T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM, JİNEKOLOJİ VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

HALEP TEKELERİNDE TRİS YUMURTA SARISI TEMELLİ SULANDIRICIYA FARKLI KONSANTRASYONLARDA KOENZİM Q10, VİTAMİN E VE VİTAMİN C İLAVESİNİN DONDURMA ÇÖZDÜRME SONRASI SPERMATOLOJİK PARAMETRELERE VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Mustafa ŞAHİN

Danışman

Prof. Dr. İlker YAVAŞ

HATAY-2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM, JİNEKOLOJİ VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

HALEP TEKELERİNDE TRİS YUMURTA SARISI TEMELLİ SULANDIRICIYA FARKLI KONSANTRASYONLARDA KOENZİM Q10, VİTAMİN E VE VİTAMİN C İLAVESİNİN DONDURMA ÇÖZDÜRME SONRASI SPERMATOLOJİK PARAMETRELERE VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Mustafa ŞAHİN

Danışman

Prof. Dr. İlker YAVAŞ

HATAY-2024

Kabul ve Onay
T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM, JİNEKOLOJİ VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

HALEP TEKELERİNDE TRİS YUMURTA SARISI TEMELLİ SULANDIRICIYA FARKLI KONSANTRASYONLARDA KOENZİM Q10, VİTAMİN E VE VİTAMİN C İLAVESİNİN DONDURMA ÇÖZDÜRME SONRASI SPERMATOLOJİK PARAMETRELERE VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİ

Doktora Tezi

Mustafa ŞAHİN

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından ..... günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oyçokluğu/oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:	Jüri Başkanı	:
	Üye	:
	Üye	:
	Üye	:
	Üye	:

Bu tez, Enstitümüz Doğum, Jinekoloji ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez aşamasındaki çalışma sürecinde bilgi ve deneyimlerini paylaşarak yardımlarını esirgemeyen başta değerli danışman hocam Prof. Dr. İlker YAVAŞ'a; Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof Dr. Fikret KARACA'ya, Prof. Dr. Cengiz YILDIZ ve Dr Öğretim üyesi Nurdan COŞKUN'a; Anabilim Dalı Öğretim Elemanı Arş. Gör. Oğuz Kaan YALÇIN'a; çalışmada kullanılan tekelerin teminini sağlayan Pan Hayvancılık Damızlık Damascus Keçi İşletmesi sahibi Veteriner Hekim Haydar DEMİREZER'e, Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme, tez çalışmalarım sırasında manevi destekleri olan eşime çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ŞEKİLLER DİZİNİ VI
ÇİZELGELER DİZİNİ VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ VIII
ÖZET X
ABSTRACT XI
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Halep Keçisi Irk Özellikleri 4
2.1.1. Halep Keçisi Morfolojisi 4
2.1.2. Halep Keçisi Döl Verim Özellikleri 5
2.2. Tekelerde Üreme Sistemi 5
2.2.1. Testisler 5
2.2.2. Epididimis 6
2.2.3. Deferent Kanallar 6
2.2.4. Tekelerde Eklenti Bezleri 6
2.2.5. Dış Genital Organları 7
2.3. Tekelerin Üreme Özellikleri 7
2.3.1. Tekelerde Cinsel Erginlik 7
2.3.2. Tekelerde Cinsel Davranışlar 7
2.3.3. Üreme Mevsimi 8
2.3.4. Spermatogenezis 8
2.3.5. Tekelerde Sperma Verimi ve Özellikleri 9
2.3.6. Spermanın Alınması 10
2.4. Spermanın Dondurulması 11

2.4.1. Teke Spermasının Dondurulmasnda Kullanılan Sulandırıcılar ve Kriyoprotektanlar 12
2.4.2. Teke Spermasının Sulandırılması ve Sulandırıcı Oranı 13
2.4.3. Teke Spermasını Dondurma Yöntemleri 14
2.4.4. Spermanın Çözdürülmesi 15
2.5. Serbest Radikaller 16
2.6. Lipid Peroksidasyon ve Malondialdehit (MDA) Oluşumu 17
2.7. Spermatozoon Üzerine Serbest Radikallerin Etkisi 19
2.8. Antioksidanlar ve İşlevi 20
2.8.1. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar 23
2.8.2. Enzimatik Antioksidanlar 26
3. GEREÇ VE YÖNTEM 27
3.1. Gereç 27
3.2. Yöntem 28
3.2.1. Spermanın Alınması 28
3.2.2. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi 30
3.2.3. Spermanın Sulandırılması ve Antioksidan Grupları 36
3.3. İstatis 39
3.3. İstatiksel Değerlendirme 39
4. BULGULAR 40
4.1. Tekelerden Alınan Sperma Örneklerinde Spermatolojik Özellikler 40
4.2. Alışım Sonrası Spermatolojik Değerler 40
4.3. Dondurma Çözdürme Sonrası Spermatolojik Değerler 42
4.4. Dondurma Protokolüne Göre Çözüm Sonu Spermatolojik Değerler 43
4.5. MDA (Molandialdehit) Sonuçları 43
5. TARTIŞMA 45
6. SONUÇ 67
7. KAYNAKLAR 69
ÖZGEÇMİŞ 76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. TBA-MDA kompleksi oluşumu 19
Şekil 4.1. Çalışmada Kullnılan Halep Tekeleri 28
Şekil 4.2. Halep Tekelerinden Elektro-Ejekülatör ile sperma alma işlemi 31
Şekil 4.3. Sperma Örneklerinin Değerlendirilmesi 32
Şekil 4.4. Ölü Spermatozoon Oranının Değerlendirilmesi 35
Şekil 4.5. Spermada Sulandırma İşlemi 39
Şekil 4.6. Grupların oluşturulması 40
Şekil 5.1. Sulandırıcı Gruplarında MDA Değerleri 48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan Halep tekelerin birleştirilmiş ejekülatlarından elde edilen ortalama spermatolojik değerler 40

Çizelge 5.2. Alışım sonrası sulandırıcı gruplarında 4-5 °C'de elde edilen spermatolojik değerler 51

Çizelge 5.3. Dondurma çözdürme sonrası sulandırıcı gruplarında spermatolojik değerler 52

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA	:	Tek yönlü varyans analiz
ATP	:	Adenozin trifosfat
BHT	:	Butylated hydroxytoluene
cc	:	Santimetreküp
cm	:	Santimetre
cm3	:	Santimetreküp
°C	:	Santigrat derece
dk	:	Dakika
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DNA	:	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
EYCE	:	Yumurta sarısını koagüle edici enzim
FSH	:	Folikül stimüle edici hormon
g	:	Gram
GnRH	:	Gonadotropin releasing hormon
GSH	:	Glutathione
GSSG	:	Glutathione disulfide
HOS	:	Hipoosmotik şişme
IU	:	Internasyonel unite
K	:	Potasyum
kg	:	Kilogram
L	:	Litre
LH	:	Luteinleştirici hormon
M	:	Molar
mM	:	Milimolar
m	:	Metre
mda	:	Malondialdehit
mm	:	Milimetre
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mOsm	:	Miliosmol
mm3	:	Milimetreküp
NaCl	:	Sodyum klorür
ng	:	Nanogram
pg	:	Pikogram
pH	:	Hidrojen konsantrasyonunun kologaritması
RNA	:	Ribo nükleik asit
rpm	:	Dakikadaki devir Sayısı
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
S	:	Kükürt
SBUIII	:	Bulboüretral kökenli bir protein
sn	:	Saniye
SOD	:	Süperoksit dismutaz
Tris	:	Hidroksimetil aminometan

USG	:	Ultrasonografi
X	:	Büyütme
X2	:	Ki kare
V	:	Volt
v	:	Hacim
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
%	:	Yüzde
10^6	:	Milyon
10^9	:	Milyar
°	:	Derece
'	:	Dakika
"	:	Saniye
>	:	Büyük
<	:	Küçük
≥	:	Büyük eşit
≤	:	Küçük eşit

ÖZET

Halep Tekelerinde Tris Yumurta Sarısı Temelli Sulandırıcıya Farklı Konsantrasyonlarda Koenzim Q10, Vitamin E ve Vitamin C İlavesinin Dondurma Çözdürme Sonrası Spermatolojik Parametrelere ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Bu çalışmada, Tris yumurta sarısı (YS) temelli sulandırıcıya farklı konsantrasyonlarda Koenzim Q10 (0.5 mM, 1 mM), E (0.3 cc/ml, 0.6 cc/ml) ve C (0.5 mg/ml, 1 mg/ml) vitamini ilavesiyle farklı dondurma protokolleri uygulanarak sperma parametrelerine olan etkisi amaçlandı. Sperma 4 adet Damascus tekesinden aşım mevsiminde elektroejakülatör ile toplandı. Ardından, normospermik kaliteye sahip olan ejekulatlar birleştirildi. Sulandırılmış sperma örneklerini içeren payetler +4 °C'de 2 saat süreyle ekilibre edildikten sonra, sıvı azot buharında (-120 °C) 2 farklı dondurma prokolü (a; 15 °C/dk. 8 dakika, b; 20 °C/dk. 6 dakika) ile dondurularak (-196 °C) saklandı. Alışım sonrası, Kontrol grubu (Tris-YS) sulandırıcısında motilite ve canlılık en düşük, anormal spermatozoon en yüksek bulunmuştur. Q1b (Koenzim Q10 1 mM) grubunda en yüksek motilite ve canlılık ile en düşük anormal spermatozoon saptanmıştır.

Farklı dondurma protokolü uygulanan antioksidan grupları arasında çözdürme işlemi sonucunda, Q1b diğer antioksidan gruplardan motilite, canlılık, membran bütünlüğü yönünden en yüksek değer ve anormal spermatozoon yönünden en düşük değer saptanmıştır. Koenzim Q10 grupları arasında, farklı dondurma protokolü uygulanmasının motilite, canlılık ve membran bütünlüğü yönünden istatiksel olarak fark olmadığı, anormal spermatozoon yönünden istatiksel olarak farklıdır. Dondurma çözdürme sonrasında sulandırıcılarda Tris-YS grubunda en düşük motilite, canlılık, ve membran bütünlüğü ile en yüksek anormal spermatozoon saptanırken, en iyi sperma parametre değerleri Q1b grubundadır. Lipid peroksidasyonun bir ürünü olan Malondialdehit (mda) oluşumu kontrol grubuna göre en az mda değeri, antioksidan eklenmiş Q1a grubunda meydana gelmiştir.

Sonuç olarak Halep (Damascus) teke spermasının dondurulmasında Tris-YS sulandırıcısına yapılan antioksidan ilavesinin lipid peroksidasyon oluşumuna olumlu etkisi olduğu, farklı dondurma protokolleri uygulanmasının istatiksel olarak gruplar arası fark sağlamadığı, sperma parametreleri geliştirmesi açısından antioksidan ilavesinin olumlu bir etkisi olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Koenzim Q10, Vitamin E, Vitamin C, Sperma dondurma, Teke.

ABSTRACT

Effect of Addition of Different Concentrations of Coenzyme Q10, Vitamin E and Vitamin C to Tris Egg Yolk Based Extender on Spermatological Parameters and Oxidative Stress After Freezing and Thawing in Damascus Goats

In this study, the effect of Tris egg yolk (EY)-based extender on sperm parameters by applying different freezing protocols with the addition of different concentrations of Coenzyme Q10(0.5 mM, 1 mM), E (0.3 cc/ml, 0.6 cc/ml) and C (0.5 mg/ml, 1 mg/ml) and C vitamins was aimed. Sperm were collected from 4 Damascus bucks by electroejaculator during the breeding season. Ejaculates of normospermic quality were then combined. Straws containing reconstituted semen samples were equilibrated for 2 hours at +4 °C, and then in liquid nitrogen vapor (-120 °C) 2 different freezing protocols (a; 15 °C/min. 8 minutes, b; 20 °C/min. 6 minutes) and frozen (-196 °C) stored. In post-breeding semen, control grub (Tris-EY extender) had the lowest motility and viability, and the highest abnormal spermatozoon. In the Q1b (Coenzyme Q10 1 mM) group, the highest motility and viability and the lowest abnormal spermatozoa were detected. As a result of the thawing process among the antioxidant groups applied to different freezing protocols, Q1b had the highest value in terms of motility, viability, membrane integrity and the lowest value in terms of abnormal spermatozoon among the other antioxidant groups. There was no statistical difference between the Coenzyme Q10 groups in terms of motility, viability and membrane integrity, and there was a statistical difference in terms of abnormal spermatozoon following different freezing protocols.While the lowest motility, viability, and membrane integrity and the highest abnormal spermatozoa were detected in the Tris-EY group, the best sperm parameter values were found in the Q1b group in extenders after freezing and thawing. The formation of Malondialdehyde (mda), a product of lipid peroxidation, occurred from the groups with the least mda value, antioxidant added Q1a compared to the control group.

As a result, it was concluded that the antioxidant addition to Tris-EY extender in the freezing of Damascus buck semen had a positive effect on the formation of lipid peroxidation, the application of different freezing protocols did not provide a statistical difference between the groups, and the addition of antioxidants had a positive effect in terms of improving semen parameters.

Keywords: Coenzyme Q10, Vitamin E, Vitamin C, Semen freezing, Billy goat.

1. GİRİŞ

Türkiye'de keçi yetiştiriciliği, genellikle orman içi ve kenarı bölgeler ile bitkisel üretime ve diğer hayvan türlerinin yetiştirilmesine uygun olmayan ve arazinin sarp olduğu alanlarda yapılmaktadır. Özellikle dağlık alanlardaki işletmelerde üretim deseninin geniş olmaması nedeniyle keçi yetiştiriciliği bir zorunluluk olarak ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla bu alanlarda keçi sayısının azaltılması ya da keçi yetiştiriciliğinden vazgeçilmesi yaşayan halkın geçimini olumsuz etkileyebilecektir. Keçi yetiştiriciliğinin bu açıdan taşıdığı sosyo-ekonomik önem bugüne kadar yapılan birçok araştırmada da ortaya konulmuştur (Gökçe ve ark. 1997). Türkiye'de keçi yetiştiriciliği; ya tarım işletmesi içinde, ya da köy sürüleri, yaylacılık veya göçer sürüler şeklinde sürdürülmektedir. Ancak son yıllarda Batı Anadolu'da, peynir üretimi yapan ya da peynir üreten mandıralara süt sağlayan entansif işletmeler de faaliyet göstermektedir. Bu işletmelerde ise genellikle Saanen melezi yetiştirilmektedir (Kaymakçı ve Taşkın 2006).

Türkiye sahip olduğu doğal ve ekonomik koşulları, tarımsal yapısı, gelenekleri ile koyun ve keçi yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapılmasına elverişli bir ülke konumundadır (Kaymakçı ve ark. 2010)

Güneydoğu bölgesinde yoğun olarak yapılan keçi yetiştiriciliğinde Kıl keçisi, Kilis keçisi ve son olarak Halep keçisi ırkı sıralamayı takip eder. Literatürlerde Damascus olarak geçen keçi ırkı, Güneydoğu gölgesinde Halep ve şami diye bilinmektedir (Barıtcı ve Adıgüzel 2017). Ayrıca damascus keçisi daha çok Suriye keçisi yada Arap keçisi olarakta tanınmaktadır (Akmaz ve ark. 2021).

Keçi sayısının ve gerekse hayvan başına alınan verim özelliklerinin artırılması, bilimsel ıslah programlarının uygulanabilirliği ölçüsünde mümkün olmaktadır. Yetiştiricilikte en önemli verim özelliği döl verimidir. Hayvanlardan sürekli ve iyi bir döl verimi alınabilmesi ise, büyük ölçüde döl verimini etkileyen faktörlerin kontrol edilebilmesine bağlıdır. Hayvan yetiştiriciliğinde suni tohumlama yöntemi, sürüde genetik iyileşmenin hızlı bir biçimde gelişimini sağlayan modern bir yöntem olarak görülmektedir. Bu nedenle keçilerde suni tohumlama yönteminden yararlanarak üstün özellikteki erkek bireylerin dondurulmuş spermalarının kullanımı, yetiştirme programlarında hızlı bir

genetik iyileşme elde edilmesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Öte yandan, teke spermasının dondurulup suni tohumlama yöntemiyle tohumlamada kullanılması üzerindeki çalışmalar 1950'li yıllarda başlayarak günümüze kadar süregelmiştir. Suni tohumlama uygulamalarının yaygınlaştırılması ile genetik ilerlemenin hızlandırılması, damızlık değeri yüksek tekelerden daha fazla yararlanılması, yetiştirmeye bağlı gereksiz uğraş ve masrafların azaltılması, çiftleşme ile bulaşabilecek reprodüktif hastalıkların kontrolü ve döl veriminin arttırılabilmesi sağlanabilecektir (Üstüner ve Günay 2009).

Suni tohumlamanın yaygınlaştırılmasındaki en önemli unsur spermanın dondurularak uzun sureli saklanmasıdır (Kaymakçı ve Taşkın 2001).

Teke sperması ilk defa 1950 yılında Smith ve Polge tarafından dondurulmuştur. Teke spermasının dondurulmasında; yağsız süt tozu, sodyum sitrat-glukoz-yumurta sarısı, laktoz yumurta sarısı, raffinoz-yumurta sarısı spermasol-yumurta sarısı, Tris-yumurta sarısı gibi birçok sulandırıcının ve %3-%9 arasında değişen gliserol konsantrasyonlarının kullanıldığı bildirilmektedir (Purdy 2006).

Spermanın dondurulmasında kullanılan sulandırıcıda kriyoprotektif özellikli maddelerin bulunması gereklidir. Kriyoprotektanlar hücrenin soğutulması ve dondurulması esnasında gelişen fiziksel, kimyasal ve oksidatif stres hasarlarını (ısı şoku ve ozmotik değişim hasarı, intraselüler kristal oluşumu, serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun oluşturduğu hasarlar) azaltmak amacıyla kullanılmaktadır (Bucak ve Tekin 2008).

Serbest oksijen radikallerinin toksik etkilerine karşı koymak için, spermatozoa ve seminal plazma lipit peroksidasyonuna karşı bir takım antioksidanları içermektedir. Fakat bu antioksidan sistemi, serbest oksijen radikallerinin olası toksik etkilerine ve oksidatif hasara karşı koymada yeterli gelmemektedir. Bunun yanısıra dondurma ve çözdürme işlemlerinin, spermada bulunan antioksidan aktiviteyi düşürdüğü saptanmıştır (Bucak ve Tekin 2008).

Dondurulmuş-çözdürülmüş spermada azalan antioksidan kapasite ve artan reaktif oksijen radikal oluşumu, spermatolojik özellikleri ve fertiliteyi olumsuz olarak etkiler. Dondurulmuş- çözdürülmüş sperma, taze spermaya göre peroksidasyona daha duyarlıdır. Son zamanlardaki araştırmalar spermanın saklanması sırasında infertiliteye yol açan en önemli sebep olarak spermatozoon membran lipidlerinin peroksidasyonunu göstermektedir. Bu nedenle teke spermasının dondurulmasında, çözdürme sonrası

spermatolojik parametreler üzerine olumlu etkileri olabileceği düşünüldüğünden, sperma sulandırıcılarına antioksidan maddeler katılmaktadır (Kulaksız ve Daşkın 2009).

Yapılan bu tez çalışmasında Halep (Damascus) tekelerden alınan spermalar Tris, Yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırılarak, spermanın dondurulmasında Kriyoprotektan olarak Gliserol antioksidan olarak Koenzim Q10, E ve C vitamini kullanılmıştır. Çözüm sonu sperma parametreleri ve lipid peroksidasyona olan etkisinin, bir göstergesi olan molandialdehit (mda) değerleri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Halep Keçisi Irk Özellikleri

Arabistan bölgesinde Şami, İngilizce literatürlerde Damascus, Ülkemizde Halep olarak bilinen keçi türü, Akdeniz şeridinde Suriye'den Mısır'a kadar uzanan yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ülkemizde Güneydoğu Anadolu bölgesinde Hatay ve Şanlıurfa'da yetiştiriciliği yoğun olarak yapılan illerdir. Halep keçisinin en önemli özelliği, yüksek sıcaklığa dayanıklı bir ırk olmasıdır. Diğer önemli bir özelliği de düz ovalarda kısa bitki örtüsünden yeterince faydalanabilmesidir. Bu keçi ırkının Türkiye'de yetiştirilmesinin en önemli avantajı özellikle Güneydoğu Anadolu, İç Anadolu ve Akdeniz bölgesindeki yüksek sıcaklık ve verimli olmayan meralardan koyuna göre daha iyi faydalanmasıdır. Ayrıca hasat sonrası anız alanlarını etkili bir şekilde değerlendirmektedir. Halep keçisinin; döl verim özelliklerinin iyi olması, kurak ve yarı kurak bölgelerde adaptasyon kabiliyetinin yüksek olması bu ırkı diğer keçi ırklarından ayıran en önemli özelliği olarak değerlendirilebilir. Türkiye'nin büyük kısmı, Güneydoğu Anadolu bölgesinin tamamı kurak ve yarı kurak bir iklim özelliğine sahiptir. Özellikle bu bölgede kış mevsiminin sert ve uzun geçmemesi Halep keçi ırkının ekonomik olarak yetiştirilmesinde önemli bir faktördür (Barıtçı ve Adıgüzel 2017).

2.1.1. Halep Keçisi Morfolojisi

Halep keçileri uzun vücut yapılı ve yüksek bacaklıdırlar. Bu özellikleri onlara geniş düzlüklerde uzun mesafe yürüme özelliği kazandırırken, dağlık ve engebeli arazilerde dezavantaj oluşturmaktadır. Halep keçisi kıl renkleri birbirinden farklı iki temel varyeteye sahiptir. Birincisi Türkiye'de sayıca fazla olan koyu kestane (kırmızı kahverengi) renkli olandır. İkincisi ise siyah renkte (gri-bej renkli) olanıdır. Ancak Halep keçilerinin Beyaz, Kül rengi ve Kırmızı-Beyaz lekeli varyeteleri vardır (Barıtçı ve Adıgüzel 2017).

2.1.2. Halep Keçisi Döl Verim Özellikleri

Amik ovasında ekstansif şartlarda yetiştirilen Şam keçisi yüksek döl verimi ile tanınmaktadır. Bölgede, bu keçilerde çiftleştirmeler Ağustos sonu Eylül başlarında gerçekleşmektedir. Halep keçilerinin döl ve süt verimi özellikleri yüksek değerdedir. Ancak keçilerin meme yapısının sarkık olması, çalılık ve taşlık arazilerde yetiştiriciliğinde dikkate alınması gereken bir durumdur. Bu konuda yapılacak seleksiyon ve tip sabitleştirmesi ile bu sorun ortadan kaldırıldığında bu keçiler dağlık ve çalılık arazilerde de süt verimi için rahatlıkla yetiştirilebilecektir (Barıtçı ve Adıgüzel 2017).
Halep keçisi döl verim özellikleri; oğlak verimi %155, fertilite oranı %140, doğum ağırlığı 3.80 kg, sütten kesim ağırlığı 18.63 kg olarak saptanmıştır (Özuyanık 2004).

2.2. Tekelerde Üreme Sistemi

2.2.1. Testisler

Testisler anatomik olarak vücut boşluğunun dışında, skrotum içerisinde perineal bölgede bulunur. Temel görevi spermatozoon üretmek olan testisler, paranşim yapılı organlardır. Testisler, endokrin hormonlardan testesteron salgısı ve ekzokrin yöndenden spermatogenezis görevi yapan bir çift organdır. Bu organlar, Funiculus spermaticusla asılı şekilde scrotum adı verilen deri kısım içinde bulunur. Skrotum altında, gevşek bağ dokusu bulunur. Bağ dokuyu M. Cremasteri kaplar. Testislerde ısı ayarlamasını bu yapılardan skrotum ve M. Cremaster birlikte gerçekleştirir. Normal vücut sıcaklığının altında, spermatozoon üretimi olur. Spermatozoon üretimi ve koordinasyonu seminifer tubüllerde meydana geldikten sonra, bu tübuller arasında bulunan Leyding hücreleri Testosteron salgılar (Edmondson ve ark. 2012). Testisin epitelyumunda bulunan sertoli hücreleri hücrelerin beslenmesini ve gelişmesini sağlar. Ergin ve sağlıklı bir tekenin her bir testis ağırlığı ortalama 275 gr.'dır. Normal sağlıklı bir testis büyüklüğü ile spermatogenezis arasında korelasyon vardır. Çiftleşme döneminde, testisin büyüklüğü ile spermatozoon üretiminim artması ilişkilidir (Evans ve Maxwell 1987; Hafez ve hafez 2000; Haigh 2007; Yavaş 2008).

Testislerin sperma üretme kapasitesi kalıtım yoluyla önceden belirlenip, yaşına, hormonlara, beslenme, iklim ve mevsim gibi koşullarla kontrol edilmektedir (Yavaş 2008).

2.2.2. Epididimis

Testisin üzerinde bulunan, Caput (baş), Corpus (gövde) ve cauda (kuyruk) olmak üzere üç kısımdan oluşan epididimis, spermatozoanın taşınmasını, beslenmesini, maturasyonun gerçekleştiği kanallardan meydana gelir (Hafez ve Hafez 2000). Tekelerde yaklaşık 60 m uzunluğuna sahiptir. Epididimisin spermatozoa iletimi, yoğunlaştırması, olgunlaşması ve depolanması bilinen görevleridir (Evans ve Maxwell 1987).

2.2.3. Deferent Kanallar

Testislerde, Epididimisin caudalinden sonra gelen Duktus deferens urethraya kadar devam ederek spermatozoonların taşınmasında görev alır. Duktus deferensin kalınlaşmasıyla şekillenen ampulla duktus deferens urethraya açılmadan önce veziküler bezlerin kanallarıyla birleşerek duktus ejekulatorius oluşturur. Urethra ejekulatın ve idrarın taşıyıcı ortak kanalıdır. Bu kanal orificium urethra externa ile dışarı açılır (Hafez ve Hafez 2000; Evans ve Maxwell 1987).

2.2.4. Tekelerde Eklenti Bezleri

Tekelerde eklenti bezleri olarak prostat, vesikula seminalis ve bulbouretral bezler (Cowper bezi) bulunur.

Prostat: Pelvisin bazal kısmında, idrar kesesi arka tarafında ve boyun kısmında yer alan tek bir salgı bezidir. Üretranın etrafını saran bu bez, corpus protatae ve pars disseminate prostat olarak iki kısımdan oluşur. Bu salgının alkali özellikte olup, üretranın ve vaginanın asidik ortamını nötr hale getirir (Evans ve Maxwell 1987).

Vesicula Seminalis: Pelvisin tabanında, ampulla duktus deferenslerin yan tarafında, idrar kesesinin boyun bölümünde V şeklinde bulunan tubuloalveoler bir çift bezdir. Yapısında yüksek konsantrasyonda potasyum (K), sitrik asit ve enzim içerdiği belirlenmiştir (Hafez ve Hafez 2000).

Cowper Bezi: Urethranın pelvik boşluktan çıktığı bölümde yer alır. Çiftleşme öncesi alkali içerikli berrak salgısı (pH 7.5-8.2) ile idrar kanalını, idrardan yani urethranın temizlenmesinden sorumlu bir bezdir (Evans ve Maxwell 1987).

2.2.5. Dış Genital Organları

Penis: Erkeklerde çiftleşme organı olan penisin, idrarın atılmasında ve spermayı dişi genital kanala iletmek gibi görevi vardır. Uzun, silindirik, fibroelastik yapısı bulunur. Penis kök, gövde ve baş kısmınlarından oluşur. Gövde kısmı kıvrım yaparak, flexura sigmoidayı oluşturur. Ereksiyonda bu kısım tamamen düzelerek, penisin uzamasını ve prepisyumdan çıkmasını sağlar. Tekelerde urethra penisten ayrı bir uçla sonlanır.

Prepisyum: Yapısı deriden meydana gelen ve penisin korunmasına yardımcı olan bir oluşumdur.

Skrotum: İçerisinde testislerin bulunduğu ve testisin ısı düzenlemesini sağlayarak spermatogenezisin sabit ve vücut ısısından düşük bir seviyede yapılmasını sağlamaktadır (Evans ve Maxwell 1987).

2.3. Tekelerin Üreme Özellikleri

2.3.1. Tekelerde Cinsel Erginlik

Erkek oğlakta eşeysel erginlik; dölleme yeteneğine sahip olan sperma üretmeleri ve cinsel istek (libido) gösterme durumudur. Ergenlik yaşı, çevresel koşullara bağlı olarak ırk, ısı, ışık ve beslenmeyede bağlı olarak çeşitlilik gösterir. Erkeklerde ergenlik yaşı spermatogenesis'in başlaması olarak kabul görsede, ejakulatta ilk kez spermatozoon görülmesiyle ergenlik yaşı saptanır (Hafez ve Hafez 2000). Pubertaya başlangıç yaşı ırklar arasında 4-8 aylıktan 1-4 yıla kadar, erken yada geç olgunlaşan ırk türüne bağlı, dikkate değer bir farklılık gözlenmektedir (Leboeuf ve ark. 2000). Üreme sistemindeki en büyük gelişme doğum ile ergenlik dönemi arasında görülür (Kridli ve ark. 2007).

2.3.2. Tekelerde Cinsel Davranışlar

Ergin genç tekelerde seksüel davranışlar koklama, flehmen, sürtünme ve aşım şeklinde, ırklar arasında değişik sürelerde, belirgin olarak devam eder. Sıfat sezonu, boynuz diplerinde koku bezleri aktif hale gelir, koku salınımı artar. Cinsel istek, ergenlikten önce gelişmeye başlar, tüm yaşam boyu belli düzeyde sabit olarak devam eder. Libido kalıtsal faktörlere bağlı olmakla birlikte, testesteron sentezi ve salgılanmasına

bağlıdır. Genellikle kızgın dişinin perineal bölgesini ya da idrarını koklaması, baş ve boyunu gererek, burun deliklerinin açılıp kapanması, üst dudağın yukarı doğru kıvrılması ile karakterize olan cinsel istek şekli flehmen ya da olfaktorik refleks olarak bilinir. Libido kendini bu şekilde belli eder (Hafez ve Hafez 2000).

2.3.3. Üreme Mevsimi

Tekeler yıl içinde bütün mevsimlerde reprodüktif aktivite göstermekle birlikte, sperma veriminde ve kalitesinde fotoperiyoda (gün ışığına) bağlı olarak değişimler gözlenir. Normal sıfat sezonunda gün ışığı azalmaya başlamasıyla, Testesteron ve LH (Lütenizing hormon) kandaki düzeylerinde, testisisin ağırlığında ve dolayısı ile spermatolojik aktivitede artış meydana gelir. Skrotum çevresi ve sperm kalitesinde meydana gelen değişikliklerde en büyük faktörün, hayvanın yaşı olması ile birlikte skrotum çevresinde oluşan değişiklik, üretilen sperma miktarıyla yakından ilişkilidir. Sezon dönemi ırkların çiftleşme mevsimi sonbahar ve erken kış dönemidir. Gün uzunluğu ve sıcaklık üreme mevsiminin uzunluğunu etkileyen faktörlerdir. Kuzey yarım kürede tekeler, gün uzunluğunun azaldığı yaz sonu ve sonbahar aylarında (Eylül-Aralık), tropikal bölgelerde yılın her mevsiminde seksüel aktivite gösterebilirler (Kulaksız 2009, Çoyan 2002).

2.3.4. Spermatogenezis

Tekelerde spermatozoa ve androjenlerin üretimini, günlerin kısalması ile hipotalamusun adenohipofizinden gonadotropin salınımı başlatmaktadır. Günlerin kısalması testis fonksiyonlarının uyarılmasına neden olmaktadır (Evans ve Maxwell 1987). Çiftleşme dönemi dışında, tekelerde gonadotropin salınımındaki azalmayla spermatozoa ve androjen üretimi de düşmektedir (Hafez ve Hafez 2000). Pubertaya giren genç tekede, çevresel, psikolojik, metabolizma ve diğer endojen faktörlerin etkisiyle, merkezi sinir sisteminin hipotalamus kısmı uyarılır. Hipotalamus, GnRH sentezletikten sonra salar, hipotalamo-hipofizel portal damarla taşınan GnRH, adenohipofizde gonadotropik hormonların oluşmasına ve salınımına neden olur. Salınan gonadotropik komplekslerden FSH, tubulus seminiferus bazal kısmını döşeyen ve gonadal hücrelere destek veren

hücrelerin sertoli hücrelerine dönüşünü ve LH ile birlikte spermatogonik faaliyeti başlatır. Artan miktardaki FSH salınımı, seminiferus tubullere sentezlenip, salgılanan inhibinin olumsuz geri etkisi ile hipofiz ve hipotalamus üzerine etkisi kontrol edilir (Walkden-Brown ve ark. 1994, Fatet ve ark. 2011). FSH ile birlikte artan LH, leydig hücrelerini etkileyerek artan miktarda testesteron üretimine ve salınmasına, ayrıca spermazoaların farklılaşmasında rol alır. Bu hormonun yani tetesteron salınması olumsuz geri etki ile hipolamus veya hipofiz bezini etkileyerek LH salınmasını kontrol eder (Hafez 1993, Sönmez 2013).

Spermatogenezis testisin tubulus seminiferus contortus adı verilen, kıvrımlı yapıya sahip kanallarda meydana gelir. Spermatogonyumlar, spermatozoa meydana gelinceye kadar çoğalma, büyüme, olgunlaşma ve başkalaşma dönemlerinden geçer. Çoğalma (spermatositogenezis) evresinde spermatogonyumlar mitoz bölünme geçirerek artarlar, bunlarda A ve B spermatogonyum olarak iki kısım oluşur. Spermatogonyum A'lar bir kısmı kaynak hücre kalırken, bir kısmı spermatogonyum B'lere dönüşür. Daha iri bir yapıya sahip olan spermatogonyum B'ler tubulus lümenine doğru hareket eder. Spermatogonyum B'ler mitotik bölünmeyle sayıca çoğalarak, luminal yüzeye yönelerek ve daha da büyüyerek primer spermatositlere dönüşür. Böylece büyüme evresi tamamlanır. Primer spermatositlerde birinci mayoz sonunda sekonder spermatositlere, bunlarda tekrar mayoz bölünme geçirerek spermatidlere dönüşür. Spermatidler morfolojik değişiklikler geçirerek spermatozoa halini alır (Hafez ve Hafez 2000).

2.3.5. Tekelerde Sperma Verimi ve Özellikleri

Teke sperma verimi üzerinde yapılan çalışmalar, testis başına düşen günlük spermatozoon üretimi $2.76\ 10^9$-$7.23\ 10^9$ arasındadır. Üreme mevsimi ve sezon dışı olarak alınan ejekulatlarda dondurma çözdürme sonu motilite değerleri arasında farklılıların bulunduğu tespit edilmiştir. Bunun nedenlerinden biri olarak üreme mevsiminde seminal plazma sıvının fazla olmasıdır. Spermanın, seminal plazma miktarı ile içerdiği motil spermatozoon arasında negatif korelasyon vardır. Üreme sezonu içinde alınan spermalarda bulunan vesikular sekresyonun, teke spermasının dondurulmasında negatif etkiye sahip olan bulboüretral sekresyonun sparmatozoanın etkisini azalttığını göstermektedir (Leboeuf ve ark. 2000, Jainudeen ve ark. 2000).

Sperma verimini ve üretimini etkileyen faktörler arasında ırk, yaş, mevsim, beslenme payı vardır. Sperma değerlendirme aşamasında, sperma alma şekli, sperma alma sıklığı, yönetim, teknik beceriye göre sperma miktarı değişebilir (Hafez 1993).

Tekelerde sperma üretimi ve libido (cinsel istek) yazın en az seviyede olup, gün uzunluğundan faydalanmasını azaltıcı etmenler sağlanarak, bu zamandada çiftleşebilirler. Spermatozoa motilitesi kışın en az seviyededir. Sonbaharda ise sperma üretimi en yüksek seviyededir. Gün uzunluğunun azalmasıyla birlikte üreme ve çiftleşme yaz mevsiminin sonlarında ve sonbahar başlangıcında en yüksek düzeye çıkar. Bu dönemlerde testesteron salgısı en üst seviyeye ulaşır (Hafez 1993).

Teke seminal plazması, diğer tür erkeklerin spermalarındaki plazmadan farklı olarak, bulbourethral bez kökenli "yumurta sarısı koagüle edici enzim" olarak belirtilen bir enzim içerir. Teke sperması çiftleşme sezonunda testosteron seviyesininde artmasıyla, vesikula seminalis kökenli olan fruktoz, diğer tür erkeklere oranla 10 kat fazladır (Tekin ve ark. 1985).

2.3.6. Spermanın Alınması

Tekelerde sperma almada pratik olarak 2 yöntem daha sıklıkla kullanılır. Suni Vagina ile sperma alınması: pratikte en çok kullanılan ve başarılı yöntemdir. Suni vagina silindirinin uzunluğu ort. 19-20 cm, çapı ise 5 cm'dir. Suni vaginanın için en önemli 3 özellik sıcaklık, basınç ve kayganlıktır. Suni vaginaya konan suyun sıcaklığı ort. 40-42 ℃ olmalıdır. Basınç koyulan su miktarı ve hava ile sağlanır. Kayganlık, penisin suni vaginaya gireceği uç kısmına sürülen uygun bir kayganlaştırıcı madde ile sağlanır. Tekeyi ejekülasyondan alıkoyacak ve penisi etkileyecek en önemli etken ısı derecesidir. Ejekülasyon sırasında suni vagina ısısı 38-40 °C olmalıdır. Bu yöntemle alınan sperma kalitesi diğer yöntemlerle alınan sperma kalitesinden en yüksek seviyededir (Gibbons ve ark. 2009).

Elektro-ejekulatör yöntemi: Bu yöntem daha çok sakat kalmış, aşım yapma yeteneğini bir nedenle kaybetmiş, libidosu zayıf ama genetik özelliği değerli damızlıkların yavrularının alınması, vücut yapıları farklılığından dolayı çiftleşemeyen hayvanların spermasını alma için kullanılan bir yöntemdir. Bu uygulama yöntemi ise bel ve sağrı bölgesinden kök alan ve genital organları besleyen sinirlerin elektriksel olarak

uyarılmasıyla, ereksiyon ve ejekülasyon şekillenir. Bu yöntemle, rektuma sokulan prob ile artan oranlarda elektrik akımı verilerek ejekülasyon oluşturulmaktadır. Probun ucu bel omurlarının ventraline kadar ilerletilerek uyarım düzenli olarak arttırılabilir. Zorunlu durumların dışında çok sık tercih edilen bir yöntem değildir. Sperması alınacak olan tekenin çok iyi tespit edilmesi, rektumun iyi bir şekilde temizlenmesi gerekmektedir. Elektrik akımının verilmesiyle ereksiyon ve ejekülasyon başlayınca prepisyumun ucuna sperma toplama kadehi tutularak sperma alınmaktadır. Bu metodla alınan sperma kalitesi daha az kalitededir ve seminal plazma genelde daha fazla olmaktadır (Tekin ve ark. 1996).

2.4. Spermanın Dondurulması

Teke sperması ilk kez Smith ve Polge (1950) tarafından dondurulmasından ve Barker (1957) dondurulmuş çözdürülmüş teke spermasının pratik uygulamalarda yetersiz olduğunu bildirmesinden bu yana, çalışmanın üzerine bir çok araştırmacı spermanın dondurulması ile ilgili çalışmalar yapmıştır. Hızlı dondurma protokolü (15-60°C/ dk) dondurma çözdürme işlemi sonrasında en iyi sonuçları vermiştir, fakat hayvan türlerine göre en iyi ya da optimum dondurma protokolünün belirlenebilmesi için pek çok çalışmaya ihtiyaç vardır (Barbas ve Mascarenhas 2009). Spermanın saklanmasında, dondurulması sırasında spermatozoonların yapısal, biyokimyasal ve fonksiyonel olarak hasara uğrar. Bunun sonucu olarak motilite, canlılık oranı düşer. Dolayısıyla fertiliteyi etkiler. Bu nedenle nativ sperma fertilite oranı, dondurulmuş spermadan daha yüksektir (Purdy 2006, Kulaksız ve Daşkın 2010).

Spermatozoa uzun süre canlılığı sürdürmesi için sulandırıcılarda bulunması gereken özellikler;

1. Ortamda oluşan laktik asit oluşumuna bağlı pH değişiklikleri için tampon rolü oynamalı.
2. Ortamın elektrolit dengesini ve optimum ozmotik basıncını devam ettirebilmeli.
3. Mikrobiyolojik üremeyi durdurabilmeli.
4. Spermatozoonlar için enerji ve besin temin etmeli.
5. Hızlı soğutma ve oluşan ısı şokuna karşı koruyucu olmalıdır (Hafez 1993).

2.4.1. Teke Spermasının Dondurulmasında Kullanılan Sulandırıcılar ve Kriyoprotektanlar

Spermatozoonların metabolik aktivitesi sonucu Hidrojen iyonlarının açığa çıkmasına neden olur. Ortaya çıkan bu iyonların taşınması için bir mekanizmanın olmaması sulandırıcı pH'sının düşmesine ve dolayısı ile motilite ve fertilitenin azalmasına neden olur. Bundan dolayı tampon solüsyonların sperma sulandırıcılarında kullanılması zorunludur (England, 1993). Sulandırıcıların ozmotik basıncı ve pH'sı kan plazması, seminal plazma gibi diğer vücut sıvılarında olduğu gibi izotonik veya izo-ozmotik ve nötrale yakın veya hafif asidik olmalıdır (Herman ve ark. 1994). Sulandırıclarda hidrojen iyon konsantrasyonu ve ozmotik basıncı ayarlamak için sitrat (2.9-Trisodyum sitrat dihidrat), Tris (hidroksimetil aminometan), sitrik asit ve fosfat gibi tampon maddeler sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlar içinde en yaygın kullanılan Tris hücre içine nüfus ederek K (potasyum) alımını düşürdüğü ve bu sayede yüksek oranda K'nın soğutma esnasında spermatozoonlar üzerinde olumsuz etkileri azalttığı kabul edilmektedir. Yağsız süt ürünleride sulandırıcılar için buffer özelliğine sahiptir (Holtz 2005, Peters ve Ball, 1995).

Bir çok sulandırıcıya spermatozoon yaşaması için gerekli enerjiyi sağlayan fruktoz ve glukoz gibi şekerler ilave edilir. Türler arasında şekerlerin kullanma oranı değişmekle birlikte genel olarak spermatozoonlar glukoz, fruktoz, mannoz ve arabinoz gibi basit yapılı şekerleri enerji kaynağı olarak kolayca değerlendirebilir (Salamon ve Ritar, 1982). Soğutmanın zararlı etkisine karşı spermatozoonu en etkili yolu spermaya yumurta sarısı, süt veya bunların yapısında bulunan lipoprotein, lesitin, sefalin gibi büyük protein ağırlıklı benzer bileşiklerin kullanılmasıdır (Fukui ve ark. 2008, Fathi ve ark. 2019). Yumurta sarısı fosfolipid yapısında olup, spermatozoonu soğuk şokundan koruduğu ve düzenli olarak sulandırıcılara katılması gerektiği bildirilmektedir (Forouzanfar ve ark. 2010). Sulandırıcılara %3-25 oranları arasında katılmaktadır. Yumurta sarısı seminal plazma proteinlerine bağlanarak, spermatozoon membranını seminal plazmanın zararlı etkilerine karşı korumaktadır (Purdy 2006).

Spermanın dondurulmasında kullanılacak olan sulandırıcıda kriyoprotektif özellikli maddelerin bulunması gereklidir. Kriyoprotektanlar soğuk şokuna karşı spermatozoonu korurlar. Bu spermatozoon soğutulması, dondurulması ve çözdürülmesi sırasında gelişen fiziksel, kimyasal ve oksidatif stresi ve meydana gelen ısı şoku, ozmotik değişim, intraselüler kristal oluşumunu azaltmak amacıyla kullanılmakta, doğrudan çözdürme

sonrası spermatolojik parametreleri ve fertiliteyi etkilemektedir (Ball ve ark 2001; Gojen ve ark. 2016). Teke spermasının dondurulmasında birçok internal özellikli kriyoprotektan olarak kullanılan gliserol, dimetil sülfoksit, etilen glikol, propilen glikol denenmiş, en fazla ve en iyi koruma sağlayanı gliserol olmuştur. Sulandırıcıya katılım oranı %4-7 arasında değişim göstermektedir. Gliserolün tek adımda ve 37 °C'de katılması diğer prosedürlere göre optimum sonucu sağlamaktadır. Gliserol, DMSO ve 1.2-propanediol gibi hücre içine nüfus edebilen kriyoprotektanlar sadece hücrenin su kaybını azaltarak solüsyon hasarını azaltmakla kalmaz, aynı zamanda buz kristalleri oluşumuna meydan vermeyerek, suyu tutarak donmanın etkisini azaltırlar. Gliserol teke spermasında buz kristalleri oluşumunu engellemektedir (Leboeuf ve ark., 2000; Purdy 2006).

Teke spermasının dondurulmasında sulandırıcıya katılan yumurta sarısı ve sütün spermatozoonlara zararlı etkileri olduğu bildirilmektedir. Bu etkinin; yumurta sarısında bulunan lesitinin seminal plazmada bulunan fosfolipaz A2 enzimiyle ve süt sulandırıcısında bulunan bir kompanent ile de bulbouretral baz kökenli SBUIII olarak adlandırılan protein fraksiyonunun reaksiyona girerek, spermanın soğutulması ve dondurulmasında yaşamını baskıladığı, akrozom reaksiyonunu uyardığı ve hücre kromatinlerinde ayrışmalara neden olduğu bildirilmiştir (Leboeuf ve ark. 2000).

2.4.2. Teke Spermasının Sulandırılması ve Sulandırıcı Oranı

Teke spermasının sulandırılması bir ya da iki aşamada yapılabilmektedir. İki aşamalı sulandırmada, tekeden spermanın alınmasından sonra kriyoprotektan içermeyen sulandırıcıyla, final sulandırma oranının yarısıyla sulandırılmakta ve daha sonra 5 °C'ta üzerine kriyoprotektan içeren sulandırıcı ile ilk sulandırıcı miktarı kadar eklenerek final sulandırma işlemi gerçekleşmektedir. İki aşamalı sulandırmanın diğerine bir üstünlüğü olmadığı bildirilmiştir. Tek aşamada sulandırma, sulandırıcı hazırlama ve spermanın sulandırılması işlemini kolaylaştırması bakımından tercih edilmektedir (Evans ve Maxwell, 1987).

Sulandırma işlemi 1:1-1:23 (sperma:sulandırıcı) oranlarında yapılabilmektedir (Purdy, 2006). Bazı araştırıcılar da başarılı dondurma ve fertilite oranının bir ml'de 80-500x10^6 oranında spermatozoaya sahip numunelerden elde edildiğini bildirmişlerdir (Ritar ve Salomon, 1983; Ritar ve ark., 1990). Servikal

tohumlamada kullanılacak olan dondurulmuş çözdürülmüş spermanın bir tohumlama dozunda yaklaşık $200x10^6$ milyon, serviks aracılığıyla intrauterin tohumlamada kullanılacak olanda ise 60×10^6 milyon, laporoskop tohumlamada ise 20×10^6 milyon motil spermatozoa olması gerektiği belirtilmektedir (Evans ve Maxwell, 1987).

2.4.3. Teke Spermasını Dondurma Yöntemleri

Spermanın dondurularak saklanması işlemi dondurma tekniği, sulandırıcı içeriği, sulandırma ve dondurma oranı ayrıca çözdürme yöntemi gibi birbiriyle doğrudan ilişkili faktörler içeren bir işlemdir. Dondurma işlemi durumunda pek çok hücrenin zarar gördüğü bilinen bir gerçektir. Bu zarar suni tohumlama sonrasında hücrelerin canlılıklarını, yaşayabilirliklerini, fertilizasyon yeteneklerini azaltmaktadır (Zhang SS ve ark, 2009; Gangyi ve ark. 2001). Dondurarak saklamada zarara neden olan faktörler soğuk şoku, buz kristal formları, oksidatif stres, membran değişiklikleri, kriyoprotektan toksikasyonu ve osmotik değişikliklerdir. Bu sebeple sulandırıcının kompozisyonu, uygun kriyoprotektanlar ve optimum dondurma ve çözdürme oranları spermanın dondurularak saklanmasında önemli faktörlerdir (Farshad ve ark., 2009). Spermanın dondurulması işleminde sıcaklığın 15 °C'den 4 °C'ye düşmesi esnasında meydana gelen soğuk şoku ve sonucunda oluşan dondurma zararı sebebiyle spermanın fertilite parametresinde azalma olur. Dondurulup çözdürülmüş spermanın kapasitasyonunu tamamlayabilmesi için dişi genital kanalında geçireceği zamanda, fertilizasyon yeteneğinde azalma ve embriyonik kayıplarda artış olur (Maxwell and Salamon 1993; Bucak and Tekin 2007; Çoyan ve ark. 2010).

Sulandırılmış teke sperması 4-5 °C'de ekilibrasyona 1,5-4 saat bırakıldıktan sonra, payet veya pelet formunda dondurma işlemi gerçekleştirilir. Normal şartlar altında, sperma içeren payetler yatay şekilde sıvı azotun 4-5 cm üzerinde, sıvı azot buharında 7-8 dakika tutulur ve bu süreç sonunda sıvı azota daldırılır. Fransa'da, payetlerin sıvı azotun 16 cm üstünde 2 dakika tutulduktan sonra 4 cm üzerinde 3 dakika daha tutulması önerilmektedir. Donma hızı payetlerin sıvı azot seviyesinden, yüksekliğine ve payetlerin hacimine göre değişebilir (Evans ve Maxwell, 1987; Leboeuf ve ark., 2000). Pelet yönteminde ise, dondurma işlemi kuru buzda (–79 °C'de) gerçekleştirildikten sonra peletler sıvı azota aktarılır. Peletlerin hacmine göre –79 °C'da dondurma hızı değişebilir (Leboeuf ve ark., 2000).

2.4.4. Spermanın Çözdürülmesi

Çözdürme sonrası en iyi fertiliteyi elde etmek amacıyla, çeşitli çözdürme sıcaklıkları ve süreleri denenmiştir. Payet veya pelet şeklinde dondurulmuş spermanın 37 °C'de 30 saniyede çözdürülmesi kabul edilebilir fertilite sonuçları vermiştir (Salamon ve Ritar, 1982; Corteel, 1980).

Çözdürme işlemi sırasında hızlı sıcaklık artışı dolayısıyla spermatozoon membranında faz değişimleri ve membran lipitlerinde destabilizasyon meydana gelmektedir. Dondurulmuş-çözdürülmüş spermada antioksidan kapasite azaldığından ve serbest radikal türleri arttığından dolayı spermatolojik kalite ve fertilite düşmektedir. Bundan dolayı dondurulma aşamasında sperma sulandırıcılarına antioksidan maddelerin katılması tavsiye edilmektedir (Sinha ve ark. 1996; Bilodeau ve ark. 2001; Chatterjee ve Gagnon 2001).

Deka ve Rao (1987) yaptıkları çalışmada, en iyi sonucu 37 °C'de 30 saniyede almışlardır. Andersen (1969) ise 75 °C'de 10 saniyede çözdürmenin 37 °C'de 30 saniyede çözmekten daha iyi sonuç verdiğini belirtmiştir. Tuli ve ark. (1991) Boer keçilerinin kullanıldığı çalışmada, payetlerin 70 °C'de 7 saniyede çözdürmenin hem 37 °C'de 2 dakikada hem de 40 °C'de 20 saniyede çözdürmekten üstün olduğunu bulmuşlardır. Fakat, saha koşullarında yapılan suni tohumlamada 37 °C'de 30 saniyede çözdürmenin daha uygun olduğuna dikkat edilmelidir. Böylece çözülmüş spermanın aşırı ısınmasının önüne geçilmiş olur.

2.4.5 Membran Bütünlük Testi

Hipo-osmotik şişme testi (HOST), spermatozoonun hücrezarı bütünlüğünü ve fonksiyonelliğini ölçer. Spermatozoon membran bütünlüğü sadece metabolik faaliyetler için değil, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve oosit yüzeyine spermatozoanın tutunma olayının gerçekleşmesinde de işlevsel bir öneme sahiptir. Bundan dolayı membran fonksiyonunun belirlenmesi, spermatozoonun fertilizasyon kapasitesinin bir göstergesidir (Jeyendran ve ark 1992). Spermatozoonlar hipoozmotik bir ortama konulduğunda, fonksiyonel olan spermatozoonun kuyrukları şişer ve kıvrılır. Yani; HOS test, farklı ozmotik basınca sahip ortamlar arasında ozmotik basınç dengeleninceye kadar fonksiyonel bütünlüğü bozulmamış aktif bir membrandan suyun taşınması esasına dayanmaktadır

(Jeyendran ve ark 1992). Hipoozmotik bir sıvıya bırakılan sperma hücreleri içerisine suyun girmesi sonucunda hipoozmotik bir durum oluşur. Fonksiyonel bir sperma plazma membranı, HOS testi boyunca spermatozoon içi ve ekstraselüler sıvı arasında ozmotik basıncı dengelemeye çalışır. Bu sırada spermatozoa içerisine suyun girmesiyle hacimde bir artış meydana gelerek spermatozoonun şişmeye başladığı ve kuyruklarının kıvrıldığı gözlenir (Jeyendran ve ark 1992). Spermatozoa kuyruğunun fibriler kısmını saran hücre zarı baş kısmını saran membran bölümüne göre daha gevşektir. Bu sebepten dolayı kuyruk kısmı diğer bölgelere göre daha bariz olarak şişer. Kıvrılma plazma membran hacminin şişmesinden ileri gelir. Düşük ozmotik basınca sahip ortamlarda kimyasal ve fiziksel olarak, fonksiyonel spermatozoonun kuyruk kısmında şişmeler oluşurken, kuyruk membranında işlevsel bozukluk olan hücrelerde herhangi bir değişiklik meydana gelmez (Ahmadi ve Soon-Chye 1997).

Bu testin sonuçlarının yüksek olması (%50 ≤) motilite, in vivo ve in vitro fertilite parametreleri ile yakından ilişkilendirilmektedir (Neild ve ark., 1999).

2.5. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış orbitalinde tek sayıda elektron bulunan atom veya moleküller olup hem organik hem de inorganik yapılarda bulunurlar. Moleküldeki eşleşmemiş elektron, reaktif duruma gelir ve kararsızlaşır. Serbest radikal elektronları yapıları, fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücresel kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli klinik durumların patogenezinde rol oynarlar (Halliwell ve Gutteridge 2000)

Serbest radikaller genel olarak; reaktif oksijen türleri (Süperoksit radikali, ozon, singlet oksijen, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, hipoklorik asit, alkoksil radikali, peroksil radikali, hidroperoksil radikali), reaktif nitrojen türleri (nitrik oksit, nitrik dioksit, peroksinitrik) ve reaktif sülfür türleri (thiyl radikali) olarak sınıflandırılırlar (Fehrenbach ve Northoff 2001).

Yaşamın devamlılığı için gerekli oksijen metabolitleri olan reaktif oksijen türleri, hücre fonksiyonlarında bozukluklara neden olmaktadır. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin artışına ve antioksidan koruma mekanizmasında azalmaya sebep olarak üreme fonksiyonunun bozulmasına yol açmaktadır (Ulutaş ve ark.

2005). Oksidatif dengenin bozulması, hücrelerin ve hücreye ait organellerin moleküler yapısının bozulmasına neden olmaktadır (Dündar ve Aslan, 2000). Serbest oksijen radikalleri, hücre ve hücre alt yapılarını 3 şekilde etkilemektedir. Birincisinde, geniş çaplı hücre hasarına neden olmayan reaksiyon gerçekleşmektedir. İkincisinde, artık radikalle reaksiyon mekanizması değişmekte ve etkilenen yapılar oransal olarak artmaktadır. Yani, oksijen radikalleri bir zincir reaksiyonu başlatmakta, yan ürün olarak da başka radikaller üretilmektedir. Her üretilen radikal kendinden önceki reaksiyonun benzerini meydana getirerek bu tarzda başka bir zincir reaksiyonu başlatmaktadır (Kerr ve ark. 1996).

2.6. Lipid Peroksidasyon ve Malondialdehit (MDA) Oluşumu

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı hassas olan yapıların başında gelen biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış (poliasantüre) bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar (Byung 1994)

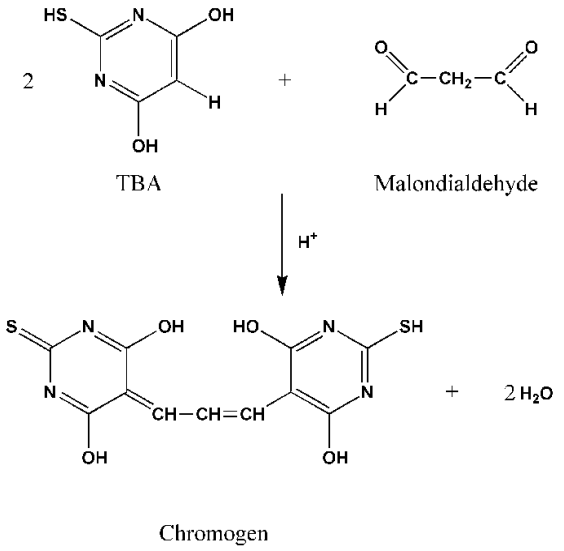
Serbest radikallerin en önemli hedeflerinden birisi membran lipidleridir. Hücre membranı serbest radikaller için önemli bir bariyerdir, çünkü serbest radikaller hücre komponentleri ile etkileşim için bu bariyeri geçmek zorundadır. Membran lipid peroksidasyonu sonucu membran bütünlüğü bozulur. Bunun sonucunda membran proteinleri, reseptörleri ve ayrıca bunlara bağlanan enzimler inaktive olurlar. Lipid peroksidasyonu, yağların özellikle poliansatüre (doymamış) yağ asitlerinin oksijen bağımlı yıkımı olarak tarif edilir ve dallanan bir zincir reaksiyonudur. Olayda genelde bir enzim varlığı gerekli olmamasına rağmen demir, bakır gibi metaller tarafından katalizlenir. Lipid peroksidasyonu, hücre zarındaki poliansatüre yağ asitlerinin alfa-metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla başlatılmaktadır (Southorn ve Powis 1988, Del Maestro 1991, Young ve Parthasarathy 1994). Hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla yağ asidi lipid radikali durumunu alır. Yapıda molekül içi çift bağların yerlerin değiştirmesi ve ardından moleküler oksijenle etkileşim sonucunda lipid peroksil radikali ortaya çıkar. Bunlar da yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de lipid hidro-peroksitlerine dönüşmektedir. Lipid hidroperoksitleri yıkımlanarak biyolojik olarak aktif yapılar olan aldehit ve karbonil bileşiklerine dönüşür. Aldehitler en toksik üründür. Lipid

peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehiddir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda mda meydana gelir. Oluşan mda, hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. Mda bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (Porter 1984, Placer ve ark 1990, Kalender ve ark 2002, Mercan 2004).

Malondialdehit (mda) yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenden dolayı biyolojik materyalde mda ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır (Akkuş 1995, Halliwel ve Gutteridge 2000, Byung 1994).

2.6.1. MDA Testi

Testin prensibi: Tiyobarbütirik asit tepkimesinde; lipid içerik, düşük pH 'da , Tiyobarbütirik (TBA) varlığında ısıtılarak 532-535 nm'de maksimum pik oluşturan stabil kırmızı-pembe renk elde edilir. Bu rengi malondialdehit molekülü ile iki TBA molekülünün birleşmesi sonucu oluşan kromojen verir. Mda'nın bir kısmı peroksidasyon sonucunda çıkarken,büyük çoğunluğu ortam asitleştirildikten sonra uygulanan ısıtma aşamasında lipit peroksitlerin yıkımına bağlı olarak oluşmaktadır.



Şekil 2.1. TBA-MDA kompleksi oluşumu (Akkuş 1995).

2.7. Spermatozoon Üzerine Serbest Radikallerin Etkisi

Spermatozoonlar oksidasyona karşı aşırı şekilde duyarlıdırlar. Çünkü, spermatozoonlar doymamış yağ asitleri yönünden zengindir (Jones ve ark., 1979). Spermatozoon hücresindeki yağ asitlerinin yaklaşık yarısını altı çift doymamış bağ içeren ve 22:6 olarak gösterilen dekosaheksanoik asit (DHA) oluşturur. Spermatozoonların plazma membranlarının yüksek oranlarda poliansatüre yağ asidi içermesinin nedeni sperm ile oosit arasındaki kaynaşma için gerekli olan membran akışkanlığının sağlanmasıdır. Lipit peroksidasyonun sonucu olarak, plazma membran akışkanlığını ve bütünlüğünü bozulur. Bu değişimlerin sonucu olarak spermatozoonlar fonksiyonlarını kaybeder. Membran akışkanlığının kaybetmesi, bu yapının füzogenitesi üzerine direkt etkiye sahiptir. Bunun sonucunda, sperm ile oosit arasındaki kaynaşma oranları belirgin şekilde düşmektedir (Aitken ve ark. 1993).

Spermatozoon hücresinin oksidatif ataklara karşı duyarlı olmasının başka bir nedeni de, spermatozoonlarda normal hücrelerin sahip olduğu, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-PX) ve katalaz (KAT) gibi antioksidan enzim etkinliklerinin ve stoplazmalarının az olması nedeni ile yetersiz yada yok olmasıdır. Bu enzimlerin eksikliği, oksidatif strese direniş açısından çok büyük eksikliktir. Bundan dolayı, spermatozoonların antioksidatif etkinlikten yoksun olmaları normaldir. Normal şartlar altında spermatozoonlar oksijen basıncına maruz kalmamaktadır. Ancak suni tohumlama yöntemlerinin gelişmesi sonucunda, doğal şartlar dışında direkt olarak oksijen basıncına ve gün ışığına maruz kalmaktadır. Bu durum, sebebiyle reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve hücresel hasarı artıracaktır (De lamirande ve Gagnon 1992a; 1992b).

Oksidatif stres yalnızca lipit peroksidasyonundan dolayı sperm fonksiyonlarını etkilemez, bununla birlikte ATP kaybına da neden olur. Reaktif oksijen türlerine maruz kalmış spermatozoonlardaki motilite kaybı, hücre içi ATP düzeyindeki ani düşüşle ilişkilendirilir. Glikolizisteki kilit enzimler üzerine hidrojen peroksitin (H_2O_2) direkt etkisi, bu değişimin sorumlu mekanizması olarak ileri sürülmüştür (Bilodeu ve ark. 2000).

Dondurulmuş-çözdürülmüş spermada azalan antioksidan kapasite ve artan reaktif oksijen radikal oluşumu, spermatolojik parametreleri ve fertiliteyi olumsuz yönde etkiler. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma, taze spermaya göre lipid peroksidayona daha

duyarlıdır. Lipit peroksidasyonuyla ortamda artan reaktif oksijen radikalleri üretimi, spermanın çözdürülmesi sırasında en yüksek seviyededir. Çözdürme esnasında spermatozoonların yüksek oranda oksijen kullanması, serbest radikal oluşumunda etkili faktördür. Bu sırada gelişen hızlı ısı artışı membranlarda faz değişimlerine ve membran lipitlerinde destabilizasyonuna neden olarak membran lipit yapılarının ve sülfidril gruplarının miktar ve dağılımında yeni düzenlemelere yol açar. Bununla birlikte, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu beraberinde getirir. Reaktif oksijen türleri içinde tanımlanmış en toksik ürünler süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalidir. Son zamanlarda araştırmacıların yaptığı çalışmalarda, spermanın saklanması sırasında fertilitide ortaya çıkan azalmaya en önemli sebep olarak spermatozoon membran lipitlerinin peroksidasyonu olduğunu göstermektedirler. Tüm bu sebeplerden dolayı, teke spermasının dondurma amaçlı sulandırıcılarına antioksidan maddelerin katılmasının dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik parametreler üzerine olumlu etkileri olabileceği düşünülmektedir (Bilodeau ve ark. 2001; Bilodeau ve ark. 2000; Chatterjee ve ark. 2001, Chatterjee ve Gagnon 2001; Sinha ve ark. 1996).

2.8. Antioksidanlar ve İşlevi

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmayı koruyan antioksidan mekanizmalar vardır. Bu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallere bağlanarak zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelerin hepsine birden genel olarak antioksidanlar denir (Frei 1994; Akkuş 1995; Dikici 1999).

Genel anlamda antioksidanların görevi; serbest radikallerin hidrojen atomu koparıp çalmasında kendilerini ortaya atarak, serbest radikallere hidrojen verip etkinliklerini durdurmaktır. Antioksidan maddeler, serbest radikalleri daha başlangıçta doyurarak onların zararlı olabilecek etkinliklerine engel olmaktadır (Funahashıa ve Sano 2005). Fakat serbest radikal oluşumu ışık ve metaller sebebiyle devam ediyorsa buna bağlı olarak antioksidan madde gittikçe harcanıp tüketilecektir. Eğer gerekli tedbirler alınıp da yeterli miktarda antioksidan madde katılmış ise daha önce serbest radikaller durdurulmuş olacak ve antioksidan etki uzun süre devam edecektir (Çakmak 2003).

Antioksidanlar dondurma-çözdürme sırasında oluşan membran lipit faz değişime, ozmotik-mekanik strese, lipit peroksidasyonuna, oluşan serbest oksijen radikallerine, ekstraselüler kristal oluşumuna, membran proteinlerindeki denaturasyona, hücre organellerinde yapısal deformasyona, DNA yapısında meydana gelen kırılmalarına karşı çözüm sonu spermatozoon fonksiyonlarını iyileştirmektedir (Bilodeau ve ark. 2001; Bucak ve Tekin 2007).

Normalde spermatozoonlarda bulunan antioksidan savunma sistemi spermatogenezis ve spermatositogenezis esnasında azalmaktadır (Arı ve Yıldız 2018). Oksidatif stresin etkilerine karşı sulandırılmış spermanın saklanmasında sulandırıcılara antioksidan ilavesi yapılarak spermatozoonun kalitesi arttırılabilmektedir (Bilodeau ve ark. 2001). Seminal plazmada süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz, askorbat, ürat, vitamin E, piruvat, glutatyon, albumin, vitamin A, ubikinol ve hipotaurin gibi antioksidanlar bulunmaktadır. Sperma sulandırıcılarına L-karnitin, Koenzim Q10 gibi enzimatik antioksidan maddelerin ilavesiyle spermatozoon miktarında ve motilitede artış bildirilmiştir (Moradi ve ark. 2010; Sharafi ve ark. 2015).

Sperma sulandırıcılarına ilave edilen enzimatik özelliğe sahip antioksidanlar arasında katalaz, süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz sayılmaktadır. Bu antioksidanlar lipid peroksidasyonuna karşı rol oynamaktadırlar (Akkuş 1995; Baumber ve ark. 2000). Enzimatik antioksidanlar başta lipid peroksidasyonunun olumsuz etkilerine karşı spermatozoonları korunması olmak üzere, oluşan hidrojen peroksidin oksijene ve suya dönüşümünde, lipit peroksitlerinin parçalanmasında, süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite dönüşümünün önlenmesinde görevlidirler (Poul ve ark. 1993; Akkuş 1995).

Oksidatif stresin etkilerini engellemede küçük ruminantların spermalarının saklanmasında birçok antioksidan denenmiştir. Bu maddeler içerisinde likopen, alfa-lipoik asit, quercetin, süperoksit dismutaz, hipotaurin, taurin, methionine, sistamin, inositol, karnitin, arbutin, aminoasit solüsyonları, BHT (butylated hydroxytoluene), pridoksin, glutatyon, C vitamini, thiol/thion bileşikleri ve benzerleridir (Arı ve Yıldız 2018). Teke spermasında sulandırıcıya ilave edilen SOD, katalaz ve sitokrom-c, GP spermatozoon canlılığında artışlar sağlamıştır, sulandırıcıya katılan katalaz (200 U/ml), sodyum piruvat (0,11 mg/ml)'ın çözüm öncesi ve sonrası progressif motiliteyi artırdığı gözlenmiştir (Bucak ve Tekin 2007). Memeli spermasındaki glutatyon seviyesi türe özgü farklılıklar

gösterir. Glutatyon, iki formda bulunmaktadır. Redükte glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG) şeklindedir. ROS ürünlerine karşı glutatyonun koruyucu etkisi, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi enzimlerle birlikte etkileşime girmesiyle kolaylaştırılır (Sinha ve ark. 1996). Glutatyonun sulandırıcılara katılması, ortamda bulunan ROS ürünleriyle reaksiyona girerek ve donma esnasında membran proteinlerindeki sülfür gruplarında gelişen bozulma ve dağılmayı kısmen engelleyerek oksidatif hasara karşı koruyucu etkinlik oluşturur (Chatterjee ve Gagnon 2001). Tekelerde yapılan çalışmada da glutatyon (5 mM) çözüm sonrası motiliteyi ve akrozom hasarını önemli oranda korumuştur. Fertilite üzerine etkisi ise önemli sayılmamıştır (Sinha ve ark. 1996; Bucak ve Tekin 2007).

Lipid peroksidasyon düzeyi ırk, bireysel ve seminal plazma içeriğine göre farklı olmasından kaynaklı olabilmektedir. ROS içerisinde bulunan hidrojen peroksid, süperoksid anyonları veya hidroksil radikalleri çok güçlü oksidanlardır ve fizyolojik olarak hücre solunumu esnasında üretilirler. Dondurma protokolleri, metod farklılıkları, sulandırıcı kompozisyonu gibi farklılıklar tekelerde antioksidan kapasiteyi etkileyebilmektedir. Yapılan çalışmalarda askorbik asit, butylated hydroksitoluene, sistein, hypotaurin ilavelerinin motilite, membran bütünlüğü, morfoloji, akrozom bütünlüğü ve viabilite üzerine olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Antioksidan molekülleri oksidatif stresi azaltır, çözdürme sonrası spermatozoon kalitesini arttırırlar (Kulaksız ve Daşkın 2010; Memon ve ark. 2012).

Antioksidanların serbest oksijen radikallerine karşı etkileri; zincir reaksiyonun başlamadan durdurmaları, başlamış olan radikal zincir reaksiyonunu kırmaları, radikal oluşumunu durdurmaları, peroksitleri parçalamaları ve lokal oksijen yoğunluğunu azaltmaları suretiyle şekillenmektedir (Cheeseman ve Slater 1993).

Antioksidanlar, serbest oksijen radikalin meydana gelişini önleyenler ve meydana gelmiş olanları etkisiz hale getirenler şeklinde ayrılabildiği gibi, doğal (endojen kaynaklı) ve ekzojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Ayrıca antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar şeklinde de sınıflandırılmaktadır (Moscio ve ark. 1991; Frei 1994).

2.8.1. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.8.1.1. Vitamin E (α-Tokoferol)

Vitamin E, doğada yaygın olarak bulunan bir antioksidandır. Yağda çözünen ve hücre membranlarında bulunan en önemli zincir kırıcı antioksidandır. Güçlü bir antioksidan olan E vitaminin en önemli işlevi serbest oksijen radikallerinin ataklarına karşı membran lipitlerindeki doymamış (poliansantüre) yağ asitlerini korumaktır (Rice ve Kennedy, 1988; Burton ve Traber, 1989). Antioksidan aktiviteleri altıncı karbonda bulunan hidroksil grubundan kaynaklanır. Peroksit radikali ile reaksiyona girerek bu radikale bir hidrojen verirler ve kendileri de tokoferoksil radikaline dönüşürler. Böylece kendileri oksitlenerek protein, lipit, enzim gibi diğer molekülerin oksitlenmesini engellerler. Bunun sonucunda lipit peroksidasyon zinciri kırılmış olur (Niki, 1987; Putman ve Comber, 1987; Wefers ve Sies, 1988; Sies, 1993).

Vitamin E'nin formları α-tokoferol, trolox spermatozoon motilitesini ve canlılığını artırarak, lipit peroksidasyonu azaltmaktadır. E vitamini; oksidatif strese karşı koruyucu etkisinden dolayı hücre ölümünü geciktirmektedir. E vitamini indirgeyici bir ajan olarak hücre içinde ROS'un fonksiyonlarını durudurucu etkisi bulunmaktadır (Akiyama, 1999). Ancak, aşırı dozda veya ROS seviyesinin artmadığı durumlarda kullanılması, kapasitasyon ve fertilizasyon ile ilgili pozitif etkilerini bloke ederek zararlı olabileceği bildirilmektedir (Donnelly ve ark. 1999). En etkili formu α-tokoferoldür. Güçlü bir antioksidan olan α-tokoferol'ün en önemli görevi serbest oksijen türlerinin ataklarına karşı membran lipitlerindeki poliasantüre yağ asitlerini korumaktır (Rice ve Kennedy 1988). α-Tokoferolün antioksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında daha etkilidir. Çünkü yüksek oksijen kısmi basınçlarına maruz kalan lipit yapılarında etkileri belirgin olup yağda çözünen diğer vitaminler arasında en az toksik olandır (Deichsel ve ark., 2008).

2.8.1.2. Vitamin C

Vitamin C hidrofiliktir. Sulu ortamda aktiftir.Antioksidan özelliği, serbest radikal temizleyici olarak işlevini gösterir. İndirgeyici ve antioksidan ajan olarak, direkt singlet oksijen (02-) ve hidroksil radikali (0H-) çeşitli lipid peroksitlerle etkileşir. Askorbik asit,

bu güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. üperoksit radikali (O2· -) ve hidroksil radikali (OH•) ile reaksiyona girerek onları ortamdan temizler. Askorbik asit antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak yada direk olarak ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali (OH•) oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir prooksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir. Buna ilave olarak, okside olmuş vitamin E'nin antioksidan özelliğini restore eder. Bu özelliği ile vitamin C'nin en önemli işlevi vitamin E radikalini yeniden antioksidan aktiviteye kazandırmak olduğunu göstermektedir (Witting ve Horwitt, 1964). Diğer hidrofilik antioksidanlarla karşılaştırıldığında, vitamin C plazma lipid peroksidasyonuna karşı en etkili korumayı sağlar (Frei ve ark., 1990).

2.8.1.3. Koenzim Q-10

Koenzim Q10 (Co-Q10), endojen olarak sentezlenen ve yağda çözünen benzokinon bileşiğidir (Crane, 2001). Co-Q10 yağ benzeri özelliklere sahiptir, bu nedenle hücre zarındaki fosfolipitleri serbest bırakır ve sperm plazma zarını korur. Oksidasyon sisteminde koenzim olarak görev gördüğü ve canlı dokularında bir kinon grubu ile yan zinciri 10 izopren ünitesinden oluştuğu için "koenzim Q10" olarak adlandırılmaktadır. Alternatif bir ismi de ubikinon olan bütün hücrelerde olması nedeniyle latincede "her yerde bulunan" anlamına gelen "ubiquitous quinone" dan türemiştir (Varela-López ve ark. 2016). İlk defa 1955'te Festenstein ve arkadaşları tarafından kalp kası mitokondrisinden izole edilmiş olup, kimyasal yapısı 1958 yılında tanımlanmıştır (Wolf ve diğ., 1958). Hücrelerde elektron taşıma ve mitokondriyal solunum zincirinde önemli görevleri olduğu bildirildikten sonra çalışmalar genellikle mitokondrideki fonksiyonları üzerine artmıştır. Çalışmalar bu yönde yapılmaya başlamıştır. Co-Q10, mitokondriyal solunum zincirindeki en önemli lipid antioksidanlarından biridir (Varela-López ve diğ., 2016).

Özellikle Koenzim Q10'nun indirgenmiş formunun önemli bir fizyolojik lipid-çözünür antioksidan olduğu gösterilmiştir (Frei 1990). Koenzim Q10, membranlarda doymamış lipit zincirlerine yakın konumda bulunmakta, serbest radikallerin başlıca

süpürücüsü gibi hareket etmektedir (Crane, 2001). Konumundan dolayı membranda üretilen serbest radikallerin komşu lipid ve protein molekülleri ile reaksiyona girmesini önlemektedir (Navarro ve ark. 1999). Bunun yanında bazı antioksidan görevi gören vitaminler ile birlikte etkileşim halinde olduğu belirtilmiştir (López-Lluch 2010). Askorbik asit (C vit.) ve α-tokoferol gibi diğer antioksidanların rejenerasyonuna katıldığı, koenzim Q10'nin olmadığı durumlarda α-tokoferol rejerenasyonunun yavaşladığı bildirilmiştir (Sohal ve Forster, 2007). Vücutta endojen olarak sentezlenmesinin, beslenme yetersizliği gibi antioksidan vitaminlerin yeterli olarak alınamadığı bazı fizyolojik durumlarda, antioksidan savunma sistemi açısından önemli olduğu bildirilmiştir. E vitamini ve selenyum gibi antioksidanların eksikliğinin, koenzim Q10 ile tedavi edilebileceği bildirilmiştir (Fabra ve ark. 2016). Protein, lipid ve DNA oksidasyonunu etkin bir şekilde önlemekte ve serbest radikal temizleyicisi olarak görev yapmaktadır. İndirgenmiş formu olan ubiquinolün, lipid peroksidasyonunun başlatılmasını inhibe ettiği belirtilmiştir (Tekle ve Dallner 2010).

Oksidatif stres, antioksidan kapasitenin azalması ve spermin zayıflamış mitokondriyal fonksiyonu erkeklerde infertilite oluşmasında rol oynadığı bildirilmektedir. Antioksidan aktivitesi sayesinde koenzim Q10 takviyesinin enerji üretimini sağladığı ve spermatozoa fonksiyonunu geliştirdiği ve infertilite üzerinde olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Tirabassi ve diğ., 2015). Bu konu ile ilgili yapılan meta-analizinin sonuçlarına göre koenzim Q10 takviyesi ile seminal koenzim Q10 konsantrasyonunun %49 oranında arttığı, sperm yoğunluğunun %5 ve sperm hareketliliğinin %4.5 oranında arttığı bulunmuştur (Tirabassi ve ark. 2015).

2.8.1.4. Glutatyon

Vücutta enzimatik olmayan önemli bir antioksidan olan Redükte glutatyon (GSH), serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (Beutler,1975; 1963; Akkuş, 1995; Fırat, 1997; Dikici, 1999; Yanbeyi, 1999). En önemli görevi, enzim ve proteinlerin tiyol gruplarının (-SH) indirgenmesi ile redükte formlarının yeterli düzeylerde kontrolünü sağlamaktadır. Tiyol grubuna sahip birçok enzim düşük hızda fakat okside olarak ya da O2'nin direkt etkisiyle hızla aktivitelerini kaybederler. Bunun için GSH kendisi okside olup tiyol gruplarını tekrar indirgeyerek bunların aktivasyonunu sağlar. Özellikle H2O2'nin elimine edilmesinde

de GSH'ın oksitlenebilirliğinden faydanılır (Calberg ve Mannervik, 1985; Akkuş, 1995; Yanbeyi, 1999)

2.8.1.5. Sistein

Tiol içeren bileşikler bütün vücut hücrelerinde bulunur ve yaşamsal öneme sahiptir. Tiol içeren antioksidanlardan bazıları sistein, metionin, taurin, glutatyondur. Tiol içeren bu yapılar çeşitli oksidanları indirgeyerek ve temizliyerek biyolojik sistemleri korurlar. Sistein temel görevi GSH (Glutatyon) sentezinde rol alır (Parcell, 2002).

2.8.1.6. Karotenler

A vitamininin metabolik ön maddesi olan β- karoten, singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleri ile doğrudan etkileşerek antioksidan olarak rol oynadığı tesbit edilmiştir (Frei, 1994; Fırat, 1997; Yanbeyi, 1999).

2.8.2. Enzimatik Antioksidanlar

2.8.2.1. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

İlk olarak 1957 yılında Mills tarafından keşfedilmiş olan bu enzim indirgenmiş glutatyon (GSH) varlığında hidrojen peroksit ve lipit peroksitlerinin parçalanmasında görev alır. Aktif bölgesinde prostetik grup olarak selenyum minerali bulunur. Membran lipidlerini lipid peroksidasyondan korur (Poul ve ark., 1993).

2.8.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutazlar (SOD), süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzim grubudur. Hücrelerin sitosolünde, mitokondrilerinde, plazmada bulunurlar (Marklund ve ark., 1982; Poul ve ark., 1993; Hearn ve ark.,1999).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Yaptığımız çalışma; Gaziantep ili Nurdağı ilçesi Hisar mahallesi 37° 09' 28.7" kuzey enlemi ve 36° 54' 20.2" doğu boylamında bulunan Pan Damızlık Damascus Keçi Çiftliği işletmesinde üreme sezonunda (Eylül-Kasım) yürütüldü. Tekelerin barındırıldığı işletme en düşük 12 °C, en yüksek 27 °C sıcaklıkta ve 642 m rakım özelliğine sahiptir. Pan Damızlık Damascus Keçi Çiftliği'nde entansif yetiştiricilik yapılmaktadır. İşletmede hayvanların yönetimi ve beslenmesine dikkat edilerek, çalışma süresince herhangi bir değişiklik yapılmadı. Çalışmada, spermanın elde edilmesi ve dondurulması işlemlerinde Halep Keçi Çiftliği'ne ait döl verimi sorunu bulunmayan, yaşları 2-6 arasında değişen 4 ergin Halep tekesi kullanıldı. Tekeler işletmede damızlık olarak kullanılan hayvanlar arasından genel muayeneleri yapılarak seçildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Çalışmada Kullanılan Halep tekeleri.

3.2. Yöntem

3.2.1. Spermanın Alınması

Elektroejakulasyon yöntemi ile sperma alma işlemi gerçekleştirildi (Şekil 4.2). Kullanılan elektroejekülatör (Ruakura Ram Probe, Manufactured For Shoof International Ltd, New Zealand) 12 volt elektrik veren, pil ile çalışmaktadır. Çiftliğe ait laboratuvar bölümüne Tekeler sperma alma işlemi için getirildi. Sperma alma işlemi için teke yumuşak

bir zemin üzerine yatırıldıktan sonra genital bölgedeki prepusyum fazla kılları ve penis civarı kıllar makasla kesildi, prepusyum ılık su ile yıkanarak, kağıt havlu ile temizlendi ve kurulandı. Tekelerin sabit bir şekilde tutulması işlemi, yardımcılar tarafından gerçekleştirildi. Elektrik uyarımlarının etkisiyle meydana gelen kontraksiyonlar sonucunda, oluşabilecek kazaların önüne geçmek için ön bacaklar, baş ve arka bacaklar tespit edilerek iş güvenliği sağlanmıştır. Probun anüsten girişini kolaylaştırmak için rektum sfinkteri üzerine yeteri miktarda vazelin sürülerek masaj yapıldı. Elektroejekülatör probu ile 8-10 cm kadar rektuma girildi. Spermayı toplayacak yardımcı gerekli hazırlıkları yaparak, penisin ucuna yakın bir yerde sperma kadehi ile bekledi. Elektroejakülatöra ait uyartı verme için bulunan düğmeye 4 saniye süre basılarak, elektriksel uyarının verilmesi ve 4 saniye çekilerek uyarıların kesilmesi şeklinde uygulama ejekülasyon şekilleninceye kadar tekrarlandı. Yardımcı tarafından sperma toplama kadehi ile sperma toplandı. Tekelerden sperma haftada iki kez olmak üzere 7 hafta süreyle toplam 14 kez alındı (HMKÜ Hayvan Deneyleri yerel etik kurulu 2018 10-4 sayılı karar).



Şekil 4.2. Halep tekelerinden elektro-ejekülatör ile sperma alma işlemi.

3.2.2. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Gerçekleştirilen çalışmada öncelikle Halep Tekelerden alınan spermaların birleştirilmesiyle elde edilen miks ejakülatın miktarı (ml), mass aktivite, spermatozoa motilitesi (%), spermatozoa yoğunluğu ($x10^9$ /ml), ölü spermatozoa oranı (%), anormal spermatozoa oranı (%), Hipo-ozmotik şişme test (HOST) (%) parametreleri ve pH yönüyle değerlendirildi.

Alınan sperma örneklerinde mass aktivite, motilite, hacim ve pH belirlendi. Hacim değeri ortalama 1.0 ml (0.5-1.5), motilite %80 (70-90) ve kitle aktivitesi 3 (3-5) olan spermalar birleştirilerek çalışmada kullanıldı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Sperma örneklerinin değerlendirilmesi.

3.2.2.1. Hacmin Belirlenmesi

Tekelerden alınan ejakulatların miktarları, sperma toplama kadehinde ml olarak belirlendi.

3.2.2.2. Kitle Aktivitesinin Belirlenmesi

Sulandırılmamış sperma örneklerinin muayenesi mikropipet ile bir damla alınarak 37 °C'deki lam üzerine konuldu ve spermatozoonların toplu hareketleri mikroskopta 100 lük büyütme ile lamel kapatılmaksızın değerlendirildi. Spermatozoon hareket biçimlerinden güçlü harekete sahip olmaları, ileri yönde hareket etmeleri, oluşan kaynama

ve dalgalanma hareketleri göz önüne alınarak, 0-5 arasında puanlanlama yapıldı (Tekin 1990).

3.2.2.3. Motilite Muayenesi

Spermatozoon motilitesi, faz konstrat mikroskoba yerleştirilen 37°C'deki ısıtma tablası üzerinde belirlendi. 1-2 damla %2.9'luk sodyum sitrat solüsyonu lam üzerine bırakıldı ve miks sperma örneğinden alınan spermadan toplu iğne başı kadar konularak karıştırıldı. Daha sonra sperma üzerine, hava kabarcıklarının oluşmasını önlemek için 45º açıyla lamel kapatıldı ve sperm hareketleri 400'lük büyütmede en az üç mikroskop alanında incelendi. Aynı yönde düzgün hareket eden spermatozoonların aynı alandaki tüm spermatozoonlara oranı yüzde (%) olarak ifade edildi (Sönmez 2013).

3.2.2.4. Spermatozoon Yoğunluğunun Belirlenmesi

Hemositometrik yöntem ile spermatozoon yoğunluğu belirlendi. Bu işlemde spermayı sulandırmak için Hayem solüsyonu kullanıldı. Yoğunluk tayini 1/200 oranında sulandırılan sperma ile gerçekleştirildi. Alyuvar sayım pipetinin 0.5 çizgisine kadar sperma ve üzerine 101 çizgisine kadar solüsyondan çekildi. Daha sonra pipetin her iki ucu parmaklar ile kapatılarak yatay konumda ileri geri hareketlerle spermatozoonlar ile solüsyon homojen bir şekilde karışrıldı. Bu işlemden sonra pipetin kılcal borusunda spermatozoon bulunmağından bu hacme eşdeğer olarak karışımın birkaç damlası alındı. Pipet, Thoma lamı üzerindeki kanala temas ettirilerek, Thoma lamı ile lamel arasına sulandırılmış solüsyonlu sperma, sayım alanlarına yayılımı sağlandı. Thoma lamı mikroskop tablasına yerleştirilerek, 3-5 dk. beklenerek pasif sıvı akışının durması ve spermatozoonların yer değiştirmelerinin engellendikten sonra sayım işlemi yapıldı. Yoğunluk, ışık mikroskobunun 400'lük büyütmesinde Thoma lamının alt ve üst sayım sahaların beşer orta karedeki (80 küçük kare) spermatozoonlar sayılarak aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı (Tekin 1994; Sönmez 2013).

Sperma Yoğunluğu = Sayılan Spermatozoon ÷ Sayılan Küçük Kare x Toplam Küçük Kare Sayısı x Sulandırma oranı (200) x 10

(Thoma lamı ile lamel arasındaki yükseklik 0.1 mm) x 1000 (1cm3 =1000 mm3) = Sayı/ ml

3.2.2.5. Ölü-Canlı Spermatozoon Oranının Belirlenmesi

Ölü spermatozoa oranı için eosin boyama yöntemi kullanılarak tespit edildi (Şekil 4.4). Testte Eosinin %3'lük sodyum sitratla hazırlanmış %1'lik konsantrasyonu kullanıldı. Lam, lamel ve pipet sıcaklığının 37 °C'de olmasına dikkat edildi. Temiz bir lam üzerine konulan sperma örneğinden bir damla, eşit büyüklükte eosin boyası ile nazik şekilde karışımı sağlandı. Bu karışımdan aynı lam üzerine sürme froti çekilerek kısa sürede inkübatörde kuruması sağlandı. Hazırlanan sürme preparatlar ışık mikroskobunun immersiyon objektifi (x100) ile yapıldı. Her preperattan 400 spermatozoon sayılarak ölü spermatozoon oranı yüzde (%) olarak belirlendi. Sürme froti preparatların değerlendirilmesinde; baş kısmı hiç boya almamış spermatozoonlar canlı, baş kısmı boya almış olanlar ise ölü olarak kabul edildi (Tekin 1990; Sönmez 2013).



Şekil 4.4. Ölü spermatozoon oranının değerlendirilmesi.

3.2.2.6. Anormal Spermatozoon Oranının Belirlenmesi

Alınan sperma numunelerindeki anormal spermatozoa oranı sıvı fikzasyon yöntemi (Tekin, 1994) kullanılarak belirlendi. Anormal spermatozoa oranını; 0,5 ml Hancock solüsyonunda tespit edilen 1 damla sperma solusyonundan alınan 1 damla numune lam üzerine konularak üzerine lamel kapatıldı. Daha sonra sedir yağı damlatılarak mikroskopta, objektif (x1000 büyütme) altında 400 spermatozoa sayılarak anormal yapı gösterenlerin oranı yüzde (%) olarak belirlendi.

3.2.2.7. HipoOsmotik Swelling Test (Membran bütünlük testi)

Hipoozmotik Swelling Test'in yapılması için, 100 µlt sperma, 900 µlt 100 mOsmol fruktoz (Söderquist ve ark., 1997) solusyonu ile karıştırılarak +37°C'deki su banyosunda 5 dakika (Uysal ve ark., 2006) bekletilmiş ve ardından lam üzerine karışımdan yapılan frotiden (Uysal ve ark., 2005) faz kontrast mikroskopta 200 adet spermatozoa sayılmış ve kuyruğu kıvrılan spermatozoa oranı yüzde (%) olarak belirlenmiştir (Hafez 1993; Nur ve ark. 2005).

3.2.2.8. pH Değerinin Belirlenmesi

Sperma numunelerinin pH değerleri yapılan çalışmada nativ muayenede, antioksidan eklenmiş gruplarda 5.5–9.0 (Merck) arasında renk skalası bulunduran pH indikatör kağıdı ile belirlendi.

3.2.2.9. Plazma malondialdehit düzeyi ölçümü

Plazma malondialdehit düzeyi ölçümünde Yoshioka ve Ark (1979) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı.

Kullanılan ayıraçlar: %20 Triklorasetik asit:200 gr. Triklorasetik asit (TCAA) (CCI3COOH) bidistile su ile çözülerek hacim bir litreye tamamlandı.

%0,67 Tiyobarbütirik asit: 1,675 TBA (4,6-Dihidrokdi-2-tiyoprimidin) bidistile suda çözülerek hacim 250 ml'ye tamamlandı.

Tetraetoksipropan standart çözeltisi (20 mmol/L):0,494 ml 1.1.3.3 Tetraetoksipropan ($C_{11}H_{24}O_4$) 100 ml absolut etanolde eritilerek 20 mmol/L'lik stok standart çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden 0,1 ml alınarak tridistile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve 20 µmol/L'lik çalışma standart çözeltisi elde edildi.

n-Butanol: Analiz saflığında kullanıldı.

Analiz prosedürü:

Kör ve test olarak işaretlenen iki adet kapaklı deney tüpü alındı. Tüplere 2,5 ml %10'luk (w/v) TCAA çözeltisi konduktan sonra kör tüpüne 0,5 ml distile su, örnek tüpüne ise 0,5 ml örnek konularak vorteksle karıştırıldı. Tüplerin ağzı kapatıldıktan

sonra 90°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildi. Tüpler soğutulduktan sonra 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Supernatantlardan 2 ml alınıp üzerine %0,675'lik (w/v) TBA çözeltisinden 1 ml eklendi. Tekrar 90°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra tüpler soğutuldu. Her numunenin absorbansı 532 nm'de köre karşı testin absorbansı UV spektrofotometrede okundu. 20 µmol/L'lik 1.1.3.3 Tetraetoksipropan çalışma standart çözeltisi ile 1,2,4,5,20 µmol/L'lik dilusyonlar hazırlanarak kalibrasyon grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak mda değerleri µmol/L plazma olarak verildi.

3.2.3. Spermanın Sulandırılması ve Antioksidan Grupları

Spermaların sulandırılmasında Tris bazlı sulandırıcısına ilaveten antioksidan komponenti değiştirilerek kullanıldı. Çalışmada kullanılan sulandırıcının kompozisyonu şu şekildedir:

Kontrol grubu (Tris – Yumurta Sarısı sulandırıcısı);

3.63 g Tris

0.30 g Fruktoz

0.50 g Glukoz

1.82 g Sitrik Asit

%6 Gliserol

Pen G 100.000 IU

Streptomisin 100 mg

%10 Yumurta Sarısı

100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

Kontrol grubuna (Tris-Yumurta sarısı), Koenzim Q10 0.5 ve 1 mM, C vitamini 0.5 ve 1 mg/ml, E vitamini 0.3 ve 0.6 cc/ml konsantrasyonlarında ilave edilerek deneme grupları oluşturulmuştur.

Çalışma gruplarına ait sperma örnekleri sulandırma işlemi sonrasında spermanın sıcaklığı 2 saat içerisinde 4-5 °C'ye düşürüldüğünde ve 4 saat boyunca ekilibrasyon işlemi sonrasında motilite, ölü-canlı spermatozoon oranı, anormal spermatozoon oranı, pH bakımından değerlendirildi.

3.2.3.1. Spermanın Sulandırılması

Tris bazlı ana sulandırıcı 12 kısma bölünerek sulandırıcı gruplarına, 2 farklı oranda, 3 çeşit antioksidan eklenip, 2 farklı dondurma protokolü uygulanarak, kontrol grubu ile beraber 13 grup yapıldı. Tekelerden alınan ejakülatlar 35-37 °C'de su banyosunda (Msb 30, Miprolab) spermatolojik değerleri uygun olan örnekler birleştirildi. Birleştirilmiş olan sperma örneği, toplam sulandırıcı hacminin yarısı olan antibiyotikli sulandırıcı kısmı ile 35-37 °C'de sulandırıldı (Şekil 3.5). Gliserol içermeyen bu sulandırıcı kısmı sperma üzerine, spermanın hacmi kadar eklendi ve sonraki aşamalarda v/v olacak şekilde 5 dk aralıklarla sulandırıldı. Ön sulandırılması yapılmış spermanın sıcaklığı 2 saat içinde kademeli olarak 4-5 °C'ye düşürüldü. Daha sonra soğutulmuş sperma bölümüne toplam sulandırıcı hacminin %6'i oranında gliserol ilave edildi ve 4-5 °C'de spermalar dondurma öncesinde soğutmalı inkübatör içerisinde (ES120, Nüve, Türkiye) 2 saat süreyle ekilibrasyona tabi tutuldu (Üstüner ve ark. 2014; Mushtaq ve ark. 2015).



Şekil 4.5. Spermalarda sulandırma işlemi.

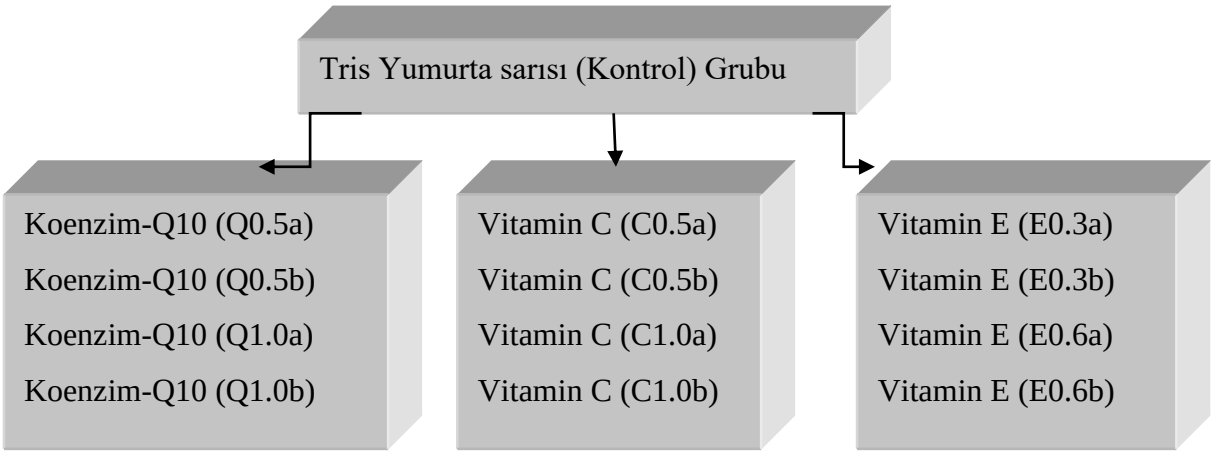
3.2.3.2. Spermanın Dondurulmasında Kullanılan Yöntemler

Raflara yerleştirilen payetler +4 °C'de 2 saat ekilibrasyona bırakıldıktan sonra sperma 0.25'lik payetlere çekilerek, payetlerin ucu polivinil alkol ile kapatılıp, payetler sıvı azot seviyesinin 4 cm üzerinde (-120 °C) sıvı azot buharında

a grubu; 8 dakikada (15 °C/dk.)

b grubu; 6 dakikada (20 °C/dk.) donduruldu ve sıvı azota daldırılarak saklandı.

3.2.3.3. Grupların oluşturulması



Şekil 4.6. Grupların Oluşturulması.

3.3. İstatiksel Değerlendirme

İstatistiki değerlendirmelerde SPSS 23.0 paket programı kullanıldı. Sperma numunelerinden elde edilen verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulaması ve analiz sonucunda gruplar arası farkın önemini belirtmek için Duncan testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Tekelerden Alınan Sperma Örneklerinde Spermatolojik Özellikler

Tekelerden alınan ve birleştirilen nativ sperma örneklerine ait tanımlayıcı istatistiki sonuçları, Çizelge 4.1'de verilmiştir. Buna göre sperma örneklerinin ortalama değerleri sırasıyla; hacim 3.91 ml, motilite 85 (%), ölü spermatozoon oranı 10.95 (%), anormal spermatozoon oranı 7.085 (%), pH değeri 6.62 ve spermatozoon yoğunluğu 3.77 x 10^9/ml olarak belirlendi (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan Halep tekelerin birleştirilmiş ejakulatlarında elde edilen ortalama spermatolojik değerler (Ort ± Std. Hata)

Uygulama no	Birleş. Eja. Miktarı (ml)	Sperm. Motilite (%)	Sperm. Yoğunluğu (x10^9/ml)	Anormal Sperm Oranı (%)	Ölü Sperm. Oranı (%)	Sperma pH
1	4.1	84	3.4	6.5	9.2	6.9
2	4.0	89	3.9	8.4	9.4	6.7
3	3.6	82	3.9	7.7	11.2	6.6
4	3.7	85	3.7	6.5	8.6	6.3
5	4.3	80	4.1	6.3	13.4	6.5
6	3.5	91	3.5	7.8	10.6	6.5
7	4.2	84	4.3	6.4	14.3	6.9
X	3.91	85	3.77	7.085	10.95	6.62
Sx-	0.31	3.82	0.33	0.85	2.17	0.22

4.2. Alışım Sonrası Spermatolojik Değerler

Antioksidan ve kontrol grubu sulandırıcı gruplarında soğutulmuş sperma örneklerinde (Çizelge 5.2) gruplar arasında motilite oranı en düşük Kontrol grubunda belirlenmiş olup antioksidan katılan grup ortalamalarından önemli farklılık göstermiştir (P0.05). Ayrıca Q1a, Q1b, E0.3a, E0.3b ve E0.6b gruplarında en yüksek motilite oranı saptanmış olup diğer antioksidan katılan gruplardan önemli farklılık göstermişlerdir (P<0.05). Ölü spermatozoon oranı değerlendirmesinde Q1a ve Q1b ile E0.3a ve E0.3b en

düşük ölü spermatozoon olduğu saptandı (P<0.05). Anormal spermatozoon oranı bakımından; Q0.5a ve C1a belirgin yüksek bulundu (P<0.01). pH değerlendirmesi bakımından kontrol ve antioksidan grupları arasında farklılık görülmedi.

Çizelge 5.2'de görüldüğü gibi, Antioksidan gruplar arasında Q1, C0.5b, E0.3 motilite bakımından, kendi gruplar arasında ve kontrol grubundan belirgin yüksek saptandı. Koenzim Q10 yüksek oranının, Vit C ve Vit E düşük oranlarda sulandırıcıya katılması motilite üzerine olumlu etkisi olduğu saptandı. Ölü spermatozoon oranı antioksidan gruplar arasında Q0.5, C0.5a ile C1a, E0.6 belirgin yüksek bulundu. Vit C farklı oranlarda, aynı dondurma protokolünde olması ölü spermatozoon oranı benzer bulundu. Anormal spermatozoon bakımından Q0.5a, C1a, E0.6b yüksek bulundu.

Çizelge 5.2. Alışım sonrası sulandırıcı gruplarında 4-5 °C'de elde edilen spermatolojik değerler (Ort ± Std. Hata)

Sulandırıcı Grupları	Motilite (%) (X ± Sx) (n = 13)	Ölü Canlı (%) (X ± Sx) (n = 13)	Anormal (%) (X ± Sx) (n = 13)	pH (X ± Sx) (n = 13)
Kontrol (Tris-YS)	68.53±2.04^{d}	14.12±1.31^{a}	9.37±1.34^{ab}	6.59±0.19
Q0.5a	78.31±2.44^{bc}	11.28±0.80^{b}	10.40±1.60^{a}	6.74±0.08
Q0.5b	77.76±2.23^{bc}	12.48±0.82^{b}	8.42±0.82^{b}	6.69±0.28
Q1a	82.31±2.03^{a}	9.38±1.33^{c}	6.84±0.82^{c}	6.57±0.16
Q1b	84.16±2.68^{a}	9.12±0.65^{c}	7.31±0.61^{c}	6.72±0.12
C0.5a	78.24±2.05^{bc}	13.80±1.27^{a}	8.57±0.47^{b}	6.64±0.22
C0.5b	80.28±2.35^{b}	12.57±1.41^{ab}	9.47±1.20^{ab}	6.69±0.21
C1a	74.71±2.68^{c}	14.09±1.40^{a}	11.15±0.78^{a}	6.65±0.16
C1b	75.73±2.13^{c}	12.50±0.92^{b}	8.50±0.90^{b}	6.61±0.24
E0.3a	81.30±2.12^{a}	9.57±1.41^{c}	6.85±0.90^{c}	6.67±0.15
E0.3b	84.14±2.74^{a}	9.12±0.65^{c}	7.31±0.61^{c}	6.72±0.12
E0.6a	79.24±2.15^{bc}	13.80±1.27^{a}	8.57±0.47^{b}	6.64±0.22
E0.6b	81.08±2.14^{a}	12.57±1.41^{ab}	9.47±1.20^{ab}	6.69±0.21
P	*	*	**	Önemsiz

**: P<0.01, aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında önemlilik derecesi.

*: P<0.05, aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında önemlilik derecesi.

4.3. Dondurma Çözdürme Sonrası Spermatolojik Değerler

Antioksidan ilaveli sulandırıcı gruplarında; dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde elde edilen spermatolojik parametreler Çizelge 5.3'de gösterilmektedir. Antioksidan sulandırıcı grubunda Koenzim Q10 motilite değerlendirmesinde; kontrol grubu ve antioksidan ilaveli gruplardan daha yüksek değere sahipti (P<0.01). Ölü spermatozoon oranı bakımından kontrol grubu, antioksidan ilaveli gruplardan daha yüksek değere sahip (P<0.05) iken, diğer Antioksidan grupları ile benzer bulundu. Antioksidan grupları arasında E0.3b, diğer gruplarla karşılaştırıldığında daha yüksek ölü spermatozoon oranına sahipti (P<0.05). Anormal spermatozoon bakımından Q1b en düşük oran saptandı. Membran bütünlüğü bakımından kontrol grubu, en düşük değere sahiptir. En yüksek değer Q1b grubundadır.

Çizelge 5.3. Sulandırıcı gruplarında dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik değerler (Ort ± Std. Hata)

Sulandırıcı Grupları	Motilite (%) (X ± Sx) (n = 13)	Ölü Canlı (%) (X ± Sx) (n = 13)	Anormal (%) (X ± Sx) (n = 13)	HOST (%) (X ± Sx) (n = 13)
Kontrol (Tris-YS)	39.05±4.34^{c}	57.27±5.41^{a}	27.26±2.16c	29.44±4.42^{c}
Q0.5a	55.14±4.45^{a}	32.61±2.14^{c}	18.32±2.37^{b}	54.03±3.12^{a}
Q0.5b	58.14±3.02^{a}	31.12±2.42^{c}	17.65±1.19^{b}	55.00±3.18^{a}
Q1a	59.24±3.02^{a}	33.42±3.52^{c}	16.85±2.16^{b}	58.00±2.38^{a}
Q1b	61.00±4.76^{a}	30.57±3.35^{c}	13.71±1.60^{c}	59.00±4.77^{a}
C0.5a	46.20±2.05^{b}	43.57±4.27^{b}	19.55±2.54^{b}	46.24±3.76^{b}
C0.5b	49.28±3.35^{b}	46.28±3.09^{b}	24.48±2.27^{a}	45.14±2.60^{b}
C1a	44.16±4.68^{b}	45.32±3.20^{b}	23.57±3.04^{a}	47.85±3.76^{b}
C1b	48.21±2.21^{b}	36.26±3.20^{c}	25.57±2.06^{a}	46.14±2.16^{b}
E0.3a	45.13±2.14^{b}	34.23±2.10^{c}	26.19±1.47^{a}	48.24±2.22^{b}
E0.3b	55.26±3.22^{a}	51.32±1.19^{a}	24.37±2.44^{a}	54.12±3.8^{a}
E0.6a	46.51±2.13^{b}	44.32±2.74^{b}	26.57±3.04^{a}	56.14±2.16^{a}
E0.6b	49.71±4.68^{b}	41.32±3.20^{b}	23.57±1.74^{a}	46.14±2.16^{b}
P	**	*	*	**

*: P<0.05, aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında önemlilik derecesi.

**: P<0.01, aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında önemlilik derecesi.

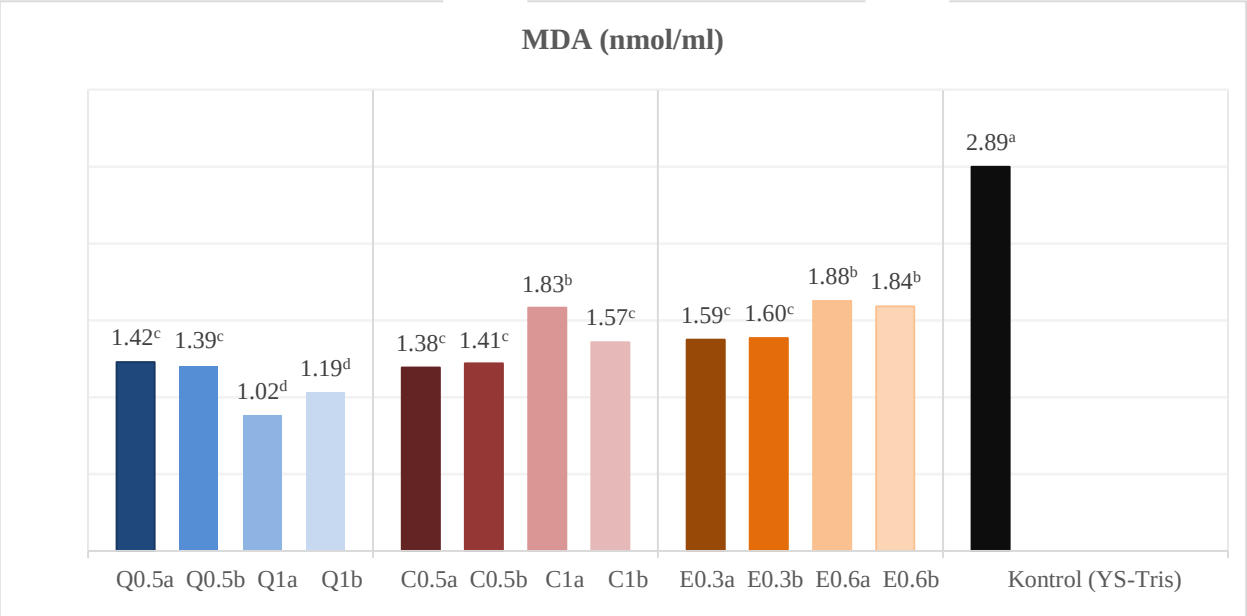
4.4. Dondurma Protokolüne Göre Çözüm Sonu Spermatolojik Değerler

Antioksidan katılan sulandırıcı grupları arasında, Çizelge 5.3'de gösterilen iki farklı sürede uygulanan dondurma protokollerinden, 8 dakikada (15 °C/dk.) dondurma protokolüne göre yapılan çözdürme sonucu spermatolojik değerlendirmede en yüksek motilite Q1a grubunda, ölü spermatozoon en düşük Q0.5a, anormal spermatozoon yönünden en düşük Q1a, membran bütünlüğü yönünden en yüksek Q1a tespit edilmiş, 6 dakikada (20 °C/dk.) uygulanan dondurma protokolünde en yüksek motilite Q1b grubunda, ölü spermatozoon en düşük Q1b, anormal spermatozoon en düşük Q1b, membran bütünlüğü en yüksek Q1b tespit edilmiştir.

Dondurma protokolleri arasında çözdürme sonucu en yüksek motilite Q1b, en düşük motilite C1a grubundadır ($P<0.01$). Ölü spermatozoon yönünden en yüksek E0.3b, en düşük Q1b grubunda ($P<0.05$), anormol spermatozoon en yüksek E0.6a, en düşük Q1b grubunda ($P<0.05$), Membran bütünlüğü bakımından en yüksek Q1b, en düşük C0.5b tespit edilmiştir.

4.5. MDA (Molandialdehit) Sonuçları

Çalışmada, dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametrelerine ait bulgular Şekil 5.1'de verildi. Kontrol grubunda mda düzeyi diğer çalışma gruplarından yüksek, ayrıca kontrol grubu diğer sperma sulandırıcı grupları ile karşılaştırıldığında rakamsal farklılığın istatistikî olarak önemli olduğu bulundu ($P<0.01$). Mda sulandırıcı gruplarında en az olarak Q1.0a (1.02) ve Q1.0b (1.19), Vit C grubunda C0.5a (1.38) ve C0.5b (1.41), Vit E grubunda ise E0.3a (1.59) ve E0.3b (1.60) ve kontrol grubunda ise en yüksek 2.89 olarak saptandı. Gruplar arasında en az mda değeri Q1a grubunda, en yüksek kontrol grubunda saptanmıştır.



**: (P< 0.01) Grup ortalamaları arası fark önemli

a,b,c,d: Aynı sütunda ortak harf taşımayan grup ortalamaları arası fark önemli

ŞEKİL 5.1. Sulandırıcı gruplarında mda değerleri

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda dört adet Halep (Damascus) tekesinden alınarak birleştirilen spermanın toplam miktarı en yüksek 4.2 ml en düşük 3.5 ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 5.1). Ayrıca grupların ortalama karışım sperma miktarı 3.9 ml olmuştur. Teke başına düşen ortalama sperma miktarı ise yaklaşık 0.97 ml (3.91 ml/ 4 teke) olmuştur. Bulgularımız, tekeler ile yapılan bazı çalışmalarda elde edilen sperma hacmi Ankara tekeleri üzerinde çalışan araştırıcılardan Daşkın (1991) tarafından 0.9 ml, Tekin ve ark. (1996)'nın 0.9 ml, Arı (2006)'nın 0.9 ml, Bucak (2007)'ın 0.9 ml ile uyumlu seviyededir. Kulaksız (2009) 1.22 ml, Karagiannidis ve ark. (2000)'nın 1.27 ml, Daşkın ve Tekin (1996)'nın 1.44 ml olarak elde ettikleri ortalama sperma miktarından düşük göstermektedir. Türk ve ark. (2005)'nın Saanen x Kıl tekelerinde 0.89 ml, Kamal ve ark. (2005)'nın 0.77 ml değerlerinden yüksektir.

Halep ırkı tekelerimizin nativ spermatozoon motilitesi ortalama %85±3.82 olarak bulunmuştur (Çizelge 5.1). Khalifa ve El-Saidy (2006) Damascus tekelerinde %80.56, Ahmad ve ark. (2015) Beetal ırkı tekelerde %87, Ankara tekeleri üzerinde yapılan çalışmalarda, Sevinç ve ark. (1985) %83.49 ile %86.82, Daşkın (1991) % 81, Tekin ve ark. (1996) %81, Bucak (2007) %84.90 ile motilite oranlarında benzerlik göstermektedir. Ancak Dorado ve ark. (2007) Florida tekelerinde %91.43, Deka ve Rao'nun (1986) Hindistan yerli tekelerinde %88.40 motilite değerlerinden düşük; Kulaksız (2009) %77, Kamal ve ark. (2005) %68.50, Nur ve ark. (2005) %62.50, Karagiannidis ve ark. (1999) %68.73, Karatzas ve ark. (1997) %65.80 olarak belirlediği motilite oranlarından yüksektir.

Spermatozoon yoğunluğu ortalama 3.77±0.33 ($x10^9$/mL) olarak bulunmuştur (Çizelge 5.1). Dorado ve ark. (2007)'nın Florida tekelerinde $3.69x10^9$/mL, Kulaksız (2009)'ın $3.62\pm0.41x10^9$/mL, Karatzas ve ark. (1997)'nın Saanen tekelerinde $3.70x10^9$/mL, olarak tayin ettikleri değerlerle benzerlik göstermektedir. Arı (2006)'nın 3.03 $x10^9$/mL, Bucak (2007)'ın 3.50 $x10^9$/mL, Ali ve Mustafa (1986)'nın Nubian tekelerinde 1.7 $x10^9$/mL, Tekin ve ark. (1996)'nın $2.89x10^9$/mL, Ritar ve ark. (1992)'nın 2.43 $x10^9$/mL, Daşkın ve Tekin (1996)'in $2.38x10^9$ /mL, değerlerinden yüksektir. Peterson ve ark. (2006)'nın $6.2x10^9$/mL olarak tayin ettikleri değerlerden oldukça düşüktür.

Araştırmamızda nativ spermada anormal spermatozoa oranı %7.085 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 5.1). Karagiannidis ve ark. (2000)'nın %7.41 ile benzer olduğu saptanmıştır. Tekin ve ark. (1996)'nın %3.63, Daşkın ve Tekin (1996)'in %4.17, Sevinç ve ark. (1985)'nın %2.06, Bucak (2007)'ın %6.70 olarak tespit ettikleri oranlardan yüksektir. Kulaksız (2009) çalışmada %11.85, Nur ve ark. (2005)'nın %9.7, Kamal ve ark. (2005)'nın %8.50, Türk ve ark. (2005)'nın %9.5, Ahmed ve ark. (1997)'nın Saanen tekelerinde %11.6, Dorado ve ark. (2007)'nın Florida tekelerinde %28.5 olarak bildirdikleri anormal spermatozoa oranından düşüktür.

Araştırmada nativ spermada ölü spermatozoon oranı %10.95±2.17 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 5.1). Kamal ve ark. (2005)'nın Saanen tekelerinde %15.49, Ahmed ve ark. (1997)'nın Saanen tekelerinde %12.4, Arı (2007)'nın Ankara tekelerinde %13.14, Nur ve ark. (2005)'nın Saanen tekelerinde %12.70, Ali ve Mustafa (1986)'nın Nubian tekelerinde %14.7, Muyan (1987)'ın Ankara tekelerinde %25.78 olarak tespit ettiği orandan düşük; Bucak (2007)'ın Ankara tekelerinde %8.60 olarak tespit ettiği orandan yüksek; Kulaksız (2009) %11.10, Daşkın (1991)'ın %11.60 ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda 6.62±0.22 olarak pH saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda teke spermasının pH değer aralığının 6.3-6.8 arasında değiştiğini araştırmacılar bildirmiştir. Araştırmamızla uyumlu olduğu saptanmıştır. (Tekin ve Daşkın 1996; Türk ve ark. 2005; Choe ve ark. 2006; Dorado ve ark. 2007; Kulaksız 2009; Uysal ve Bayraktar 2011; Ferdinand ve ark. 2012; Kalyani ve ark. 2015; Çetin Coşkun ve Karaca 2019).

Nativ spermada elde edilen spermatolojik bulgular, tekeler için bildirilen fizyolojik değerler içerisinde bulundu (Hafez ve Hafez 2000).

Bu araştırmada elde edilen nativ teke spermalarında saptanan başlıca spermatolojik özelliklerin değerlerlerine ilişkin bulgular ile, diğer araştırmacıların bildirdiği veriler arasındaki farkların, araştırma yapılan tekelerin ırkına, yaşına, teke sayısına, sperma alma aralığına, sıklığı ve gün içindeki sperma alma zamanına bağlı olabileceği gibi, bakım-besleme, çevre, iklim farklılığından da kaynaklanmış olabilir. Başka yönden sperma alma ve değerlendirmede kullanılan yöntem farklılığı da elde edilen verilerin farklı olmasında etkili olabilir (Kulaksız 2009; Tekin ve ark. 1996; İnanç ve ark. 2014; Hafez ve Hafez 2000). Elde edilen spermatolojik parametrelerin, tekelerde bildirilen ortalama değerlerlerin uyum içinde bulunduğu ve dondurulmaya elverişli olduğu saptanmıştır.

Sulandırılmış spermada, Antioksidan Gruplarına göre Kontrol grubu (Tris-YS) Motilite yönünden istatiksel olarak düşük saptandı (%68.53) (Çizelge 4.2). Tris-YS sulandırıcısının kullanıldığı Boer ırkı tekelerde %64.40 motilite (Memon ve ark. 2011) ve tekelerde %66.2 motilite (Soltan ve ark. 2017) bulguları araştırmamızdaki verilerimizle benzer saptandı. Ancak Daşkın ve Tekin (1996) Ankara tekelerinde %81.5 motilite, Khalifa ve El-Saidy (2006) Damascus tekelerinde %80.56 motilite ve Ahmad ve ark. (2015) Beetal ırkı tekelerde %87 motilite değerleri araştırmamız sonuçlarından yüksektir.

Dondurulmuş-çözdürülmüş spermada azalan antioksidan kapasite ve artan reaktif oksijen radikal oluşumu, sperma parametrelerini ve fertiliteyi olumsuz olarak etkiler. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma, nativ spermaya göre peroksidasyona daha hassastır. Son zamanlardaki araştırmalar spermanın saklanması sırasında infertiliteye yol açan en önemli sebeplerin başında spermatozoon membran lipidlerinin peroksidasyonunu göstermektedir. Bu nedenle teke spermasının dondurulmasında, çözdürme sonrası spermatolojik parametreler üzerine olumlu etkilerini arttırabileceğinden, sperma sulandırıcılarına antioksidan maddeler katılmaktadır (Chen ve ark. 1993; Sinha ve ark. 1996).

Sperma sulandırıcılarına eklenen antioksidanların kryoprotektif ve antioksidatif etkilerinden dolayı dondurma çözdürme işlemleri sonrası spermatozoa motilitesini, membran bütünlüğünü, endojen antioksidan aktiviteyi ve fertilizasyon yeteneğini geliştirir. (Bucak ve ark. 2009).

Çalışmada çözüm sonrası en yüksek motilite oranı ortalaması %61.00±4.76 ile 1 mM Koenzim-Q10 ilavesi içeren 20 ˚C /dk. 6 dakika dondurma protokolü uygulanan sulandırıcı Q1b grubu olmuş, kontrol, Vitamin C ve Vitamin E gruplarından istatistiksel olarak önemli ($P>0.01$) farklılık göstermiştir (Çizelge 5.3). Ayrıca en düşük çözüm sonrası motilite oranı ise %39.05±4.34 ile kontrol grubu (Tris-YS) belirlenmiştir. Yapılan çalışmada, Tris sulandırıcısına katılan antioksidanlar arasında 1 mM Koenzim Q-10 eklenmesinin kontrol ve diğer antioksidan eklenen gruplara göre motilite değerinde istatistiki olarak önemli bir fark bulunurken ($p<0.01$), Tris sulandırıcısına 0.5 ve 1 mM Koenzim Q-10 ilavesinin ve dondurma protokolü farklılığının Koenzim Q10 grubu içinde, motilite oranına olumlu etkisi saptanmamıştır ($p>0.01$). Gruplar arasında E0.3b'nin, Koenzim-Q10 grupları arasında istatistiki fark önemli olmamasına rağmen ($p>0.05$), aynı dondurma protokolü uygulanması motilite değerlerine etki etmiştir. Vitamin C farklı doz ve dondurma

protokollerinin kendi gruplar arasında motilite değerleri arasındaki fark önemli olmamasına rağmen ($p>0.05$), Kontrol, Koenzim Q10'lu gruplar ve E0.3b gruplarının motilite değerlerinden önemli derecede farklı bulunmuştur ($p<0.01$). Ayrıca Vitamin E farklı doz ve dondurma protokolleri motilite değeri bakımından kendi gruplar arasında önemli farklılık göstermiş ($p<0.01$) ve en yüksek motilite değeri 0.3 cc/ml Vitamin E yani E0.3b grubunda olmuştur. Antioksidanların (Koenzim-Q10, Vitamin E ve C), kontrol grubuna göre motilite oranına olumlu etki yaptığı belirlenmiştir.

Konu ile ilgili bazı çalışmalar; Yousefian ve ark. (2018) Mahabadi tekelerinde Koenzim Q10 dondurulmuş çözdürülmüş spermadaki oksidatif etkisini araştırdığı çalışmada, soya lesitini %5 Gliserol temelli sulandırıcıya koenzim Q10 farklı dozları (0.5, 1, 1.5 µM) ile %9 DMSO ile gruplar oluşturulmuştur. Motilite değerleri kontrol grubu %43, DMSO %42, Koenzim Q10'un 0.5, 1 ve 1.5 µM dozları için verilen sırayla %44, %53 ve %48 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca Koenzim Q10'un 1.0 µM dozunun kontrol grubundan istatiksel olarak önemli ($p<0.05$), diğer gruplardan ise önemsiz ($p>0.05$) farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamız Koenzim Q10 grubu ile benzer motilite değerine sahip bulunmaktadır.

Saaed ve ark. (2016) Sığır ve manda spermasının sulandırılmasında, Tris-%7 YS temelli sulandırıcıya antioksidan olarak katılan Koenzim Q10 (0, 20 µM, 30 µM) etkilerini araştırdığı çalışmada, dondurma çözdürme işlemi sonrası en ideal Koenzim Q10'un 30 µM dozunda çoğu sperm parametrelerini geliştirdiği, özellikle motilite, canlılık, plazma membran bütünlüğü arttırdığını, sperm anormalliğini azalttığını, akrozom hasarına karşı koruduğunu bildirmiştir.

Nogueira ve ark. (2015) Koenzim Q-10 (40 µg/ml) ve α-Tokoferolün (2 mM) +5 °C de 72 saat saklanan aygır spermatozoon üzerinde etkisini araştırdığı çalışmada; Koenzim Q10 eklenen grupta motilite (%69.1±16) kontrol grubuna göre (%62.1± 16.2) daha yüksek oldugunu bildirmiştir. Çalışmamızda elde edilen motilite değerinden yüksek çıkmıştır.

Abd-Allah ve ark. (2021) Damascus tekelerinde yaz sezonunda L-Karnitin, Koenzim Q10 ve çinko metiyoninin bazı kan parametreleri ile sperma kalitesine olan etkisini incelediği çalışmada, kontrol grubu %60 konsantre yemle, %20 yonca saman, %20 mercimek samanı, 2. gruba beslenme ile beraber haftada iki defa L-Karnitin 50 mg/kg enjeksiyonu, 3. Gruba beslenme ile beraber haftada iki kez 6 mg/kg Koenzim Q10 enjeksiyonu, 4. Gruba beslenme ile günlük oral yolla 25 mg çinko metiyonin beslenmeye

alınmıştır. Araştırıcılar kontrol grubu sperma hacmi 1.26 ml. ve motilitesi %50 ile L-Karnitin ise sırayla 1.93 ml. ve %84, Koenzim Q10 grubu ise sırayla 1.53 ml. ve %68, Çinko Metiyonin grubu ise sırayla 1.80 ml. ve %78 olarak kaydetmiştir. Kontrol grubuna göre sperma parametrelerini geliştirdiğini, bunlar arasında en iyi sonuç L-Karnitin verdiğini bildirmiştir ($P<0.001$). Araştırmamızda kaydettiğimiz Koenzim Q10 motilte değerinden yüksek bulunmuştur.

Daghigh Kia ve ark. (2017) Ghezel koç spermasının dondurulmasında, Tris-temelli sulandırıcısına antioksidan olarak 0.5 µM Koenzim Q10 ve 0.25 mM ellagik asitin farklı oran ve kombinasyon ilavesinin sperma parametrelerini incelediği çalışmada, dondurma çözdürme işlemi (37 ˚C'de 30 saniye) sonucunda kontrol grubu motilite %48.2, 0.5 µM Koenzim Q10 grubunda en yüksek motilite %66.3 olarak kaydetmiştir. Araştrmamızda elde ettğimiz motilite değerinden yüksek çıkmış olup, istatiksel olarak uyumlu bulunmuştur.

Sampaio ve ark. (2018) Askorbik asit (0.65 mg/mL) ve α-tokoferolün (2 mmol/L) +5 ^{o}C de 72 saat saklanan aygır spermatozoon üzerinde etkisini araştırdığı çalışmada; Motilite yönünden Askorbik asit eklenen grup %68.4±18.1 iken α-tokoferol eklenen grupta %65.0±17.7 ve kontrol grubu %62.1±16.2 olarak saptanmıştır ($P<0.05$). E vitamini anologu olan α-tokoferolün ve Askorbik asitin motilteye olumlu etkisi olduğu bildirmiştir.

Memon ve ark. (2012) antioksidanların, Boer tekesi spermasının dondurma işlemi sonrası sperma parametreleri, lipid peroksidasyonu ve fertilitesi üzerine etkilerini araştırdığı çalışmada, Tris- %18 YS temelli sulandırıcıya kontrol grubu dışında her gruba Askorbik asit (8.5 mg/ml), sistein (5 mM), toluen (2 mM), taurin (10 mM) eklenmiştir. Dondurma çözdürme işlemi sonrasında motilite yönünden kontrol grubu (%64.30) ve diğer gruplardan Askorbik asit eklenmiş grup (%68.60) daha yüksek ($P<0.05$) olarak bildirmiştir. Araştırmamızda kaydedilen motilite değerinden yüksektir.

Balercia ve ark. (2009) Koenzim Q-10'nun etkisini, astenozospermli hastalar üzerinde yaptığı çalışmada, CoQ10 ve indirgenmiş formu olan ubiquinol, tedaviden sonra seminal plazma ve sperm hücrelerini ve ayrıca spermatozoa motilitesini önemli ölçüde arttırmıştır. Başlangıç motilite değeri ve CoQ10 seviyeleri daha düşük olan hastaların tedaviye yanıt verme olasılığı istatistiksel olarak daha yüksekti. Sonuç olarak, CoQ10'un ekzojen uygulanması, semendeki hem ubiquinon hem de ubiquinol seviyelerini arttırdığını

ve idiyopatik astenozoospermiden etkilenen hastalarda sperm kinetiğini geliştirdiğini bildirmiştir.

Bansal ve ark. (2008) boğa spermasında spermatozoon canlılık ile motilite üzerine yapılan çalışmada, sitratlı sulandırıcıya E vit (0, 1, 2 ve 2.5 mM) ve Demir içeren Askorbat (FeAA, 150 µM FeSO4 içeren ve 750 µM askorbik asit) ilave ettiği çalışmada sonuç olarak, FeAA katılan sulandırıcı sperm canlılığı ve hareketliliğini azalttığını, Tüm E vitamini dozları sperm hareketliliğini ve canlılığını arttırdığı, bununla birlikte 2 mM E vitamini dozu en etkili olduğunu bildirmiştir. Araştırmamız E vitamini motiliteye olan etkisine uyumludur.

Hong ve ark. (2009) Boer keçilerinin 3 aylık erkek yavrularına 5 ay süre içinde grupların yemlerine ilave olarak vitamin E'nin 0, 80, 320 ve 880 IU dozlarında katılmıştır. 8 aylık süre sonucunda testislerin biyopsi sonucunda, vitamin E'nin 80 ve 320 IU dozunda yem takviyesi yapılan grupta reprodüktif organ gelişiminde duktus deferens ağırlığı ve kalınlığı ile epididimal duvar önemli ölçüde arttı ($P<0.01$). Seminifer tubullerin kıvrımların artmasına, spermatojenik hücrelerin ve epididimal tubul ve çapların artmasına geliştirdiğini bildirmiştir.

Anghel ve ark. (2010) Tris bazlı koç sperma sulandırıcısına faklı konsantrasyonlarda bovine serum albumin (BSA), sistein ve vitamin E ilave ederek dondurdukları spermalarda çözüm sonrası 1 mM vitamin E ilave edilen grupta motilite değerini ortalama %62.61±1.53 bulduklarını bildirmişlerdir.

Sharideh ve ark. (2019), horozların spermatozon penetrasyon oranları üzerindeki etkisini değerlendirme için Beltsville kümes hayvanı sperma sulandırıcısı ile seyreltilerek ve farklı seviyelerde CoQ10 (0, 100 ve 200 µM/mL) ilave edildi. +5 C'de 24 saat saklandıktan sonra yapılan değerlendirmede sperm kalitesinin ve penetrasyon oranı en iyi CoQ10 200 µM/L bildirmiştir.

Michael ve ark. (2009), köpek sperması üzerinde, Tris temelli sulandırıcıya (kontrol gubu antioksidansız) C vitamini (0.5 mM), N- Asetil Sistein (NAC; 0.5 mM), taurin (0.2 mM), katalaz (100 U/ml), E vitamini (0.1 mM) and 0.1 mM B16 vitamini eklemiştir. Spermalar +4 ^{o}C'de 0, 24 ve 72 saat saklandıktan sonra, 37 ^{o}C'de spermatozoon parametreleri en iyi sonuç E vit ve B16 eklenmiş sulandırıcı vermiştir.

Bucak ve Uysal (2008), Saanen teke spermasını 5 mM sisten, 25 mM taurin, 50 mM trehaloz katılan ve Tris (kontrol) sulandırıcılarıyla dondurdukları spermalardan

çözüm sonrası %64, %46, %54, %53'lük motilite elde etmiştir. Antioksidan eklenen gruplardan sistein motilite değeri, çalışmamızla elde ettiğimiz değere paraleldir.

Thuwanut ve ark. (2008) kedi spermasını 5 mM sistein, 5 mM vitamin E katılan ve Tris (kontrol) sulandırıcılarıyla dondurdukları çalışmadan elde ettikleri spermatozoa motilitesini sırasıyla %61.9, %69.4, %59.4 olarak bulmuşlardır. Hem sisteinin hem de vitamin E'nin spermatozoa motilitesini geliştirdiğini bildirmişlerdir. Araştırmamız elde edilen motilte değerleri ile uyumludur.

Rostami ve ark. (2019) Tris-yumurta sarısı %15 ve farklı şekerler (trehaloz, sükroz, rafinoz) ile antioksidan (taurin, vit e) eklenmiş koç sperması üzerine yaptığı çalışmada, 100 mM trehaloz ve 2 mM vit E eklenmiş gruptan, İstatiksel olarak antioksidan eklenmiş gruplarda motilite %62.41 yüksek çıkmıştır. Yaptığımız çalışmada motilite değeri ile uyumludur.

Bu araştırmada grupların çözdürme sonrası ortalama spermatozoa motilitesi, Daşkın ve Tekin (1996) tarafından Ankara tekesi spermasını seminal plazmasından ayırmaksızın Tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı (%20)-gliserol (%7) sulandırıcısıyla dondurdukları çalışmadan elde ettikleri %47.4'lük motiliteden yüksek, Dorado ve ark. (2007)'nın Florida teke spermasını seminal plazmasını ayırarak Tris ve yağsız süt tozu ile sulandırıp dondurdukları çalışmadan elde ettikleri %56.19 ve %52.40'lık motiliteye çalışmamızda elde ettiğimiz değerler paralel, Gacitua ve Arav (2005)'ın Saanen teke spermasını Andromed sulandırıcısıyla dondurdukları çalışmadan elde ettikleri %61.2' lik motilite ile araştırmamız uyumlu, Karatzas ve ark. (1997)'nın Alpin, Saanen, Damaskus ırkı tekelerin spermalarını Tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı-gliserol sulandırıcıyla dondurdukları çalışmadan elde ettikleri %49.4, %51.8 ve %51.6'lık motilite araştırmamızdaki motilite oranlarından düşük bulunmuştur.

Çözüm sonrası spermatozoa motilitesindeki farklılıklar, dondurma işleminde kullanılan sulandırıcılar ile, sulandırıcıların içerdiği komponentlerin miktar ve oranlarının, seminal plazmanın ayrılıp ayrılmamasına, sperma sulandırıcısının içerdiği yumurta sarısı oranlarının farklılığına, sperma sulandırıcılarına katılan antioksidanların miktar, oran ve türünün farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan dondurma tekniklerindeki farklılıklara, çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimlere, analizi yapan kişi veya cihaza bağlı olarak meydana gelmiş

olabilir. Ayrıca tür, ırksal, mevsimsel ve bireysel farklılıklar da motilite oranlarında farklılığa neden olmuş olabilir.

Çalışmada çözüm sonrası en düşük ölü spermatozoa oranı %30.57 ile Q1b grubunda olmuştur. Çözüm sonrası en yüksek ölü spermatozoa oranı ise %57.27 oranı ile Tris- yumurta sarısı içeren kontrol grubu olmuştur. Sunulan çalışmada, Tris sulandırıcısına katılan antioksidanlar arasında 1 mM Koenzim Q10 eklenmesinin kontrol grubuna ve antoksidan eklenen diğer gruplardan C0.5a, C0.5b, E0.3b, E0.6a, E0.6b göre ölü spermatozoa oranında istatistiki olarak önemli bir fark bulunurken ($p<0.05$), dondurma protokolüne göre Koenzim Q10 grubu arasında ölü spermatozoa oranının azaltılmasına olumlu etkisi saptanmamıştır ($p>0.05$). Tris-YS sulandırıcısına katılan antioksidanlar arasında vitamin C'nin 0.5 mg/ml ve vitamin E'nin 0.6 cc/ml dozlarında gruplar arasında istatistiki olarak fark önemli olmamasına rağmen ($p>0.05$), kontrol grubuna göre ölü spermatozoa oranını azalttığı belirlenmiştir. Kontrol grubu ile Vitamin E (E0.3b) grubu arasında ölü spermatozoon değerleri arasında istatiksel olarak fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Cabrera ve ark. (2005) Kanarya ırkı tekelerde yaptıkları çalışmada, çözüm sonrası ölü spermatozoa oranını yıkanmış spermada %69.6; yıkanmamış spermada ise %72 olarak tespit etmişlerdir. Araştırıcıların tespit ettiği ölü spermatozoa oranları, bu çalışmadaki tüm sulandırıcı gruplarının ölü spermatozoa oranlarından yüksek bulunmuştur.

Bucak ve Uysal (2008)'ın Saanen teke spermasını 5 mM sistein, 25 mM taurin, 50 mM trehaloz katılan ve antioksidansız Tris (kontrol) sulandırıcılarıyla dondurdukları spermalardan çözüm sonrası elde ettikleri %18, %33, %25, %27'lik ölü spermatozoa oranları, 25 mM taurin grubu çalışmamızla uyumludur. Diğer sulandırıcı grupları çalışmamızdaki ölü spermatozoa oranından düşüktür.

Daghigh Kia ve ark. (2017) Ghezel koç spermasının dondurulmasında, Tris-temelli sulandırıcısına antioksidan olarak 0.5 µM Koenzim Q10 ve 0.25 mM ellagik asitin farklı oran ve kombinasyon ilavesinin sperma parametrelerini incelediği çalışmada, dondurma çözdürme işlemi (37 ˚C'de 30 saniye) sonucunda kontrol grubu ölü spermatozoon oranı %44, 0.5 µM Koenzim Q10 canlılık %19 elde ettiği araştırma, Koenzim Q10 yönünden çalışmamızla paralel değere sahiptir.

Rostami ve ark. (2019) Tris %15 ys ve farklı şekerler (trehaloz, sükroz, rafinoz) ile antioksidan (taurin, vit e) eklenmiş koç sperması üzerine yaptığı çalışmada, çözdürme

sonucunda kontrol grubunda ölü spermatozoon %49, 100 mM trehaloz ve 2 mM vit E eklenmiş grupta ölü spermatozoon oranı %34 saptamışlar. Çalışmamız değeriyle uyumludur.

Gadea ve ark. (2004) Murciana Granadina ırkı tekeleri üzerinde yaptığı çalışmada, Tyrodenin sperm sulandırıcısına ilave olarak Glutatyon (1 mM ve 5 mM) ekleyerek dondurulmuş çözdürülmüş, ölü spermatozoon kontrol grubunda %53, glutatyon eklenmiş gupta %48 (1 mM), %49 (5 mM), tespit etmişlerdir. Çalışmamız antioksidan gruplarından yüksek değere ve kontrol grubu paralel değerlere sahiptir.

Sun ve ark. (2019) Chongming Beyaz teke ırkı üzerinde Tris temelli sulandıcıya ilave edilen soya lesitini (%0.5, %1, %2, %3) ve %15 yumurta sarısı ile yaptığı çalışmada dondurma çözdürme sonucunda kontrol grubunda (Tris + %20 YS) ölü spermatozoon %41 bulunmuştur. %2 SL ise %43 bulunmuştur. Çalışmamız vitamin E (E0.6a, E0.6b) ve C (C0.5a, C0.5b, C1a) antioksidan grupları ile uyumludur.

Merati ve Farshad (2021) Teke spermasına, Tris-%5 YS temelli sulandırıcısına aminoasitler (Glisin, L- Glutamin) ile beraber E vitamini etkisini araştırdığı çalışmada dondurma çözdürme işlemi sonucunda kontrol grubu ölü spermatozoon %38, Vitamin E ekli grupta ise %31 bulunmuştur. Çalışmamızdaki E vitamini grubundan E0.3a ile uyumludur.

Memon ve ark. (2012) Boer tekesi spermasının dondurma çözdürme işlemi sonrası Tris- %18 YS temelli sulandırıcıda kontrol grubu ölü spermatozoon %31, Vit C (8.5 mg/ml) ise %27 tespit etmiş olup, çalışmamız değerlerinden düşüktür.

Yousefian ve ark. (2018) Mahabadi tekeleri üzerinde Koenzim Q10 dondurulmuş çözdürülmüş spermadaki oksidatif etkisini araştırdığı çalışmada, soya lesitini %5 Gliserol temelli sulandırıcıya koenzim Q10 farklı dozları (0.5, 1, 1.5 µM) ile %9 DMSO ile gruplar oluşturulmuştur. Dondurulmuş çözdürülmüş Kontrol grubu; ölü spermatozoon %58, DMSO grubu %58, Koenzim Q10 grubu; 0.5 µM %55, 1 µM %45, 1.5 µM %50 tespit etmiştir. Araştırmamız değerinden yüksektir.

Çalışmada çözüm sonrası gruplarda elde edilen ölü spermatozoon oranlarıyla diğer çalışmaların elde ettiği çözüm sonu ölü spermatozoon oranları arasındaki farklılıklar sperma sulandırıcısının içeriğinden, özellikle sperma sulandırıcısının içerdiği yumurta sarısı oranlarının farklılığından kaynaklanmış olabileceği gibi seminal plazmanın ayrılıp ayrılmamasından, sulandırma oranına, spermanın

sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan tekniklerdeki farklılıklara, çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimlere, dondurma tekniğindeki farklılıklarına ve çözüm sıcaklığı ile süresinden kaynaklanıyor olabilir. Özellikle sperma sulandırıcılarına katılan antioksidanlardan, hayvanın türüne, tekenin ırkına bağlı olarak değişebilir.

Çalışmada çözüm sonrası en düşük anormal spermatozoon oranı %13.71 ile Q1b olmuştur. Çözüm sonrası en yüksek anormal spermatozoa oranı ise %27.26 ile Tris- yumurta sarısı içeren kontrol grubu olmuştur. Kontrol grubuna göre Vitamin E'li gruplar ve C1a, C1b ve C0.5b grupları benzerken diğer gruplar istatistiksel olarak önemli derecede farklı olmuştur ($p<0.05$)

Memon ve ark. (2011) Boer tekelerinde Tris-%18 YS sulandırıcısına antioksidan olarak katılan hidroksi toluen bütilat (BHT) farklı dozlarının (0.5, 1, 2, 3 mM) dondurma-çözdürme sonrasında sperma parametrelerine olan etkisini incelediği çalışmada, kontrol grubu %20 anormal spermatozoon oranı saptamışlardır. Antioksidan grubunda 2 mM BHT anormal spermatozoon %18, kaydetmişlerdir. Çalışmamız değerinden yüksektir.

Jamadi ve ark. (2017) Mahabadi teke spermasının dondurulmasında, Tris-%20 YS temelli sulandırıcıya %5 DMA ve %5 Gliserol içeren gruplara quercetin (0, 10 ve 20 µM) farklı dozlarında yaptığı çalışmada, dondurma çözdürme sonucu kontrol grubu DMA; anormal spermatozoon %14, Gliserol grubu; anormal spermatozoon % 15 bulunmuştur. En iyi 10 µM quercetin ile DMA kombinasyonu grubunda ise anormal spermatozoon %15 kaydetmişler, çalışmamız elde ettiğimiz Q1b grubu değeriyle uyumludur.

Daghigh Kia ve ark. (2017) Ghezel koç spermasının dondurulmasında, Tris-temelli sulandırıcısına antioksidan olarak 0.5 µM Koenzim Q10 ve 0.25 mM ellagik asitin farklı oran ve kombinasyon ilavesinin sperma parametrelerini incelediği çalışmada, dondurma çözdürme işlemi (37 ˚C'de 30 saniye) sonucunda kontrol grubu anormal spermatozoon %25.5 olarak, 0.5 µM Koenzim Q10 grubunda en yüksek anormal spermatozoon %19.5 tespit etmiştir. Çalışmamız elde edilen kontrol grubu değeri ile uyumlu, Q1b grubu değerinden yüksektir.

Bucak ve Uysal (2008) Saanen teke spermasını 5 mM sistein, 25 mM taurin, 50 mM trehaloz katılan ve antioksidansız Tris (kontrol) sulandırıcılarıyla dondurdukları çalışmadan çözüm sonrası elde ettikleri %5.25, %8.0, %5.25 ve %10.4'lük anormal spermatozoon oranları bu çalışmadaki tüm sulandırıcı gruplarının anormal spermatozoon oranlarından çok düşüktür.

Yousefian ve ark. (2018) Mahabadi tekeleri üzerinde Koenzim Q10 etkisini araştırdığı çalışmada, soya lesitini %5 Gliserol temelli sulandırıcıya koenzim Q10 farklı dozları (0.5, 1, 1.5 µM) ile %9 DMSO ile ilavesi sonucu, Kontrol grubu; Anormal spermatozoon %16, DMSO grubu %15, Koenzim Q10 grubu sırasıyla; 0.5 µM %16, 1 µM %12, 1.5 µM %16 elde etmişler. Çalışmamız Q1b grubu ile buradaki 1 µM eklenmiş Koenzim Q10 grubu değeri uyumludur.

Sarangi ve ark. (2017) Beetal tekesi sperması ile Tris-YS temelli sulandırıcısına 3 mM vitamin E, 1 mM Glutatyon ilave ettiği çalışma gruplarından kaydettiği, anormal spermatozoon değerlerinden, çalışmamız değerleri yüksek bulunmuştur.

Salmani ve ark. (2013) Soya lesitini temelli sperma sulandırıcısına antioksidan olarak katılan Glutatyonun Mahabadi teke spermasına ait Anormal spematozoon kontrol grubunda %15, Soya lesitini 5 mM Glutatyon grubunda ise %23 saptamıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz Q1b grubu değerinden yüksektir

Araştırmada elde edilen anormal spermatozoon oranıyla diğer çalışmalarda elde edilen değerler arasındaki farklılıklar tekelerin genotipik ve ırksal farklılıklarından, sperma sulandırıcısının içeriğinden, yumurta sarısının oranından, sulandırıcılarda kullanılan antioksidanların yapısından, dondurma ve çözdürme yöntemleri ve değerlendirmede kullanılan teknikler arasındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmada çözüm sonrası en yüksek HOST oranı %59.00 ile 1 mM Koenzim-Q10 ilavesi içeren Q1b sulandırıcı grubu olmuştur. En düşük çözüm sonrası HOST oranı ise % 29.44 ile Tris-YS (kontrol) grubu olmuştur. Yapılan çalışmada, HOST oranlarıyla sulandırıcı gruplarının ortalama spermatozoa motilitesi oranları arasında paralellik olduğu gözlenmiştir.

Sun ve ark. (2019) Chongming Beyaz teke ırkı üzerinde Tris temelli sulandıcıya ilave edilen soya lesitini (%0.5, %1, %2, %3) ve %15 yumurta sarısı ile yaptığı çalışmada dondurma çözdürme sonucunda kontrol grubunda (Tris + %20 YS) HOST %45.9 bulunmuştur. %2 SL HOST %45.3 bulunmuştur. Yaptığımız çalışmadan düşük çıkmıştır.

Azimi ve ark. (2020) Markhoze tekesinden alınan spermaların sulandırılmasında, Tris temelli, %5 YS sulandırıcya ileveten Semiz otu ekstratı (25 µg, 50 µg, 100 µg) ile yaptıkları çalışmada, dondurma çözdürme sonucunda kontrol grubu HOST %46.1, 50 µg semiz otu ekstraktında plazma membran bütünlük oranı %56.1, bulunmuştur. Araştırmamızla antioksidan eklenmiş Koenzim grubu paralel değere sahiptir.

Gadea ve ark. (2004) Murciana Granadina ırkı tekeleri üzerinde yaptığı çalışmada, Tyrodenin sperm sulandırıcısına ilave olarak Glutatyon (1 mM ve 5 mM) grubu spermatozoon membran bütünlüğü ise %47.8 (5 mM), %44.1 (1 mM), kontrol grubunda ise %42.2'dir. Çalışmamızda elde edilen değerden düşüktür.

Adeyanju ve ark. (2018) Kırmızı Kalahari tekelerinde yaptıkları çalışmada dondurma çözdürme sonrasında Tris-sitrik asit-glikoz-%20 yumurta sarısı sulandırıcısında %96.33 membran bütünlüğü bildirmişlerdir. Çalışmamız elde edilen değerden yüksektir.

Merati ve Farshad (2021) Teke spermasına, Tris-%5 YS temelli sulandırıcısına aminoasitler (Glisin, L- Glutamin) ile beraber E vitamini etkisini araştırdığı çalışmada dondurma çözdürme işlemi sonucunda kontrol grubu akrozom bütünlüğü %70.7, Vitamin E ekli grupta akrozom bütünlüğü %71.3 kaydedilmiştir. Bu çalışmada amino asitlerle beraber E vitaminin sperma sulandırıcısna katılmasının sperma parametrelerini geliştirdiği bildirmiştir. Araştırmamızda kaydedilen değerden yüksektir.

Memon ve ark. (2012) Antioksidanların, Boer tekesi spermasının dondurma çözdürme işlemi sonrası kontrol grubu (Tris- %18 YS) dışında her gruba Askorbik asit (8.5 mg/ml), sistein (5 mM), toluen (2 mM), taurin (10 mM) eklenmiştir. Dondurma çözdürme işlemi sonrasında Kontrol grubu plazma membran bütünlük oranı %58.1, Vit C; HOST (%69.4) bildirmiştir. Araştırmamızda elde edilen değerden yüksektir. Çalışmamızda 1 mg/ml askorbik asit eklenen grupta plazma membran bütünlük oranı %47.85 değere sahiptir. Antioksidan eklenen gruplar, çalışmamızı olumlu olarak destekleyen sonuca sahiptir..

Memon ve ark. (2011) Boer tekelerinde Tris-%18 YS sulandırıcısına antioksidan olarak katılan hidroksi toluen bütilat (BHT) farklı dozlarının (0.5, 1, 2, 3 mM) dondurma-çözdürme sonrasında %54.1 membran bütünlüğü saptamışlardır. Antioksidan grubunda en iyi sonucu 2 mM BHT vermiştir. Buna göre membran bütünlüğü %59.4, kaydetmişlerdir. Araştırmamızla uyumludur.

Wahjuningsih and Rachmawati (2012), teke spermasının Andromeda sulandırıcısına, α-tokoferol farklı dozlarda (0 g, 0.2 g, 0.4 g, 0.6 g) katılarak plazma membran bütünlüğüne etkisini incelediği çalışmada, kontrol grubu membran bütünlüğü %69.8, α-tokoferol (0,4 g/100 ml) %73.1 en iyi doz olduğu sonucuna varmıştır. Araştırmamızda kaydedilen değerden yüksektir. Reaktif oksijen türlerinin ROS'un sperm fonksiyonlarını

bozduğu mekanizmalar içinde, plazma membranında çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu içerdiğine inanılmaktadır (Aitken, 1994).

Jamadi ve ark. (2017) Mahabadi teke spermasının dondurulmasında, Tris-%20 YS temelli sulandırıcıya %5 DMA ve %5 Gliserol içeren gruplara quercetin (0, 10 ve 20 µM) farklı dozlarında yaptığı çalışmada, dondurma çözdürme sonucu kontrol grubu DMA; membran bütünlüğü %53, Gliserol grubu; membran bütünlüğü %50, bulunmuştur. En iyi 10 µM quercetin ile DMA kombinasyonu grubunda ise membran bütünlüğü %55 tespit etmiştir. Araştırmamızla parelel değere sahiptir.

Daghigh Kia ve ark. (2017) Ghezel koç spermasının dondurulmasında, Tris-temelli sulandırıcısına antioksidan olarak 0.5 µM Koenzim Q10 ve 0.25 mM ellagik asitin farklı oran ve kombinasyon ilavesinin sperma parametrelerini incelediği çalışmada, dondurma çözdürme işlemi (37 ˚C'de 30 saniye) sonucunda kontrol grubu membran bütünlüğü %37.6, 0.5 µM Koenzim Q10 grubunda membran bütünlüğü %56.6 kaydedilmiştir. Yapılan çalışmalar Koenzim Q10 yönünden çalışmamızla paraleldir.

Rostami ve ark. (2019) Tris %15 ys ve farklı şekerler (trehaloz, sükroz, rafinoz) ile antioksidan (taurin, vit e) eklenmiş koç sperması üzerine yaptığı çalışmada, çözdürme sonucunda kontrol grubunda HOST %43 bulmuştur. Antioksidan eklenmiş gruplarda HOST %56.0 100 mM trehaloz ve 2 mM vit E eklenmiş gruptadır. Araştırıma E0.6a grubumuzda (0.6 cc/ml E vitamini) aynı değere sahiptir. Koenzim Q10 grubu paralel değere sahiptir.

Yousefian ve ark. (2018) Mahabadi tekeleri üzerinde Koenzim Q10 dondurulmuş çözdürülmüş spermadaki oksidatif etkisini araştırdığı çalışmada, soya lesitini %5 Gliserol temelli sulandırıcıya koenzim Q10 farklı dozları (0.5, 1, 1.5 µM) ile %9 DMSO ile gruplar oluşturulmuştur. Dondurulmuş çözdürülmüş Kontrol grubu Host %35, DMSO grubu; HOST %34, Koenzim Q10 grubu sırasıyla; 0.5 µM ; HOST % 40, , 1 µM; HOST %50, 1.5 µM; HOST %43 ($p<0.05$) kaydedilmiştir. Çalışmamızda kaydedilen membran bütünlüğü değerlerinden düşüktür.

Salmani ve ark. (2013) Soya lesitini temelli sperma sulandırıcısına antioksidan olarak katılan Glutatyonun, Mahabadi teke sperması parametrelerine dondurma çözdürme sonrası etkisini incelediği araştırmada, kontrol grubu Tris-%15 YS; HOST %64, Soya lesitin; HOST %62, Soya lesitini 5 mM Glutatyon; HOST %55 Soya lesitini 10 5 mM Glutatyon

grubunda ise HOST %51, saptamıştır. Çalışmamız antioksidan eklenmiş Koenzim Q10 grubu ile paralel değere sahiptir.

Andreea ve ark. (2010) Tris-%20 YS sperma sulandırıcısına antioksidan olarak 5 mg/ml BSA (sıgır serum albumini), 0.1 mM ve 1 mM E vitamini ve 5 Mm L- sistein ilave ederek dondurdukları alpina teke sperması çözüm sonrası, Kontrol grubuna göre vitamin E ilave edilen gruplarda 0.1 mM konsantrasyonlardaki sperma parametrelerinde önemli bir artış olmadığını, 1 mM konsantrasyonlardaki sperma canlılık ve membran bütünlüğünde %4-11 oranında artış meydana geldiğini bildirmiştir.

Metvaly ve ark. (2016) Balad tekelerinde Tris -%15 YS ile farklı oranlarda sistein (0.5, 2.5, 5 mM) ilavesi yaptıkları sulandırılmaş sperma örneklerinde kontrol grubu seyreltme sonrası, alışım sonrası, çözdürme sonrasına göre sırasıyla membran bütünlüğü %73, %64, %37, 2.5 mM Sistein aynı şekilde işlem sırasına göre membran bütünlüğü %80, %75, %53 tespit etmiştir. Sperma sulandırıcısına 2.5 mM Sistein ilavesinin sperma parametrelerini geliştirdiğini bildirmiştir. Çalışmamızda paralel değere sahip olup, antioksidan eklenmiş Koenzim Q10 sperma parametresini geliştirmiştir.

Susilowati ve ark. (2019) Yağsız süt sulandırıcısına L-arginin farklı dozlarda (4, 6 mM) ilavesinin +5 °C'de soğutulmuş Etawa ırkı teke sperması 5 gün süreyle kalitesi üzerine yaptığı çalışmada kontrol grubu Kontrol grubu HOST değerleri günlere göre sırayla %53, %45, %35, %20, %15, L-arginin 4 mM HOST %68, %56, %49, %35, %22, L-arginin 6 mM HOST %57, %50, %41, %22, %18 bildirmiştir. HOST değerleri zamana bağlı olarak düşmüştür. İlk 1.gün elde edilen verilerle çalışmamız paralel değere sahiptir.

Aurich ve ark. (1997) askorbik asit (0.45 ve 0.9 g/L) ve katalaz ($0.45x10^6$ ve $1.8x10^6$ birim/l) antioksidanlarının soğutulmuş aygır sperması üzerindeki etkileri 5°C'de 24, 48 ve 72 saat sonra sperm motilitesi ve membran bütünlüğü araştırıldı. Askorbik asit, sulandırıcıdan bağımsız olarak kontrollerle karşılaştırıldığında ($p<0.05$) 5°C'de 24, 48 ve 72. saatlerde membran bütünlüğü, sağlam spermatozoa yüzdesini önemli ölçüde arttırdı. Askorbik asit, 0.9 g/l'lik bir konsantrasyonda giderek hareketli spermatozoa yüzdesini ($p<0.05$) azaltmıştır. Sulandırılmış aygır spermasında askorbik asitin sperm membran bütünlüğü üzerinde koruyucu etkileri olduğunu bildirmiştir. Araştırmamızda antioksidan ilave edilmiş gruplarda sperma parametrelerinden HOST üzerine olumlu etkisi olmuştur.

El Harairy ve ark. (2016) Hürrem devesinin epididimisinde depolanmış sperma üzerine antioksidanların etkisi 5°C'de incelediği çalışmada, Tris-%20 YS temelli

sulandırıcya 0.4 ve 0.8 mM Glutatyon ile 0.5 ve 1 g/l Askorbik asit ile oluşturulan gruplarda, 0.5 g/l Askorbik asit sperm motilitesini ve canlılığını, membran bütünlüğünü arttırmış, anormal spermatozoonu düşürdüğünü bildirmiştir. Yapılan çalışma, araştırmamızla olumlu yönde sonuca sahiptir.

Samir ve ark. (2018) Antioksidan olarak Askorbik asit (0.1, 0.2, 0.3 mM) ve vitamin E (α-tokoferol) farklı dozları (0.1, 0.2, 0.3 mM), Tris sitrik asit-%40 YS temelli sulandırıcıya ilave edilerek, Barki koç sperması dondurma çözdürme sonucunda 0.1 mM Askorbik asitin kontrol grubuna göre yüksek motilite, canlılık ve membran bütünlüğü sağladığını, α-tokoferolün 0.2 ve 0.3 mM dozlarında yüksek motilite, canlılık ve normal spermarozoon oranını arttırdığını bildirmiştir. Araştırmamız antioksidan gruplarla olumlu sonuca sahiptir.

Daramola ve ark. (2015) Batı afrika tekesinin spermasını Tris-%20 YS sulandırıcısı ile buna ilaveten Vitamin C farklı (0, 2, 4, 6 ve 8 mM) konsantrasyonlarını eklediği çalışmada, dondurma çözdürme sonucu 0, 2, 4, 6, 8 mM sıra ile %33, %36, %43, %45, %54 membran bütünlüğü değerleri kaydetmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında en yüksek membran bütünlüğü 8 mM vitamin C grubunda elde etmiştir. Çalışmamız C vitamini gruplarıyla parelel değere sahiptir. Araştırma gruplarından C vitamini (0.5, 1 mg/ml) farklı konsantrasyonları arasında istatiksel olarak fark yoktur ($p>0.05$).

Shahin ve ark. (2019) Tek hörgüçlü develerden alınan epididimal spermanın Tris-%20 YS temelli sulandırıcına antioksidan (200 µM/mL vitamin E, 1 mg/mL vitamin C) ilave edilerek dondurma çözdürme işlemi sonunda kontrol grubu membran bütünlüğü %28, Vitamin C membran bütünlüğü %30, Vitamin E membran bütünlüğü %31 olarak kaydetmiştir. Yapılan araştırmamız değerinden düşük HOST değerine sahiptir.

Bu araştırmada elde edilen HOST oranıyla diğer çalışmalarda elde edilen HOST oranları arasındaki farklılıklar, hayvanların türüne, tekelerin genotipik ve ırksal farklılıklarından, sperma sulandırıcısının içeriğinden, sulandırıcıda kullanılan yumurta sarısının oranından, sulandırıcılardaki antioksidanlara, antioksidanların dozuna, dondurma ve çözdürme prosedürleriyle değerlendirmede kullanılan teknikler arasındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir.

Yapılan bu çalışmada antioksidan gruplar arasında, dondurma sürelerine ilişkin yapılan değerlendirmede en yüksek motilite, en düşük ölü spermatozoon, en düşük anormal spermatozoon, en yüksek membran bütünlüğü Q1b grubunda kaydedilmiştir.

Kulaksız ve Daşkın (2010) Ankara tekesi spermasının farklı oranlarda yumurta sarısı içeren yağsız süt tozu sulandırıcısı ile sıvı azot seviyesinin 4 cm. üzerinde sıvı azot buharında 15 dk. süreyle dondurulup, azot tankında -196 °C saklandıktan sonra, çözdürülmesi sonucunda en yüksek spermatozoa motilitesi (%65.0±4.53) %10 yumurta sarısı içeren yağsız süt tozu sulandırıcısında bulunurken, anormal spermatozoa bakımından %22.6±4.01, canlı spermatozoa oranı bakımından en yüksek oran (%74.5±2.86) kaydetmiştir. Çalışmamız Q1b grubuyla uyumludur.

Saanen teke spermasında Daşkın ve Kulaksız (2008) sıvı azot buharında 4 cm. üzerinde -110 °C ve -130 °C arasında 10 dakikada dondurularak, -196°C saklandıktan sonra, çözdürme sonrası sırasıyla; spermatozoa motilitesi (%34±4.1; %20±3.5), anormal spermatozoa oranı (%45.40±3.7; %62.40±5.7) ve membran bütünlük testinde (%36±3.5; %27.20±2.3) bildirmiştir. Araştırmamıza göre motilite düşük, anormal spermatozoon yüksek, membran bütünlüğü testi düşük bulunmuştur.

Yousefian ve ark. (2018) Mahabadi tekelerinde alınan spermaların sulandırıcısına katılan Koenzim Q10 sıvı azot buharı 5 cm. üzerinde 12 dakikada yaptığı dondurma protokolü sonrası azot tankında -196°C saklandıktan sonra, çözüm sonrası Koenzim 1mM motilite (%53.40), spermatozoon canlılık (%54.20) tespit etmiştir. Çalışmamızla motilite değeri düşük, ölü spermatozoon oranı yüksektir.

Küçük ve ark. (2013) tekelerden alınan sperma örneklerini %15 yumurta sarısı Tris sulandırıcısı içeren sperma örnekleri, sıvı azot buharı 4 cm. üzerinde 7 dk. yaptığı dondurma işlemi sonrası azot tankında -196°C saklandıktan sonra, çözdürme sonucunda motilite %47, ölü spermatozoon %20, anormal spermatozoon %20 oranında tespit ettiği çalışma, araştırmamız motilite, ölü spermatozoon ve anormal spermatozoon değerinden düşüktür.

Azimi ve ark. (2020) Markhoze tekesinden alınan spermaların sulandırılmasında, Tris temelli, %5 YS sulandırıcya ileveten Semiz otu 50 µg ekstratında, sıvı azot düzeyinden 4 cm. üzerinde 15 dk. yaptığı dondurma işleminin ardından azot tankında -196°C saklandıktan sonra, çözdürme sonucunda motilite %54.71, membran bütünlüğü %56.14, ölü spermatozoon %40.57 değerleri, çalışmamızla uyumludur.

Jamadi ve ark. (2017) Mahabadi tekelerinden alınan sperma örneklerinin quercetin içeren sulandırıcı sıvı azot 4 cm. üzerinde 10 dk. yaptığı dondurma işlemi sonrası azot tankında -196°C saklandıktan sonra, çözdürülen payette spermatozoon motilite %61.39,

canlılık %63.52, membran bütünlüğü %55, anormal spermatozoon %14 bildirmiştir. Çalışmamız değerleriyle uyumludur.

Merati ve Farshad (2021). Teke spermasına, Tris-%5 YS temelli sulandırıcısına aminoasitler (Glisin, L- Glutamin) ile beraber E vitamini etkisini araştırdığı çalışmada, spermaları sıvı azot buharının 3-4 cm. üzerinde 15 dk. sürede gerçekleştirdiği, daha sonra azot tankında -196°C saklandıktan sonra dondurma çözdürme işlemi sonucunda (proline+ vitamin E) motilite %67.02, canlılık %77.7, Membran bütünlüğü Taurin+ Vitamin E grubunda %81.7 bulunmuştur. Çalışmamızdan yüksek değerlere sahiptir.

Daramola ve Adekunle (2015) Batı afrika tekesinin spermasını Tris-%20 YS sulandırıcısı ile buna ilaveten Vitamin C farklı konsantrasyonlarını eklediği çalışmada, sıvı azot buharının 4 cm. üzerinde 10 dk. sürede yapılan dondurma aşamasından sonra azot tankında -196°C saklandıktan sonra çözdürme sonucu 8 mM vitamin C grubunda motilite %41.40, anormal spermatozoon %1.00, membran bütünlüğü %54.00 olarak bildirilmiştir. Çalışmamız değerlerinden düşüktür.

Sperma dondurma protokolleri sürelerine bağlı olarak yaptığımız çalışmada, dondurulup-çözdürülen spermada, elde edilen çözüm sonu sperma parametreleri diğer çalışmalar ile arasındaki farklılıklar, hayvanların ırkına, tekelerin genotipik yapısına, sperma sulandırıcısının içeriğine, sulandırıcıda kullanılan yumurta sarısının oranına, sulandırıcılardaki antioksidanlara, antioksidanların miktarına, dondurma süresine, sıvı azot buharından yüksekliğine, uygulayıcıya ve çözdürme prosedürlerinden kaynaklanıyor olabilir.

Azimi ve ark. (2020) Markhoze tekesinden alınan spermaların sulandırılmasında, Tris temelli, %5 YS sulandırıcya ileveten Semiz otu ekstratı (25 µg, 50 µg, 100 µg) ile yaptıkları çalışmada, dondurma çözdürme sonucunda kontrol grubu mda sonucu 2.91 nmol/ml çalışmamız konrol grubu ile paralel değere sahiptir. 50 µg semiz otu ekstraktında mda en düşük 1.49 nmol/ml bulunmuştur. Çalışmamızda bulunan değerden yüksektir.

Adeyanju ve ark. (2018) Kırmızı Kalahari tekelerinde yaptıkları çalışmada dondurma çözdürme sonrasında Tris-sitrik asit-glikoz-%20 yumurta sarısı sulandırıcısında mda 1.10 nmol/ml bildirmişlerdir. Çalışmamız değeriyle uyumludur. Kontrol grubundan düşüktür.

Merati ve Farshad (2021) Teke spermasına, Tris-%5 YS temelli sulandırıcısına aminoasitler (Glisin, L- Glutamin) ile beraber E vitamini etkisini araştırdığı çalışmada dondurma çözdürme işlemi sonucunda kontrol grubu mda 3.91. Vitamin E ekli grupta mda

(nmol/ml-1) 3.23 bulunmuştur. Mda yönünden istatiksel bir fark bulunmamıştır. En düşük mda 1.42 (10 mM L-glutamin+ 1 mM vit E), 1.48 (10 mM Glisin, 1mM Vit E) kaydedilmiştir. Bu çalışmada amino asitlerle beraber E vitaminin sperma sulandırıcısna katılmasının sperma parametrelerini geliştirdiği bildirmiştir. Çalışmamız bulunan değerden yüksektir. Antioksidan olarak E vitamini eklenmiş gruptan düşüktür.

Sun ve ark. (2019) Chongming Beyaz teke ırkı üzerinde Tris temelli sulandıcıya ilave edilen soya lesitini (%0.5, %1, %2, %3) ve %15 yumurta sarısı ile yaptığı çalışmada dondurma çözdürme sonucunda mda yönünden Tris- %20 YS ile %2 SL istatiksel fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Mda değerleri diğer gruplardan daha düşük bulunmuştur $p<0.05$).

Memon ve ark. (2012) antioksidanların, Boer tekesi spermasının dondurma işlemi sonrası sperma parametreleri, lipid peroksidasyonu ve fertilitesi üzerine etkilerini araştırdığı çalışmada, Tris- %18 YS temelli sulandırıcıya kontrol grubu dışında her gruba Askorbik asit (8.5 mg/ml), sistein (5 mM), toluen (2 mM), taurin (10 mM) eklenmiştir. Dondurma çözdürme işlemi sonrasında mda kontrol grubunda 3.52 nmol/ml, askorbik asit 1.27 nmol/ml çıkmıştır. En iyi sperma değerlerinin askorbik asit eklenmiş grupta olduğunu, sonuçların antioksidan eklenmesinin kontrole kıyasla LPO oranını önemli ölçüde azalttığını ($P < 0.05$) bildirmiştir. Çalışmamızda bulunan Q1b grubu değerden yüksektir. C vitamini eklenmiş gruptan düşüktür.

O'Flahtery ve ark. (1997) Tris sulandırıcısına vitamin E (1 mg/ml) ilavesi ile dondurdukları boğa spermalarında çözüm sonrası mda seviyesinin azaldığı bildirilmiştir.

Sicherle ve ark. (2011) süt bazlı sperma sulandırıcısına 12.5 mg/mol katalaz ve 100 mM trolox ilave ederek dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası kontrol grubu mda 1.2±0.20 nmol/ml, trolox grubunda ortalama mda düzeyini 1.4±0.20 nmol/ml olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda bulunan Q1b grubu değerden yüksektir. E vitamini eklenmiş gruptan düşüktür.

Banday ve ark. (2006) Koç sperması Tris-%20 YS temelli sulandırıcısına antioksidan olarak 5 µg/ml Quercetin (3.26±0.48 nmol/ml), 40 mM Taurin (3.26±0.21 nmol/ml), 5 mM redükte Glutatyon (3.34±0.31 nmol/ml) ilavesinin, kontrol grubuna (4.43±0.62) göre mda düzeyinde fark istatiksel olarak anlamlı ($p>0.05$) bulundu. Sonuç olarak, Tris temelli sulandırıcıya antioksidan ilavesi lipid peroksidasyonu azaltmış ve dondurma çözdürme sonrası sperma parametrelerini arttırmıştır.

Bucak ve ark. (2010) Ankara tekelerinde Tris-%15 YS temelli sulandırıcısında antioksidan olarak kurkumin (2.5, 5, 10 mM), inositol (2.5, 5, 10 mM), Karnitin (2.5, 5, 10 mM) katılarak yapılan çalışmada, dondurma çözdürme sonrasında, mda yönünden kontrol grubu 2.0 nmol/ml, kurkumin (2.0, 1.87, 2.0 nmol/ml), inositol (2.2, 2.2, 2.0 nmol/ml), Karnitin (1.9, 1.9, 1.9 nmol/ml) olarak kaydedilmiştir. İstatiksel olarak mda yönünden fark bulunmamıştır.

Bucak ve ark. (2008) Tris bazlı koç sperma sulandırıcısına farklı antioksidanlar (Sistein, GSH, GSSG) ilave ettikleri çalışmalarında dondurma-çözdürme sonrası kontrol grubundaki ortalama mda 9.20±0.5 nmol/l ve en düşük Sistein mda 9.96±0.3 bulduklarını bildirmişlerdir. Çalışmamız değerinden yüksektir.

Tuncer ve ark. (2010). Dondurulmuş çözdürülmüş teke spermada, 5 mM rafinoz grubunda kontrol grubuna göre mda oluşumu daha düşük (1.8±0.1 nmol/L) bulundu ($P<0.01$). Kontrol grubu mda sonucu 2.5±0.2 çıkmıştır. Çalışmamızda bulunan değerden yüksektir.

Jamadi ve ark. (2017) Mahabadi teke spermasının dondurulmasında, Tris-%20 YS temelli sulandırıcıya %5 DMA ve %5 Gliserol içeren gruplara quercetin (0, 10 ve 20 µM) farklı dozlarında yaptığı çalışmada, dondurma çözdürme sonucu Kontrol grubu mda konsantrasyonu DMA 6.08 nmol/ml, Gliserol 6.95 nmol/ml ($p<0.001$)'dir. Quercetin (0, 10 ve 20 µM) ise mda sıra ile 6.96 (0), 5.81 (10 µM), 6.78 (20 µM) nmol/ml kaydedilmiştir. Çalışmamız değerinden yüksektir.

Daghigh Kia ve ark. (2017) Ghezel koç spermasının dondurulmasında, Tris-temelli sulandırıcısına antioksidan olarak 0.5 µM Koenzim Q10 ve 0.25 mM ellagik asitin farklı oran ve kombinasyon ilavesinin sperma parametrelerini incelediği çalışmada, dondurma çözdürme işlemi (37 ˚C'de 30 saniye) sonucunda 0.5 µM Koenzim Q10 grubunda diğer gruplara kıyasla en düşük mda konsantrasyonu gözlendiğini, oksidatif parametreleri azalttığını, sperma kalite parametrelerini arttırdığını bildirmiştir.

Yousefian ve ark. (2018) Mahabadi tekeleri üzerinde Koenzim Q10 dondurulmuş çözdürülmüş spermadaki oksidatif etkisini araştırdığı çalışmada, soya lesitini %5 Gliserol temelli sulandırıcıya koenzim Q10 farklı dozları (0.5, 1, 1.5 µM) ile %9 DMSO ile gruplar oluşturulmuştur. Lipid peroksidasyon göstergesi olan mda seviyesi kontrol grubu 2,3 nmol/ml, Dmso grubu 2.2 nmol/ml, Koenzim Q10 0.5 µM eklenmiş grubta 2,1 nmol/ml, 1 µM grupta 1.6 nmol/ml, 1,5 µM grupta 1.7 nmol/ml kaydetmişlerdir. İstatiksel olarak,

mda konsantrasyonu yönünden Koenzim Q10 1 ile 1.5 µM katılmış grup benzer, diğerlerinden düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Koenzim Q10 1 µM teke sperması parametrelerini geliştirdiğini ve lipid peroksidasyona faydalı olduğunu bildirmiştir. Çalışmamız değeriden yüksektir.

Yousefian ve ark. (2014) Aygır spermasına, yağsız süt tozu sulandırıcısına ilaveten Koenzim Q10 ve α-tokoferolün farklı dozlarının etkilerini belirlemek için yaptığı çalışmada, 48 saat boyunca +5 ºC'de, mda konsantrasyonu konrtol grubu 4.42 nmol/ml, DMSO grubu 4.33 nmol/ml, 1 µM CoQ10 grubu 3.97 nmol/ml, 2 µM CoQ10 grubu 4.32 nmol/ml, 5 mM α-tokoferol ve 1 µM CoQ10 kombinasyonu ile en düşük mda konsantrasyonu 2.94 nmol/ml kaydetmiştir ($P<0.05$). Bu kombinasyonla sperm kalite parametreleri iyileşme olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda elde edilen değerden yüksek bulunmuştur.

Salmani ve ark. (2013) Soya lesitini temelli sperma sulandırıcısına antioksidan olarak katılan Glutatyonun, Mahabadi teke sperması parametrelerine dondurma çözdürme sonrası etkisini incelediği araştırmada, kontrol grubu Tris-%15 YS; mda 4.01 nmol/ml. Soya lesitin; mda 2.96 nmol/ml, Soya lesitini 5 mM Glutatyon; mda 1.61 nmol/ml, Soya lesitini 10 5 mM Glutatyon grubunda ise mda 3.54 nmol/ml saptamıştır. Yüksek konsantrasyondaki Glutatyonun sperma parametrelerini geliştirmediğini, 5 mM Glutatyonun mda düşürdüğünü belirtmiştir. Çalışmamız değerinden yüksek saptanmıştır.

Alyethodi ve ark. (2021) boğa spermalarının dondurulabilir ve dondrulamaz özelliğe sahip gruplarla yaptığı çalışmada Gliserol-Ys sitrat Tris buffer sulandırıcı ile dondurma-çözdürme sonucu, mda dondurulabilir grupta 2.69, dondurulamaz grupta 3.13 kaydetmiştir. Dondurulabilir grup, çalışmamız kontrol grubuyla uyumlu ama antioksidan grubundan yüksektir.

Mao ve ark. (2018) Quercetin'in oksidatif stres üzerine olan etkisini teke sperması ve zigotlar üzerine yaptığı çalışmada, tekelerden alınan spermalara 10 µM Quercetin ile 60 µM CdCl2 kombinasyonu 38.5 °C' de 4, 8 ve 12 saat in vitro fertilizasyon için inkübasyona bırakılarak, bu sürelerde sperma parametreleri kontrol edilmiştir. Bu sürelerde 4. Saatte kontrol grubu ile Quercetin grubu Cd2+ 'nın neden olduğu malonaldehit ve reaktif oksijen türleri (ROS) düzeylerini azaltmıştır ($p<0.05$).

Daramola ve ark. (2016) E vitaminin batı afrika tekesi sperması oksidatif stres ve parametrelerine etkisini araştırdığı çalışmada, tedavi amaçlı 30 gün süreyle 0 mg, 15 mg,

30 mg ve 45 mg'dan oluşan E vitamini verildikten sonra kan ve sperma örnekleri değerlendirilerek seminal plazmada mda, 0 mg grupta 0.04 nmol/ml, 15 mg 0.02 nmol/ml, 30 mg 0.04 nmol/ml, 45 mg 0.04 nmol/ml. olarak kaydetmiştir. E vitaminin farklı dozlarının oksidatif stres ve sperm parametreleri üzerine yararlı bir etkisi olmadığını bildirmiştir.

Wen ve ark. (2019) üzüm çekirdeği prosiyanidin özütünün (GSPE) antioksidan etkilerini gösterdiği çalışmada, teke spermalarına sodyum sitrat temelli sulandırıcıya, GSPE (10, 30, 50, and 70 mg/L) katılarak, 4 °C'de 120 saat için saklandı. 24, 72 ve 120. saat sperm parametreleri kontrollerinde en iyi 30 mg/L GSPE grubundaki sperm kalitesi yüksekti ve mda (2.2 nmol/ml) diğer gruplara göre anlamlı derecede düşüktü ($p < 0.05$). Çalışmamız değerinden yüksektir.

Sampaio ve ark. (2018) Askorbik asit (0.65 mg/mL) ve α-tokoferolün (2 mmol/L) +5 °C' de 72 saat saklanan aygır spermatozoon üzerinde etkisini araştırdığı çalışmada; Lipid peroksit analizinde antioksidan eklenen gruplarından, kontrol grubu 2506.2 ±796.4 ng mda/108 sperm olarak istatiksel olarak daha yüksek değer çıkmıştır ($P < 0.05$).

Nogueira ve ark. (2015) Koenzim Q-10 (40 µg/ml) ve α-Tokoferolün (2 mM) +5 °C de 72 saat saklanan aygır spermatozoon üzerinde etkisini araştırdığı çalışmada; Lipid peroksidasyon yönünden CoQ10+α-TOH (1765.9±695.9 ve α-TOH (1890.8±749.5) grupları, kontrol grubuna (2506.2 ±769.4 ng mda/10^8 sptz) kıyasla daha etkili bulunmuştur. Yapılan bu çalışma, araştırmamız aynı yönde desteklemektedir.

Sarangi ve ark. (2017) Beetal tekesi sperması ile Tris-YS temelli sulandırıcısına 3 mM vitamin E, 1 mM Glutatyon katarak, 0, 24, 48 ve 72. saat boyunca 4 °C sperma parametresine etkisini incelediği çalışmada, 0. ve 72. saatte kontrol grubu mda konsantrasyonu sırasıyla 2.48, 2.88 µg/mol, E vitamini 2.47, 2.65 µg/mol, Glutatyon 2.38, 2.56 µg/mol kaydedilmiştir. Sperma sulandırıcısına 3 mM vitamin E, 1 mM Glutatyon ilavesinin sperma parametrelerini iyileştirdiğini ve Lipid peroksidasyonu azalttığını bildirmiştir. Çalışmamız değeriden yüksektir.

Chelucci ve ark. (2014) Sarda ırkı tekesinin spermasını Tris-%20,%4 gliserol ve soya lesitini temelli sulandırıcısı ile dondurma-çözdürme sonucu sperma parametresine olan etkisini kıyasladığı çalışmada, en düşük mda soya lesitini grubunda, en yüksek ise Tris- %20 yumurta sarısı temelli sulandırıcı grupta olduğunu bildirmiştir.

Daramola ve ark. (2015) Batı afrika tekesinin spermasını Tris-%20 YS sulandırıcısı ile buna ilaveten Vitamin C farklı (0, 2, 4, 6 ve 8 mM) konsantrasyonlarını eklediği çalışmada, dondurma çözdürme sonucu 0, 2, 4, 6, 8 mM sıra ile 0.12, 0.12, 0.13, 0.10, 0.11 nmol/ml mda konsantrasyonu değerleri kaydetmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında en düşük mda 6 ve 8 mM eklenmiş grupta elde etmiştir. Çalışmamız değerinden düşük bulunmuştur.

Shahin ve ark. (2019) Tek hörgüçlü develerden alınan epididimal spermanın Tris-%20 YS temelli sulandırıcına antioksidan (200 µM/mL vitamin E, 1 mg/mL vitamin C) ilave edilerek dondurma çözdürme işlemi sonunda kontrol grubu mda 30.1 nmol/ml. Vitamin C grubuna ait mda 14.8 nmol/ml. Vitamin E grubunda mda 14.8 nmol/ml olarak kaydetmiş, mda konsantrasyonu E ve C vitamini düşürmüştür. Çalışmamızla uyumlu sonuca sahiptir.

Cerolini ve ark. (1999) Domuz sperması 5 gün 19 °C'de EDTA-sitrat sulandırıcısı olarak kullanılan dilüsyona ilaveten α-tokoferol 0.2 mg/ml katılması sonucunda mda konsantrasyonu konrol grubu 0. gün 1.5, 3. Gün 18.9, 5. Gün 28.6 µg mda/10^9 spz. α-tokoferol 0. Gün 1.5, 3. Gün 7.4, 5. gün 6.5 µg mda/10^9 spz. kaydetmiştir. Sperma sulandırıcısında böyle aktif antioksidan oldukça lipid peroksidasyonuna karşı dirençlerini önemli ölçüde arttıracağını bildirmiştir.

Zou ve ark. (2021) Guanzhong tekelerinde sitrat-%15 YS sulandırıcısına farklı oranlarda (0, 1, 2, 3, 4 mmol/l) Glutatyon eklenmesiyle sulandırılmış spermanın dondurma-çözdürülmesinde, kontrol grubu mda 6.28 nmol/l, 2 mmol/l glutatyon mda 5.05 nmol/l bildirmiştir. Çalışmamız değerinden yüksektir.

Lafuente ve ark. (2013) İnfertil erkeklerde Koenzim Q10 ile tedavilerinin etkisini araştırdığı bir meta analiz çalışmada canlı doğum, gebelik oranı, koenzim Q10 seminal konsantrasyonu ve sperm motilitesi parametrelerine bakmıştır. Bunun sonucunda gebelik oranını arttırmadığını, Seminal konsantrasyonda, sperma konsantrasyonunda, motilitede anlamlı bir artış olduğunu, spermatozoon parametrelerinde iyileşme yaptığını bildirmiştir.

Yapılan çalışmalarda genel olarak antioksidan katılması lipid peroksidasyonu azalttığını, mda düşürdüğünü göstermektedir. Bulunan sonuçlardaki mda farklılıkları sperma alınan hayvanın türüne, ırkına, fiziksel bakım ve beslenmesine, sperma alınmasından dondurma-çözdürme tekniğine kadar geçen aşamalara, antioksidan maddenin türüne, yapısına, konsantrasyonuna, ölçüm tekniğine bağlı olarak değişmektedir.

6. SONUÇ

Spermanın başarılı bir şekilde dondurulması, birçok faktörün optimal şartların sağlanmasını gerektiren kompleks bir yöntemdir. Bir türün sperması için standart edilen protokol başka türler için yeterli olamayabilmektedir. Teke spermasının dondurulma işlemide bunu gösteren bir örnektir. Teke sperması ile diğer evcil türlerin sperması arasında, sperma sulandırıcısı, kriyoprotektantları, dondurma ve çözdürme hızları gibi ortak noktalardan faydalanılmasına karşın, çözdürme sonrası maksimum canlılık elde edebilmek için türe özgü ayrı bir özene gereksinim vardır. Teke spermasının dondurulmasında, çözdürme sonrası spermatolojik parametreler, oksidatif stress ve mda oluşumu üzerine olumlu etkileri olabileceği düşünüldüğünden sperma sulandırıcılarına antioksidan maddeler katılmaktadır. Yapılan çalışmalarda olumlu etkileri olmakla beraber antioksidanların etkileri hayvan türüne, antioksidanların türüne, dozuna, sulandırıcı kompozisyonuna ve dondurma prosedürüne göre değişiklik göstermektedir.

Tez çalışması, Halep tekelerde spermanın dondurularak saklanmasında farklı protokoller uygulanarak ve sulandırıcıya antioksidatif maddeleler katılarak çözüm sonu sperma parametrelerinin ve oksidatif stresin mda yönünden değerlendirilmesi amacıyla yürütüldü. Ekilibrasyon sonrasında Q1b (Koenzim Q10 1mM) ve E0.3b (E vitamini 0.3 cc/ml) grupları istatiksel olarak yüksek motiliteye sahipti. Sulandırılmış sperma örneklerini içeren payetler +4 °C'de 2 saat süreyle ekilibre edildikten sonra, dondurma protokolerinden, sıvı azot buharından 4 cm üzerinde (-120 °C) 20 °C/dk. 6 dakika dondurma işlemi uygulanan Q1b grubu dondurma çözdürme sonucu en yüksek spermatolojik değerler saptanmıştır.

Dondurma-çözdürme sonrası motilite, membran bütünlüğü, ölü canlı ve anormal spermatozoon bakımından Tris-YS en düşük spermatolojik kalitede değerler saptandı. Koenzim Q10 1.0 mM eklenmiş grup en iyi kaliteye sahipti. Spermatozoon yapısında bulunan Co-Q10, Mitokondrinin en önemli lipid antioksidanlarından birisidir. Mitokondriyal solunumda oksidatif strese olumlu etkisi olduğu düşünülmektedir. Spermatozoon plazma membranındaki lipid peroksidasyon düzeyinin bir göstergesi olan,

mda oluşumu en az Koenzim Q10, E ve C vitamini eklenmiş gruplarda meydana gelmiştir. Bunlar arasında ise en az Koenzim Q10 1 mM eklenmiş grupta meydana gelmiştir.

Sonuç olarak, sulandırıcılara yapılan antioksidatif madde ilavesinin dondurma-çözdürme sonrasında sperma parametrelerini iyileştirdiği gözlendi. Bunlar arasında Koenzim Q10'nun E ve C vitaminlerinden daha iyi bir etkiye sahiptir. Dondurma prokolünün farklılığı, çözdürme sonucu sperma parametresine olan etkisinde istatiksel olarak fark gözlenmemiştir.

7. KAYNAKLAR

1. **Adeyanju SO, Daramola JO, Olanite JA, Awokola OS.** Effect of sunflower lecithin on Kalahari Red goat semen during cryopreservation. *Agricultura Tropica et Subtropica*, **2018,** 51(1): 21-28.
2. **Aguiar GV, Van Tilburg MF, Catunda AGV, Celes CKS, Lima ICS ve ark.** Sperm parameters and biochemical components of goat seminal plasma in the rainy and dry seasons in the Brazilian Northeast: the season's influence on the cooling of semen. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **2013,** *65*(1): 6-12.
3. **Ahmad M, Nasrullah R, Ahmad N.** Effect of cooling rate and equilibration time on pre-freeze and post-thaw survival of buck sperm. *Cryobiology*, **2015,** 70(3): 233-238.
4. **Ahmed MMM, Makawı SA, Gadır AA.** Reproductive performance of Saanen bucks under tropical climate. *Small Rum. Res*. **1997,** 26:151-155.
5. **Ahmed MMM, Makawi SE, Jubara AS.** Synchronization of oestrus in Nubian goats. *Small Rumin Res,* **1998,** 30: 113-120.
6. **Akkuş İ.** Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları, Kuzucular ofset, Konya, **1995.**
7. **Akmaz A, Çağlayan T.** Zootekni II (Küçükbaş ve Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliği). **2021.** Editörler: Akmaz A, İnal Ş, Garip M; Atlas Akademi Yayınevi, Sayfa: 145-200.
8. **Alaçam E.** Üremenin Denetlenmesi. İn Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite, 1. Baskı, Medisan, Ankara, **1997,** s. 59–65.
9. **Alaçam E.** Üremenin Kontrolü. In: Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite, Ed: E. Alaçam (6. Baskı). Ankara, Medisan, **2007.**
10. **Alcay S, Gokce E, Toker MB, Onder NT, Ustuner B ve ark.** Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology,* **2016,** 72(3):269-273.
11. **Ali Ahmadi MS, Soon CN.** The single sperm curling test, a modified hypo-osmotic swelling test, as a potential technique for the selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection. Elseiver **1997,** 68 (2):346-350.
12. **Al-Ghalban AM, Tabbaa MJ, Kridli RT.** Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus bucks. *Small Ruminant Research*, **2004,** 53(1-2): 141-149.
13. **Andersen, K.** Artificial insemination in the dog. **1969**; Medlemsbl norshe Vet. Foren 21: 482.
14. **Arı UÇ, Yıldız S.** Teke Spermasının Saklanması. *Turkiye Klinikleri Reproduction and Artificial Insemination-Special Topics*, **2018,** 4(2):8-18.
15. **Arthur GH, Noakes DE, Pearson H, Parkinson TJ.** Veterinary Reproduction and Obstetrics. **1996,** 621-654.
16. **Azawi OI, Al-Dahash SYA, Juma FT.** Effect of different diluents on Shami goat semen. *Small Ruminant Research,* **1993,** 9(4): 347-352.
17. **Azevedo DMMR, Tonıollı R.** Seminal characteristics of Maroto bucks in the Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Ciencia Veterinaria,* **2005,** 12:127-130.
18. **Azimi G, Farshad A, Farzinpour A, Rostamzadeh J, Sharaf M**. Evaluation of used Purslane extracts in Tris extenders on cryopreserved goat sperm. Cryobiology. **2020**. 94: 40-48.
19. **Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumber J.** Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*, **2001,** 56: 577-589.
20. **Barbas JP, Mascarenhas RD.** Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking,* **2009,** 10(1): 49-62.
21. **Barker, C.A.** Some Aspects Of Artificial Insemination in Swine And Goats. Toronto: In: Proc. 10th Ann. Conv. National Assoc. Artif.Breeders**. (1957).** s.:127-132.
22. **Barıtcı İ, Adıgüzel C.** Halep (Damascus, Şam) Keçisi Yetiştiriciliği. *Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **2017,** 6(1): 39-42.
23. **Baruah D, Sinha S, Deka BC, Biswas RK, Borah RS ve ark.** Effect of Tris Egg Yolk and Tris Soya Lecithin Extenders in Frozen Beetal Buck Semen. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, **2019,** 8(1): 2740-2748.
24. **Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medına V, Davıes-Morel MC.** The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of andrology*, **2000,** 21(6): 895-902.

25. **Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA.** Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, **2001**, 56(2): 275-286.
26. **Bucak MN, Sarıözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A ve ark.** The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircus ancryrensis) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*, **2010,** 89(1): 24-30.
27. **Bucak MN, Tekin N.** Kryoprotektanlar ve Gamet Hücrelerinin Dondurulmasında Kryoprotektif Etki. *Ankara Üni. Vet. Fak. Derg,* **2007,** 54(1):67-72.
28. **Byung PY** Cellular Defenses Againt Damage from Reactive Oxygen Species, Phsical. Res**., 1994**, 74: 139-72.
29. **Cabrera F, Gonzalez F, Batista M, Calero P, Medrano A ve ark.** The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (Capra hircus). *Reproduction in domestic animals*, **2005,** 40(3): 191-195.
30. **Chatterjee S, De lamırande E, Gagnon C.** Cryopreservation alters membrane sulfhydrl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol. Reprod. Dev*, **2001** 60: 498-506.
31. **Cheeseman, K.H. and Slater,** T.F. An introduction to free-radical biochemistry. British Medical Bulletin, **1993;** 49, 481-493.
32. **Chelucci S, Pasciu V, Succu S, Addis D, Leoni GG ve ark.** Soybean lecithin–based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*, **2015,** 83(6): 1064-1074.
33. **Chen Y, Foote RH, Brockett CC.** Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, **1993,** 30: 423-431.
34. **Choe CY, Kım JG, Cho SR, Son DS, Kım YK ve ark.** Influence of seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. *Reproduction Domestic Animals*, **2006,** 41: 55-60.
35. **Corteel JM, Baril G, Leboeuf B.** Residual seasonal variations in fertility in selected deep-frozen ejaculates of European dairy male goats. In: 9th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. Madrid 5, **1980,** 422–425.
36. **Coşkun N, Karaca F.** Dondurmanın (Kriyopreservasyon) Sperma Kalitesi ve Fertilite Üzerine Etkileri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **2016,** 56(1): 32-39.
37. **Crane, F.L.** (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(6), 591-598.
38. **Çoyan K.** Evcil Hayvanlarda Dölerme ve Sun'i Tohumlama, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya, **2002.**
39. **Daramola, JO. Adekunle EO**. Cryosurvival of goat spermatozoa in Tris-egg yolk extender supplemented with vitamin C. **2015**. Archivos de zootecnia, 64(247): 261-268.
40. **Daşkın A, Tekin N.** The Effect of Egg-Yolk on The Quality of Frozen Angora Buck Semen. *Tr. J. of Vet. and Ani. Sci*, **1996,** 20: 395-398.
41. **Debbarma V, Sinha S, Singh LK, Deka BC, Biswas RK ve ark.** Effect of extenders on semen quality of Beetal bucks preserved at 5 C. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, **2019,** 7(5): 278-282.
42. **Del Maestro RF.** An approach to free radicals in medicine and biology. Acta Physiol Scand . **1980;** Supl 492:153-168
43. **Deka BC, Rao AR.** Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semne. *Indian Vet. J,* **1987,** 64: 591-594.
44. **Deka BC, Rao AR.** Effect of glycerol level in Tris-basek extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. *Theriogenology*, **1986,** 26(2): 231-238.
45. **Delgadıllo JA, Leboeuf B, Chemıneau P.** Abolition of Seasonal Variations in Semen Quality and Maintenance of Sperm Fertilizing Ability by Short Photoperiodic Cycles in He-Goats. *Small Ruminant Res*, **1992,** (9): 47-59.
46. **Delgadillo JA, Flores JA, Véliz FG, Duarte G, Vielma J ve ark.** Importance of the signals provided by the buck for the success of the male effect in goats. *Reprod. Nutr. Dev,* **2006**, 46: 391-400.
47. **Demirci E.** Evcil hayvanlarda reprodüksiyon, suni tohumlama ve androloji ders notları. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ders Teksiri No:53, Elazığ, 66-75, **2000.**
48. **Doğan I, Konyalı A, Tolu C, Yurdabak S.** Different estrous induction protocols during the transition period in lactating Turkish Saanen does following AI. *Acta Vetrinaria (Beograd)*, **2008**, 58(2-3): 259-266.

49. **Dorado J, Mu˜noz-Serrano A, Hıdalgo M.** The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Animal Reproduction Science*, **2010,** 121: 115–123.

50. **Dorado J, Rodríguez I, Hidalgo H.** Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenolology*, **2007,** 68: 168-177.

51. **Dündar Y, Aslan R.** Oksidan-antioksidan denge ve korunmasında vitaminlerin rolü. Hayvancılık Araştırma Dergisi, **1999;** 9:1-39.

52. **Edmondson MA, Roberts JF, Baırd AN, Bychawskı S, Pugh DG.** Theriogenology of sheep and goats. In: Sheep and Goat Medicine, Eds: D.G. Pugh, A.N. Baird (2. Baskı). Missouri: Elsevier Saunders, **2012.**

53. **El Aich A, Waterhouse A.** Small ruminants in environment conservation. *Small Ruminant Research*, **1999**, 34: 271-287.

54. **Engeland IV, Ropstad E, Andresen O.** Pregnancy diagnosis in dairy goats using progesterone assay kits and oestrous observation. *Anim Reprod Sci*, **1997,** 47(3): 237-243.

55. **Engeland IV, Waldeland H, Andresen E, Loken T, Bjorkman C ve ark.** Foetal loss in dairy goats: An epidemiological study in 22 herds. *Small Rum Res*, **1998**, 30: 37-48.

56. **England GCW.** Cryopreservation of dog semen. *J. Reprod. Fert. Suppl*, **1993,** 47: 243-255.

57. **Evans G, Maxwell WMC.** Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Sidney: Butterworths, 8-21: 107-141, **1987.**

58. **Evans WJ.** Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr*, **2000**, 72: 647-52.

59. **Farshad A, Akhondzadeh S.** Effects of sucrose and glycerol during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. Asian-Australasıan Journal Animal Science **2009**; 21(12):1721-1727

60. **Fatet A, Pellicer-Rubio MA, Leboeuf B.** Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science*, **2011,** 124(3-4):211-219.

61. **Fathi M, Zaher R, Ragab D, Gamal I, Mohamed A ve ark.** Soybean lecithin–based extender improves Damascus goat sperm cryopreservation and fertilizing potential following artificial insemination. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, **2019,** 8(4): 174.

62. **Fehrenbach E, Northoff H**. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. Exercise immunology review, **2001,** 7: 66-89

63. **Ferdinand N, Thomas TT, Augustave K, Henry DF, Fernand T, Etienne PT.** Effects of Buck Age, Storage Duration, Storage Temperature and Diluent on Fresh West African Dwarf Buck Semen. *Journal of Reproduction and Infertility*, **2012**, 3(3): 58-66.

64. **Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M ve ark.** In vitro comparison of egg yolk–based and soybean lecithin–based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, **2010,** 73(4): 480-487.

65. **Frei B.,** *Natural Antioxidants in Human Health and Disease.* New York: Academic Press; **1994.**

66. **Fukui Y, Kohno H, Togari T, Hiwasa M, Okabe K.** Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *Journal of Reproduction and Development*, **2008,** 54(4): 286-289.

67. **Funahashıa H, Sano T.** Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10ºC. *Theriogenology*, **2005,** 63: 1605-1616.

68. **Gacitua H, Arav A.** Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. *Theriogenology*, **2005,** *63*(3): 931-938.

69. **Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R, et al..** Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology.* **(2004)** 62:690–701.

70. **Gangyı X, Hongpıng Z, Changjun Z, Xınglın X, Dan Z ve ark.** Research on quality, preservation dilutors and frozen technology of boer goat semen. Proceedings of the conference on Boer goats in China, 88-93**, 2001.**

71. **Gibbons A, Cueto M, Wolff M.** Artificial insemination in goats. **2009.**

72. **Gojen Singh L, Ray K, Sarkar B.** Effect of different levels of egg yolk on cryopreservation of Black Bengal buck semen in Tris egg yolk citrate fructose glycerol extender. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, **2016,** 6(1): 101-106.

73. **Gökçe, O., Engindeniz, S.,** Keçi Yetiştiriciliğinin Ekonomisi, Keçi Yetiştiriciliği (Ed.: Kaymakçı, M., Aşkın, Y.), Ankara, 1997, s.4-33

74. **Hafez B, Hafez ESE.** Reproduction in Farm Animals, 509, Lippincott, William & Wilkins. **2000.**

75. **Hafez ESE.** Reproduction in farm animals, 6th edition, Philadelphia, 330-343,**1993.**

76. **Haigh H.** Reproductive Anatomy and Physiology of small ruminants Animal Andrology Theories and Applications. 2nd Edition, 450-465, **2007.**

77. **Halliwell B, Gutteridge JMC.** Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press New York USA. 107-208, **2000.**

78. **Herman, H.A., Mitchell, J.R., Doak, G.A.,** The Artificial Insemination and Embryo Transfer of Dairy and Beef Cattle. **1994**, Interstate Publishers, Inc.

79. **Hıdalgo M, RodrÍguez I, Dorado JM.** The Effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Animal Reproduction Science*, **2007,** 100: 61-72.

80. **Holtz W.** Recent developments in assisted reproduction in goats. *Small Ruminant Research*, **2005,** 60: 95–110.

81. **İnanç ME, Uysal O, Gürcan IS.** Farklı Irklardan Tekelerde Başlıca Spermatolojik Parametreler. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **2014**, 2(1): 13-19.

82. **Jainudeen MR, Wahid H, Hafez ESE.** Sheep and goats. In: Reproduction and Farm Animals 7th, Ed., A Wolters Kluver Company, Philadelphia, **2000**. 172-181.

83. **Jamadi AS, Ahmad E, Ansari M, Kohram H.** Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. **2017**, 75(1): 15-20.

84. **Jeyendran RS, Van der van HH, Zaneveld LJ.** The hypoosmotic swelling test **1992.** 29(2): 105.

85. **Kakati U, Sinha S, Deka BC, Biswas RK, Baruti M ve ark.** Effect of Soybean Lecithin Based Extender and Ovixcell on Quality of Frozen Semen in Beetal, Sirohi and Assam Hill Goat. *International Journal of Livestock Research*, **2019,** 9(1):95-110.

86. **Kalyani R, Gojen SL, Bidhan S.** Cryopreservation of Black Bengal buck semen by Tris-based extenders containing different levels of egg-yolk. *Annals of Veterinary and Animal Science*, **2015,** 2(3): 47-54.

87. **Kamal AG, Amel AA, Bakhıet O, Babıker A.** Comparative studies on reproductive performance of Nubian and Saanen bucks under the climatic conditions of Khartoum. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **2005,** 4:942-944.

88. **Karagıannıdıs A, Varsakelı S, Karatzas G.** Characterisics and seasonal varıatıons in the semen of Alpine, Saanen, Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology*, **2000,** 53: 1285-1293.

89. **Karagıannıdıs A, Varsakelı S, Karatzas G.** Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology*, **1999**, 53(6): 1285-1293.

90. **Kaymakçı, M., Eliçin, A., Tuncel, E., Pekel, E., Karaca, O., Işın, F., Taşkın, T., Aşkın, Y., Emsen, H., Özder, M., Selçuk, E., Sönmez, R.,** Türkiye'de Küçükbaş Hayvan Yetiştiriciliği, Türkiye Ziraat Mühendisliği V.Teknik Kongresi, 17-21 Ocak **2000**, Ankara., s.765-793.

91. **Kaymakçı, M., Taşkın,T., Mutaf, S., Kumlu, S., Yalçın, S., Koşum, N.** Türkiye Damızlık Üretim Stratejisi. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongre Bildirisi. Ankara, **201**0 syf.11-15.

92. **Khalifa EI, Abdel-Hafez MAM.** Evaluation of different levels of soybean lecithin as an alternative to egg yolk for cryopreservation of goat and ram spermatozoa. *Journal of Animal and Poultry Sciences, Suez Canal University*, **2013,** 13(1): 1-6.

93. **Khalifa EI, Abdel-Hafez MAM.** Effect of soybean lecithin-based semen extender on freezability and fertility of Rahmani ram spermatozoa. *Egyptian Journal of Sheep & Goat Sciences*, **2014,** 9(1): 59- 66.

94. **Khalifa EI.** Physıologıcal response of zaraıbı bılly goats spermatozoa to soybean lecıthın addıtıon as an alternatıve to egg yolk varıetıes ın semen extenders. *Egyptian J. Anim. Prod*, **2015,** 52(3): 155-162.

95. **Khalifa TAA, El-Saidy BE.** Pellet-freezing of Damascus goat semen in a chemically defined extender. *Animal reproduction science*, **2006,** 93(3-4): 303-315.

96. **Khalili B, Farshad A, Zamiri MJ, Rashidi A, Fazeli P.** Effects of sucrose and trehalose on the freezability of Markhoz goat spermatozoa. *Asian-australas J Anim Sci*, **2009**, 22: 1614-1619.

97. **Kridli RT, Tabbaa MJ, Barakeh FS.** Seasonal variation in scrotal circumference and semen characteristics of Black Bedouin and Black Bedouin-Damascus crossbred bucks. *Asıan Australasıan Journal of Anımal Scıences*, **2007**, 20(3): 359.

98. **Kulaksız R, Daşkın A.** Farklı antioksidanlarla dondurulan Saanen teke spermasının in vitro ve in vivo değerlendirilmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2009,** 56: 201-205.

99. **Kulaksız R, Daşkın A.** Teke Spermasının Kısa ve Uzun Süreli Saklanması. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, **2007,** 78(4):51-56.

100. **Kulaksız R.** Farklı Antioksidanlar Eklenmiş Sulandırıcılarla Dondurulmuş Saanen Tekesi Spermasının İn Vitro Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, **2009.**

101. **Kulaksiz R, Daskin A**. Reproductive performance of primiparous and multiparaous Saanen goats after laparoscopic intrauterine insemination: a field study. *Turk J Vet Anim Sci*, **2012**, 36(2): 201-204.

102. **Kulaksiz R, Daşkın A.** In vitro evaluation of Saanen buck semen frozen in different extenders supplemented with various antioxidants. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2010,** 57(3): 151-156.

103. **Küçük N, Aksoy M, Uçan U, Ahmad E, Naseer Z, Ceylan, Serin İ.** Comparison of two different cryopreservation protocols forA freezing goat semen. **2014,** 68(3): 327-331.

104. **Leboeuf B, Forgerit Y, Bernelas D, Pougnard JL, Senty E ve ark.** Efficacy of two types of vaginal sponges to control onset of oestrus, time of preovulatory LH peak and kidding rate in goats inseminated with variable numbers of spermatozoa. *Theriogenology*, **2003**, 60: 1371-1378.

105. **Leboeuf B, Restall B, Salamon S** Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, **2000,** 62: 113-141.

106. **López-Lluch, G., Rodríguez-Aguilera, J.C., Santos-Ocana, C., Navas, P.** Is coenzyme Q a key factor in aging? *Mechanisms of ageing and development*, **2010**, 131(4), 225-235.

107. **Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M.** Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender. *Animal reproduction science*, **2012,**136(1-2): 55-60.

108. **Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M.** Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. *Animal reproduction science*, **2011,** 129(1-2): 44-49.

109. **Merati Z, Farshad A.** Supplementary role of vitamin E and amino acids added to diluent on goat sperm freezability. **2021**, 100(1): 151-157.

110. **Mohammed K, Khalıl M, Al-Saef AM.** Effect of goat breeds, semen dıluents and freezıng methods on sperm freezabılıty and reproductıve performance. *Assiut Vet. Med. J*, **2012,** 58: 235-246.

111. **Moradi M, Moradi A, Alemi M, Ahmadnia H, Abdi H ve ark.** Safety and efficacy of clomiphene citrate and L-carnitine in idiopathic male infertility: a comparative study. *Urol J*, **2010**, 7: 188-93.

112. **Moscio DP, Murphy EM, Sies H.** Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. Am J Clin Nutr, **1991;** 53, 194-200.

113. **Navarro, F., Arroyo, A., Martín, S.F., Bello, R.I., De Cabo R, Burgess, J.R.,** Protective role of ubiquinone in vitamin E and selenium-deficient plasma membranes. *Biofactors*, **1999.** 9(2-4), 163-170.

114. **Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüera A.** Hypoosmotic test in equine spermatozoa **1999.** 51(4):721-727.

115. **Nogueira DM, Eshtaeba A, Cavalieri J, Fitzpatrick LA, Gummow B ve ark.** Short-term supplementation with maize increases ovulation rate in goats when dietary metabolizable energy provides requirements for both maintenance and 1.5 times maintenance. *Theriogenology*, **2015**, 89: 97-105.

116. **Nunes JF, Salgueiro CCM.** Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. *Small Rum Res*, **2011,** 98: 176-184.

117. **Nur Z, Dogan I, Gunay U, Soylu MK.** Relationships between sperm membrane ıntegrıty and other semen quality characteristics of the semen of Saanen goat bucks. *Bull Vet Inst Pulaway*, **2005,** 49: 183-187.

118. **Nur Z, Zik B, Ustuner B, Sagirkaya H, Ozguden CG.** Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNAintegrity. *Theriogenology*, **2010,** 73(9): 1267-1275.

119. **Özuyanık, O.** Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti kurak iklim koşullarında yetiştirilen Damascus keçilerinin adaptasyon mekanizmaları üzerinde bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniv., Fen Bilimleri Enst., (2004). Adana

120. **Peters AR, Ball PJH** Reproduction In Cattle. 2nd Edit: Blackwell Sci. Ltd. **1995**, 62-88.

121. **Peterson K, Kappen MAPM, Ursem PJF, Notlıng JO, Colenbrander B.** Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: Effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. *Theriogenology*, **2007,** 67: 863-871.

122. **Poul JL, Sall ND, Sonı T.** Lipit peroxidation abnormalites. *Nephron*, **1993,** 64: 106-109.

123. **Purdy PH.** A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rum. Res*, **2006,** 63: 215-225.

124. **Rıtar AJ, Ball PD, O'may PJ.** Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reprod. Fertil. Dev*, **1990,** 2: 27-34.

125. **Ritar AJ, Salamon S.** Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small Ruminant Research*, **1991,** 4(1): 29-37.

126. **Ritar AJ, Salamon S.** Effects of seminal plasma and its removal and of egg yolk in the diluent on thesurvival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci*, **1982,** 35: 305–312.

127. **Salamon S, Maxwell WMC.** Storage of ram semen. *Animal reproduction science*, **2000,** 62(1): 77-111.

128. **Salamon S, Ritar AJ.** Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Australian journal of biological sciences*, **1982,** 35(3): 295-304.

129. **Salmani H, Nabi MM, Vaseghi-Dodaran H, Rahman MB, MohammadiSangcheshmeh A ve ark.** Effect of glutathione in soybean lecithin-based extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Rumin Res*, **2013,** 112: 123-127.

130. **Salmani H, Towhidi A, Zhandi M, Bahreini M, Sharafi M.** In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*, **2014,** 68(2): 276-280.

131. **Santiago-Moreno J, Coloma MA, Dorado J, Pulido-Pastor A, Gómez-Guillamon F ve ark.** Cryopreservation of Spanish ibex (Capra pyrenaica) sperm obtained by electroejaculation outside the rutting season. *Theriogenology*, **2009,** 71(8): 1253-1260.

132. **Sarıözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Taşdemir U, Kinet H ve ark.** Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. *Theriogenology*, **2010,** 73(3): 316-323.

133. **Sevinç, A., Tekin, N ., Yavaş, N., Kale, N.** Çifteler Harası Tiftik Tekelerinin Başlıca Spermatolojik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar. Doğa Bilim Derg., **(1985).** 9(3): 265-273.

134. **Sharafi M, Zhandi M, Sharif AA.** Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. *Cell and tissue banking*, **2015,** 16(2): 261-269.

135. **Sharma A, Sood P.** Caprine semen cryopreservation and the factors affecting it: An overview. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*, **2020,** 6(1): 46-57.

136. **Sınha MP, Sınha AK, Prasad RL.,** The effect of glutathione on motility, enzyme leakage and fertilility of frozen goat semen. *Anim. Reprod. Sci*, **1996,** 41: 237-243.

137. **Singh MP, Sinha AK, Singh BK.** Effect of cryoprotectants on certain seminal plasma attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*, **1995,** 43: 1047–1053.

138. **Smith MC.** Caprine reproduction. In: Current Therapy in Theriogenology Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals. W.B. Saunders Company, Philadelphia, **1986**, 575-629.

139. **Sohal, RS., Forster, MJ.** Coenzyme Q, oxidative stress and aging. *Mitochondrion*, 2007.,103-111

140. **Soltan W, El-Siefy ES, Abe El-Razek I, El-Sharawy M, Kubota K ve ark.** Soybean Milk–Based Extender for Cryopreservation of Buck Spermatozoa. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ*, **2017,** 62(2): 361-366.

141. **Southorn, P. ve Powis, G.** Free radical in medicine. I. Chemical and Biological reactions. Mayo Clinic Proc., **1988;** 6, 23-30.

142. **Sönmez M.** Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. Fırat Üniversitesi, Elazığ, **2013.**

143. **Sun L, Fan W, Wu C, Zhang S, Dai J ve ark.** Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in Tris-based extender on goat semen cryopreservation. *Cryobiology*, **2020**, 92: 146–150.

144. **Şen ÇÇ, Tekin K, Akçay E.** Effect of Egg Yolk and Removal of Seminal Fluid on Semen Cryopreservation in Norduz Goat. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, **2015**, 4(2): 64-67.

145. **Şimşek ÜG, Bayraktar M, Gürses MM.** Çiftlik koşullarında kıl keçilerine ait bazı verim özelliklerinin araştırılması. *Fırat Ünv. Sağlık Bilimleri Dergisi*, **2006,** 20(3): 221-227.

146. **Taylor CT.** Antioxidants and reactive oxygen species in human infertlility. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, **2001,** 10: 189-198.

147. **Tekın N, Yurdaydın N, Daskın A.** Ankara Keçilerinden Değişik Yöntemlerle Sperma Alınması ve Dğerlendirilmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **1996,** 43: 397-403.

148. **Tekin N, Günzel AR, Yurdaydın N, Yavaş Y, Daşkın A ve ark.** Östrüsları Sinkronize Edilen Koyunlarda Suni Tohumlama Yöntemiyle Elde Edilen Dölverimi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg*, **1991,** 38(1- 2): 60-73.

149. **Tekin N, Muyan M.** Keçilerde Başlıca Dölerme Özellikleri. *Doğa Bilim Derg*, **1985,** 9(2): 208-219.

150. **Tekin N.** Erkek üreme organlarının muayenesi (Androlojik muayeneler). Theriogenoloji evcil hayvanlarda reprodüksiyon sun'i tohumlama obstetrik ve infertilite. Nurol Matbacılık, Ankara, **1990,** 53-67.

151. **Tekin N.** Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. Evcil Hayvanlarda Reprodüksyon, Suni Tohumlama, Doğum ve İnfertilite. Dizgievi: Konya. 7. Bölüm. 69-79, **1994.**

152. **Tuli, R.K., Holtz, W.,** The effect of season on seminal characters in Boer goat bucks in the Northern temperate zone. Recent Advances in Goat Production. Proc. papers presented at 5th Int. Conf. on Goats. **1992.** New Delhi, Abstract No. 1195.

153. **Tuncer PB, Taşdemir U, Büyükleblebici S, Özgürtaş T, Coşkun E ve ark.** Effects of different doses of trehalose supplementation in egg yolk extender in frozen–thawed Angora buck semen. *Small Ruminant Research*, **2013,** 113(2-3): 383-389.

154. **TÜİK**, Hayvansal Üretim İstatistikleri 2020, Erişim: http://www.tuik.gov.tr **10.10.2020.**

155. **Türk G, Sönmez M, Şimsek UG.** Kıl keçisi tekeleri ve SaanenxKıl keçisi (F1) melezi tekelerinin bazı üreme özelliklerinin karşılaştırılması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **2005,** 19: 87-92.

156. **Ulutaş P, Serin İ, Ceylan A.** Horozlarda Seminal Plazma Lipid Peroksidasyonu ve Ekstraselüler Antioksidanlar ile Bazı Spermatolojik Özellikler Arasındaki İlişkiler. İstanbul Univ. Vet. Fak. Derg. **2005.** 31 (1). 67-74.

157. **Uysal O, Kinet H, Çevik M, Çetinkaya S.** Değişik antioksidanlar içeren farklı sulandırıcılarla dondurulmuş koç spermalarında elde edilen dölverimi. *A.Ü. Vet. Fak. Derg*, **2000,** 47(2): 177-189.

158. **Uysal OTD, Bayraktar EY.** Kilis tekesi spermasının dondurulmasında sukrozun etkisi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, **2011.**

159. **Üstüner B, Akçay S, Nur Z, Sağırkaya H, Soylu MK.** Effect of Egg Yolk and Soybean Lecithin on Tris-based Extender in post-thaw ram semen quality and in vitro fertility. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg*, **2014,** 20(3): 393-398.

160. **Üstüner B, Günay Ü.** Teke Spermasının Saklanması ve Suni Tohumlama. *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med*, **2009,** 28(1): 53-58.

161. **Varela-López, A., Giampieri, F., Battino, M., Quiles, J.L.** Coenzyme Q and its role in the dietary therapy against aging. *Molecules*, **2016**; 21(3), 373.

162. **Walkden-Brown SW, Restall BJ, Taylor WA.** Testicular and epididymal sperm content in grazing cashmere bucks seasonal variation and prediction from measurements in vivo. *Reprod. Fertil. Dev*, **1994,** 6: 727-736.

163. **Wolf, D.E., Hoffman, C.H., Trenner, N.R., Arison, B.H., Shunk, C.H., Linn, B.O**. Coenzyme QI Structure studies on the coenzyme Q group. *Journal of the American **1958;** Chemical Society*, 80(17):4752-4752.

164. **Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M.** Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. Elseiver, **1979,** 135(3): 372-376.

165. **Parthasarathy S, Young SG,** Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. J Clin Invest **1994,** 77:641.

166. **Yousefian I, Zare- Shahneh MSc.** The effect of coenzyme Q10 and α-tocopherol in skim milk-based extender for preservation of Caspian stallion semen in cool condition. Journal of Equine Veterinary Science, **2014**.

167. **Yousefian I, Emamverdi M, Karamzadeh-Dehaghani A, Sabzian-Melei R, Zhandi M, Zare-Shahneh A.** Attenuation of cryopreservation-induced oxidative stress by antioxidant: Impact of Coenzyme Q10 on the quality of post-thawed buck spermatozoa.Cryobiology. **2018**, (81): 88–93.

168. **Youngquist RS, Threlfall WR.** Current Therapy in Large Animal Theriogenology. *Elsevier Health Sciences*, **2006,** 481-555.

169. **Zhang SS, Hu JH, Lı QW, Jiang ZL, Zhang XY.** The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *Afr. J. Biotechnol*, **2009,** 8: 6476-6480.

ÖZGEÇMİŞ

İlkokulu Toprakkale merkez İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimini Osmaniye Merkez İmam Hatip Okulu'nda, lise öğrenimini ise Osmaniye Merkez İmam Hatip Lisesi'nde tamamladı. 2001 yılında kazandığı Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2006 yılında mezun oldu. 2011-2014 Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Tezli Yüksek Lisans bitirdi. 2015-2019 Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Elektrik Elektronik Mühendisliği Bölümü bitirdi. 2006-2010 tarihleri arasında Veteriner Kliniğinde serbest Hekim olarak çalıştı. 2010 yılında Gaziantep Nizip ilçe Tarım Müdürlüğünde göreve başladı. 2016 yılında Nurdağı İlçe Tarım Müdürlüğünde, 2022 yılında Osmaniye iline bağlı Toprakkale ilçe Tarım Müdürlüğünde göreve devam etmektedir. Evli ve 3 çocuk babasıdır.