyle iyileştirilmiştir ($P<0,05$). Farshad et al. (2010) tarafından koç spermasında da benzer sonuçlar bildirilmiştir. Ancak sperma sulandırıcıya 3,0 mM BHT eklenmesi, 1,0 ve 2,0 mM BHT eklenmesine kıyasla spermatozoanın motilitesini azaltmıştır. Elde ettikleri istatistikî bulgular, tez çalışmasıyla uyumludur.

Akhil Patel et al. (2015), Haryana boğa spermatozoasında sperm hareketliliği için de benzer bir eğilim görölmüştür. Kontrol gruba göre hem 0,5 hem de 1,0 mM BHT gruplarının her ikisinde de progresif motilite önemli ölçüde artmıştır ($P<0,05$). 1,0 mM BHT grubu, işlem sürecinin üç aşamasının tümünde de progresif motilite açısından en iyi sonuçları göstermiştir (sıcaklığın 5°C/dk'da 4'ten -10°C'ye, 40°C / dk'da -10'dan -100°C'ye, 20°C/dk'da -100'den -140°C'ye düşürölmüştür). Benzer bir çalışmada Asmaa Mostafa et al. (2019), kontrol grubuna kıyasla 1,0 ve 1,5 mM/mL BHT ile Tris-sitrat-fruktoz yumurta sarısı gliserol (TCFYG) sulandırıcıda soğutulan spermada 1,5 mM/mL kullanımıyla daha iyi sonuçlara ulaşarak progresif motilitenin artığını ($P<0,05$) belirtmiştir. Ancak Lesitin (TCFGL) sulandırıcı ile soğutulan sperma, 0,5 mM/mL BHT ile TCFYG sulandırıcı ile karşılaştırıldığında daha iyi sperma kalitesi sergilemiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, sırasıyla; 1,0 ve 0,5 mM/mL'lik BHT konsantrasyonlarında, 1,0 mM/mL'de üstün olmak üzere progresif motilite iyileştirilmiştir ($P<0,05$).

Mandada benzer sonuçlara göre, Wadood et al. (2016) kontrol grubu hariç dimetilsülfoksit (DMSO) dahil diğer gruplara göre 2,0 mM BHT'nin daha yüksek ($P<0,05$) sperm motilitesi kaydetmiştir. Ancak, 0,0, 2,0 mM BHT ve DMSO grubuna kıyasla 2,25 mM'de daha yüksek DNA hasarı kaydedilmiştir. BHT ile muamele edilen gruplarda DMSO ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük bir lipid peroksidasyonu da kaydedilmiştir (Wadood et al., 2016). Bunun nedeni, aşırı antioksidan normal spermatozoa fonksiyonu için gerekli kabul edilen oksidanların fizyolojik seviyesini azalttığı için BHT'nin toksik etkileri olabilir (Roca et al., 2004). Ayrıca, daha yüksek BHT konsantrasyonları, son olarak plazma zarı geçirgenliği artıran çoklu doymamış yağ asitlerinde (PUFA) spermatozoa zarındaki oksidasyon hızını azaltarak spermleri kriyo-yaralanmaya karşı savunmasız hale getirmektedir (Shoae and Zamiri, 2008).

Çözdürmeden sonra sperm motilitesinde gözlemlenen fark, seminal plazmanın ayrılmasından, dondurma sırasında kullanılan seyrelticilerin miktar, oranlarındaki farklılıktan ve seyrelticide bulunan bileşenlerden, özellikle sperm seyrelticideki yumurta sarısı miktarından kaynaklanıyor olabilir. Sperm artırıcıya eklenen antioksidanların miktarı, oranı ve tipindeki farklılıkların yanı sıra ek olarak, spermi kurtarmak ve dondurmak için kullanılan tekniklerdeki farklılıklar, çözme süreleri, sıcaklıklarındaki değişiklikler, analizörler veya ekipmanlardan da kaynaklanabilir. Ayrıca tür, ırk, mevsim ve bireysel farklılıklar hareket hızlarında farklılıklara neden olabilmektedir.

Dondurulma ve çözülme işlemi sırasında, akrozom hasarının indüklenmesi nedeniyle ROS üretimi meydana gelir, daha sonra erken kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu ile sonuçlanır (Uysal et al., 2007). Akrozom ve plazma zarının bütünlüğünde BHT'nin neden olduğu iyileşme için önerilen bir mekanizma, BHT'nin hücre zarına dahil edilmesiyle, zarların artan geçirgenliği ve sınırlı lipid peroksidasyon reaksiyonları ile sonuçlanmasıdır (Shoae and Zamiri, 2008). Tersine, Aitken and Clarkson (1988), BHT'nin lipid peroksil radikallerini hidroperoksitlere dönüştürebileceğini ve bunun da spermatozoa hasarını azaltabileceğini öne sürmüşlerdir.

Kriyoprezervasyon sırasında BHT'nin koruyucu mekanizmasını açıklamak için çeşitli yazarlar tarafından çeşitli hipotezler ve tahminler yapılmıştır. Snipes et al. (1975) ve Hammerstedt et al. (1976), BHT'nin antiviral aktiviteye sahip olduğunu ve böylece lipid içeren virüsleri inaktive edebileceğini öne sürmüştür. Ayrıca Hammerstedt et al. (1976), fenolik bir

antioksidan olarak BHT'nin spermatozoal membrana dahil olduğunu ve böylece membran lipidlerinin viskozitesini azalttığını öne sürmüştür. Bu, düşük sıcaklıklarda daha fazla lipid akışkanlığı anlamına gelebilir ve hücreler soğuk şoka maruz kaldığında sperm plazma zarının geçirgenlik değişikliklerini önleyebilir veya büyük ölçüde azaltabilir.

Killian et al. (1989), Aitken and Clarkson (1988) ve Aitken, (1995), BHT'nin sperm özelliklerine zararı en aza indirmek için sulandırıcı ve sperm ile ilişkili oksijen serbest radikallerinin bir temizleyicisi olarak hizmet ettiğini öne sürmüşlerdir. Ancak Watson (1981), soğuk şoku sırasında koç sperminde meydana gelen hücre zarı bozulmasının kapsamlı olduğunu ve tek başına lipid faz değişiklikleri kavramlarıyla açıklanmasının zor olduğunu öne sürmüştür. Bildirilen bazı araştırma sonuçlarına göre optimal BHT konsantrasyonunun hayvan türlerine bağlı olduğu ve 0,05-2,0 mM arasında değiştiği görülmektedir (Bamba and Cran, 1992; Roca et al., 2004; Shoaie and Zamiri, 2008; Ijaz et al., 2009).

Shoaie and Zamiri (2008), sperma sulandırıcıda daha yüksek seviyelerde BHT kullanıldığında, plazma zarının akışkanlığının istenen noktanın üzerine çıkabileceğini ve spermatozoayı akrozomal hasara daha yatkın hale getirebileceğini öne sürmüştür. Ancak Watson and Anderson (1983), optimal konsantrasyon olarak 2,0-4,0 mM BHT'yi bildirmiştir. Khalifa et al. (2008), yumurta sarısı bazlı sperma sulandırıcıya 5,0 mM BHT eklendiğinde optimal teke sperm kriyoprezervasyonunun sağlandığını bildirmiştir. Optimal BHT konsantrasyonu ile ilgili türler ve laboratuvarlar arasındaki bu farklılıklar, bu antioksidanın oksidatif hasarı önleme üzerindeki potansiyel etkisinin, sulandırıcı bileşimi, seyreltme hızı, soğutma ve dondurma/çözme yöntemi gibi birçok faktöre bağlı olmasından kaynaklanabilir (Khalifa et al., 2008) ve diğer türlere kıyasla koç sperminde düşük kolesterol/fosfolipit oranına ve yüksek doymamış fosfolipid içeriğine (Watson, 2000) sahip olan plazma membran bileşimi etkin rol oynayabilir.

BHT'nin sperm hücre zarına nüfuz ettiği ve böylece antioksidan savunmasını uyguladığı varsayıldığından, BHT ilavesinin sperm üzerinde koruyucu bir rolü vardır (Shoaie and Zamiri, 2008). Ayrıca BHT penetrasyonu, peroksil radikallerinin hidroperoksitlere dönüşümü ile spermelerin membran akışkanlığını ve esnekliğini arttırmaktadır. Bu mekanizmalarla BHT, sperm kriyoprezervasyonunda bir antioksidan görevi görmektedir. Çalışmalar, BHT'nin bir anti-lipid peroksidasyon ajanı olarak rolünün olduğunu göstermiştir ve bu nedenle kriyoprezervasyon

sırasında spermlere koruma sağlamaktadır (Naijian et al., 2013). Birçok evcil hayvan türünde yapılan araştırmalar da BHT'nin donma-çözülme işlemi sırasında spermler üzerinde koruyucu etki gösterdiğini göstermiştir. BHT'nin faydalı etkileri, aynı zamanda türe bağlı ve spesifik olan sulandırıcıdaki konsantrasyona da bağlıdır. Daha önceki çalışmalar, BHT'nin yararlı rolünün BHT konsantrasyonuna, sperm membran bileşimine, inkübasyon süresine ve kriyoprezervasyon işlemi için kullanılan sulandırıcı tipine bağlı olduğunu bildirmiştir (Roca et al., 2004).

Diğer bir taraftan, bu araştırmada elde edilen sonuçlar santrifüj ile sperma yıkamanın teke sperminin kriyoprezervasyonu üzerinde çeşitli nedenlerle olabilecek faydalı bir etki sağladığını göstermiştir. Bunun bir nedeni, santrifüjleme yoluyla spermayı yıkamak için kullanılan tekniğin, hasarlı ve ölü sperm oranını azaltması olabilir (Cebrián et al., 2010). Santrifüjün etkileri yıkamanın yoğunluğuna ve kullanılan seyrelticilere bağlı olmakla birlikte, bu durum spermi olumsuz etkileyerek toplam sperm miktarının %6-15'ini kaybetmesine neden olabilmektedir (Ritar and Salamon, 1991; Leboeuf et al., 2000). Bispo et al. (2011)'nın bildirdiğine ve teke sperması için tarif ettiğine göre, spermanın yıkanması yumurta sarısının soğuk şokuna karşı koruyucu kapasitesini artırmış olabilmektedir.

5.2.2. Ölü spermatozoa oranı

Çalışmada çözündürme sonrası yıkanmış spermada en düşük ölü spermatozoa oranı % $28,34 \pm 2,86$ ile Tris-sitrik asit-glikoz (TCG) sulandırıcı için 2 mM BHT içeren grupta saptanmıştır. En yüksek ölü spermatozoa oranı ise % $51,25 \pm 1,45$ ile TCG sulandırıcısına BHT ilavesi içermeyen grupta (Kontrol grubu) elde edilmiştir. Diğer yandan, çözündürme sonrası yıkanmamış spermada en düşük ölü spermler oranı % $46,71 \pm 3,44$ ile TCG sulandırıcı için 5 mM BHT içeren gruptadır. En yüksek ölü spermatozoa oranı ise % $59,02 \pm 2,05$ ile TCG sulandırıcısına BHT ilavesi içermeyen grupta (Kontrol grubu) gözlenmiştir. Ayrıca en düşük ölü spermatozoa oranı $49,90 \pm 2,17$ ile yıkanmış sperma grubunda kaydedilmiştir. En yüksek ölü spermatozoa oranı ise $49,90 \pm 2,17$ ile yıkanmamış sperma grubundadır.

Bu çalışma sonuçları Dewry et al. (2015) ile uyumludur. Dewry et al. (2015), 2,0 mM E vitamini içeren Tris sulandırıcısında, 0,0, 5,0 ve 7,0 mM E vitamini içerene göre hem dengelemeden sonra hem de dondurmadan sonra canlı sperm yüzdelерinin önemli ölçüde

($P<0,01$) olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, 5,0 mM ve 7,0 mM E vitamini içeren grupta kontrolden daha düşükken, dengelemeden sonra canlı sperm yüzdesi 5,0 mM E vitamini ve kontrol arasında önemli ölçüde farklılık göstermemiştir. Lalramdintluanga (2012) tarafından teke spermasında da benzer sonuçlar bildirilmiştir. Bununla birlikte, çözülme sonrası canlılık yanıtı, 2,0 mM ve 5,0 mM BHT konsantrasyonu içeren spermelerin canlılığının, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla; $59,00\pm3,74$, $59,90\pm2,78$ ve $54,40\pm3,68$ olduğu gösterilmiştir.

Üstelik, Boer tekelerde kontrol grubuna göre Akeel et al. (2011), sperm canlılığının, muamele edilen tüm BHT gruplarında (0,5 mM, 1,0 mM, 2,0 mM, ve 3,0 mM) önemli ölçüde ($P<0,05$) daha yüksek olduğunu göstermiş, ancak gruplar arasında morfoloji özelliklerinde önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Sperma sulandırıcıya 2,0 mM BHT eklenmesi, diğer gruplarla karşılaştırıldığında, sperm özelliklerinde genel bir gelişme göstermiştir. Elde ettikleri istatistiksel bulgular, tez çalışmasıyla uyumludur. Khalifa et al. (2008), Damascus tekelerinin sperma sulandırıcılarına artan konsantrasyonlarda (0,6 mM, 2,0 mM, ve 5,0 mM) BHT eklenmesiyle saklanan spermelerin canlılık indekslerinin önemli ölçüde ($P<0,01$) iyileştiğini göstermiştir. Canlılık indeksinin maksimum değerine ($114,51\pm4,25$) spermatozoanın 5,0 mM BHT'ye maruz bırakılmasından sonra ulaşılmıştır. Ayrıca, 0,3 mM veya 0,6 mM BHT içeren seyrelticilerin eklenmesiyle korunmuş spermelerin canlılık indeksleri önemli ölçüde ($P<0,01$) artmıştır. Canlılık indeksinin en yüksek değeri ($106,17\pm2,41$) spermaya 0,3 mM BHT ilavesinden sonra elde edilmiştir (Khalifa et al., 2008). Aksine, seyrelticilere depolama öncesi 5,0 veya 8,0 mM BHT ilavesi önemli ölçüde ($P<0,01$) korunmuş spermatozoanın canlılık indekslerinde açık bir azalmaya yol açmıştır.

Koçlarda en düşük canlılık antioksidan içermeyen yıkanmamış spermde gözlenirken, 5,0 mM BHT ilave edilen sulandırıcıda saklanan yıkanmış spermde, eklenen seminal plazmanın varlığı veya yokluğundan bağımsız olarak diğer muameleye göre anlamlı olarak daha yüksek canlılık gözlenmiştir (María Jesús Palomo et al. 2017). Benzeyen bulgularda Anghel et al. (2010)'e göre koç spermasında rapor edilmiştir. Ayrıca, Ceylan vd. (2013) koç spermasının kısa süreli saklanması (72 saat süresince) BHT ilavesiyle canlı spermatozoa oranı bakımından 0 ile 72 saatler arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar oluşturmadığını belirlemiştir ($P>0,05$).

Ijaz et al. (2009), manda sperma sulandırıcısına artan konsantrasyonlarda BHT (0,5, 1,0, 2,0 ve 3,0 mM) eklenmesiyle çözülmüş spermatozoanın canlılığı en iyi 1,0 ve 2,0 mM BHT grubunda gözlenmiştir ($P<0,05$). Canlılık için en yüksek değerler 2,0 mM BHT konsantrasyonunda elde edilmiştir. Sperma sulandırıcıya daha yüksek (3,0 mM) BHT eklenmesi, 1,0 ve 2,0 mM BHT'ye kıyasla spermatozoanın canlılığını azaltmıştır (Ijaz et al., 2009). Farshad et al. (2010) tarafından koç spermasında da benzer sonuçlar bildirilmiştir. Elde ettikleri istatistiksel bulgular, tez çalışmasıyla uyumludur.

Asmaa Mostafa et al. (2019), kontrol grubuna kıyasla 1,0 ve 1,5 mM/mL BHT ile TCFYG sulandırıcıda soğutulan spermada 1,5 mM/mL kullanımıyla daha iyi sonuçlara ulaşılarak sperm canlılığının arttığını ($P<0,05$) belirtmiştir. TCFGL sulandırıcı ile soğutulan sperma, 0,5 mM/mL BHT ile TCFYG sulandırıcı ile karşılaştırıldığında daha iyi sperma kalitesi sergilemiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında, 0,5 mM/mL BHT ile sperm canlılığı iyileştirilmiştir. Asmaa Mostafa et al. (2019) bildirdiğine göre, elde ettikleri istatistiksel bulgular, tez çalışmasıyla uyumludur. Wadood et al. (2016) (kontrol grubu hariç DMSO dahil) diğer gruplara göre 2,25 mM BHT'de, spermatozoa canlılığı daha yüksek BHT seviyesinde iç organların zarar görmesi nedeniyle sırasıyla; 1,75 mM ve 2,0 mM BHT'ye göre daha düşük belirlemiştir ($P<0,05$).

Bu sonuç, sperma seyreltici ile en iyi sonuçları elde etmek için uygun BHT seviyelerinin gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Yumurta sarısındaki yüksek yoğunluklu lipoprotein, sperm fonksiyonuna müdahale ederek, kriyoprezervasyon sırasında yumurta sarısının koruyucu etkisinin azalmasına neden olmaktadır (Akhter et al., 2011). Bu nedenle, TCG'de daha yüksek BHT konsantrasyonları gereklidir. Yukarıda belirtilen sperma değişkenlerini iyileştirmek için dondurma aşamasında daha yüksek BHT konsantrasyonları gereklidir. 2,0 mM/mL BHT kullanımı ile TCG'de uzatılan dondurma / çözündürme sonrası sperm kalite parametrelerinde bir iyileşme olmuştur. TCG'de seyretilmiş sperma ile ilgili olarak, 0,6-2,0 mM/mL BHT ilavesiyle iki değişken hareketlilik ve canlılık artmıştır. Alternatif olarak, 2,0 mM/mL'nin üzerinde daha yüksek BHT konsantrasyonlarının kullanılması, sulandırıcıya eklendiğinde sperm kalite özelliklerini azaltmıştır. Bu azalma, daha fazla antioksidan, normal sperm metabolizması ile ilgili olan oksidanların fizyolojik seviyesini azalttığı için BHT'nin tehlikeli özelliğine atfedilebilir (Roca et al., 2004). Ayrıca, yüksek BHT seviyeleri, spermleri, besinlerin spermatozoaya nüfuz

etmesinde başarısızlıkla (Wadood et al., 2016) birlikte kriyohasara yatkın halede getirmektedir (Shoae and Zamiri, 2008).

Optimal BHT konsantrasyonlarının hayvan türlerine bağlı olduğu görülmektedir. Örneğin, optimal BHT konsantrasyonu domuz (Bamba and Cran, 1992 & Roca et al., 2004) için 0,2-1,6 mM/mL ve boğa (Shoae and Zamiri, 2008, Mutha Rao et al., 2012, Khumran et al., 2015, Patel et al., 2015) için 0,5-1,5 mM/mL idi. Bununla birlikte, koçlarda (Farshad et al., 2010) ve tekelerde (Khalifa et al., 2008, Naijian et al., 2013, Iqbal et al., 2015, Alcay et al., 2016) istenen çözündürme sonrası sperm kalitesini elde etmek için daha yüksek BHT konsantrasyonları (2,0-5,0 mM/mL) önerilmiştir. Soğuk şoku sırasında koç ve teke spermasında meydana gelen sperm hücre zarı bozulması, yüksek PUFA konsantrasyonları nedeniyle kapsamlıdır ve tek başına lipit faz değişiklikleri kavramlarıyla açıklanması zordur (Khalifa et al., 2008, Farshad et al., 2010, Naijian et al., 2013, Iqbal et al., 2015).

Bu nedenle, sperma seyrelticiinde zenginleştirilmiş daha yüksek BHT ilavesi, bu tür hayvanlarda dondurma sonrası daha yüksek sperma kalitesi elde etmek için optimaldir. BHT'nin dondurma öncesi ve çözündürme sonrası sperma özellikleri üzerindeki olumlu etkisi, BHT'nin lipit çözünürlüğü nedeniyle sperm membran geçirgenliğini koruduğu bilgisine bağlanabilir (Khalifa et al., 2008). BHT, E vitamininin sentetik bir analogudur ve temizleyici bir antioksidan değil, ROS zinciri için bir kırıcıdır, bu nedenle hedef, oksijen serbest radikal üretimini etkilemeden sperm zarının bütünlüğünü korumaktadır. BHT'nin bir başka iyileştirici etkisi, anti-viral aktivitesinden kaynaklanmaktadır ve bu nedenle spermada lipit içeren virüsleri inaktive edebilir (Shoae and Zamiri, 2008).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Başarılı sperm dondurma, birçok faktörün dengesini gerektiren karmaşık bir prosedürdür. Bir dondurma yönetimi bir türden sperm için en uygun hale getirilmiş, bir başka tür için uygun olmayabilir. Teke spermi bu temanın mükemmel bir örneğidir. Teke spermi diğer evcil türlerden alınan spermlerle donmuş besiyeri, kriyoprotektanlar, dondurma ve çözme gibi ortak özelliklere sahip olsa da bu tür maksimum canlılığı elde etmek için çözündürmeden sonra özel bakım gerekmektedir. Çözündürme işleminden sonra spermatolojik parametreler üzerinde olumlu etkisi olduğu düşünüldüğü için sperm katkı maddelerine antioksidanlar eklenmektedir. Genellikle pozitif etkiler olmasına rağmen, antioksidanlar etkileri hayvan türüne, antioksidan tipine ve dozuna, seyreltici bileşenlere ve soğutma uygulamalarına göre değişebilmektedir.

Bu araştırmada elde edilen sonuçlar, kullanılan sulandırıcı tipine ve dondurma aşamasına bağlı olarak Saanen teke spermasının dondurulması için 0,6 ile 2,0 mM/mL arasında değişen BHT konsantrasyonunun optimum olabileceğini göstermiştir. Çözündürme sonrası yıkanmış spermada hem en yüksek motilite oranı hem de en düşük ölü spermatozoa oranı tris-sitrik asit-glikoz (TCG) sulandırıcısına 2 mM BHT ilavesi içeren grupta kaydedilmiştir. Bunun sonucu olarak, toz yumurta sarısı bazlı ortamda kriyoprezerve edilmiş yıkanmış ve yıkanmamış spermlerin kalite parametrelerinin çoğunu iyileştirmek için 2.0 mM konsantrasyonda BHT ilavesi önerilmiştir. Ancak TCG sulandırıcısına BHT'nin daha yüksek oranda takviyesi, sperma özellikleri üzerinde tehlikeli etkilere neden olabilmektedir.

Ayrıca, bu çalışmada hem en yüksek motilite oranı hem de en düşük ölü spermatozoa oranı yıkanmış sperma grubunda kaydedilmiştir. Bununla birlikte, spermanın ilk santrifüjlenmesiyle spermin yıkanmasının, spermin dondurularak hayatta kalmasının iyileştirilmesi için önerilmiştir. Saanen tekelerde BHT ilavesiyle önemli bir ölçüde hem sperm motilitesi hem de sperm canlılığı oranı artmıştır. Bununla birlikte, Saanen keçisinin verimlilik kapasitesini geliştirmek için ve mevcut sonuçları doğrulamak amacıyla bu faydalı etkilerin uygulanıp uygulanmayacağından emin olmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Üstelik, in vitro veya in vivo fertilizasyon yoluyla daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Bu alışmada, BHT ile spermanın çözündürme sonrası kalitesinin artması, ROS'un membran lipitlerindeki yağ asidi zincirleri arasında oluşturduğu kovalent bağları kırabilmesi ve serbest radikalleri temizleyerek sperm zarındaki lipit peroksidasyon reaksiyonunu engelleyebilmesi nedeniyle olabilir. Böylece, BHT Saanen teke sperminin hipotermik korunması için güvenilir bir yumurta sarısı yardımcısı olarak kullanılabilir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abd El-Salaam, A.M.**, 2002, Studies on freezing rabbit semen, M.Sc. thesis, Fac. Agric., Zagazig Univ., Zagazig, Egypt.
- Agarwal, A., Saleh, R.A. and Bedaiwy, M.A.**, 2003, Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction, *Fertil. Steril.*, 79 (4): 829-843.
- Agarwal, A., Sharma, R.K., Nallella, K.P., Thomas, A.J., Alvarez, J.G. and Sikka, S.C.**, 2006, Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility, *Fertil. Steril.*, 86 (4): 878-885.
- Aitken, R.J. and Clarkson, J.S.**, 1988, Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of spermatozoa preparation techniques, *J. Androl.*, 9 (6): 367-376.
- Aitken, R.J. and Krausz, C.**, 2001, Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome, *Reprod.*, 122 (4): 497-506.
- Aitken, R.J.**, 1994, A free-radical theory of male-infertility, *Reprod. Fertil. Dev.*, 6: 19-24.
- Aitken, R.J.**, 1995, Free radicals, lipid peroxidation and sperm function, *Reprod. Fertil. Dev.*, 7 (4): 659-668.
- Aitken, R.J., Harkiss, D. and Buckingham, D.**, 1993, Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function, *J. Reprod. Fertil.*, 98 (1): 257-265.
- Ak, K.**, 1996, Keçilerde reproduksiyon ve sun'i tohumlama. Evcil hayvanlarda reproduksiyon ve sun'i tohumlama, 100-110, Masa Üstü Yayıncılık. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını ders notu: 59.
- Akeel Ahmed Memona, Wahida, H., Rosninaa, Y., Gohb, Y.M., Ebrahimi M., Nadiac, F.M. and Audrey, G.**, 2011, Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender, *Anim. Reprod. Sci.*, 129 (1-2): 44-49.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Akhil Patel, Atul Saxena, Dilip Kumar Swain, Dushyant Yadav, Sanjay Singh Yadav, Abhishek Kumar and Anuj Kumar**, 2015, Effect of supplementation of butylated hydroxytoluene on post-thaw sperm viability, motility and membrane integrity of Haryana bulls, *Veterinary World*, 8 (6): 808-812.
- Akhter, S., Ansari, M.S., Rakha, B.A., Ullah, N., Andrabi, S.M.H. and Khalid, M.**, 2011, In vitro evaluation of liquid-stored buffalo semen at 5°C diluted in soya lecithin based extender (bioxcell®), tris-citric egg yolk, skim milk and egg yolk-citrate extenders, *Reprod. Domest. Anim.*, 46 (1): 45-49.
- Alcay, S., Gokce, E., Toker, M.B., Onder, N.T., Ustuner, B., Uzabaci, E., Gul, Z. and Cavus, S.**, 2016, Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa, *Cryobiology*, 72 (3): 269-273.
- Alvarez, J.G. and Storey, B.T.**, 1989, Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation, *Gamete Res.*, 23 (1): 77-90.
- Alvarez, J.G. and Storey, B.T.**, 1992, Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation, *J. Androl.*, 13 (3): 232-241.
- AminiPour, H., Tahmasbi, A.M. and Naserian, A.A.**, 2013, The influence of vitamin E on semen characteristics of ghezel rams in during cooling and frozen process, *Eur. J. Zool. Res.* 2 (5): 94-99.
- Anderson, S., Harkness, W., Akin, Y., Kaproth, M. and Killian, G.**, 1994, Categorical data analysis of the effect on bull fertility of butylated hydroxytoluene addition to semen extenders prior to freezing, *J. Dairy Sci.*, 77 (8): 2302-2307.
- Anghel, A. and Stela, Z.**, 2010, Role of antioxidant additives in the protection of the cryopreserved semen against free radicals, *Romanian Biotechnological Letters*, 15 (3): 33-41.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Anghel, A.H., Zamfirescu, S. and Coprean, D.,** 2010, Influence of vitamin E on microscopic and oxidative parameters of frozen-thawed ram semen, *Lucrari Stiintifice - Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara, Seria Zootehnie*, 54: 261-265.
- Anghel, A.H., Zamfirescu, S., Coprean, D. and Sogorescu, E.,** 2009, The effects of cysteine, bovine serum albumin and vitamin E on the calitative parameters of frozenthawed ram semen, *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 14 (1): 97-103.
- Arı, U.Ç.,** 2006, Yıkanmış Ankara teke spermasının boğa ve koç seminal plazması eklenmiş sulandırıcıyla dondurulması, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Arthur, G.H., Noakes, D.E., Pearson, H., Parkinson, T.J.,** 1996, *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 7th ed., 621-654.
- Asadpour, R.J., Jafari, R. and Nasrabadi, H.T.,** 2012, The effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and lipid peroxidation of chilled bull spermatozoa, *Inter. J. Vet. Res.*, 13 (3): 246-249.
- Askari, H., Check, J., Peymer, N. and Bollendorf, A.,** 1994, Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process, *Arch. Androl.*, 33 (1): 11-15.
- Asmaa, A. Mostafa, Mohamed, S. El-Belely, Sayed T. Ismail, Reda I. El-Sheshtawy and Mohamed I. Shahba,** 2019, Effect of butylated hydroxytoluene on quality of pre-frozen and frozen buffalo semen, *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 8 (1): 20-24.
- Bailey, J.L., Bilodeau, J.F. and Cormier, N.,** 2000, Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon, *J. Androl.*, 21(1): 1-7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bailey, J.L., Lessard, C., Jacques, J., Brèque, C., Dobrinski, I., Zeng, W. and Galantino-Homer, H.L.,** 2008, Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry, *Theriogenology*, 70 (8): 1251-1259.
- Ball, B.A.,** 2008, Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse, *Anim. Reprod. Sci.*, 107 (3-4): 257-267.
- Ball, B.A., Medina, V., Gravance, C.G. and Baumber, J.,** 2001, Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C, *Theriogenology*, 56 (4): 577-589.
- Baluja, S., Bhesaniya, K., Bhalodia, R. and Chanda, S.,** 2014, Solubility of butylated hydroxytoluene (BHT) in aqueous and alcohol solutions from 293.15 to 313.15 K, *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 9 (28): 48-58.
- Bamba, K. and Cran, D.G.,** 1992, Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution, *J. Reprod. Fertil.*, 95 (1): 69-77.
- Barker, C.A.,** 1957, Some aspects of artificial insemination in swine and goats. In: Proc. 10th Ann. Conv, National Assoc. Artif. Breeders, Toronto, pp. 127-132.
- Beconi, M.T., Francia, C.R., Mora, N.G. and Affranchino, M.A.,** 1993, Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation, *Theriogenology*, 40 (4): 841-851.
- Bergeron, A. and Manjunath, P.,** 2006, New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk, *Mol. Reprod. Dev.*, 73 (10): 1338-1344.
- Bilaspuri, G.S. and Sing, K.,** 1992, Developmental changes in body weight and testicular characteristics in Malabari goat kids, *Therigenology*, 37 (2): 507-520.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Gagnon, C. and Sirard, M.A.,** 2001, Thiols prevents H₂O₂ -mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen, *Theriogenology*, 56 (2): 275-286.
- Bilodeau, J.F., Chatterjee, S., Sirad, M.A. and Gagnon, C.,** 2000, Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing, *Molecular Reproduction*, 55 (3): 282-288.
- Bispo, C.A.S., Pugliesi, G., Galvão, P., Rodrigues, M.T., Ker, P. and Filgueiras, B.,** 2011, Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation, *Small Rumin. Res.*, 100: 54-58.
- Bucak, M.N.,** 2007, Ankara tekesi spermasının dondurulmasında bazı kriyoprotektanların etkisi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Bucak, M.N., Atessahin, A. and Yuce, A.,** 2008, Effect of antioxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process, *Small Rumin. Res.*, 75 (2-3): 128-134.
- Bucak, M.N., Atessahin, A., Varisli, O., Yuce, A., Tekin, N. and Akcay, A.,** 2007, The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process, *Theriogenology*, 67 (5): 1060-1067.
- Cebrián, J., Muño-Blanco, T., Pérez-Pé, R., Casao, A.,** 2010, Manejo y conservación del semen. In: Manejo reproductivo en ganado ovino, Cordinadores: Abecia, A; Focada, F. Edt.Servet. Zaragoza, España. pp: 127.
- Cerolini, S., Maldjian, A., Surai, P. and Noble, R.,** 2000, Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage, *Anim. Reprod. Sci.*, 58 (1-2): 99-111.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ceylan A., Aksoy, M., Serin, İ., Küçük, N., Uçan, U., Ahmed, E., ve Naseer, Z.,** 2013, Farklı antioksidanlarla kısa süreli saklanılan Kıvrıcık koç spermasının *in vitro* ve *in vivo* değerlendirilmesi, *Animal Health Prod. Hyg.*, 2 (2): 216-220.
- Chatterjee, S. and Gagnon, C.,** 2001, Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing, *Mol. Reprod. Dev.*, 59 (4): 451-458.
- Chaudhari, A.R., Das, P. and Singh, R.,** 2008, Study of oxidative stress and reduced glutathione levels in seminal plasma of human subjects with different fertility potential, *Biomed. Res.*, 19 (3): 207-210.
- Chen, Y., Foote, R.H. and Brockett, C.C.,** 1993, Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine and blood serum on survival of frozen bull sperm, *Cryobiol.*, 30 (4): 423-431.
- Colas, C., Junquera, C., Perez-Pe. R., Cebrian-Perez, J.A. and MuinoBlanco, T.,** 2009, Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock, *Microsc Res. Tech.*, 72 (8): 566-572.
- Copland, J.W.,** 1984, Goat production and research, ACIAR Proceedings Series 7, Australia, pp. 66-69.
- Cordova, A., Perez-Gutierrez, J.F., Lleo, B., Garcia-Artiga, C., Alvarez, A., Drobchak V. and Martin-Rillo, R.S.,** 2002, In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen semen packaged in 0.5 and 5 ml straws, *Theriogenology*, 57 (8): 2119-2128.
- Corteel, J.M.,** 1977, Production, storage and artificial insemination of goat semen. In: Management of reproduction in sheep and goats symposium, Madison, July 24-25, pp. 41-57.
- Corteel, J.M.,** 1981, Collection, proceeding and artificial insemination of goat semen. In: Gall, C. (Editör), Goat production, Academic Press, London, pp. 171-191.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Daşkın, A. and Tekin, N.,** 1996, The effect of egg-yolk on the quality of frozen Angora Buck semen, *Tr. J. of Veterinary and Animal Science*, 20 (5): 395-398.
- Daşkın, A.,** 1991, Teke spermasının dondurulması ve değişik yöntemlerle östrusları sinkronize edilen Ankara Keçilerinin tohumlamalarından elde edilen dölverimi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Deka, B.C. and Rao, A.R.,** 1987, Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen, *Indian Vet. J.*, 64: 591-594.
- Devendra, C. and Burns, M.,** 1983, Goat production in the tropics, Chapter 6. Commonwealth Agricultural Bureaux. London.
- Dewry, R.K., Deka, B.C., Bhuyan, D., Biswas, R.K., Sinha, S., Hussain, Z., Das, A., Borah, P. and Hazarika, S.B.,** 2015, Effect of vitamin E on the quality of frozen buck semen, *The Indian Journal of Small Ruminants*, 21 (2): 343-346.
- Dewry, R.K., Deka, B.C., Biswas, R.K., Bhuyan, D., Borah, P., Mahanta, N. and Kurmi, D.,** 2020, Effect of butylated hydroxy toluene and vitamin E on the cryosurvivability of buck semen, *CryoLetters*, 41 (2): 68-74.
- Donoghue, A.N. and Donoghue, D.J.,** 1997, Effects of water and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage, *Poult. Sci.*, 76 (10): 1440-1445.
- Dorado, J., Rodriguez, I. and Hidalgo, H.,** 2007, Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination, *Theriogenology*, 68 (2): 168-177.
- England, G.C.W.,** 1993, Cryopreservation of dog semen, *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 47 (1): 243-255.
- Evans, G. And Maxwell, W.M.C.,** 1987, Salamon's artificial insemination of sheep and goats, Sidney: Butterworths, pp. 107-141.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- FAO**, 2007, In: The state of world's animal genetic resources for food and agriculture (eds. B. Richkowsky and D. Pilling), FAO, Rome.
- Farshad, A., Amidi, F., Khor, A.K. and Rashidi, A., 2011**, Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin in presence and absence of egg yolk during freezing step on quality of Markhoz buck's spermatozoa, *Asian Australasian Journal of Animal Science*, 4 (2): 181-189.
- Farshad, A., Khalili, B. and Jafaroghli, M., 2010**, Effects of butylated hydroxytoluene on freezability of ram spermatozoa, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23 (10): 1276-1281.
- Foote, R.H., Brockett, C.C. and Kaproth, M. T., 2002**, Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants, *Anim. Reprod. Sci.*, 71 (1-2): 13-23.
- Foulkes, J.A., 1977**, The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa, *J. Reprod. Fert.*, 49 (2): 277-284.
- Funahashia, H. and Sano, T., 2005**, Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C, *Theriogenology*, 63 (6): 1605-1616.
- Gacitua, H. and Arav, A., 2005**, Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen, *Theriogenology*, 63 (3): 931-938.
- Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M., Garcia-Vazquez, F. and Gardon, J., 2011**, Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders, *Cryobiology*, 62 (1): 40-46.
- Gall, C., 1981**, Goat production. Academic press, Inc., London, England.
- Graham, J.K. and Hammerstedt, R.H., 1992**, Differential effects of butylated hydroxytoluene analogs on bull sperm subjected to cold-induced membrane stress, *Cryobiology*, 29 (1): 106-117.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gravance, C.G., Vishwanath, R., Pitt, C., Garner, D.L. and Casey, P.J.,** 1998, Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry, *J. Androl.*, 19 (1): 704-709.
- Hafez, E.S.E.,** 1993, Reproductive Behaviour. Ed., Hafez., E.S.E., Reproduction in Farm Animals, (İç.) Lea and Febiger, Philadelphia.
- Hammerstedt, R.H. and Graham, J.K.,** 1992, Cryopreservation of poultry semen: The enigma of glycerol, *Cryobiology*, 29 (1): 26-38.
- Hammerstedt, R.H., Amann, R.P., Rucinsky, T., Morsel, I.I. and Lepock, P.D.,** 1976, Use of spin labels and electron spin resonance spectroscopy to characterize membrane of bovine sperm: the effect of butylated hydroxytoluene and cold shock, *Biol. Reprod.*, 14 (4): 381-397.
- Hammerstedt, R.H., Keith, A.D., Snipes, W., Amann, R.P., Arruda, D. and Grid, L.C.,** 1978, Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolarity of sperm, *Biology of Reproduction*, 18 (4): 686-96.
- Hatamoto, L.K., Sobrinho, C.B., Nichi, M., Barnabe, V., Barnabe, R. and Cortada, C.,** 2006, Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and vitamin E oral supplementation on the spermiogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs, *Theriogenology*, 66 (6-7): 1610-1614.
- Herman, H.A., Mitchell, J. and Doak, G.A.,** 1994, The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle, Eight Ed: Interstate Publishers, Inc., Danville, Illinois. pp. 3-137.
- Haupt, K.A. and Wolski, T.R.,** 1982, Domestic animal behaviour for veterinarians and animal scientist, the iowa state university press, ames, iowa. pp: 96-104.
- Ijaz, A., Hussain, A., Aleem, M., Yousaf, M.S. and Rehman, H.,** 2009, Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the postthawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*), *Theriogenology*, 71 (8): 1326-1329.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Iqbal, Z., Ijaz, A., Aleem, M., Shahzad, A.H., Sohail, M.U., Nak, D., Nak, Y. and Abbas, S.,** 2015, Effect of butylated hydroxytoluene on post-thawed semen quality of Beetal goat buck, *Capra hircus*, *Pakistan J. Zool.*, 47 (1): pp. 119-124.
- Jeong, Y.J.,** 2009, Effect of a-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes, *Cryobiology*, 58 (2): 181-189.
- Kalthur, G., Raj, S., Thiyagarajan, A., Kumar, S., Kumar, P., Adiga, S.K.,** 2011, Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage, *Fertil. Steril.*, 95 (3): 1149-1151.
- Kamal, A., Gubartallah, A., Ahmed, A., Bakhiet, O. and Babiker, A.,** 2005, Comparative studies on reproductive performance of Nubian and Saanen bucks under the climatic conditions of Khartoum, *J. Anim. Vet. Adv.*, 4: 942-944.
- Karagiannidis, A., Varsakeli, S. and Karatzas, G.,** 2000, Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen, Damascus goat bucks born and raised in Greece, *Theriogenology*, 53 (6): 1285-1293.
- Karatzas, G., Karagiannidis, A., Varsakeli, S. and Brikas, P.,** 1997, Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season, *Theriogenology*, 48 (6): 1049-1059.
- Kaymakçı, M. ve Aşkın, Y.,** 1997, Keçilerde üreme. Keçi yetiştiriciliği (Ed:M. Kaymakçı, Y. Aşkın s: 64-77, Bornova, İzmir.
- Kaymakçı, M.,** 2022, Üreme Biyolojisi, Ege Üniversitesi yayınları, No: 503.
- Kefer, J.C., Agarwal, A. and Sabanegh, E.,** 2009, Role of antioxidants in the treatment of male infertility, *Int. J. Urol.* 16: 449-457.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kessopoulou, E., Powers, H.J., Sharma, K.K., Pearson, M.J., Russell, J.M., Cooke, I.D. and Barratt, C.L.,** 1995, A double-blind randomized placebo crossover controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility, *Fertil. Steril.*, 64 (4): 825-831.
- Khalifa, T.A.A., Lymberopoulos, A.G. and El-Said, B.E.,** 2008, Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen, *Reprod. Dom. Anim.*, 43 (5): 525-530.
- Khumran, A.M., Yimer, N., Rosnina, Y., Ariff, M.O., Wahid, H. and Kaka, A.,** 2015, Butylated hydroxytoluene can reduce oxidative stress and improve quality of frozen-thawed bull semen processed in lecithin and egg yolk-based extenders, *Anim. Reprod. Sci.*, 163: 128-134.
- Killian, G., Honadel, T., McNutt, T., Henault, M., Wegner, C. and Dunlap, D.,** 1989, Evaluation of butylated hydroxytoluene as a cryopreservative added to whole or skim milk diluent for bull semen, *J. Dairy Sci.*, 72 (5): 1291-1295.
- Klemm, S.,** 1993, Processing semen-quality control. Bovine artificial insemination technical manual, Ed.:P. Penner. 2nd Ed. Reproduction Technology Semex Canada Guelph, Ontario, Canada. pp: 59-67.
- Kulaksız, R.,** 2009. Farklı antioksidanlar eklenmiş sulandırıcılarla dondurulmuş Saanen tekesi spermasının in vitro değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Lalramdintluanga,** 2012, Effect of additives on quality of frozen goat semen, M.V.Sc. thesis, Assam Agricultural University, Khanapara, Guwahati-22.
- Lasso, J.L., Noiles, E.E., Alvarez, J.G. and Storey, B.T.,** 1994, Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation, *J. Androl.*, 15 (3): 255-265.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Leboeuf, B., Restall, B. and Salamon, S.,** 2000, Production and storage of goat semen for artificial insemination, *Anim. Reprod. Sci.*, 62 (1-3): 113-141.
- Lewis, S.E.M. and Aitken, R.J.,** 2005, DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy, *Cell Tissue Res.*, 322 (1): 33-41.
- Mammoto, A., Masumoto, N., Tahara, M., Ikebuchi, Y., Ohmichi, M. And Tasaka, K.,** 1996, Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice, *Biol. Reprod.*, 55 (5): 1063-1068.
- María Jesús Palomo, Wilber García and Abigail Tabarez,** 2017, Effect of seminal plasma and butylated hydroxytoluene (BHT) concentration on ram sperm freezability, *Small Ruminant Research*, 153: 66-70.
- Maxwell, W.M.C. and Watson, P.F.,** 1996, Liquid storage of ram semen in the absence of some antioxidants, *Reprod. Fertil. Dev.*, 8 (6): 1013-1020.
- Memon, A.A., Wahid, H., Rosnina, Y., Goh, Y.M., Ebrahimi, M., Nadia, F.M. and Audrey, G.,** 2011, Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender, *Animal Reproduction Science*, 129 (1): 44-49.
- Memon, M.A., Bretzlaff, K.N. and Ott, R.S.,** 1985, Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa, *Am. J. Vet. Res.*, 46 (2): 473-475.
- Merino, O., Aguagüina, W.E., Esponda, P., Risopatrón, J., Isachenko, E. and Isachenko, V.,** 2015, Protective effect of butylated hydroxytoluene on sperm function in human spermatozoa cryopreserved by vitrification technique, *Andrologia*, 47 (2): 186-193.
- Minaei, M.B.,** 2012, Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility, *Iran J. Reprod. Med.*, 10 (2): 99.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mostafa, A.A., El-Belely, M.S., Ismail, S.T., El-Sheshtawy, R.I. and Shahba, M.I.,** 2019, Effect of butylated hydroxytoluene on quality of prefrozen and frozen buffalo semen, *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 8: 20-24.
- Muduuli, D.S., Senford, L.M. and Polmer, W.M.,** 1979, Secretory patterns and circadian and seasonal changes in LH, FSH, prolactin and testosterone in male pygmy goat, *J. Anim. Sci.*, 49 (2): 543-553.
- Mutha Rao, M., Verma, P.K., Bhat, M.A., Pandey, A.K. and Raina, R.,** 2012, Effect of anti-oxidant supplementation on post thaw sperm characteristics, cellular enzyme leakage and lipid peroxidation in bull semen, *Indian J. Anim. Reprod.*, 33(1):29-32.
- Naijian, H.R., Kohram, H., Shahneh, A.Z., Sharafi, M. and Bucak, M.N.,** 2013, Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze-thaw process, *Cryobiology*, 66 (2): 151-155.
- Nain, D., Mohanty, T.K., Dewry, R.K., Bhakat, M., Nath, S., Gupta, V.K. and Parray, M.A.,** 2023, Butylated Hydroxytoluene (BHT) improves the post-thaw semen quality in low-dose sperm cryopreservation in Murrah buffalo bull, *CryoLetters*, 44 (1): 57-65.
- Neagu, V.R., Garcia, B., Sandoval, M., Rodriguez, C.S., Ferrusola, A.M., Fernandez, C.O., Tapia, L.G. and Pena, F.J.,** 2010, Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthawed sperm membrane integrity, *Theriogenology*, 73 (5): 645-650.
- O'connell, M., McClure, N. and Lewis, S.,** 2002, The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility, and mitochondrial function, *Human Reprod.*, 17 (3): 704-709.
- O'flaherty, C., Beconi, M. and Beorlegui, N.,** 1997, Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa, *Andrologia*, 29 (5): 269-275.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pace, M.M. and Graham, E.F.**, 1974, Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing, *J. Anim. Sci.*, 39 (6): 1144-1149.
- Papas, A.M.**, 1993, Oil- soluble antioxidants in foods, *Toxicology and Industrial Health*, 9 (2): 123-128.
- Partyka, A., Łukaszewicz, E. and Nizan'ski, W.**, 2012, Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen, *Theriogenology*, 77 (8): 1497-1504.
- Patel, A., Saxena, A., Swain, D.K., Yadav, D., Yadav, S.S. and Kumar, A.**, 2015, Effect of supplementation of butylated hydroxytoluene on post-thaw sperm viability, motility and membrane integrity of Haryana bulls, *Veterinary World*, 8 (6): 808-812.
- Pellicer, M.T.R., Magallon, T. and Combarous, Y.**, 1997, Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity, *Biol. Reprod.*, 57 (5): 1023-1031.
- Perchek, G., Jeulin, C., Cosson, J., Andre, F. and Billard, R.**, 1995, Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa, *J. Cell Sci.*, 108 (2): 747-753.
- Perez, B. and Mateos**, 1996, Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malaguena breeds, *Small Rum. Res.*, 23 (1): 163-168.
- Peterson, K., Kappen, M.A.P.M., Ursem, P.J.F., Notling, J.O, Colenbrander, B. and Gadella, B.M.**, 2007, Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: Effect of semen processing procedures and their correlation to fertility, *Theriogenology*, 67 (4): 863-871.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Priyadharsini, R., Saraswat, S., Yadav, S., Ramachandran, N., Jindal, S.K., Karche, S.D. and Goel, A.K.,** 2011, Influence of exogenous antioxidants on motility, membrane integrity and lipid peroxidation of frozen-thawed Sirohi buck spermatozoa, In: XXVII Annual Convention of Indian Society for the Study of Animal Reproduction, pp.104.
- Purdy, P.H.,** 2006, A review on goat sperm cryopreservation, *Small Rum. Res.*, 63 (3): 215- 225.
- Raheja, N., Choudhary, S., Grewal, S., Sharma, N. and Kumar, N.,** 2018. A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation, *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6 (3): 239-245.
- Ritar, A.J. and Salamon, S.,** 1983, Fertility of fresh and Frozen-thawed semen of the Angora goat, *Aust. J. Biol. Sci.*, 36 (1): 49-59.
- Ritar, A.J. and Salamon, S.,** 1991, Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa, *Small Rumin. Res.*, 4 (1): 29-37.
- Ritar, A.J., Ball, P.D. and O'may, P.J.,** 1990, Examination of methods for the deep freezing of goat semen, *Reprod. Fertil. Dev.*, 2 (1): 27-34.
- Ritar, A.J., Mendoza, G., Salamon, S. and White, I.G.,** 1992, Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*), *J. Reprod. Fert.*, 95 (1): 97-102.
- Roca, J., Gil, M.A., Hernandez, M., Parrilla, I., Vazquez, J.M. and Martinez, E.A.,** 2004, Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene, *J. Androl.*, 25 (3): 397-405.
- Roca, J., Martinez, E., Vazquez, J.M. and Coy, P.,** 1992, Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area, *Anim. Reprod. Sci.*, 29 (3-4): 255-262.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sakkas, D. and Alvarez, J.G.**, 2010, Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis, *Fertil. Steril.*, 93 (4): 1027-1036.
- Salamon, S. And Maxwell, W.M.C.**, 2000, Storage of ram semen, *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 77-111.
- Salamon, S. and Ritar, A.J.**, 1982, Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa, *Aust. J. Biol. Sci.*, 35 (3): 295-303.
- Saraswat, S., Jindal, S.K., Ramachandran, N., Yadav, S. and Priyadharsini, R.**, 2012, Standardization of antioxidant fortification in frozen buck semen, *Indian Journal of Small Ruminants*, 18 (1): 47-51.
- SAS**, 2000, SAS User's Guide, Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC.
- Shannon, P. and Vishwanath, R.**, 1995, The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences, *Anim. Reprod. Sci.*, 39 (1): 1-10.
- Sharma, R.K. and Agarwal, A.**, 1996, Role of reactive oxygen species in male infertility, *Urology*, 48: 835-850.
- Shoae, A. And Zamiri, M.J.**, 2008, Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender, *Anim. Reprod. Sci.*, 104 (2-4): 414-418.
- Silva, S., Soares, A., Batista, A., Almeida, F., Nunes, J. and Peixoto, C.**, 2011, In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione, *Reproduction in Domestic Animals*, 46 (5): 874-881.
- Sinha, M.P., Sinha, A.K. and Prasad, R.L.**, 1996, The effect of glutathione on motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen, *Anim. Reprod. Sci.*, 41:237-243.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Smith, A.H. and Polge, C.**, 1950, Survival of spermatozoa at low temperatures, *Nature* (London) 166: 668-671.
- Snipes, W., Person, S., Keith, A. and Cupp, J.**, 1975, Butylated hydroxytoluene inactivates lipid containing viruses, *Science* NY 188 (4183): 64-66.
- Sungur, H., Goncagül, T. ve Özsar, S.**, 1993, Ankara keçilerinde sıfat mevsiminde dondurulmuş ve taze sperma ile suni tohumlama çalışmaları ve fertilite kontrolü, *Lalahan Hay. Arş. Ens. Der.*, 33: 59-64.
- Şengonca, M. ve Koşum, N.**, 2015, Koyun ve keçi yetiştirme (Keçi yetiştirme ve ıslahı), Güncellenmiş 2. Baskı, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi yayınları, No. 563.
- Tekin, N., Yurdaydın, N. ve Daşkın, A.**, 1996, Ankara Keçilerinden değişik yöntemlerle sperma alınması ve değerlendirilmesi, *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 43 (4): 397-403.
- Thangamani, A., Srinivas, M., Chandra Prasad, B., Anusha, K. and Sadasiva Rao, K.**, 2018, Semen additives improves motility and fertility of bovine spermatozoa, *International Journal of Science, Environment and Technology*, 7 (2): 554-560.
- Therond, P., Auger, J., Legrand, A. and Jouannet, P.**, 1996, A-Tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes, *Mol. Hum. Reprod.*, 2 (10): 739-744.
- Thomson, L., Fleming, S., Aitken, R., De Iuliis, G., Zieschang, J.A and Clark, A.**, 2009, Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis, *Hum. Reprod.*, 24 (9): 214.
- Tuli, R.K., Schmidt-Baulain, R. and Holtz, W.**, 1991, Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats, *Anim. Reprod. Sci.*, 25 (2): 125-131.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Türk, G., Sönmez, M., ve Şimşek, Ü.G.,** 2005, Kıl keçisi tekeleri ve Saanen x Kıl keçisi F1 melezi tekelerinin bazı üreme özelliklerinin karşılaştırılması, *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi.*, 19: 87-92.
- Upreti, G., Jensen, K., Munday, R., Duganzich, D., Vishwanath, R. and Smith, J.,** 1998, Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant, *Anim. Reprod. Sci.*, 51 (4): 275-287.
- Uysal, O. and Bucak, M. N.,** 2007, Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozenthawed ram semen, *Acta Veterinaria Brno*, 76 (3): 383-390.
- Uysal, O., Bucak, M.N., Yavaş, I. and Varişli, O.,** 2007, Effects of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen, *J. Anim. Vet. Adv.*, 6: 1362-1366.
- Üstüner, B., Nur, Z. ve Alcay, S.,** 2015, Effect of freezing rate on goat sperm morphology and DNA integrity, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39 (1): 110-114.
- Viillemure, M., Lazure, C. and Manjunath, P.,** 2003, Isolation and characterization of gelatine-binding proteins from seminal plasma, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 1: 39.
- Wadood, F., Aleem, M., Ijaz, A., Ahmad, N., Yousaf, M.S. and Mughal, D.H.,** 2016, Effect of extender osmolality and butylated hydroxytoluene supplementation on post thaw quality and fertility of Nili Ravi buffalo bull (*Bubalus bubalis*) semen, *J. Anim. Plant Sci.*, 26 (3): 605-611.
- Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J. and Taylor, W.A.,** 1994, Testicular and epididymal sperm content in grazing cashmere bucks: seasonal variation and prediction from measurements in vivo, *Reprod. Fertil. Dev.*, 6 (6): 727-736.
- Watson, P.F. and Anderson, W.,** 1983, Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock, *J. Reprod. Fertil.*, 69 (1): 229-235.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Watson, P.F.**, 1981, The role of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein, *J. Reprod. Fertil.*, 62 (2): 483-492.
- Watson, P.F.**, 2000, The cause of reduced fertility with cryopreserved semen, *Anim. Reprod. Sci.*, 61 (1): 481-492.
- Wu, T-W., Hashimoto, N., Wu, J., Carey, D., Li, R-K., Mickle, D.A. and Weisel, R.D.**, 1990, The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells, *Biochem. Cell Biol.*, 68 (10): 1189-1194.
- Yükçü, S. ve Bahşı, S.**, 2019, Keçi sütü maliyeti uygulama önerisi, *İzmir YMMO Dergisi*, 1 (1): 13-24.
- Zini, A., Fischer, M.A., Mak, V., Phang, D. and Jarvi, K.**, 2002, Catalase-like and superoxide dismutase-like activities in human seminal plasma, *Urol. Res.*, 30 (5): 321-323.
- Zribi, N., Chakroun, N.F., El Euch, H., Gargouri, J., Bahloul, A. and Keskes, L.A.**, 2010, Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity, *Fertil. Steril.*, 93 (1): 159-166.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sırasında ve tez çalışmamın her aşamasında fikirleri ve tavsiyeleriyle çalışmalarına yol gösteren değerli danışmanlar hocam Sayın; Prof. Dr. Nedim KOŞUM'a ve hocam Sayın Prof. Dr. Turgay TAŞKIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bilgi birikimi ve becerilerini benimle paylaşan ve yardımını her daim esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Çağrı KANDEMİR'e teşekkür ederim.

Bu çalışmada veri toplama sürecine destek veren tüm Ege Üniversitesi Zootečni Bölümü Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı araştırma görevli ve öğrencileri ile ve bu süreçte bana destek olan kıymetli ailem ve yakın dostlarıma teşekkür ederim.

Doktora öğrenim ve tez aşamaları boyunca hem maddi hem manevi yardımlarını esirgemeyen Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na en içten duygularıyla teşekkür ederim.

19/06/2023

Ahmed SEIOUDY

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Ahmed Fathy Hassan SEIOUDY

Uyruğu: Mısır

Eğitim

Lisans: Ain Shams Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü (2003-2007).

Yüksek Lisans: Ain Shams Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü (2009-2013).

Doktora: Ain Shams Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü (2014- 2021).

Doktora: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootečni Bölümü (2018- 2023).

Yabancı dili

Arapça (Ana dil), İngilizce, ve Türkçe.

YAYINLAR:

- Seioudy, A.F., Abdalla, E.B., Ashmawy, A.A., Farouk, M.H., Salama, O.A. and Khalil, F.A.,** 2015. Milk production potential in Maghrebi she-camels. Small Ruminant Research, Vol. 123: Issue 1, pp. 129-135.
- Seioudy, A.F., Abdalla, E.B., Ashmawy, A.A., Salama, O.A., Farouk, M.H., Khalil, F.A. and Caja, G.,** 2016. Effect of milking interval on milk partitioning between udder compartments, milk yield and milk composition in Maghrebi dairy camels. Small Ruminant Research, Vol. 136: Issue 3, pp. 214-220.
- Gbadamonsi, A.A., Ahmed, A.S., Cisse, A.S., Seioudy, A.F., Taşkın, T., Engindeniz, S., Kandemir, Ç. ve Koşum, N.,** 2020. Süt Tüketiminde Laktoz Duyarlılığının (İntolerans) Analizi: İzmir İli Bornova İlçesi Örneği J. Anim. Prod., 61 (2): pp. 127-134.
- Abdalla, E.B., Zeidan, A.E., Seioudy, A.F., Khalil, F.A., Abdel-Salam, Z.A., Badr, M.R. and Allam, M.W.,** 2021. Effect of Green Laser Irradiation on Camel Semen Quality Stored at 5°C. Arab Universities Journal of Agricultural Sciences, Vol. 29: Issue 1, pp. 307-314.
- Engindeniz, S., Taşkın, T., Gbadamonsi, A.A., Ahmed, A.S., Cisse, A.S., Seioudy, A.F., Kandemir, Ç. ve Koşum, N.,** 2021. Tüketicilerin Süt ve Süt Ürünleri Tercihlerinin Analizi. Journal of Tekirdag Agricultural Faculty, 18 (3): pp. 470-481.

KONGRE YAYINLARI

Caja, G., Salama, O.A., Seioudy, A.F., El-Sayed, H. and Salama, A.A.K., 2011. Milk partitioning and accumulation in the camel udder according to time elapsed after milking. The 62nd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP), Stavanger, Norway, 29/08 - 02/09/2011, pp. 363.

Abdalla, E.B., Ashmawy, A.A., Salama, O.A., Seioudy, A.F. and Caja, G., 2013. Milking at different intervals including milk partition and accumulation in Maghrebi she-camels udder. Conference of Sustainability of Camel Population and Production (CSCPP), College of Agricultural and Food Sciences, King Faisal University, Al-Ahsa, Saudi Arabia, 17/02 - 20/02/2013, pp. 82.

Abdalla, E.B., Ashmawy, A.A., Salama, O.A., Khalil, F.A. and Seioudy, A.F., 2014. Relationship between milk production and some blood constituents in Maghrebi she-camels. The Twelfth Conference of Agricultural Development Researches, Faculty of Agriculture, Ain Shams University, Cairo, Egypt, 24/03 - 27/03/2014, pp. 71.

Abdalla, E.B., Seioudy, A.F., Ashmawy, A.A., Salama, O.A. and Khalil, F.A., 2016. The short-term effects of milking intervals on milk yield and milk composition in Maghrebi dairy camels. The 25th Congress of the Egyptian Society for Animal Reproduction and Fertility (ESARF), Taba, South Sinai, Egypt, 14/04 -17/04/2016, pp. 75.

Abdalla, E.B., Caja, G., Seioudy, A.F., Salama, O.A. and Farouk, M.H., 2016. Milking interval and cisternal udder evaluation in Egyptian Maghrebi camels (*Camelus dromedarius* L.). The 67th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP), Belfast, United Kingdom, 29/08 - 02/09/2016, pp. 275.

Seioudy, A.F., Salamaa, O.A. and Seioudy, M., 2017. Effect of milking interval on alveolar versus cisternal milk accumulation and milk composition in Egyptian Maghrebi camels (*Camelus dromedarius* L.). 19th International Veterinary Medicine Student Scientific Research Congress, Istanbul, Turkey, 02/05 - 04/05/2017, pp. 169-170.

Kandemir, Ç., Taşkin, T., Akkaya, F., Kandemir, B.N., Ahmed, A.S., Seiouy, A.F., Gbadamonsi, A.A., and Koşum, N., 2019. Relationship Between Placental Features and Birth Characteristics in Goats. 11th International Animal Science Conference, Cappadocia, Turkey, 20/10 - 22/10/2019, pp. 110-111.

Seiouy, A.F. and Koşum, N., 2021. Green Laser Irradiation Effects on Camel Spermatozoa Quality during Incubation. 31st International Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry (AGRIFOOD 2021), Ege University, Izmir, Turkey, 27/09 - 28/09/2021, pp. 41-49.

Seiouy, A.F., 2021. Epididymal Camel Spermatozoa Quality as Affected by Green Laser Irradiation during Incubation at 37°C. 6. Uluslararası Öğrenci Bilimler Kongresi, Ankara, Turkey, 09/12 - 12/12/2021.

ONUR VE ÖDÜLLER

Fen Bilimleri, Birinci Ödülü. Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı (YTB), 6. Uluslararası Öğrenci Bilimler Kongresi, Ankara, Turkey, 24/12/2021.