T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BOĞA SPERMASININ DONDURULMASINDA YUMURTA SARISI İÇEREN TRİS SULANDIRICISINA KATALAZ, MELATONİN VE KOLESTEROL İLAVESİNİN SPERMA KALİTESİ VE FERTİLİTE ÜZERİNE ETKİSİ

Gökhan YILMAZ

DOKTORA TEZİ

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN

KONYA-2022

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BOĞA SPERMASININ DONDURULMASINDA YUMURTA SARISI İÇEREN TRİS SULANDIRICISINA KATALAZ, MELATONİN VE KOLESTEROL İLAVESİNİN SPERMA KALİTESİ VE FERTİLİTE ÜZERİNE ETKİSİ

Gökhan YILMAZ

DOKTORA TEZİ

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19202081 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2022

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Gökhan YILMAZ tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Unvanı Adı SOYADI ……Üniversitesi	İmza
Danışman:	Unvanı Adı SOYADI ……Üniversitesi	İmza
Üye:	Unvanı Adı SOYADI ……Üniversitesi	İmza
Üye:	Unvanı Adı SOYADI ……Üniversitesi	İmza
Üye:	Unvanı Adı SOYADI ……Üniversitesi	İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ……. tarih ve ……. Sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Unvanı Adı SOYADI
Enstitü Müdür

ÖNSÖZ

Üstün verim özelliklerine sahip hayvan ırkları suni tohumlama ile kısa sürede genetik yönden ıslah edilebilmektedir. Suni tohumlamada en önemli aşamalarından birisi dondurma işlemleri esnasında sulandırıcıya ilave edilen kriyoprotektanlar ile spermatozoonların zarar görmesinin en aza indirilmesidir. Bunun içinde sperma sulandırıcılarına çeşitli katkı maddeleri eklenerek kriyojenik hasarlar en aza indirilmektedir. Kriyoprezervasyon ile spermatozoon hücrelerin metabolik aktiviteleri minimum seviyeye indirilerek, uzun süreli olarak saklanmaları amaçlanmaktadır. Ayrıca donmanın hücrelerde oluşturduğu hasarın da en az seviyelerde olması gerekmektedir. Dondurma sırasında meydana gelen hücresel hasarın iki ana sebebi bulunmaktadır. Bunlardan birincisi buz kristallerinin oluşmasına bağlı olarak şekillenen fiziksel hasar, ikincisi ise hücre içi çözünen maddelerin konsantrasyonlarından kaynaklanan kimyasal hasarlardır. Dondurma aşamasında sıcaklığın kontrollü bir şekilde azaltılması veya hücresel koşulların değiştirilmesi ile hücrelerde oluşacak hasarları en az seviyeye indirmek ya da önleyebilmek mümkün olmaktadır. Kriyoprotektanlar kullanılarak hücrenin hızlı bir şekilde soğutulması ile ortaya çıkabilecek fiziksel hasarların oranı düşürülebilmektedir. Dolayısıyla kullanılacak kriyoprotektanın en az toksisiteye sahip olması, hücre içine nüfuz edebilmesi ve çok düşük sıcaklıklara dayanabilmesi gerekmektedir. Kriyoprotektan benzeri ajanların kullanımı da hücreleri dondurma çözdürme sonrası oluşabilecek hasarlardan koruyabilmektedir. Bu nedenle sunulan tez projesinde, kriyoprotektif etkili ajanların kullanılması ile üstün nitelikli hayvanların spermalarının hasar oluşmadan dondurulması ve çözdürülmesi sonrası uygun bir zamanda suni tohumlamada kullanılması, böylece yararlı genlerin aktarımının da süreklilik kazanması umulmaktadır.

Ülkemizde suni tohumlama oranı hayvancılık yönünden ilerlemiş ülkelere kıyasla çok azdır. Özellikle spermatozoonların saklanması sırasında oluşan kriyojenik hasarlar, dondurma çözdürme sonrası motilite oranlarını düşürmektedir. Bu çalışmada spermatozoonların dondurulması sırasında eklenen melatonin, katalaz ve kolesterol ile kriyojenik hasarları azaltarak, dondurma çözdürme sonrası motiliteyi artırmak ve bunun fertilite üzerine etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

Tez çalışmam ve doktora eğitimimin her aşamasında hiçbir yardımını ve tecrübesini esirgemeyen başta danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN'a ve Prof. Dr. Abdullah KAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tez çalışmam süresince tecrübelerini ve bilgilerini esirgemeyen Prof. Dr. Mustafa Numan BUCAK'a teşekkür ederim. Sunulan tez çalışmasının uygulamalarında bana yardımlarını

esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Mustafa BODU'ya ve Dr. Öğr. Üyesi Ali Erdem ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamın materyal kısmında tüm yardımlarını esirgemeyen ve laboratuarlarını kullanmam konusunda bana yardımcı olan Süper Genetik Suni Tohumlama Hay. Tic. San. Ltd. Şti. Firmasına ve sahibi Veteriner Hekim Halil AYDIN çok teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında bana inancı tam olan ve beni bu günlere getiren, tüm zor zamanlarımda maddi ve manevi yanımda olan kıymetli aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Sunulan tez çalışması 19202081 proje numarası ile desteklenmiştir. Tez projemi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **v**
ÖZET ..... **vii**
SUMMARY ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
1.1. Suni Tohumlamanın Tarihçesi 2
1.2. Ejakülat 4
1.2.1. Boğa Spermasının Özellikleri 6
1.3. Spermanın Sulandırılması 7
1.3.1. Sperma Sulandırıcılarına Eklenen Katkı Maddeleri 8
1.4. Spermatozoonlarda Flow Sitometri Analizi 26
1.4.1. Spermatozoon Canlılığı 27
1.4.2. Spermatozoon Plazma Membran ve Akrozom Bütünlüğü 28
1.4.3. Spermatozoon Mitokondriyal Membran Bütünlüğü 29
1.4.4. Spermatozoonlarda Reaktif Oksidatif Stresinin Belirlenmesi 30
1.5. Boğalardan Sperma Alma Yöntemleri 30
1.5.1. Suni Vajen ile Sperma Alma Yöntemi 30
1.5.2. Elektro-ejakülatörle Sperma Alma Yöntemi 31
1.6. Boğalarda Spermanın Sulandırılması 32
1.6.1. Boğa Spermasının Yumurta Sarısı İçeren Tris Sulandırıcısı ile Sulandırılması 33
1.7. Spermanın Ekilibrasyonu 33
1.8. Boğalarda Spermanın Dondurulması 34
2. GEREÇ VE YÖNTEM **35**
2.1. Hayvan Materyali 35
2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması 36
2.3. Spermanın Alınması 38
2.4. Spermanın Muayenesi 38
2.4.1. Spermanın Mikroskopik Muayenesi 39
2.5. Sulandırıcının Hazırlanması 39
2.5.1. TRİS Hazırlanması 39
2.6. Spermanın Sulandırılması 41

2.7. Ekilibrasyon (Alışım) 45
2.8. Spermanın Dondurulması 45
2.9. Spermanın Çözdürülmesi 45
2.10. CASA ile Motilite Oranlarının Belirlenmesi 46
2.11. Flow Sitometri Muayeneleri 46
2.11.1. Spermatozoon Canlılık Oranının Belirlenmesi 47
2.11.2. Spermatozoon Plazma Membran ve Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi 47
2.11.3. Spermatozoon Mitokondrial Oksidatif Stresin Belirlenmesi (Mitosox/PI) 48
2.11.4. Spermatozoonlarda Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi 48
2.12. Çözdürme Sonrası 2. Saat Motilite Muayeneleri 49
2.13. Suni Tohumlama Uygulamaları 50
2.14. İstatistiksel Analizler 50
3. BULGULAR 51
3.1. Çalışmanın I. Bölümünde Dondurulan Payetlerin Çözdürme Sonrası Motilite Değerleri 51
3.2 Çalışmanın II. Bölümünde A, B, C Boğalarından Elde Edilen Payetlerin Çözdürme Sonrası Motilite Değerleri 52
3.3. Flow Sitometri Muayene Sonuçları 54
3.4. Çözdürme Sonrası 2. Saat Motilite Değerleri 56
3.5. Fertilite Sonuçları 58
4. TARTIŞMA 59
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 79
6. KAYNAKLAR 80
7. EKLER 91
EK-A: Etik Kurul Onayı 91
8. TURNİTİN RAPORU 92
9. ÖZGEÇMİŞ 102

SİMGELER VE KISALTMALAR

-	Eksi
+	Artı
±	Artı-Eksi
%	Yüzde
º	Derece
<	Küçüktür
=	Eşittir
>	Büyüktür
≤	Küçük Eşittir
≥	Büyük Eşittir
/	Bölme
ºC	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
AI	Artificial Insemination/Suni Tohumlama
ATP	Adenozin Trifosfat
BSA	Bovine Serum Albumin/Sığır Serum Albumini
BSP	Bovine Seminal Plasma/ Sığır Seminal Plazması
CASA	Computer Assisted Semen Analysis/Bilgisayar Destekli Sperma Analizi
CAT	Katalaz
CD	Cyclodextrin/Siklodekstrin
CLC	Cholesterol-Loaded Cyclodextrin/Kolesterol Yüklü Siklodekstrin
CPA	Cryoprotectant Agent/Kriyoprotektan Ajanlar
DMSO	Dimetilsülfoksit
EH	Etidyum Homodimer
FC	Flow Cytometre/Flow Sitometre
FCS	Flow Cytometre Standart/Flow Sitometre Standartları
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
GSH	Glutathione Peroxidase/Glutatyon Peroksidaz
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
IU	International Unit/ Internasyonal Ünite
IVF	In Vitro Fertilizasyon
kDa	Kilodalton

LDL	Low Density Lipoprotein/Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LN_2	Liquid Nitrogen/Sıvı Nitrojen
LPO	Lipid Peroksidasyon
mA	Miliamper
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O_2	Oksijen
OH^-	Hidroksil Radikali
OS	Oksidatif Stres
PI	Propidyum Iodür/ Propidyum İyodür
PMAI	Plasma Membrane and Acrosome Integrity
PSA	Pisium Sativum Aglutinin
RIA	Recenctly by Immunoassays
RNS	Reactive Nitrogen Species/Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reactive Oxygen Species/Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAS	Tris Ana Solüsyonu

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Boğa Spermasının Dondurulmasında Yumurta Sarısı İçeren Tris Sulandırıcısına Katalaz, Melatonin ve Kolesterol ilavesinin Sperma Kalitesi ve Fertilite Üzerine Etkisi

Gökhan YILMAZ

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA 2022

Boğa spermasının dondurulmasında yumurta sarısı içeren tris sulandırıcısına katalaz, melatonin ve kolesterol ilavesinin sperma kalitesi ve fertilite üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla sunulan bu tez çalışmasında normospermi gösteren üç boğadan suni vajen yoluyla elde edilen ejakülatlar %20 yumurta sarısı ve %6 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırıldı. İlk bölümde sulandırılan ejakülatlar on eşit parçaya ayrıldı. Gruplar kontrol, melatonin 0,1 mM/ml, melatonin 1 mM/ml, melatonin 3 mM/ml, katalaz 50 IU/ml, katalaz 150 IU/ml, katalaz 300 IU/ml, kolesterol-siklodekstrin (CLC) 1,25 µg/ml, CLC 2,5 µg/ml ve CLC 5 µg/ml olacak şekilde oluşturuldu. Her gruptan 45 adet payet dondurulduldu. Payetlerin çözdürme sonrası motilite değerleri CASA ile belirlendi. En yüksek motilite değerlerine sahip gruplar çalışmanın II. bölümünde kullanıldı. Bu bölümdeki gruplar kontrol, melatonin 0,1 mM/ml, katalaz 150 IU/ml, CLC 2,5 µg/ml, melatonin 1 mM/ml + katalaz 150 IU/ml, melatonin 1 mM/ml + CLC 2,5 µg/ml, katalaz 150 IU/ml + CLC 2,5 µg/ml ve melatonin 1 mM/ml + katalaz 150 IU/ml + CLC 2,5 µg/ml olacak şekilde oluşturuldu. Çalışmanın bu bölümünde her gruptan 51 adet payet dondurulduldu. Çözdürme sonrası motilite değerleri CASA ile belirlendi. Çalışmanın II. bölümünde A ve C boğalarına ait örneklerde motilite değerleri açısından gruplar arasında istatistiki farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$). B boğasına ait örneklerde motilite değerleri açısından gruplar arasında istatistiki farklılık önemli bulundu ($p<0,05$). Üç boğada en yüksek motilite değerini sağlayan katalaz 150 IU/ml ve CLC 2,5 µg/ml grupların sperma örnekleri flow sitometride değerlendirildi. A boğasına ait sperma örneklerinde canlı spermaztozoon (SYBR+) analizleri açısından gruplar arasında istatistiki farklılık önemli bulundu ($p<0,05$). A boğasına ait sperma örneklerinde plazma membran ve akrozom bütünlüğü (FITCH-PI-), mitokondriyal oksidatif stres (MITOSOX+) ve ROS değerleri (BODIPY+) açısından gruplar arasında istatistiki farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). B ve C boğalarına ait sperma örneklerinde plazma membran ve akrozom bütünlüğü (FITCH-PI-), canlı spermatozoon muayenesi (SYBR+), mitokondriyal oksidatif stres (MITOSOX+) ve ROS değerleri (BODIPY+) açısından gruplar arasında istatistiki farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). A, B ve C boğalarına ait sperma örneklerinde çözdürme sonrası 0. saate motilite değerleri açısından katalaz (150 IU/ml) grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiki farklılık önemli bulundu ($p<0,05$). A, B ve C boğalarına ait sperma örneklerinde çözdürme sonrası 2. saat motilite değerleri açısından katalaz (150 IU/ml) grubu ile kontrol grubu ve kolesterol (2,5 µg/ml) grubu ile kontrol grubu arasında istatistiki farklılık önemli bulundu ($p<0,05$). A, B ve C boğalarına ait spermalarla yapılan tohumlamaları takiben elde edilen gebelik oranları açısından gruplar (kontrol, katalaz (150 IU/ml), kolesterol (2,5 µg/ml)) arasında istatistiki farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

Sonuç olarak melatonin, katalaz ve CLC'in boğa spermatozoonlarına eklenmesi, dondurma çözdürme sonrası spermalarda motiliteyi koruduğu, ayrıca katalazın boğa spermatozoonlarına eklenmesi dondurma çözdürme sonrası plazma membran ve akrozomal membran bütünlüğünü koruduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Katalaz; Kolesterol; Melatonin; Spermatozoon; Yumurta Sarısı;

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

The Effects of Catalase, Melatonin and Cholesterol Addition to Tris Diluent Containing Egg Yolk on the Sperm Quality and Fertility in Freezing Bull Sperm

Gökhan YILMAZ

Department of Reproduction and Artificial Insemination

PhD THESIS / KONYA 2022

It was aimed to determine the effect of catalase, melatonin and cholesterol addition to tris diluent containing egg yolk on the semen quality and fertility in the freezing of bull semen.

For this purpose, in the present thesis study, ejaculates obtained from three bulls with normospermia through artificial vagina were diluted with tris diluent containing 20% egg yolk and 6% glycerol. In the first part, diluted ejaculates were split into ten equal parts. The groups were comprised of control, melatonin 0,1 mM/ml, melatonin 1 mM/ml, melatonin 3 mM/ml, catalase 50 IU/ml, catalase 150 IU/ml, catalase 300 IU/ml, cholesterol-cyclodextrin (CLC) 1,25 µg/ml, CLC 2,5 µg/ml and CLC 5 µg/ml. 45 straws were frozen from each group. Motility values of straws after thawing were determined by CASA. The groups with the highest motility values were included in the second part of the study. Groups at this part were made up as control, melatonin 0.1 mM/ml, catalase 150 IU/ml, CLC 2.5 µg/ml, melatonin 1 mM/ml + catalase 150 IU/ml, melatonin 1 mM/ml + CLC 2.5 µg /ml, catalase 150 IU/ml + CLC 2.5 µg/ml and melatonin 1 mM/ml + catalase 150 IU/ml + CLC 2.5 µg/ml. In this part of study, 51 straws were frozen from each group. Post-thaw motility values were determined by CASA. In the second part of the study, no statistically significant difference was observed among the groups in tems of motility values in the samples belonging to A and C bulls ($p > 0.05$). A statistically significant difference was found among the groups in terms of motility values in the samples of B bulls ($p<0.05$). The semen samples of catalase 150 IU/ml and CLC 2.5 µg/ml groups, which provided the highest motility value in three bulls, were evaluated in flow cytometry. Statistical difference was found to be significant among the groups in terms of live sperm (SYBR+) analysis of semen samples of A bull ($p<0.05$). No statistical difference was observed among the groups in terms of plasma membrane and acrosome integrity (FITCH-PI-), mitochondrial oxidative stress (MitoSOX+) and ROS values (BODIPY+) in semen samples of bull A ($p>0,05$). No statistical difference was observed among the groups in terms of plasma membrane and acrosome integrity (FITCH-PI-), live sperm examination (SYBR+), mitochondrial oxidative stress (MitoSOX+) and ROS values (BODIPY+) in semen samples belonging to bulls B and C ($p > 0.05$). The statistical difference between the catalase (150 IU/ml) group and the control group was found to be significant in terms of motility values at the zeroth hour after thawing in the semen samples belonging to A, B and C bulls ($p<0.05$). Statistical difference was found between catalase (150 IU/ml) group and control group and cholesterol (2.5 µg/ml) group and control group in terms of motility values in the second hour after thawing in the semen samples belonging to A, B and C bulls ($p<0.05$). No statistical difference was observed between the groups (control, catalase (150 IU/ml), cholesterol (2.5 µg/ml)) in terms of pregnancy rates obtained after insemination with the semen belonging to A, B and C bulls ($p>0.05$).

As a result, it was concluded that adding melatonin, catalase and CLC to the bull spermatozoa preserves motility in semen after freezing and thawing, also adding catalase to the bull spermatozoa preserves the integrity of the plasma membrane and acrosomal membrane after freezing and thawing.

Key Words: Catalase, Cholesterol, Melatonin, Spermatozoa, Egg Yolk

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun artışına paralel olarak ihtiyaç duyulan hayvansal protein açığını kapatmak için dünya genelinde hayvansal üretimin artırılması ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Hayvansal üretimi artırmanın en önemli yolu suni tohumlama ve embriyo transferidir. Bu tekniklerin çiftlik hayvanlarında tercih edilmesinin ana nedeni hayvansal gıdaya daha hızlı ulaşım için çiftlik hayvanlarının fertilitesini artırarak, genetik ilerleme oranını hızlandırmaktır. Genetik ilerlemenin hızlandırılması üstün verim özelliklerine sahip boğaların sperması ile binlerce inek veya düvenin tohumlanmasıyla oluşturulmaktadır (Ombelet ve Van Robays 2015). Sığırcılık işletmelerinde genetik ilerleme genelde iki şekilde yapılmaktadır. Bunlardan biri üstün genetik verime sahip boğaların suni tohumlamada kullanılması, diğeri de verim yönünden yüksek dişi buzağıların zamanla sürüdeki ineklerin yerini alması şeklindedir (Chupin ve Schuh 1993, Dana ve Kanbid 1998, Vishwanath ve Shannon 2000). Suni tohumlama ve embriyo transferi teknikleri süt yönlü işletmelerde verimi artırmanın yanında, hayvanlardaki genetik ilerlemenin hızlandırılması ve ürogenital sistem hastalıklarının önlenmesi gibi önemli işlevlere de sahiptir. Bazı ürogenital sistem hastalıkları çoklu doğal aşım sırasında boğalardan ineklere bulaşarak yavru kayıplarına ve süt veriminin düşmesine neden olmaktadır (Ball ve Peters 2008). Günümüzde modern teknik ve teknolojilerin kullanılarak spermatozoonların analizinin ve değerlendirilmesinin yapılması, X ve Y kromozomları içeren spermatozoonların ayırt edilebilmesi daha sağlıklı ve verimli hayvansal üretimlerin yolunu açmaktadır.

Suni tohumlama damızlık erkek hayvanların yetiştirilmesi, spermanın alınması, değerlendirilmesi, korunması ve tohumlama ile ilgili yöntemlerle birlikte tohumlama yapılacak dişi hayvanın genotipi, sağlığı, östrus tespiti ve dişilerdeki östrojen döngüsünün kontrolünde önemlidir (Foote 2010). Suni tohumlamada önemli olan diğer bir özellikte kullanılan tekniktir. Dünyanın hemen her ülkesinde inek ve düvelerin suni tohumlamasında rektovaginal teknik kullanılmaktadır. Bu tekniğin en büyük avantajı ineğin gebe olup olmadığının ya da genital sistem organlarında gebeliği

önleyecek herhangi bir olumsuz durumun bulunup bulunmadığının Veteriner Hekim tarafından kontrol edilebilmesidir. Böylelikle ürogenital sistem hastalıklarının tedavisi yapılarak bu hastalıkların önüne geçilmektedir (Ball ve Peters 2008). Değişen ekosistem ve insan nüfusun artış hızına bağlı olarak birçok hayvan ırkının nesli tükenmekle karşı karşıya kalmıştır. Nesilleri tükenme tehlikesi altında olan ırkların korunması içinde suni tohumlama önem arz etmektedir.

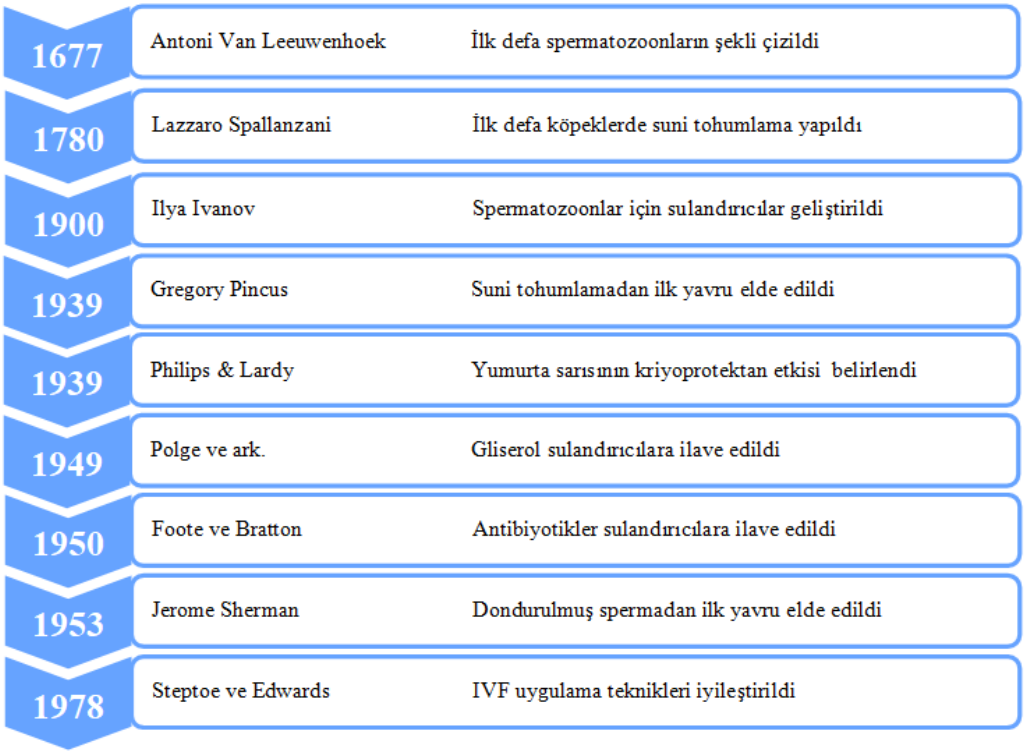
Ülkemiz hayvancılığının en büyük sorunlarının başında hayvancılıktaki verim düşüklüğü gelmektedir. Hayvan türlerimizin verimlerini hayvancılıkta ileri olan ülkeler ile kıyasladığımızda ülkemizin verim yönünden gerilerde kaldığı görülmektedir. Hayvanların bireysel verimlerini artırmanın en hızlı yolu ırkın ıslah edilmesidir. Kalıtsal verimin artırılması anlamına gelen ırk ıslahı, üstün kalıtsal yapıya sahip erkek ve dişi hayvanların yaygınlaştırılmasıyla mümkün olmaktadır. Bu yaygınlaştırma kısa süre içerisinde suni tohumlama ve embriyo transferi teknikleri ile mümkün olabilmektedir.

1.1. Suni Tohumlamanın Tarihçesi

Tarihte bilinen ilk suni tohumlama uygulamasının 14. yüzyılda bir Arap şeyhinin kısrağını rakibinin daha üstün özelliklerdeki aygırından gizlice aldığı sperma ile yapıldığı bildirilmektedir (Foote 2010). İnsan ve köpek ejakülatları içerisinde *animalculus* olarak tanımlanan spermatozoonlar ilk defa Antoni Van Leeuwenhoek (1678) tarafından geliştirilen mikroskop ile görüntülenmiştir (Ombelet ve Van Robays 2015, Korkmaz ve Çil 2020). Gerçek anlamda ilk bilimsel suni tohumlama uygulaması İtalyan bilim insanı Lazaro Spallanzani (1780) tarafından gerçekleştirilmiştir. Spallanzani evinde beslediği dişi köpeğini kızgınlık göstermesi üzerine erkek köpekten aldığı sperma ile tohumlamıştır. Köpek 62 gün sonra kendisine ve sperması alınan erkek köpeğe benzeyen üç yavru doğurmuştur (Ax ve ark 2000, Foote 2010, Ombelet ve Van Robays 2015). Rus bilim insanları 1900 yılların başlarında çiftlik hayvanları üzerinde suni tohumlama uygulamalarına başlamışlardır. Suni tohumlama uygulamalarına yönelik ilk girişimler 1899'da Ilya Ivanovich Ivanoff (Rusya, 1870-1932) tarafından başlatılmıştır. Ivanoff evcil çiftlik hayvanları, köpekler, tavşanlar ve kümes hayvanlarında suni tohumlama çalışmaları gerçekleştirmiştir. Bu çalışmalara Rus bilim insanı olan Milovanov katkı sağlamış ve geliştirmeye devam etmiştir. Milovanov (1938), Journal of Heredity adlı dergide “ilk defa Rusya'da suni

tohumlama" adlı bilimsel araştırmasını yayınlatmıştır. İlave olarak Milovanov, bugün kullanılanlara çok benzeyen ilk suni vajeni tasarlamıştır (Ombelet ve Van Robays 2015). İlk suni tohumlama kooperatifi Danimarka'da 1936 yılında Sorenson tarafından kurulmuştur. Köpeklere uygun olan ilk suni vajen Roma üniversitesinde fizyolojisi profesörü olan Guiseppe Amentea (1914) tarafından icat edilmiştir. Boğa, koç ve aygırlar için suni vajenler Rus bilim insanları tarafından geliştirilmiştir. Elektrojakülatörün icat edilmesi ise 1940'lı yıllarından sonra olmuştur (Ball ve Peters 2008, Walters ve ark 2009, Foote 2010).

Yumurta sarısının içerdiği fosfolipidler ve lipoproteinlerden kaynaklanan koruyucu etkisi 1940'da ilk defa P.H. Phlips ve H.A. Lardy tarafından belirlenmiş ve sperma sulandırıcısına ilave edilmeye başlanılmıştır (Phillips ve Lardy 1940). Salisbury ve ark (1941); düşük sıcaklıklarda spermatozoonları daha iyi korumak için yumurta sarısı ilaveli sodyum sitratlı sulandırıcıları geliştirmişlerdir. Bu sayede spermatozoonların motilite ve canlılık kaybı olmaksızın 5°C'de üç güne kadar yaşadıkları belirlenmiştir. Polge ve ark (1949) ise; gliserolün kriyoprotektif madde olarak rol oynadığını belirlemişler ve sulandırıcıya gliserol ekleyerek kümes hayvanları ve boğalara ait spermaları dondurmuşlardır. Sperma sulandırıcılarına penisilin, streptomisin ve polimiksim B gibi antibiyotikler uzun yıllardır ilave edilmektedir (Foote ve Bratton 1950). Boğa ejakülatları ilk defa kuru buz (-79 ^{o}C) üzerinde Bratton ve ark (1954) tarafından dondurulmuş ve çözüm sonu canlılıkların devam ettiği tespit edilmiştir (Bratton ve ark 1955).



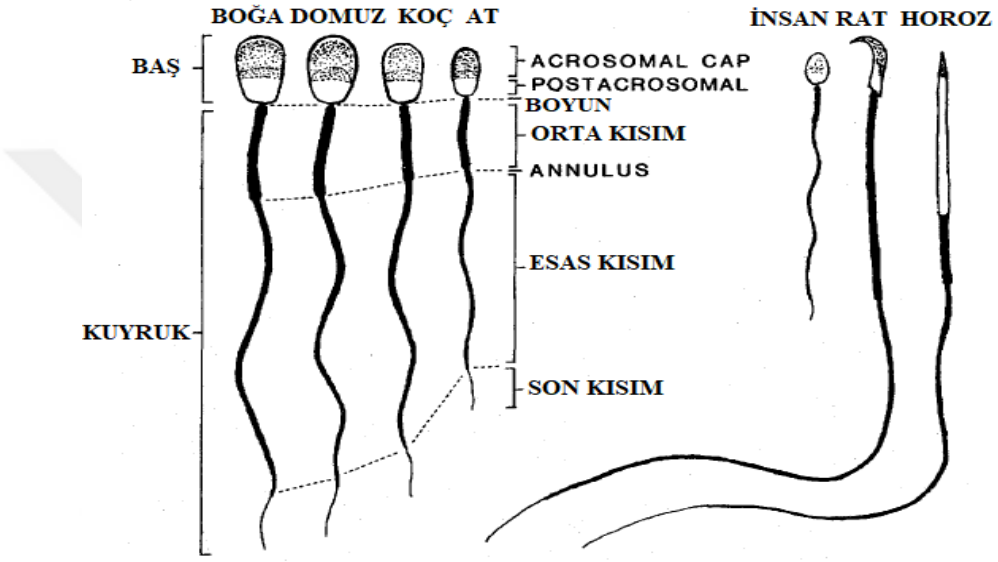
Şekil 1.1. Tarihte suni tohumlama alanındaki önemli gelişmeler (Foote 2010).

Ülkemizde evcil hayvanlarda ilk suni tohumlama uygulamaları 1930'lu yıllarda Bursa ve Balıkesir bölgesinde bulunan çiftliklerdeki kısrak, inek ve keçilerde başlamıştır. Ülkemizde dondurulmuş sperma kullanımı ile suni tohumlama uygulamaları yaygınlaştırılmıştır. Türkiye'de boğa spermasının ilk defa dondurulması İsveçli Veteriner Hekim Polson (1970) tarafından Lalahan Veteriner Zootekni Araştırma Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir. Özel sektöre suni tohumlama yetkisi 1985 yılında tanınmıştır (Gençdal ve ark 2015).

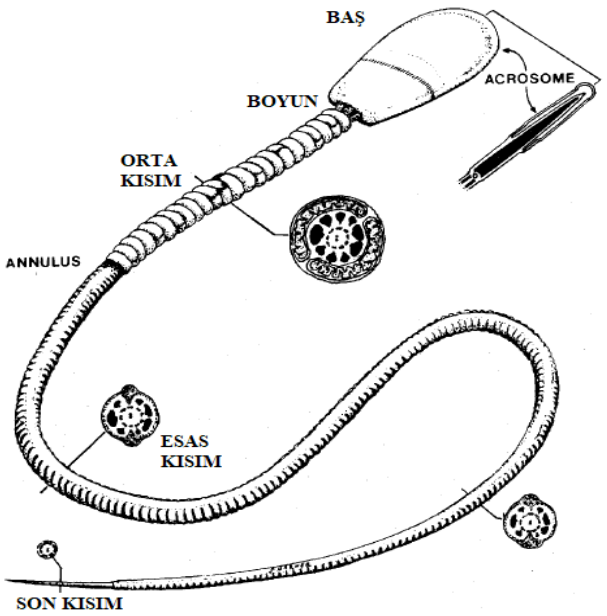
1.2. Ejakülat

Ejakülasyon ile ampulla ductus deferensten penis yolu ile gelen, içerisinde spermatozoon ve eklenti bezleri sıvıları içeren süspansiyona ejakülat denilmektedir. Ejakülatın hacmi ve yoğunluğu hayvan türlerine göre değişiklik göstermektedir. Küçük cüsseli evcil hayvanlarda ejakülatın hacmi az yoğunluğu fazla, büyük cüsseli hayvanlarda ise ejakülatın hacmi fazla yoğunluğu ise daha düşük olmaktadır (Chenoweth ve Lorton 2014).

Özel bir yapıya sahip olan spermatozoon baş, orta ve kuyruk kısmı olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır (Yoshida 2000). Türe bağlı olarak spermatozoonların baş kısmının şekli değişmektedir. Spermatozoonun baş kısmı akrozom ve çekirdek olmak üzere iki kısma ayrılır. Boyun kısmı baş ile kuyruk kısmını birbirine bağlamaktadır. Kuyruk boyun, orta, esas ve son (uç) kısım olmak üzere dört bölüme ayrılmaktadır. Kuyruk kısmının en önemli organelleri mitokondria ve aksonemadır (Çoyan ve ark 2002, Kaya ve ark 2014).



Şekil 1.2. Türlere göre spermatozoon şekillerinin karşılaştırılması (Garner ve Hafez 2000).



Şekil 1.3. Boğa spermatozoon şekli (Garner ve Hafez 2000).

1.2.1. Boğa Spermasının Özellikleri

Boğa spermasının rengi ejakülatın kıvamına, içerdiği spermatozoon sayısına ve erkek eklenti bezlerinin salgısına bağlı olarak değişmektedir. Boğa sperması, genel olarak fildişinden açık krem rengine kadar değişmekte olup krema ya da süt kıvamında homojen bir sıvıdır. Bazı boğalarda sarı rengin görülmesi sperma içerisinde bulunan riboflavin pigmentinden kaynaklanmaktadır (Jainudeen ve Hafez 2000).

Yoğunluk, birim hacimde bulunan spermatozoon sayısıdır. Boğalarda spermatozoon yoğunluğu, sağlık durumu, testis ağırlığı, yaş, sperma alma sıklığı, bakım ve beslenme durumu, cinsel uyarım yoğunluğu, ejakülat miktarı ve bulunduğu ortamın çevresel faktörlerine bağlı olarak değişebilmektedir. Ejakülatın hacmi alındıktan sonra dereceli sperm toplama kadehi ya da pipetle ölçülebilmektedir. Boğa ejakülatının hacmi ortalama olarak 2-8 ml arasında değişmektedir. Boğa ejakülatlarındaki spermatozoon yoğunluğu ise ortalama olarak 800-2000 $x10^6$ /ml arasında değişmektedir (Jainudeen ve Hafez 2000).

Ejakülatın pH'sı ejakülata dışarıdan yabancı herhangi bir maddenin karışıp karışmadığı veya eklenti bezlerinde fonksiyonel bir bozukluk olup olmamasına göre değişmektedir. Boğa spermasının pH'sı ortalama olarak 6,4-7,8 arasında değişmekte olup genel olarak pH 6,2 – 6,8 arasındadır (Jainudeen ve Hafez 2000).

Hancock (1952); boğa spermasının elektron mikroskobunda ilk defa detaylı bir şekilde incelenmesinin Bretschneider ve Van Iterson tarafından 1949 yılında yapıldığını ifade etmektedir. Boğa spermatozoonlarının uzunluğu yaklaşık olarak 53,5 µm (baş kısmı 6,8 µm, orta kısım 9,8 µm ve kuyruk kısmı da 36,9 µm) olarak bildirilmiştir (Cummins ve Woodall 1985).

Motilite; herhangi bir yönde hızlı ve güçlü hareket eden spermatozoonların hareketsiz ya da diğer hareket biçimlerini gösteren spermatozoonlara oranı olarak tanımlanmaktadır. Boğa ejakülatlarının motilite oranı %0-%90 arasında değişmektedir. Nativ spermadaki motilite oranı %70'in altında olan boğaların damızlık değeri daha düşüktür. Spermatozoonların motilitesi, dişi genital kanalına bırakıldığı bölümden fertilizasyon bölgesi olan ampullaya (ampulla isthmus) ulaşmasını kolaylaştırmak ve oositin fertilizasyonunu sağlamak açısından önemlidir (Ax ve ark 2000).

Spermatozoonların ölü–canlı oran tespiti çeşitli boyalar ile yapılmaktadır. Membran bütünlüğü bozulmuş ölü spermatozoonların baş kısımları boyaları içlerine alırken, canlı spermatozoonların baş kısımları boyaları içlerine almazlar. Genel olarak ölü-canlı spermatozoonların oranının tespiti için eozin, eozin-nigrosin, SYBR/PI boyaları kullanılmaktadır (Ax ve ark 2000, Gillan ve ark 2005).

Anormal spermatozoonlar esas olarak kusurlu spermatogenezin bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Bu durum genetik hastalıklardan kaynaklı veya olumsuz çevresel koşullara bağlı olarak şekillenmektedir (Ball ve Peters 2008). Anormal spermatozoonlar oluşum aşamasında primer, sekonder ve tersiyer kökenli olarak üç bölüme ayrılmaktadırlar. Spermatozoonun baş kısmı ve akrozomu ile ilgili anomaliler primer anomaliler, boyun kısmı ile ilgili anomaliler sekonder anomaliler ve kuyruk kısımları ile ilgili anomaliler ise tersiyer anomaliler olarak değerlendirilmektedir. Bir ejakülatta anormal spermatozoon oranının %25'den fazla olması fertilite oranlarında düşmeye neden olmaktadır (Herman ve ark 1994).

1.3. Spermanın Sulandırılması

Bir boğanın ejakülatı fertilizasyonun oluşması için gerekli olandan çok daha fazla spermatozoon içermektedir. Spermatozoonların sulandırılması birçok düve ya da ineğin tohumlanmasına olanak sağlamaktadır. Bir ejakülat; spermatozoon sayısı, ejakülat kalitesi (motilite, yoğunluk vb), boğanın fertilite oranı ve spermanın bırakılma yerine göre farklı oranlarda sulandırılabilmektedir (Arthur ve ark 1996). Suni tohumlama uygulamalarının ekonomik ve pratik değeri üzerine en etkili faktör spermatozoonların muhafaza edilme şekilleridir. Boğalardan alınan ejakülat hemen nativ olarak ya da sulandırılarak birkaç gün içerisinde kullanılmayacak ise dondurma işlemine tabi tutulmaktadır. Ayrıca genetik yönden üstün özeliklere sahip boğaların spermalarına yetiştiricilerin gösterdikleri büyük talepleri zamanında karşılamak içinde dondurularak saklanmaktadır (Sevinc ve Hafs 1961). Spermatozoonların uzun süre saklanabilmesi için, metabolizmalarının yavaşlatılması veya durdurulması gerekmektedir. Böylelikle ömürleri uzatılarak uzun süreli muhafazaları sağlanmaktadır (Yoshida 2000). Spermatozoonlar ani bir sıcaklık düşüşüne maruz kalırlarsa, aktivitelerinde geri dönüşü olmayan hasarlar oluşabilmektedir (Hancock 1952). Spermatozoonların dondurulmasında en önemli nokta membran bütünlüğünün korunmasıdır. Bu sebeple sulandırıcılara kriyoprotektanlar eklenmektedir. Boğa

sperması genellikle yumurta sarısı, homojenize süt, yağsız süt tozu, hindistan cevizi sütü ve Tris bazlı sulandırıcı ile de sulandırılabilmektedir (Ax ve ark 2000).

1.3.1. Sperma Sulandırıcılarına Eklenen Katkı Maddeleri

Yumurta Sarısı

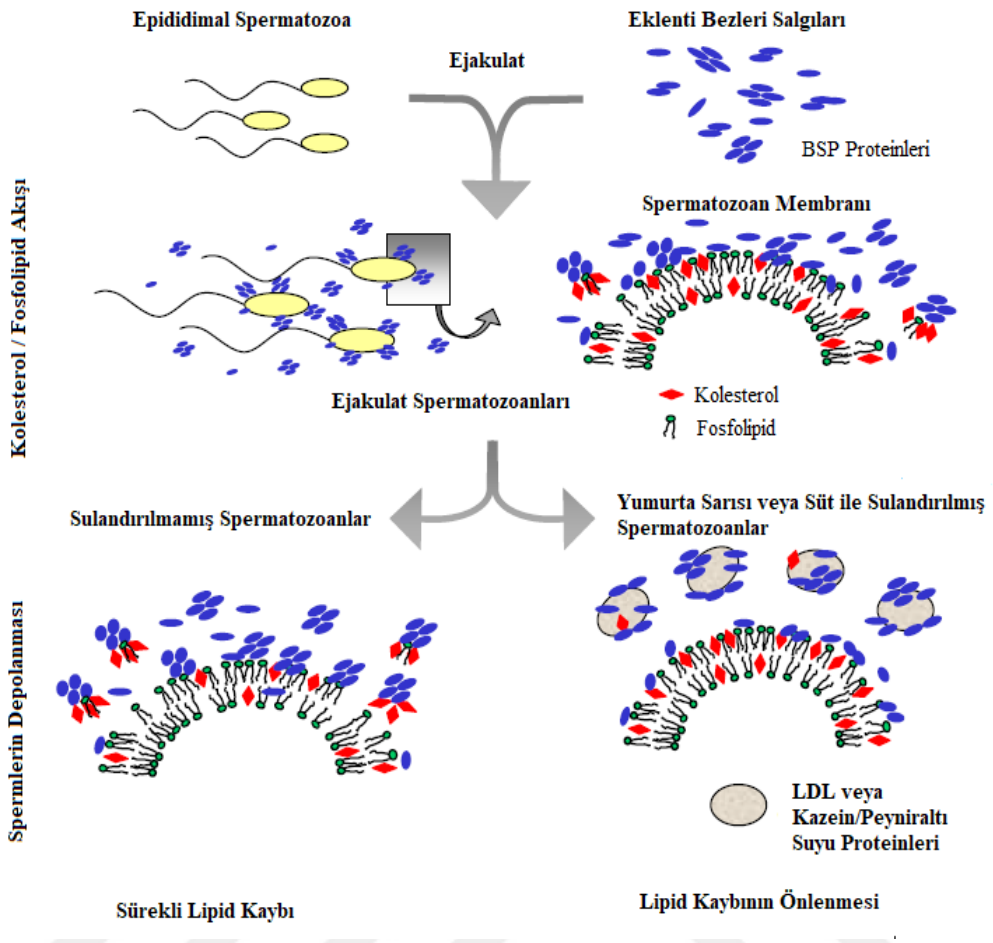
Yumurta sarısı ihtiva ettiği fosfolipitlerden dolayı spermatozoonları soğutma ve dondurma işlemleri esnasında soğuk şokuna karşı korumaktadır. Yumurta sarısında bulunan kolesterol, lesitin, fosfolipit ve düşük yoğunluktaki lipoproteinler dondurma sırasında spermatozoonları soğuk şokuna karşı korumanın yanında spermatozoonların canlılıklarını sürdürebilmesine yardım etmektedir (Blackshaw 1954, Pace ve Graham 1974). Yumurta sarısında bulunan LDL'lerin (Low Density Lipoprotein) %75 lipitlerden, %25'i ise rezidüal lipoproteinler oluşmaktadır (Evans ve ark 1973). Yumurta sarısındaki düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL), spermatozoon membranının etrafını sararak dondurma-çözdürme işlemleri esnasında oluşacak hasarlara karşı spermatozoonları korumaktadır (Amirat ve ark 2004). Ayrıca bu LDL'ler seminal plazmada bulunan Bovine Seminal Plasma (BSP)'leri bağlamakta ve onların spermatozoon membranına tutunmasını engelleyerek spermatozoon membranında bulunan kolestereol ile fosfolipidlerin kayıplarını önlemektedir (Hu ve ark 2010).

Seminal plazma; testis, epididimis ve eklenti bezlerinin salgılarından oluşmaktadır. Seminal plazma spermatozoonların dişi genital kanalına taşınmasına yardımcı olmakla beraber, spermatozoonlar için hem yararlı hem de zararlı olabilmektedir (Killian ve ark 1993, Bergeron ve Manjunath 2006, Moura ve ark 2006). Seminal plazma, sperma motilitesi (Acott ve Hoskins 1978), kapasitasyonu (Killian ve ark 1993) ve fertiliteyi kolaylaştırma açısından yararlı olurken (Miller ve ark 1990) boğa spermasının depolanmasında ve kriyoprezervasyonunda ise zararlı olabilmektedir (Dott 1974). Seminal plazma kompozisyonu türlere göre değişiklik gösterebilmektedir (Pluciennicczak ve ark 1999).

BSP proteinleri ejakülasyon sırasında spermatozoon membranında bulunan kolin fosfolipidlerine bağlanarak spermatozoon membranındaki kolesterol ile fosfolipit akışını uyarmaktadır (Thérien ve ark 1999, Manjunath ve ark 2002). Dişi genital kanalda spermazoonlara bağlı BSP proteinleri oviduktal/foliküler sıvı

bileşenleri (yüksek yoğunluklu lipoproteinler gibi) ile etkileşime girmektedir. Böylece ikinci bir kolesterol akışını uyarmakta ve kapasitasyonun oluşmasını sağlamaktadır. Bir diğer alternatif yol ise; spermatozoonlara bağlı BSP proteinleri oviduktal/foliküler sıvıda bulunan glikozaminoglikanlar ile etkileşime girerek spermatozoon proteinlerinin tirozin fosforilasyonunu tetiklemekte ve kapasitasyonun oluşumuna yol açmaktadır (Thérien ve ark 2005).

Farklı türlerden elde edilen ejakülatların dondurma öncesi yoğunlukları azaltılmaz ise; spermatozoonlar sürekli olarak yüksek düzeyde BSP proteinlerine maruz kalacağı için membranlarındaki lipid kayıpları devam edecek ve membran bütünlükleri bozulacaktır. Bu durumda soğuk şoku ve donmaya karşı spermatozoonların dirençlerinde azalma şekillenecektir (Bergeron ve Manjunath 2006, Hu ve ark 2010). Yumurta sarısı ve süt spermatozoonların kısa süreli veya donmuş halde saklanabilmeleri amacı ile elli yılı aşkın süreden itibaren kullanılmaktadır. Uzun süredir kullanılmalarına rağmen her iki ajanın spermatozoonları koruma mekanizmaları bugüne kadar belirsizliğini korumaya devam etmektedir. Bu mekanizmaları açıklayabilmek için son yıllarda yapılan birçok çalışmadan elde edilen bulguların bir kısmı şu şekildedir; ilk olarak boğa seminal plazmasında bulunan bir fosfolipid bağlayıcı protein ailesinin (BSP), spermatozoon membranından lipid akışını uyardığı için spermatozoonların korunmasında olumsuz etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. İkinci olarak, BSP'ler bugüne kadar incelenen tüm türlerde (aygır, koç, keçi, bizon ve yaban domuzu) önemli miktarda tespit edilmiştir. Üçüncü olarak, yumurta sarısı içeren sulandırıcıların ana bileşeni olan LDL'in, seminal plazmanındaki bu BSP'ler ile etkileşime girdiği belirtilmiştir. Dördüncü olarak, bu etkileşimin spermatozoonlardan lipid kayıplarını engellemesi spermatozoonların kısa süreli veya dondurulmuş halde depolanmasına olumlu katkı sağlamaktadır. Bu ve bunun gibi tespitler yumurta sarısı içeren sulandırıcıların spermatozoonlar üzerindeki koruyucu etkisini, içerdikleri LDL'ler tarafından seminal plazmada bulunan BSP proteinleri bağlayıp spermatozoonların membranından uzaklaştırılması ile sağladıklarını göstermektedir (Manjunath ve ark 2002, Bergeron ve Manjunath 2006, Bergeron ve ark 2007). Böylelikle sulandırıcıya ilave edilen yumurta sarısı -20 ^{o}C'ye kadar spermatozoonların membranındaki lipit faz geçişine etki etmek sureti ile onları soğuk şokuna karşı korumaktadır (Drobnis ve ark 1993).



Şekil 1.4. Yumurta sarısı ve sütün spermatozoonları koruma mekanizması (Bergeron ve Manjunath 2006).

Sulandırıcılar

Boğa sperması asidik bir pH'ya sahiptir. Kriyoprezervasyon esnasında spermatozoonların metabolik aktivitelerden dolayı laktik asit üretimi artmakta ve oluşan laktik asitin diğer asitlerle beraber hücre dışına salınması ortamdaki pH'nın düşmesine neden olmaktadır. Düşen pH sonucu artan asidik ortam spermatozoonlara zarar verip ömürlerini kısaltmaktadır (Iritani 1980). Spermatozoonların sulandırılması için kullanılacak olan sulandırıcılar, farklı sıcaklık ve çevre koşullarında pH'yı dengeleyebilmelidirler (Gadea 2003).

Spermatozoonların sulandırılması ve saklanması amacıyla tampon maddeler kullanılmaya başlanmıştır. İlk kullanılan tampon madde fosfattır. Daha sonra sitratın bulunması ve sitratın yumurta sarısında bulunan protein fraksiyonlarının eriyebilirliğini artırmasından dolayı fosfatın yerine kullanılmaya başlanmıştır (Vishwanath ve Shannon 2000). Araştırmacılar 1970'lerden sonra fosfat ve sitrattan

daha iyi tamponlama kapasitesine sahip olacak organik sulandırıcılar üzerine çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır. Bu çalışmalarda toksik olmayan, spermatozoonlara nufüz edebilen ve pH değişimlerine karşı hücreleri koruyabilen maddeleri bulmak amaçlanmıştı. Tris bazlı sulandırıcıya yumurta sarısı ve gliserolün ilavesi 1963 yılında gerçekleşmiştir. Günümüzde farklı hayvan türlerinin ejakülatlarının sulandırılması ve dondurulması için hazır ticari sulandırıcılar bulunmaktadır (Vishwanath ve Shannon 2000).

Kriyoprotektan Maddeler

Hücreleri dondurma işlemine bağlı oluşabilecek hasarlara karşı koruyan maddelere kriyoprotektan denilmektedir. Spermatozoonların soğutulması, dondurulması ve çözdürülmesi sırasında hücrelerde meydana gelebilecek fiziksel ve kimyasal etkilerin yanı sıra oksidatif stres sonucu oluşan intraselüler kristal (buz) oluşumu, soğuk şoku ve serbest radikallerin oluşturduğu hasarları en aza indirmek amacıyla kriyoprotektanlar kullanılmaktadır (Cerolini ve ark 2001, Holt ve ark 2014, Öztürk ve ark 2019). Kriyoprotektan maddelerin dozları ve koruyucu etkileri hayvan türü, spermanın dondurulma metodu ve sulandırıcının kimyasal bileşenine göre değişiklik gösterebilmektedir (Foote ve Arriola 1987, Salamon ve Maxwell 2000).

Gliserolün düşük sıcaklıkta hücreleri koruyabileceğinin tespit edilmesi, spermatozoon kriyobiyoloji teorisinin oluşumunda belirleyici faktör olmuştur. Böylelikle spermatozoonlar dondurularak saklanan ilk memeli hücresi olmuştur (Bucak ve Tekin 2007, Sathe ve Shipley 2014). Gliserolün kriyoprezervasyondaki rolü spermatozoonun membran bütünlüğünü korumasıdır (Öztürk ve ark 2019). Gliserolün kriyoprotektan olarak kullanımının başlaması ile spermatozoonların yıllarca depolanıp saklanabilmesine olanak sağlanmıştır (Chatterjee ve ark 2001).

Spermanın dondurulması ile birlikte yüksek verimli boğalardan daha fazla yararlanarak suni tohumlama uygulamalarının tüm dünyaya yayılması ve sürülerin kolayca ıslah edilmesi sağlanmıştır (Holt ve ark 2014). Süt yönlü işletmelerde suni tohumlama amacıyla kullanılacak boğa spermasının dondurulma protokollerinin geliştirilmesi 1950'lerde başlanılmıştır. Bratton ve ark. (1955); pellet (-79^{o}C'de kuru buz) içerisinde dondurdukları boğa sperması ile gebelik elde edilebileceğini göstermişlerdir. Yumurta sarısı ve gliserolün koruyucu etkileri sulandırıcıların

geliştirilmesine katkı sağlamıştır. Boğa spermatozoonlarını dondurmak için standart haline gelen tris - yumurta sarısı - gliserol sulandırıcısı bu çalışmalar sonucu ortaya çıkmıştır (Foote 1970, Sathe ve Shipley 2014). Boğa spermatozoonlarının korunmasında gliserol ve yumurta sarısı sinerjik bir etki oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar boğalarda dondurma çözdürme sonrası spermatozoonların motilitesi ve fertilite yeteneğinin sulandırıcıda bulunan gliserol oranına bağlı olarak değiştiğini göstermektedir (Anzar ve ark 2019, Bucak ve ark 2021). Gliserol hücre içine kolayca nüfus ederek bulunduğu ortamın donma noktasını düşürmekte, spermatozoonların su kaybetmesini sağlamakta, su moleküllerinin yapısını değiştirerek büyük buz kristallerinin oluşmasını engelleyerek spermatozoonların zarar görmelerini önlemektedir. Gliserol ayrıca hücre membranının permeabilitesini artırarak ekstrasellüler olarak spermatozoonların korunmasını sağlamaktadır (Çoyan ve ark 2002, Öztürk ve ark 2019, Anzar ve ark 2019).

Günümüzde en yaygın kullanılan kriyoprezervasyon yöntemi, spermatozoonların sıvı nitrojen içerisinde (LN_2 = Liquid Nitrogen) depolanmasıdır. Bu işlemler hızlı ya da yavaş dondurma yöntemleri kullanılarak veya programlanabilir bir dondurucu ile yapılabilmektedir. Kullanılan bu dondurma yöntemlerinde, spermatozoon hücrelerinde buz oluşumunu önlemek için sulandırıcıya düşük moleküler ağırlıklı bir kriyoprotektan eklenmektedir (Sharma ve ark 2015, Bucak ve ark 2015). Uzun süreli saklama amacıyla kullanılacak sulandırıcılara eklenecek kimyasalların; ozmotik basıncı optimize ederek spermatozoon hücrelerinde buz oluşumunu önleyebilme, pH'yı optimize ederek spermatozoonların zarar görmesini engelleyebilme, spermatozoonlara hücre dışı enerji sağlayabilme ve bakteriyel kontaminasyonu önleyebilme (antibiyotikler içermesi) özelliklerine sahip olmaları gerekmektedir. En yaygın kullanılan kriyoprotektanların başında yumurta sarısı-gliserol gelmektedir. Bu karışım, spermatozoonların hücre membranlarını korumakta ve hücrelerdeki ozmotik stresi önlemektedir (Sarıözkan ve ark 2014, Bucak ve ark 2015).

Spermatozoonların kriyoprezervasyonu, çiftlik hayvanlarının ıslahında ve nesli tükenmekte olan türlerin korunmasında önemli role sahiptir. Spermatozoonların dondurulması uzun süre saklanmalarını sağlamakta ve uzak populasyonlar arasında genetik materyal alışverişini kolaylaştırmaktadır (Steponkus ve ark 1983). Kriyo-

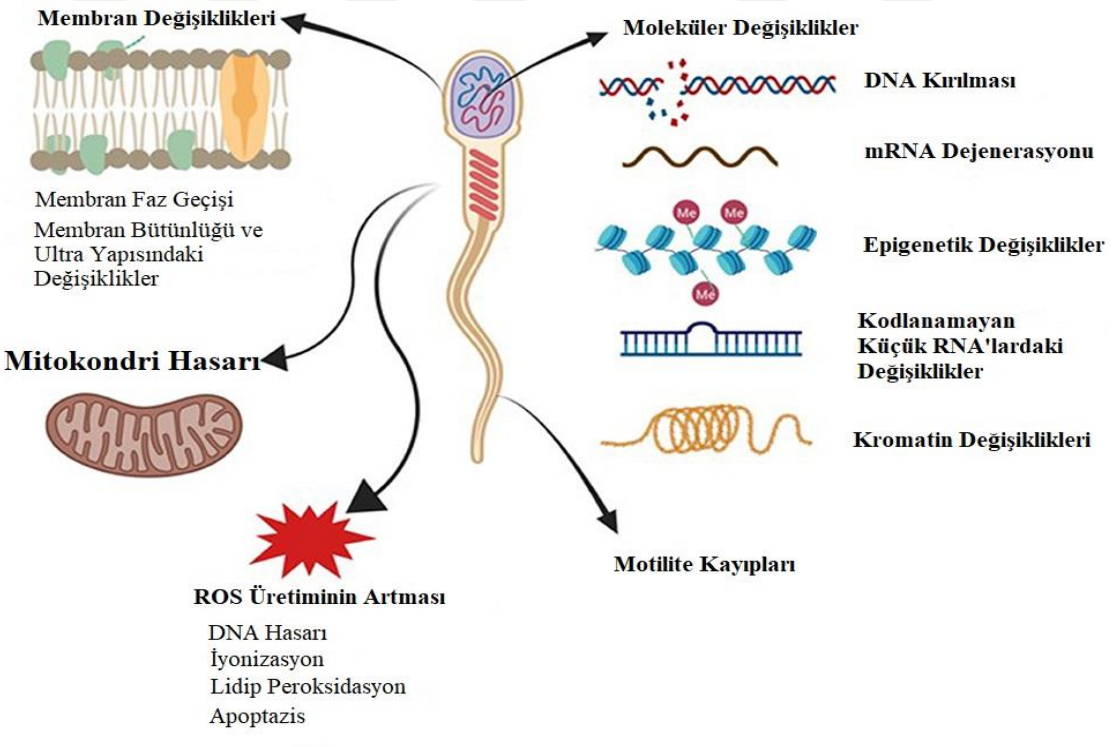
hasarlar; sıcaklık değişimini, ozmotik stresin uyarılmasını, spermatozoonların hücre yapısını ve fizyolojilerini değiştirerek geri dönüşümsüz hasarlara neden olan buz kristallerinin oluşumuna bağlı olarak şekillenmektedir (Amidi ve ark 2016). Kriyoprezervasyon, spermatozoonun saklanma süresini uzatmasına rağmen, dondurma sırasında meydana gelebilen kriyo-hasarlar, spermatozoon motilitesinde azalmaya, akrozomal hasara, mitokondriyal membran depolarizasyonuna, kriyo-kapasitasyon ve plazma membran geçirgenliğinde değişiklere sebep olabilmektedir. Spermatozoonların dondurularak saklaması çalışmalarında dondurma işleminin, spermatozoonlarda motilite ve canlılık kaybı, plazma membranın stabilizasyonu, akrozomal bütünlüğün bozulması ve fertilite yeteneğinin azalması gibi hasarlara neden olduğu tespit edilmiştir (Steponkus ve ark 1983, Bailey ve ark 2000, Holt 2000). Bu ve benzeri hasarlara bağlı olarak suni tohumlama başarısı azalmakta ve önemli ekonomik kayıplar şekillenmektedir (Chung ve ark 2019, Singh ve ark 2020). Dondurma-çözdürme sürecinde ozmotik dengedeki değişiklikler, reaktif oksidanların ve hücre içi buz kristallerinin aşırı oluşumu spermatozoonların yapısını bozmaktadır (Öztürk ve ark 2019).

Spermatozoonlar dondurma-çözdürme işlemleri esnasında çevrelerinde bir dizi fiziksel ve kimyasal değişikliklere maruz kalmakta (Woelders 1997) ve böylelikle spermatozoonlarda geri dönüşümü olmayan değişiklikler şekillenmektedir (Andrabi 2009). Spermatozoonlarda kolesterol kaybı, membran akışkanlığı, membran geçirgenliği ve ozmotik dirençte azalmaya sebep olmakta, kriyokapasitasyon, erken akrozom reaksiyonu ve apoptoz benzeri değişikliklere yol açarak spermatozoonların fertilitelerinde azalma ile birlikte (Watson 2000) ölümlere bile sebep olabilmektedir (Nijs ve ark 2009). Bu nedenle spermanın sulandırılması ve dondurulması için antioksidan ve kriyoprotektif ajanlara (CPA = Cryoprotectant Agent) ihtiyaç duyulmaktadır (Watson 2000, Ugur ve ark 2019). Spermatozoonların kriyoprezervasyonu, ön soğutma, hücrenin su kaybı, dondurma, saklama ve sonra çözdürme işlemlerinden oluşmaktadır (Ugur ve ark 2019).

Spermatozoonları dondurma sırasında buz kristallerinin neden olabileceği fiziksel ve kimyasal stres faktörlerinden korunabilmek için permeabl ve nonpermeabl kriyoprotektanlar kullanılmaktadır. Hücre içine nüfuz eden kriyoprotektanlar ortamda bulunan toksisitenin azaltmasına yardımcı olurken, hücre içine nüfuz etmeyen

kriyoprotektanlar ise vitrifikasyona yardımcı olabilmektedir. (Oldenhof ve ark 2010, Öztürk ve ark 2017).

Spermatozoon hücreleri vücuttaki diğer hücrelerden farklı olarak, düşük su içeriği ve membran yapılarındaki yüksek akışkanlıklar nedeniyle kriyo-hasarlara karşı daha az duyarlıdır. Buna rağmen kriyo hasarlar kriyoprezervasyon esnasında spermatozoon bütünlüğüne zarar verebilmektedir (Hammerstedt ve ark 1990, Baust ve ark 2009). Baust ve ark. (2009); soğutma ve dondurma aşamalarında hücreleri etkileyen stres faktörlerini; soğutma esnasında şekillenen, metabolik ayrışma, iyon dengesizliği, proteazların aktivasyonu, hücresel asidoz şekillenmesi, enerji yoksunluğu, membran faz geçişi, serbest radikallerin veya reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu, buz kristali oluşumu, hiper-ozmolarite, hücre hacmi değişiklikleri ve protein denatürasyonu şeklinde özetlemiştir. Oluşan bu değişikliklere bağlı olarak spermatozoonlarda plazma ve akrozom membran bütünlüğünün bozulması, mitokondriyal aktivitede azalmalar, ROS oluşumu, DNA bütünlüğünün bozulması, spermatozoon motilitesi ve canlılığında azalma şekillenebilmektedir (Chatterjee ve ark 2001, Öztürk ve ark 2019).



Şekil 1.5. Dondurma-çözdürme işlemlerinin boğa sperması üzerindeki morfolojik ve fizyolojik etkilerinin özeti (Ugur ve ark 2019).

Ön soğutma işlemi plazma membranındaki lipidlerin faz geçişlerine neden olmanın yanı sıra yapısal bütünlük ile iyon metabolizması için gerekli olan spermatozoon membran proteinlerinin işlevlerini de bozabilmektedir. Bununla birlikte hücre dışı buz kristallerinin oluşumu ve buna bağlı olarakta spermatozoonlarda ozmotik basınç değişikliği ile su kaybına neden olabilmektedir. Oluşan bu değişiklikler spermatozoon membranlarında bulunan çift katmanlı lipit tabakasının stabilitesinin azalmasına yol açabilmektedir (Öztürk ve ark 2019).

Spermatozoonların ısılarının 30^{o}C'den 5^{o}C'ye hızlı bir şekilde düşürülmesi sırasında soğuk şoku meydana gelebilmektedir. Buna bağlı olarak spermatozoon metabolizması ile motilitesinde azalmalar, plazma, mitokondri ve akrozom mebranlarında değişikler meydana gelebilmektedir (Gillan ve Maxwell 1999, Pena ve ark 2009).

Permeabl kriyoprotektanlar (Gliserol, Etilen Glikol, Amid Türevleri, Dimetil sülfoksit [DMSO], Propilen Glikol ve 1,2-propandiolün) hücre içine nüfuz ederek membran akışkanlığının ve dehidrasyonun artması ile hücre içinde buz kristalleri oluşumunu azaltarak, canlılığın korunmasına yardımcı olmaktadırlar. Nonpermeabl (Yumurta Sarısı, Yağsız Süt, Trehaloz, Amino Asitler, Dekstroz ve Sukroz gibi Şekerler, EDTA) kriyoprotektanlar plazma membranını geçemediklerinden, hücre dışında donma sıcaklığını düşürerek hücre dışı buz oluşumunu azaltarak hücreleri korumaktadırlar (Tuncer ve ark 2011, Büyükleblebici ve ark 2014, Sathe ve Shipley 2014). Gliserol diğer CPA'lara göre ozmotik uyarı oluşturarak hücrelerin dehidrasyonuna neden olduğu için boğa spermatozoonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Barbas ve Mascarenhas 2009). Bu kriyoprotektanlar su molekülleri ile etkileşime girerek buz kristallerinin oluşması için gerekli olan hidrojen bağlarının oluşumunu engellemektedirler. Kriyoprotektan ların etki mekanizmaları oldukça karmaşık ve çok faktörlüdür, ancak esas olarak bu bileşiklerin suyun donma noktasını ve dolayısıyla buz kristali oluşumu için gerekli olan ısı derecesini düşürdüğü bilinmektedir (Fuller 2004, Öztürk ve ark 2019). Güngör ve ark. (2019); boğalardan aldıkları ejakülatları, %20 yumurta sarısı ve %7 gliserol (permeable kriyoprotektan) içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya katalaz (400 µg/ml), trehaloz (nonpermeable kriyoprotektan; 50 mM/ml), sistein (1 mM/ml), trehaloz (50 mM/ml) + sistein (1 mM/ml) ve trehaloz (50 mM/ml) + sistein (1 mM/ml) + katalaz (400 µg/ml) eklemişler ve kontrol grubu ile birlikte beş grup

oluşturmuşlardır. Sonuç olarak araştırmacılar sulandırıcıya eklenen katalaz ilave edilen grup hariç diğer gruplarda motilite oranını kontrol grubuna göre önemli ölçüde korunduğunu ifade etmektedir.

Şekerler

Her canlı organizma gibi spermatozoonlarında hayatta kalabilmesi için enerji kaynağına ihtiyaçları vardır. Spermatozoonlar enerji ihtiyaçlarını genellikle fruktoz gibi basit şekerler ile sağlamaktadırlar (Ball ve Peters 2008, Tuncer ve ark 2011). Fruktoz daha çok meyvelerde bulunmasına rağmen spermatozoonların başlıca enerji kaynağıdır (Mann 1946). Sperma sulandırıcısına glukoz, trehaloz, riboz, raffinoz, sakkaroz ve galaktoz gibi farklı türden şekerler enerji kaynağı olarak ilave edilmiştir (Evans ve Maxwell 1987, Tuncer ve ark 2011). Glikoz ve fruktoz oksidasyon veya glikolizis yoluyla spermatozoonlar tarafından kullanılabilmektedir (Ford ve Rees 1990). Şeker ve gliserol gibi maddeler bulundukları ortamda viskoziteyi artırarak ortamda çözünmüş halde bulunan maddelerin kristalleşmesini önlerler ve bulundukları ortamın mekanik özelliklerini değiştirirler (Nicolajsen ve Hvidt 1994, Woelders 1997).

Yıldız ve ark. (2000); köpeklerden aldıkları ejakülatları %20 yumurta sarısı ve %8 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya 70 mM/ml dozunda farklı yapıda monosakkarit (fruktoz, galaktoz, glukoz, ksiloz), disakkarit (laktoz, trehaloz, maltoz, sükroz), trisakkarit (raffinoz) şekerlerden eklemişler ve kontrol grubu ile toplamda on grup oluşturmuşlardır. Sonuç olarak araştırmacılar sulandırıcıya eklenen şekerlerin kontrol grubuna göre daha fazla motiliteyi koruduğunu, ayrıca fruktoz ve ksilozun kontrol grubu ve diğer gruplara göre akrozom hasar oluşumunu azalttığını, motilite ve canlılığı daha iyi koruduğunu belirlemişlerdir.

Antimikrobiyal Maddeler

Sperma sulandırıcısına hayvansal kökenli yumurta sarısı ilave edilmesi veya süt içeren sulandırıcıların kullanılması dişi genital kanalda kontaminasyona sebep olabilmektedir. Bu sebeple sulandırıcıya eklenecek olan kimyasal ajanların mikrobiyal açıdan temiz olmasına dikkat edilmeli ve bunu önleyebilmek için sulandırıcıya belirli antibiyotiklerin ilave edilmesi gerekmektedir (Sevinç 1984, Bergeron ve Manjunath 2006).

Foote ve Bratton (1950); sperma sulandırıcına streptomisin, penisilin, polimiksin, penisilin + streptomisin ve sulfanilamid ilavesinin fertilite oranlarını artırdığını ifade etmişlerdir. Almquist ve Zaugg (1974); sütlü sulandırıcı içine 150 µg/ml lincomisin + 300 µg/ml spectiomisin, 1000 IU/ml penisilin + 1000µg/ml neomisin ve 1000 IU/ml penisilin + 1000 µg/ml streptomisin ekleyerek elde ettikleri ejakülatları dondurmuşlardır. Araştırmacılar yaptıkları tohumlamları takiben geri dönmeme oranlarının farklı antibiyotik gruplarında benzerlik gösterdiğini ve adı gecen antibiyotiklerin sulandırıcıya ilavesinin kontaminasyonu engellediğini vurgulamışlardır.

Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin ve oksidatif stresin neden olduğu hasarlara karşı hücreleri koruyan özel kimyasal bileşiklere ve/veya enzimlere antioksidan denilmektedir (Halliwell ve ark 1995, Ari ve Ozturkler 2015). Spermatozoonların dondurma-çözdürme işlemleri esnasında maruz kaldıkları fiziksel ve kimyasal etkiler canlılıklarının azalmasına neden olmaktadır (Fernández-Santos ve ark 2009). Birçok hayvan türünde de gözlendiği gibi dondurarak saklamanın zararlı etkilerinden birisi de reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesidir (Chatterjee ve Gagnon 2001). Evcil hayvanlarda suni tohumlama veya in vitro fertilizasyon (IVF) esnasında, spermatozoonların oksijen temasına maruz kalmalarına bağlı olarak reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu artmaktadır. ROS oluşumu spermatozoonlar üzerinde zararlı etkiye neden olabilmektedirler (VanDemark ve ark 1949, Steinbach ve Foote 1967). Dondurma-çözdürme esnasında ROS miktarı oluşumunun artması spermatozoonlarda DNA hasarı, hücre iskeleti değişiklikleri, sperm-oosit füzyonunun inhibisyonuna ve motilite kayıplarına yol açmaktadır (Lopes ve ark 1998, Chatterjee ve Gagnon 2001, Fernández-Santos ve ark 2009). ROS seviyelerinin artışı ile anormal spermatozoon oluşumu (anormal baş, akrozom anomalileri, orta parça anomalileri, sitoplazmik damlacıklar ve kuyruk hasarları) arasında önemli pozitif korelasyon vardır. Anormal spermatozoon artışına bağlı olarak ROS seviyelerinin yükselmesi, spermatozoonlarda fertiliteyi düşürmekte ve hatta infertiliteye sebep olabilmektedir (Sikka 2001, Bucak ve ark 2010, Sabeti ve ark 2016).

Spermatozoon membranlarının yüksek miktarda doymamış yağ asitleri içermesi ve antioksidan içeren sitoplazmik bileşenlerden yoksun olmalarından dolayı

O_2, H_2O_2 ve lipid peroksidasyonuna karşı duyarlı olmaktadırlar (Foote ve ark 2002). Reaktif oksijen bileşikleri tarafından uyarılan lipid peroksidasyonu, hücre membranlarının fosfolipid bileşenlerine doğrudan zarar vermesinden dolayı reaktif gruplar radikal oluşum bölgesinden daha uzak bölgelerde dahi etki gösterebilirler (Cheeseman 1993).

Yüksek seviyede ROS üretimi, glikolitik enzimleri etkisiz hale getirebilmekte, akrozomal membranlara zarar verebilmekte ve spermatozoon hareketliliğini azaltabilmektedir (Alvarez ve Storey 1984). Antioksidanlar reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu engelleyen moleküller olduklarından (Sanocka ve Kurpisz 2004), dondurma-çözdürmeye bağlı olarak meydana gelen ROS etkilerini azaltmak amacıyla sulandırıcıya ilave edilmektedirler (Pena ve ark 2003, Fernández-Santos ve ark 2009). Bu amaçla sperma sulandırıcılarına katalaz, süperoksit dismutaz, α-tokoferol, askorbik asit, karotenoidler ve melatonin gibi antioksidanlar eklenmektedir (Medrano ve ark 2017). Sperma sulandırıcıları için en önemli antioksidanlar süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalazdır (Sanocka ve Kurpisz 2004). Sulandırıcıya ilave edilen antioksidanlar oksidatif stresi azalttığı için dondurma-çözdürme işlemlerinde motilite kayıplarını önleyerek spermatozoon motilitesini iyileştirmektedir (Berra ve Rizzo 2009, Ashrafi ve ark 2013).

Sperma sulandırıcılarına BSA, glutatyon, resveratrol, E vitamini, metiyonin, karnitin, inositol, bitki kaynaklı özlerden yeşil çay özü (ekstreti), mikroalg olan Spirulina maxima ekstresi, trehaloz ve selenyum gibi antioksidanların eklenmesi; oksidatif hasarları azaltmakta, akrozom membran bütünlüğünü korumakta ve çözdürme sonrası motilite kaybını engellemektedir (Ugur ve ark 2019). Katalaz, GSH, süperoksit dismutaz (SOD), taurin gibi diğer eksojen antioksidanların ilavesi ise ROS oluşumunu nötralize etmekte ve boğa spermatozoonlarının motilitesini korumaktadır (Bilodeau ve ark 2001). Antioksidanlar endojen ve eksojen antioksidanlar diye iki gruba ayrılmaktadır (Félix ve ark 2021).

Tablo 1.1. Endojen ve eksojen antioksidanların sınıflandırılması (Bansal ve Bilaspuri 2010, Karabulut ve Gülay 2016).

Endojen Antioksidanlar	Enzimatik Antioksidanlar	Katalaz, Süperoksit dismutaz (SOD), Glutatyon redüktaz (GR), Glutatyon peroksidaz (GPx)
	Nonenzimatik Antioksidanlar	Melatonin, Glutatyon, Koenzim Q10, Selenyum, Ürik asit, α-lipoik asit, Bilirubin, Seruloplazmin, Albümin, Transferrin
Eksojen Antioksidanlar	Vitamin Eksojen Antioksidanlar	β-karoten (Vitamin A), Folik asit (Vitamin B9), Askorbik asit (Vitamin C), α-Tokoferol (Vitamin E)
	İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar	Trolox-C (vitamin E analoğu), Rekombinant süperoksit dismutaz, NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kal-siyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar), Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten), Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein), Nötrofil adezyon inhibitörleri, Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin), Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin), Sitokinler (TNF ve IL-1), Demir şelatörleri, Barbitüratlar

Wafa ve ark. (2021); Buffalo boğalarından aldıkları ejakülatları %10 yumurta sarısı ile %7 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya Koenzim Q10 (nonenzimatik antioksidan; 0,03 mM/ml), L-karnitin (3,0 mM/ml) ve N-Acetil-sisteine (1,0 mM/ml) dozlarını eklemişler ve kontrol grubu ile birlikte dört grup oluşturmuşlardır. Sonuç olarak araştırmacılar sulandırıcıya eklenen antioksidan dozlarının kontrol grubuna göre daha fazla motilite kaybını, anormal spermatozoon ve akrozomal hasar oluşumunu engellediğini, spermatozoon canlılığını ve plazma membran bütünlüğünü koruduğunu belirlemişlerdir.

Melatonin

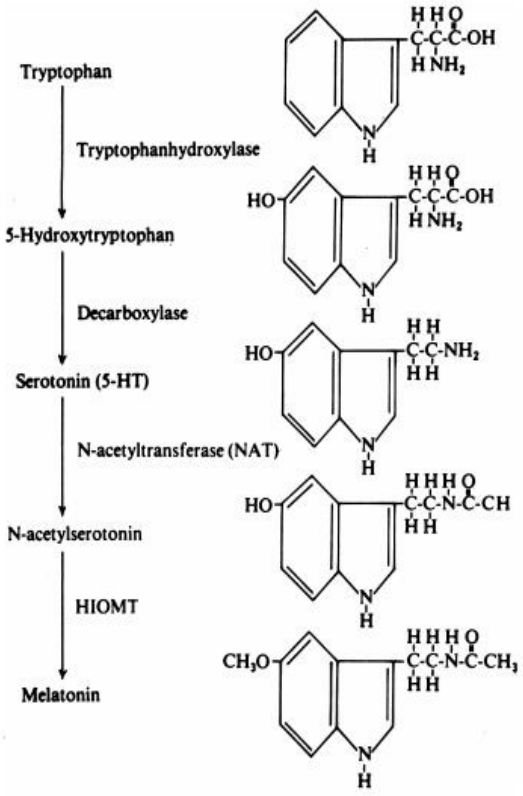
Melatoninin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) pineal bezlerden salgılandığı ilk defa Lerner ve ark. 1958 yılında belirlenmiştir. Amfibilerin derisinde bulunan epidermal melanositlerin ***mela****nin* dağılımı üzerine etkiye sahip olmaları ve *sero****tonin***inde bir metoksi türevi olmasından dolayı melatonin adı verilmiştir (Reiter

1973, Wetterberg 1979, Reiter ve ark 2000). Melatonin memelilerde pineal bezler dışında retina, lenfositler, ovaryumlar, göz merceği, kemik iliği, safra ve gastrointestinal sistemden de sentezlenip salgılanabilen bir hormondur (Reiter ve ark 1995, Tan ve ark 1999). Memelilerde melatonin salgılanması karanlık ve ışık döngüsüne bağlı olarak hipotalamustan kontrol edilmektedir. Melatoninin yağda ve suda çözünürlüğü yüksektir. Dolaşımda bulunan melatoninin büyük bir kısmı epifiz bezinden salgılandığı için vücudun tüm dokularına hızlıca ulaşabilmekte, hücre membranlarından kolayca geçebilmekte ve hücre içi reseptörlerle etkileşime girebilmektedir (Jan ve ark 2011). Melatonin, mevsimsel üremenin kontrolü yanında birçok fizyolojik fonksiyona katılıp, immun sistem ile circadian (biyolojik saat) ritimlerine de etki etmektedir (Reiter ve ark 2000). Melatonin salgısının gece pik düzeye ulaştığı, ışık ortamında ise salınımının azaldığı ayrıca bakteriler, protozoalar, bitkiler, mantarlar, omurgasız canlılar ile birçok omurgalı canlıların dokularından sentezlendiği belirtilmektedir (Hardeland ve ark 2006).

Melatonin, hidroksil ve peroksil radikalleri yakalayıp ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Antioksidan olarak başka bir özelliği de lipofilik olmasıdır (Okatani ve ark 2000). Melatoninin OH^- (hidroksil) radikalini nötralize edici etkisi glutatyondan 5 kat fazla olmakta ve OH^- (hidroksil) radikalinin inaktivasyonunda ise E vitamininden 2 kat daha fazla etkilidir (Reiter ve ark 2000). Melatoninin serbest radikaller üzerinde dolaylı etkisi de bulunmaktadır. Melatonin hidroperoksitleri metabolize eden Glutathione Peroxidase (GSH-Px) enzimini aktive eder, O_2 radikalini H_2O_2'ye kataliz eden Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesini artırır, oksidatif stres esnasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önleyerek nitrik oksit (NO) oluşumundan sorumlu nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe ederek antioksidan etki gösterir (Reiter ve ark 2000, Reiter ve ark 2009). Melatonin ayrıca, doğrudan toksik oksijen türevlerini temizlemesi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktife nitrogen türlerinin (RNS) oluşumunu azaltma etkisinden dolayı, tüm makromoleküllerin oksidatif ve nitrosatif zararlarını önleyen güçlü bir antioksidan olmanın yanı sıra anti-apoptotik ajandır. Erkek üreme dokularında melatonin olduğu bildirilmiştir. Melatonin memeli spermatozoon fonksiyonunun korunmasında yararlı etkiye sahiptir ve spermatozoonun morfolojik özelliklerini iyileştirmektedir (Cruz ve ark 2014).

Inyawilert ve ark (2021); Buffalo boğalarından aldıkları ejakülatları %20 yumurta sarısı ve %7 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırılmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya melatonin farklı dozlarını (0,1 mM/ml; 0,5 mM/ml; 1,0 mM/ml; 2,0 mM/ml; 3,0 mM/ml) eklemişler ve kontrol grubu dahil toplamda altı grup oluşturmuşlardır. Sonuç olarak araştırmacılar sulandırıcıya 0,1 mM/ml melatonin ilavesinin diğer doz gruplarına göre motilite oranını önemli ölçüde koruyucu etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

ChaithraShree ve ark (2020); boğalardan aldıkları ejakülatları yumurta sarısı ile gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya melatonin farklı dozlarını (0,1 mM/ml; 0,2 mM/ml; 0,25 mM/ml) eklemişler ve kontrol grubu ile dört grup oluşturmuşlardır. Sonuç olarak araştırmacılar sulandırıcıya 0,1 mM/ml ve 0,25 mM/ml melatonin eklenen grupların kontrol grubuna göre daha fazla motiliteyi iyileştirdiğini, 0,1 mM/ml melatonin eklenen grubunun ise kontrol grubu ve diğer melatonin gruplarına göre akrozom hasar oluşumunu azalttığını, plazma membran bütünlüğü ve kriyohasarlara karşı spermatozoonları koruduğunu belirlemişlerdir.



Şekil 1.6. Melatoninin üretim şekli (Reiter ve ark 2000).

Katalaz

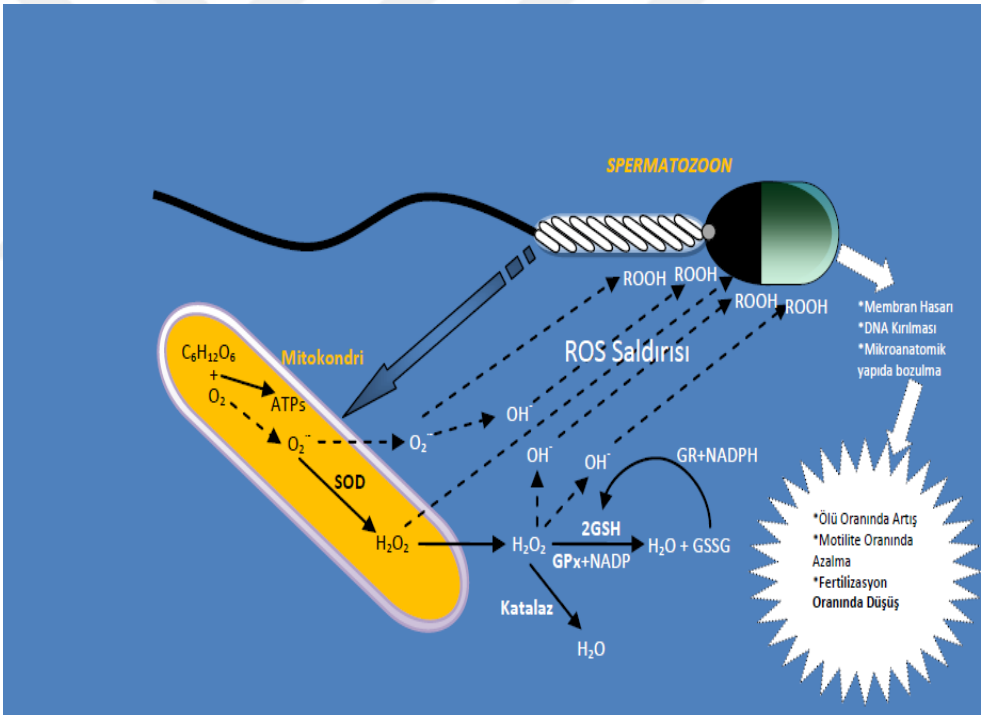
Louis Jacques Thenard (1818); hidrojen peroksitin hayvansal dokular tarafından gaz halinde oksijene ($2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$) ayrıştığını gözlemlemiştir. Loew (1901) bu etkinin katalaz adını verdiği spesifik bir enzimden kaynaklandığını tespit etmiştir. Warburg (1923); katalazın siyanür tarafından inhibe edildiği için demir içeren bir enzim olduğunu öne sürmüştür. Sumner ve Dounce (1937); katalaz enzimini sığır karaciğerinde bulan ilk bilim insanları olmuştur. Katalaz o günden sonra günümüze kadar insan ve birçok hayvan türünün karaciğer ya da eritrositlerinden elde edilebilmektedir (Percy 1984, Glorieux ve Calderon 2017).

Katalaz dört benzer alt birime sahip 240 kilodalton (kDa) tetramerik bir proteindir (Radi ve ark 1991). Katalaz hidrojen peroksiti (H_2O_2) oksijen ve suya parçalar ve spermatozoonun ROS hasarına karşı korunmasını sağlayan enzimatik sistemlerden biridir (John Aitken ve ark 1989). H_2O_2 üretimi farklı dokularda farklı düzeyde gerçekleştiğinden, katalazın gerçek fonksiyonu da dokudan dokuya ve subsellüler kompartmanlara göre farklılıklar gösterebilmektedir (Percy 1984, Aitken 1995).

Spermatozoonlar enerji ihtiyaçlarını karşılamak için mitokondrilerinde oksijen ve şekerlerden adenozin trifosfat (ATP) üretimini gerçekleştirmektedirler. Spermatozoonlar ürettikleri bu ATP'yi hareket, akrozom reaksiyonu, membrandan gerçekleşen aktif transport gibi fizyolojik olaylarda ana enerji kaynağı olarak kullanmaktadır. Mitokondrilerde ATP üretmek için kullanılan oksijenin büyük kısmı suya dönüşürken, %1-2'lik bölümü ise süperoksit anyonuna (O^-_2) dönüşebilmektedir. Oluşan bu süperoksit anyonu mitokondrilerde ve hücrenin sitoplazmasında bulunan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüştürülmektedir. H_2O_2 süperoksit anyonuna göre daha az aktif olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) ara metaboliti olarak tanımlanmaktadır. Bulunduğu ortamda hidrojen peroksiti suya indirgeyecek antioksidanlar yok ise, H_2O_2 ortamdaki demir iyonu aracılığı ile hızlı bir şekilde hidroksil (OH^-) radikaline dönüşmektedir. Hidroksil radikali ise hücrede bulunan lipid, karbonhidrat ve protein bileşikleri ile etkileşime girerek yeni peroksit radikallerinin oluşmasına ve oluşan bu radikallerin hücrenin yapı taşlarına zarar vermesine neden olmaktadır. Meydana gelen H_2O_2'in hücreye zarar vermemesi için OH^-'ya dönüşmeden suya (H_2O) dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu işlemi ise katalaz

enzimi veya yapısından hidrojen vererek H_2O_2'yi suya indirgeyebilecek diğer antioksidanlar (glutatyon, ergotiyonin, sistein, N-asetil sistein gibi) yapabilmektedir (Aitken ve ark 2013).

Katalaz aktivitesi iki adımda gerçekleşir. Birinci adımda, hidrojen peroksit "hem" molekülünü bir oksiferril türüne okside etmektedir. Demirden ve porfirin halkasından bir oksidasyon eş değeri çıkarıldığında bir porfirin katyon radikali üretilir. İkinci adımda ise bir hidrojen peroksit (H_2O_2) molekülünden bir oksijen (O_2) ve su (H_2O) molekülü üreterek indirgeyici ajan olarak görev yapmaktadır (Chelikani ve ark 2004). Katalaz H_2O_2'yi parçalamakta, lipid peroksidasyon ve diğer reaktif radikallerin oluşumuna yol açan zincir reaksiyonların başlamasını engellemekte (Fernández-Santos ve ark 2009) ve spermatozoonların ROS etkilerine karşı korunmasını sağlamaktadır (John Aitken ve ark 1989).



Şekil 1.7. Spermatozoonlarda oksidatif stres kaynağı ros'larının oluşumu ve antioksidan koruma sisteminin şematik görünümü (Ari ve Ozturkler 2015).

SOD: Süperoksit Dismutaz, GSH: Glutatyon, GSSG: Yüseltgenmiş Glutatyon, GPx: Glutatyon Peroksidaz, GR: Glutatyon Redüktaz

Boğa spermaları çok az miktarda katalaz içermektedir (Sevinc ve Hafs 1961, Foote 1962). Yumurta sarısı içeren sulandırıcılar ile süt içeren sulandırıcılara katalaz ilave ederek 5°C'de 12 gün muhafaza edilmiştir. Bu spermalar 1, 4, 8 ile 12. günlerde değerlendirdiğinde, yumurta sarılı sulandırıcıya eklenen katalazın spermatozoonların

canlılık kayıplarını azaltırken, süt bazlı sulandırıcıların bu etkiyi sağlamadığı görülmüştür (Foote 1962). Sing ve ark (2020); boğalardan aldıkları ejakülatları %20 yumurta sarısı %7 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıyı katalaz 100 IU/ml dozuda eklemişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar sulandırıcıya 100 IU/ml katalaz ilave edilen grubun kontrol grubuna göre motilite kaybını önemli ölçüde engellediğini belirlemişlerdir.

Kolesterol

Kolesterolün varlığı ve kimyasal yapısı ile ilgili ilk çalışmalar 1773 yılında başlamış ve ilk olarak safra taşında belirlenmiş ve bu yapıya Chevrul (1816) kolesterol adını vermiştir. Lecanu (1838) ise, insan kanında kolesterolü tespit etmiştir. Kolesterol isminin tanıtılması ve plazmadaki kolesterol esterlerinin tanımlanması Berthelot'un (1859) 'kolesterinin' alkol olduğunu gösteren çalışmasını takip etmektedir. Kolesterolün yapısal formülünün aydınlatılma çalışmalarına 1900'lerde başlanılmış ve en tanınmış kimyagerlerin çözmesi 30 yıl kadar sürmüştür. Weiland ve Windaus, bu alandaki çalışmalarından dolayı 1928'de Nobel ödülünü almışlardır. Kolesterol ilk olarak plazma lipoprotein komplekslerinde Macheboeuf (1929) tarafından gösterilmiştir (Richmond 1992).

Kolesterol spermatozoon plazma membranının ayrılmaz bir parçasıdır, fosfolipitlerin hidrokarbon zincirlerinin yapısal bileşimindeki değişime direnerek, faz geçiş sıcaklığının altında membran yapılarını güçlendirip koruma işlevi yapmaktadır (Quinn 1989). Bir membranın genel akışkanlığı yapısında bulunan kolesterolün fosfolipidlere oranı ile fosfolipitleri oluşturan çoklu doymamış yağ açil zincirlerinin miktarına göre belirlenmektedir. Araştırmalarda farklı türlere ait spermatozoonların 'soğuk şokuna' karşı dirençleri değişiklik göstermektedir. Yaban domuzu, boğa, koç veya aygır spermatozoonları soğuk şokuna karşı oldukça duyarlı iken, kedi ve köpek gibi türlerin spermatozonları soğuk şokuna karşı daha az duyarlı olmaktadır. İnsan, tavşan ve kümes hayvanlarının spermatozoonları soğuk şokuna karşı oldukça dirençlidir (Darin-Bennett ve White 1977, Watson 1981). Kolesterol soğutma sırasında membran fosfolipidlerinin kümeleşmesini önlemekte ve lipid-protein etkileşimlerinin bozulmasını en aza indirerek daha düşük sıcaklıklarda membran stabilitesinin korumasında önemli rol oynamaktadır (Parks ve Graham 1992).

Spermatozoon kapasitasyonundaki ilk aşamalardan biri plazma membranındaki kolesterol kaybıdır (Ehrenwald ve ark 1988). Kolesterol akışı, plazma membranındaki lipidlerin yeniden düzenlenmesini indükler ve sonuçta Ca^{+2}, HCO_3 ve K^{+1}' iyonlarına karşı membran geçirgenliğini arttırmaktadır (Visconti ve Kopf 1998). Spermatozoonun akrozom reaksiyonu geçirmesi ve oositle infüzyonu için Ca^{+2}, HCO_3 ve K^{+1} gibi iyonların hücre içinde yüksek konsantrasyonda bulunması gerekmektedir (Parrish ve ark 1999). Ortamdaki bu iyonlardan herhangi birinin konsantrasyonu çok düşükse, spermatozoon kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonunun oluşumunu uzatmakta ve ortamda Ca^{+2} iyonunun bulunmaması bu süreçleri tamamen inhibe edebilmektedir. Hücre içi Ca^{+2} artışı kapasitasyonun erken aşamaları için önemlidir (Visconti ve Kopf 1998). Spermatozoon membran yapısından yeterli miktarda kolesterol uzaklaştırıldığında, membran dengesiz hale gelerek akrozom reaksiyonu gerçekleşmektedir (Ehrenwald ve ark 1988, Nolan ve ark 1992). Spermatozoonların inkübe edildikleri ortama kolesterol eklenmesi, akrozom reaksiyonunu inhibe etmektedir (Li ve ark 2006). Spermatozoon plazma membranlarının lipid bileşiminin değiştirilmesini, kapasitasyonunu, akrozom reaksiyonunu ve kriyoprezervasyon yeteneğini önemli ölçüde etkilemektedir (Purdy ve Graham 2004, Moore ve ark 2005).

Siklodekstrin

Siklodekstrin (CD)'ler, nişastanın birincil bozunma ürünleri olan α-(1-4) bağlı d- glikopiranoz birimlerinden oluşan oligosakkaritlerdir. Bu bileşikler suda çözünübilmelerine rağmen, çeşitli hidrofobik molekülleri kapsayan bir boşluk içerdiklerinden dolayı hidrofobik ilaçlar için güçlü taşıyıcılardır. CD'lerin heksamerler (αCD'ler), heptamerler (βCD'ler) veya oktomerler (γCD'ler) olmak üzere üç çeşidi vardır. Kolesterole karşı en yüksek afiniteye β-siklodekstrinler sahiptir (Zidovetzki ve Levitan 2007). Oligosakkaritler gibi siklodekstrinlerde hidrofilik bir dış bileşene ve hidrofobik bir iç çekirdeğe sahiptirler. Siklodekstrinler eksojen kolesterol ile bağlanıp çözünebilir bir kompleks oluştururarak, kolesterolün spermatozoonun plazma membranına bağlanması sağlanmaktadırlar (Choi ve Toyoda 1998, Yu ve ark 2006). Siklodekstrinler tek başına sulandırıcıya eklendiğinde, kolesterolün spermatozoon membranından uzaklaştırılmasını uyarmaktadırlar. Siklodekstrinler iç hidrofobik çekirdeğe sahip olmaları ve sterollere olan yüksek afinitelerinden dolayı kolesterol ile yüklendiklerinde kolesterolün hücre membranına girmesini uyarmaktadırlar (Navratil

ve ark 2003). Spermatozoonlara dışarıdan kolesterol yüklemek için önce siklodekstrinlere kolesterol yüklenir ve kolesterol yüklü siklodekstrin (CLC) elde edilir. Kriyoprezervasyondan önce boğa spermatozoonları ile CLC inkübe edilir. CLC'ler hücre membranı ile etkileşime girdikten sonra membrana kolesterol transferini kolaylaştırır. Kolesterol yüklenmesi spermatozoon plazma membranının ozmotik basınç ve sıcaklık değişimleri sırasında membrandan su transferini sınırlamakta ve dolayısıyla spermatozoon membranını güçlendirerek kriyohasara karşı dayanıklı hale gelmesini sağlamaktadır (Purdy ve Graham 2004, Li ve ark 2006, Salmon ve ark 2017).

Purdy ve Graham (2004); boğalarından aldıkları ejakülatları %20 yumurta sarısı %14 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya CLC farklı dozlarını (0,75 mg/ml; 1,5 mg/ml; 3,5 mg/ml; 4,5 mg/ml, 6 mg/ml; 7,5 mg/ml) eklemişler ve kontrol grubu dahil olmak üzere yedi grup oluşturmuşlardır. Sonuç olarak araştırmacılar dondurulmadan önce CLC'lerle inkübe edilen spermatozoonların, yüksek oranda motil ve canlı spermatozoon geri kazanımı sağladığını belirlemişlerdir.

1.4. Spermatozoonlarda Flow Sitometri Analizi

Flow sitometri (FC) akışkan içerisindeki partiküllerin lazer kaynağından geçerken spermatozoonların fiziksel, optik ve kimyasal floresan özelliklerinin ölçümünü kullanan akışkan, optik ve elektronik sistemlerden oluşmaktadır (Silva ve Gadella 2006, Korkmaz ve Çil 2020). Flow sitometri akışkanlar, optikler, elektronikler ve yazılım kullanımı olmak üzere temel dört ana sistemden oluşmaktadır. Böylelikle hücre süspansiyonu boru şeklindeki bir sistemden akarken, belirli noktalarda lazer (veya bazı eski cihazlarda civa ark lambası) aydınlatmasına maruz kalmaktadır. Bu aydınlatma sonucunda hücrelerden kaydedilen emisyonlar sayısallaştırılarak bilgisayar ortamında işlenmek suretiyle sonuçlar elde edilmektedir. Bir laminer akış altında hareket eden sıvıda hücrelerin dedektörden geçerken sahip oldukları hareketi ve hızları belirlenmektedir. Bu taşıma sırasında, floresans, absorbans ve ışık saçılması hücre özellikleri farklı aydınlatma kaynakları kullanılarak tespit edilmektedir. Bu şekilde flow sitometri, tek tek spermatozoon ile ilişkili birden fazla florokrom ile etiketlemeyi tespit etmekte, böylece birden fazla spermatozoon niteliği aynı anda değerlendirilebilmekte ve bu nitelikleri örneğin potansiyel fertilite kapasitesi ile

ilişkilendirme oranını arttırmaktadır (Givan 2011, Hossain ve ark 2011, Standerholen ve ark 2014). Elde edilen veriler Flow Cytometre Standart (FCS) dosyalarına kaydedilmektedir. Böylece her bir spermatozoon için her dedektörden alınan bilgiler daha sonra tekrar analiz edilebilmektedir. Bazı araştırmacılar flow sitometrideki bulgulardan yararlanmak için istatistiksel tekniklerin kullanılmasını önermişlerdir (Lo ve ark 2008).

Tablo 1.2. Sperma muayenesinde kullanılan çeşitli florokromlar (Korkmaz ve Çil 2020).

Spermatozoon Muayenesi	**Florokromlar**				
Membran Bütünlüğü	CDFA	SYBR-14/PI	Etdh	CellROX	Deep Green
Oksidatif Stres	DCFDA	Deep Red, Green, Orange	CellROX	MITOSOX	DHE
Membran Stabilitesi	Mero-540	Yo-PRO-1	SNARF-1		
Plazma membran ve akrozom bütünlüğü (PMAI)	SYBR-14/PE-PNA/PI	FITC-PNA/PSA-PI	Ca Iyonoforları		
Mitokondriyal Bütünlük	Rhodamine	JC-1	MitoTracker		
Kromatin/DNA Bütünlüğü	TUNEL	COMET	SCSA		
Lipid Peroksidasyon	BODIPY C11				
Apoptosis	Annexin V				

1.4.1. Spermatozoon Canlılığı

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan ve canlılığı gösteren boya kombinasyonlarından biri ticari olan LIVE/DEAD Sperm Viability kiti (Molecular Probes Inc., OR, ABD) olarak satılan SYBR-14 ve Propidyum iyodür (PI)'dir. Her iki florokrom da aynı hücresel bileşeni hedeflemekte, bu durumda ayrı bileşenler hedeflendiğinde ortaya çıkabilecek belirsizliği ortadan kaldırmaktadır. Florometrik boyama kombinasyonu olan SYBR-14 ve PI'ın, ejakülattaki canlı ve ölü spermatozoon oranlarını belirlemede hızlı ve güvenilir bir araç olarak kullanılmaktadır (Gillan ve ark 2005, Martínez-Pastor ve ark 2010). SYBR-14 ile PI problarının her ikisinin de nükleik asitlere afinitesi bulunmaktadır. SYBR-14, canlı spermatozoonların çekirdeklerinden yeşil floresan yayılmasını sağlarken, PI membran bütünlüğünü kaybetmiş dejenere spermatozoonlardan kırmızı floresan yayılmasını sağlamaktadır. Ayrıca PI,

membranın bozulması durumunda SYBR-14 tarafından yayılan floresanı bastırmaktadır (Riedy ve ark 1991, Garner ve ark 1994, Garner ve Johnson 1995, Garner 1997, Gillan ve ark 2005). Kriyoprezervasyon esnasında, sıcaklık değişimleri ve ozmotik stres sonucu plazma membranında oluşan hasarlar nedeniyle spermatozoonların canlılığı bozulmaktadır (Gürler ve ark 2016). Bu yöntem tek başına veya etidyum homodimer (EH), propidyum iyodür (PI), Yo-Pro-1 ve Bizbenzimidazole Hoechst 33258 gibi boyalar ile kombinasyon halinde kullanılabilmektedir (Ugur ve ark 2019). PI 488-nm lazer ile uyarılır ve ölü spermatozoonlara hasarlı plazmalemma yoluyla nüfuz edebilmekte, daha sonra nükleik asitlere bağlanmasıyla kırmızı floresan yayabilmektedir (Gillan ve ark 2005).

Mocé ve ark (2010); boğalardan aldıkları ejakülatları %20 yumurta sarısı ve %8 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya CLC'nin 2 mg/ml dozunu eklemişler ve kontrol grubu ile iki grup oluşturmuşlardır. Spermatozoonları SYBR-14 ve PI boyaları ile boyadıktan sonra flow sitometride spermatozoonların ölü-canlı oranlarını araştırmışlardır. Sonuç olarak araştırmacılar sulandırıcıya 2 mg/ml CLC eklenen grubun kontrol grubuna göre yüksek oranda spermatozoon canlılığını koruduğunu belirlemişlerdir.

1.4.2. Spermatozoon Plazma Membran ve Akrozom Bütünlüğü

Spermatozoon çekirdeğinin ön kısmını kaplayan etrafı membranla çevrili yapıya akrozom denilmektedir. Fertilite için akrozomal bütünlük bir ön koşuldur. Memeli spermatozoonlarındaki güçlü hidrolize edici enzimler spermatozoonun akrozomunda bulunmaktadır (Yanagimachi 1994). Flow sitometride akrozom bütünlüğünün kontrolu için en yaygın kullanılan boyalar fluorescein isothiocyanate conjugated (FITC), arachis hypogaea (fıstık), aglutinin (PNA) ve pisum sativum (bezelye) aglutinin (PSA) lektinleridir (Graham 2001). Bu lektinler akrozomal membranın farklı kısımlarında bulunan glikozidik kalıntılara bağlanmaktadırlar (Tao ve ark 1993). Pisum sativum aglutinin (PSA), akrozomal matrisin mannoz ve galaktoz kısımlarına bağlanan bezelye bitkisinden elde edilen bir lektindir. PSA bozulmamış bir akrozomal membranı geçemediğinden, sadece akrozom reaksiyonu geçirmiş veya akrozomu hasar görmüş spermatozoonlara etki ederek onları boyamaktadır (Graham 2001). Hasarlı akrozomlarda PSA lektini akrozomdaki α-D-glukozil ve α-D-mannosil kalıntılarını tanıyıp ve akrozomal matrisi

boyamakta ve PSA dış akrozomal membrana bağlanmaktadır. Yeşil renk canlı, kırmızı renk ölü, mavi renk ölmekte olan spermatozoonları (ölü olarak değerlendirilirler) göstermektedir (Cross ve ark 1986, Hossain ve ark 2011, Korkmaz ve Çil 2020). Plazma membran ve akrozomal bütünlüğün aynı anda değerlendirilmesi için FITC-PSA ve PI en sık kullanılan florokrom kombinasyonlarındandır (Pena ve ark 2003).

Paudel ve ark. (2010); boğalardan elde ettikleri spermayı içerisinde %20 yumurta sarısı ve %7 gliserol bulunan tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya askorbik asit (10 mM/ml), klorpromazin (0,1 mM/ml), katalaz (200 IU/ml), askorbik asit (10 mM/ml) + klorpromazin (0,1 mM/ml) ve katalaz (200 IU/ml) + klorpromazin (0,1 mM/ml) dozlarını ilave etmiştir ve kontrol grubu dahil altı grup oluşturmuşlardır. Sonuç olarak araştırmacılar sulandırıcıya 200 IU/ml katalaz ilavesinin kriyohasarlara karşı plazma membran ve akrozom bütünlüğü üzerine koruyucu etkiye sahip olduğunu belirtmektedirler.

1.4.3. Spermatozoon Mitokondriyal Membran Bütünlüğü

Spermatozoonların membran bütünlüğü ATP için önemli bir parametredir. Mitokondriyal membran bütünlüğü ve canlılığı fertilite için önem arz etmektedir (Korkmaz ve Çil 2020). JC-1, spermatozoon mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemdir. Yüksek mitokondriyal aktivite potansiyeline sahip olanlar kırmızı-turuncu floresan, düşük ile orta mitokondriyal aktivite potansiyeline sahip olanlar ise yeşil floresan ışık yaymaktadırlar. R123 ve JC-1 membran potansiyellerinin varlığını gösterirken, ayrıca JC-l yüksek ve düşük membran potansiyellerini ayırt etmede hassas bir özelliğede sahip olabilmektedir. Yeni mitokondriyal boyalar MitoTracker, Green FM (MITO) sulu çözeltide floresan oluşturmaz ve mitokondriyal membran potansiyeline bakılmaksızın mitokondride birikim üzerine yeşil floresan ışık vermektedirler. Uyarma ve emisyon maksimum değerleri sırasıyla 490 ve 516 nm'dir (Garner ve ark 1997).

Gürler ve ark (2016); simental ırkı boğalardan alınan ejakülatları Andromed sulandırıcısı ile sulandırarak taze ve dondurulmuş spermanın mitokondriyal oksidatif stresinin belirlenmesinde (Mitosox /PI) flow sitometri yöntemini kullanmışlardır. Sonuç olarak araştırmacılar dondurma-çözdürmenin spermada mitokondriyal oksidatif

stresi artırdığını, Mitosox/PI boyaları kullanılarak mitokondriyal oksidatif stresin başarıyla tespit edilebileceğini vurgulamışlardır.

1.4.4. Spermatozoonlarda Reaktif Oksidatif Stresinin Belirlenmesi

Spermatozoonların antioksidan savunma sistemleri reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu karşısında yetersiz kalmaktadır. Bunun sonucunda; DNA bütünlüğünde bozulma, membran lipid yapısında hasarlar ve fertilite kayıpları meydana gelmektedir. Spermatozoonların dondurulması ve çözdürülmesi işlemleri oksidatif stres oluşumunda büyük rol oynadığından spermatozoonlarda oksidatif stresin belirlenmesi dondurma çözdürme işlemlerine karşı dayanıklılığı göstermektedir (Gürler ve ark 2016). Oksitadif stresin belirlenmesinde 5-(ve-6)-carboxy-2′,7′-dichlorodihydrofluoresence indiacetate (DCFDA) sıkça kullanılan bir florokromdur. Bunun haricinde MitoSOX, DHE, DAF2-DA, CellROX Deep Red, CellROX Orange florokromlarıda kullanılabilmektedir (De Castro ve ark 2016).

Roca ve ark (2005); domuzlardan aldıkları ejakülatları %20 yumurta sarısı içeren B-laktoz solüsyonu ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya katalaz (200 IU/ml; 400 IU/ml), superoksit dismutaz (150 IU/ml; 300 IU/ml), katalaz (200 IU/ml) + superoksit dismutaz (150 IU/ml) ve katalaz (400 IU/ml) + superoksit dismutaz (300 IU/ml) eklemişler ve kontrol grubu dahil toplamda yedi grup oluşturmuşlardır. Araştırmacılar Luminol ve Lucigenin testi ile ROS değerlerini belirlemişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar sulandırıcıya 400 IU/ml eklenen katalaz ve 150 IU/ml eklenen SOD gruplarının kontrol grubuna göre ROS üretimini azalttığını belirlemişlerdir.

1.5. Boğalardan Sperma Alma Yöntemleri

1.5.1. Suni Vajen ile Sperma Alma Yöntemi

Suni vajenler dış kısımlarında sert bir plastik ve iç kısmında lastik bulunan silindir şeklindedirler. Su ve hava girişi yapılabilmesi için sert plastiğin üzerinde musluk ve sibop bulunmaktadır. Suni vajenin uzunluğu 30-60 cm, çapı da 5-8 cm arasında değişebilmektedir. Suni vajen distile su ile yıkanıp otoklavda 120^{o}C'de 20 dakika süre ile strelize edildikten sonra kullanılmaktadır. Suni vajen kullanılırken sıcaklık, basınç ve kayganlık dikkat edilmesi gereken üç önemli noktadır. İdeal olan

sıcaklık ise 38-41ºC'dir. Düşük sıcaklıkta boğalarda seksüel reflekler oluşmaz, yüksek sıcaklıklarda ise ejakülasyon sonrası spermatozoonların motilitesi ve canlılıkları olumsuz etkilenebilmektedir. Bu yüzden suni vajen içerisine doldurulacak suyun sıcaklığı önem arz etmektedir. Suni vajenlerin basıncı yaklaşık olarak 5300 pascala eşit olmalıdır. Pratikte uygularken suni vajen iç lastiğinin 2/3 su ile doldurulduğunda iç lastiğin "Y" formunu alması basıncın uygun olduğunu göstermektedir. Yeterli basınç sağlanamaz ise boğalardan sperma alma güçleşmektedir. Suni vajen kayganlığı için kullanılacak kayganlaştırıcılar spermatozoonların yapısına ve penis mukozasına zarar vermeyecek yağsız içerikler ihtiva etmelidir. Bunun için günümüzde genelde steril vazelin ya da sperma sulandırıcısı kullanılmaktadır. Suni vajen hazırlandıktan sonra sperma toplama hunisi ve kadehi takılarak suni vajen kullanıma hazır hale getirilir. Sperm alma esnasında boğanın fantom veya partnerine kör atlayışlar yaptırıldıktan sonra tekrar aşım için geldiğinde penisin arama refleksleri engellenmeden sol el ile penis prepisyumundan tutulup median hattan çekilerek suni vajene yönlendirilmektedir. Bu sırada boğanın yüklenme hareketi ile ejakülasyon şekillenmektedir. Boğanın fantom ya da partnerden inmesine kadar beklenir, boğa indikten sonra suni vajen çekilerek dik konuma getirilir ejakülatın kadehin içine akması sağlanır (Arthur 1996, Çoyan ve ark 2002, Ball ve Peters 2008).

1.5.2. Elektro-ejakülatörle Sperma Alma Yöntemi

Bu yöntem daha çok ejakülasyon alım süresi kısa olan hayvanlarda tercih edilmektedir ve genelde koçlarda kullanılmaktadır. Ekstremite hastalıkları olan aşım yeteneğini yitirmiş boğalarda da kullanılabilmektedir. Uygulama bipolar elektrot kullanılarak yapılmaktadır. Boğanın arka ayakları travaya sabitlendikten sonra, rektum boşaltılır ve prepusyal boşluk %1-2'lik tuzlu su ya da serum fizyolojik ile yıkanır. Elektrojakülatörün probu rektumdan içeri sokularak v. seminalisin üzerine yerleştirilir. Akım 10-30 volt ve 0-600 mA'lik olacak şekilde uygulanır. Akım verme süresi 3-5 saniyedir ve her defasında 20 mA yükseltilerek akım verilir. Akım uygulandıktan sonra 0 mA dönülür, 3-5 sn süre ile akım verilmez. Akım verme süresi ile akım uygulanmayan (latent) süre aynı olmalıdır. Genelde ejakülasyon 100 mA seviyelerinde gerçekleşmektedir. Tam ereksiyon olmaksızın kısmı ereksiyon ile ejakülasyon şekillenmekte ve ejakülat sperma toplama kadehine alınmaktadır (Çoyan ve ark 2002).

Bu iki yöntem dışında boğalardan ampullaya masaj tekniği ve cerrahi yöntemle de sperma toplanabilmektedir. Pratikte en yaygın olan yöntem ise suni vagina ile sperma toplama yöntemidir.

1.6. Boğalarda Spermanın Sulandırılması

Boğalardan ejakülat haftada yaklaşık 2 ya da 3 defa olacak şekilde alınmaktadır. Ejakülat gerekli spermatolojik muayeneler ve spermanın sulandırılma işlemleri için 30-35ºC sıcaklıktaki su banyosunda muhafaza edilmelidir (Ball ve Peters 2008). Suni tohumlamada başarı oranını artıran en önemli faktör kullanılan payette bulunan spermatozoon sayısıdır. Bunun dışında sperma alma ve sulandırma yöntemi, spermanın payetlenme şekli, dondurulma, nakliye, çözdürülme yöntemi, teknisyenin tecrübesi, ineğe bağlı sebepler ve sürü yönetimi gibi faktörlerde başarı oranını etkilemektedir (Foote ve Kaproth 1997). Spermanın sulandırıldıktan sonra dondurulup saklanması hayvancılık, biyoteknoloji, türlerin korunması ve klinik veteriner hekimlikte büyük potansiyel uygulamalara katkı sağlayacağından önem arz etmektedir (Yoshida 2000).

Spermanın sulandırılıp dondurulma işleminde hayvan tür ve ırkına göre farklı yöntem ve teknikler kullanılmasına rağmen, dondurma işleminin prensipleri aynıdır. Sperma sulandırıcılarında bulunması gereken temel özellikler şunlardır; a) Spermatozoonun canlılığı ile aktivitelerinin uzun süre sağlanması için gerekli olan kimyasal maddeler arasında bir denge olmalı ve enerji kaynağı içermelidir. b) Uygun ozmotik basınç ve elektrolit konsantrasyonunu sağlamalıdır. c) Aerobik ve anaerobik ortamlarda spermatozoonların beslenmesini sağlayacak besin maddelerini içermelidir. d) Spermatozoonları pH değişikliklerinden ve laktik asit oluşumundan koruyabilmek için bir tampon görevi yapmalıdır. e) Spermatozoonların metabolizma artıkları sonucu oluşan toksik etkileri ortadan kaldıracak kimyasal maddeler içerebilmelidir. f) Soğuk şoku ve dondurmanın zararlı etkilerine karşı spermatozoonları koruyabilmelidir. g) Fertilizasyonu engelleyecek şekilde spermatozoonlara ve dişi genital kanala zarar verecek enfeksiyon etkenlerini taşımamalıdır (Yoshida 2000, Manafi 2011).

1.6.1. Boğa Spermasının Yumurta Sarısı İçeren Tris Sulandırıcısı ile Sulandırılması

Yumurta sarısı, yüksek moleküler ağırlıklı ve düşük yoğunluklu lipoprotein fraksiyonundan dolayı spermatozoonları soğuk şokuna karşı korumanın yanı sıra, akrozomal enzimlerin kaybını azaltarak sıvı nitrojende muhafazası esnasında akrozomda oluşabilecek dejenaratif değişikliklerideide önleyebilmektedir (Salamon ve Maxwell 2000). Hastalıklardan eradike edilmiş kümeslerden alınan günlük yumurtalar yıkanıp temizlenir, alkolle dezenfekte edildikten sonra steril bıçak ile kabuğu kırılır ve yumurta akı uzaklaştırılır. Steril bir filtre kâğıdı üzerinde yumurta sarısı iyice kurulandıktan sonra steril bisturi ile yumurta sarısı sulandırıcıya ilave edilir (Çoyan ve ark 2002).

Tris + yumurta sarılı sulandırıcı hazırlanması (1000 ml için);

30,76 gr Tris
12,61 gr Fruktoz
16,39 gr Sitrik Asit
20 ml Yumurta Sarısı
100.000 IU penisilin
100 mg streptomisin
1000 ml ye kadar distile su ile tamamlanır (Bucak ve ark 2007).

Hazırlanan bu temel sulandırıcı 30-35^{o}C'deki benmaride bekletilerek aynı sıcaklıkta bulunan sperma ile yavaş yavaş karıştırılmaktadır. Hiçbir zaman sperma sulandırıcı içine katılmaz, her zaman sulandırıcı spermaya katılmalıdır, karışım sırasında birebir oranında karıştırmaya ve köpük oluşturmamaya dikkat edilmelidir (Çoyan ve ark 2002).

1.7. Spermanın Ekilibrasyonu

Spermatozoonların dondurulmadan önce gliserol ile temas halinde kaldığı toplam süreye genellikle ekilibrasyon denilmektedir. Bu aşama sadece gliserolün değil aynı zamanda sulandırıcı içerisinde bulunan bileşenlerinde spermatozoonların içinde ve dışında dengeli bir konsantrasyon oluşturulması için gerekli bir aşama olmaktadır. Sulandırıcılar sperma ile karıştırıldıktan sonra ortalama 4 saatte sıcaklıkları yavaş yavaş 37^{o}C'den 4^{o}C'ye düşürülmektedir (Andrabi 2014). Böylece spermatozooların

dondurma esnasında zarar görmeleri azaltılmakta, sulandırıcıların içerisindeki bileşenlerin spermatozoonların içine nufüz etmeleri sağlanmakta, dengeli bir ozmotik ortam oluşturulmakta ve spermatozoonların membran bütünlüğü korunmaktadır (Leite ve ark 2010).

Khan ve ark (2021); boğalardan aldıkları ejakülatları tris-yumurta sarısı-gliserol içeren sulandırıcı ile sulandırmışlardır. Sulandırılan spermayı 2, 4 ve 6 saatlik süreler ile ekilibrasyona almışlardır. Sonuç olarak araştırmacılar 4 saat ekilibrasyonda bekletilen grubun daha az motilite kaybı sağladığını ve plazma membran bütünlüğünü daha çok koruduğunu ve akrozomal hasar oluşumunu düşürdüğünü belirlemişlerdir.

1.8. Boğalarda Spermanın Dondurulması

Spermatozoonların dondurularak saklaması, suni tohumlama ve in vitro fertilizasyon (IVF) gibi üreme tekniklerinin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Özellikle sütçülük yönlü işletmelerde suni tohumlamanın yaygın kullanımı hayvansal üretimde genetik seleksiyon hızını artırmaktadır (Medeiros ve ark 2002). Spermanın muhafaza edilme sıcaklığı, kullanılan kimyasalların bileşimleri ve hijyenik kombinasyonlar spermatozoonların ömrünü etkileyen faktörlerin başında gelmektedir (Vishwanath ve ark 1996, Yoshida 2000). Dondurma yöntemi spermanın daha düşük ısılarda saklanması temeline dayanır. Hücreyi soğuk şokunun etkilerinden koruyan kriyoprotektif maddelerle sulandırılan sperma, ampul (etil alkol banyosunda), pellet (-79ºC kuru buzda) veya payet (-110ºC sıvı azot buharında) yöntemiyle dondurularak -196ºC'ta saklanabilmektedir (Nur ve Ak 2003).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Sunulan tez çalışmasında, hayvan materyali olarak Süper Genetik Suni Tohumlama Hay. Tic. San. Ltd. Şti. firmasına ait Suni Tohumlama Laboratuvarında (38º 09’ 53.5” N ve 32º 24’ 18.3” E Kurşunlu Mah. Sarayönü / KONYA) bulundurulan 2-4 yaşları arasında 3 baş Simental ırkı boğa kullanıldı. Boğaların bakım ve beslenmeleri firmanın şartlarında gerçekleştirildi.



Şekil 2.1. Süper Genetik Suni Tohumlama Hay. Tic. San. Ltd. Şti. firmasına ait sperma üretim laboratuvarından genel görünüş (38º 09’ 53.5” N ve 32º 24’ 18.3” E Kurşunlu Mah. Sarayönü / KONYA).

Çalışmada spermaların dondurulması Süper Genetik Suni Tohumlama Hay. Tic. San. Ltd. Şti. firmasının sperma üretim laboratuarında bulunan alet ve ekipmalar kullanılarak gerçekleştrildi. Dondurulmuş spermaların çözdürme sonrası motilitelerinin değerlendirilmesi için CASA analizleri yine aynı laboratuarda bulunan SpermVision 3.8 (Minitube /Almanya) cihazı ile yapıldı.

Spermaların flow sitometri analizleri Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Laboratuarında bulunan CytoFLEX (Beckman Coulter /ABD) cihazı ile yapıldı.

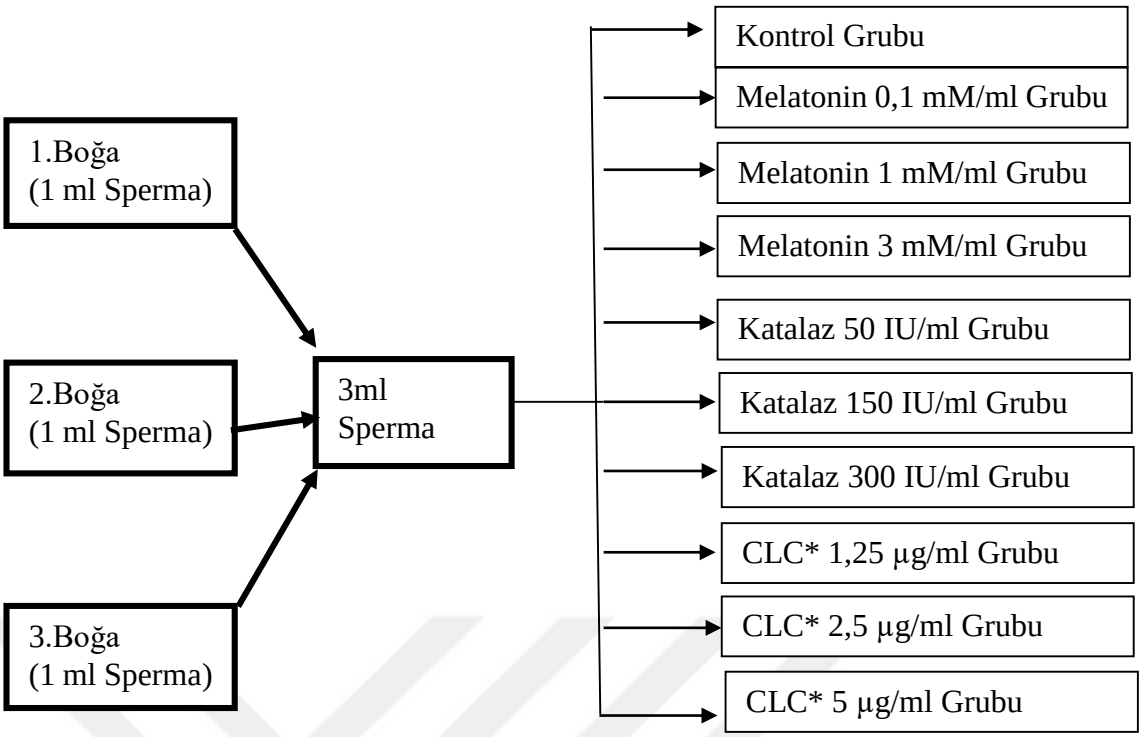
Hayvanlar üzerinde yapılacak tüm deneysel çalışmalar için Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulunun (SÜVDAMEK) 23.03.2022 tarihli 2022-27 sayılı kararı ile çalışma izni alındı.

Boğalardan elde edilen ejakülatları sulandırmak amacıyla yumurta sarısı ve gliserol içeren tris sulandırıcısı hazırlandı ve eşit hacimlere bölündü. Çalışmada kullanılacak olan antioksidanların farklı dozlarının sulandırıcılara eklenmesini takiben spermalar sulandırıldı. Çalışmada kullanılacak CLC'nin farklı dozları spermaya doğrudan eklendi, 15 dakika inkübasyonda bekletildikten sonra üzerine sulandırıcı ilave edildi. Sulandırılan spermalar 4 saat ekilibrasyonda bekletildikten sonra payetlenip donduruldu. Çözdürüldükten sonra motilite değerlerinin karşılaştırılmasının yapılması, eklenen katalaz, melatonin ve CLC'nin en iyi dozların tespit edilmesi, tespit edilen bu dozların kombine edilerek uygulamasını takiben bazı spermatolojik parametreler üzerine etkilerinin araştırılması, elde edilen en iyi dozlarda spermanın çözdürme motilitesini koruma süresi ve fertilite sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlandı. Bu amaçlar doğrultusunda sunulan tez çalışması iki bölümde gerçekleştirildi.

Çalışmada en az > %70 motiliteye sahip ejakülatlar dondurma amaçlı kullanıldı.

2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

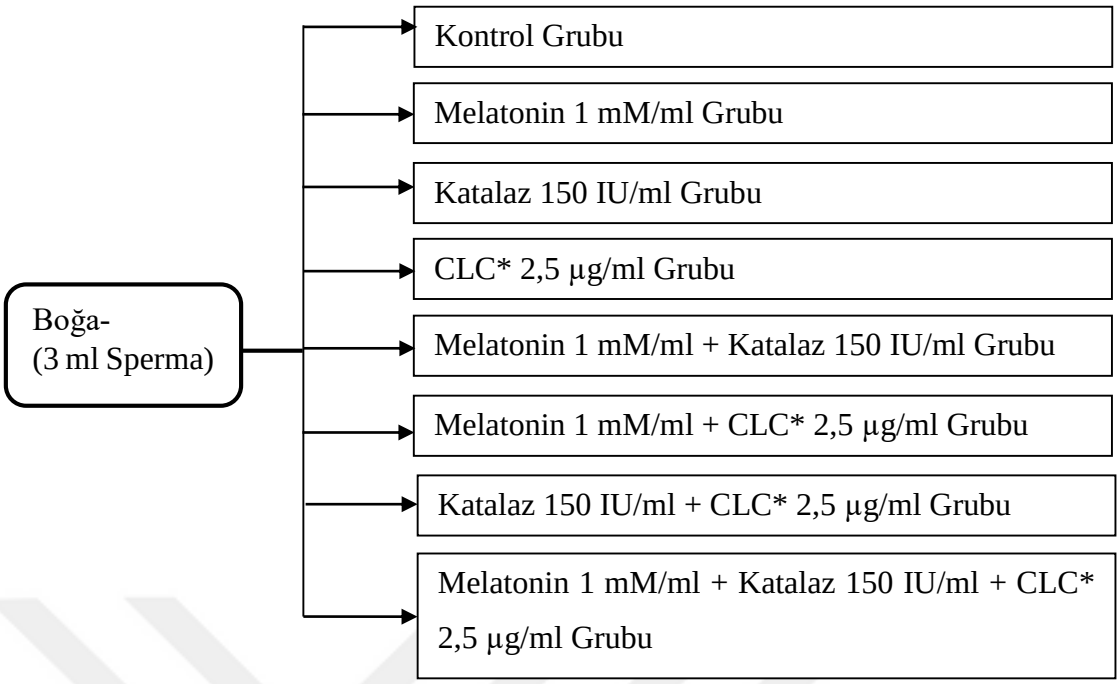
I. Bölüm: Katalaz, melatonin ve kolesterolun (CLC) en iyi dozlarını tespit aşamasıdır. Çalışma günü sperması alınan ve > %70 motiliteye sahip boğalardan üç adet rastgele seçildi. Her boğadan 1 ml ejakülat alındı. Farklı üç boğaya ait ejakülatlar karıştırıldıktan sonra melatonin (0,1 mM/ml; 1 mM/ml; 3 mM/ml), katalaz (50 IU/ml; 150 IU/ml; 300 IU/ml), kolesterol (1,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 5 µg/ml) dozları ve kontrol grubu olmak üzere on eşit gruba ayrıldı. Bu çalışma bir hafta ara ile beş kez tekrarlandı. Grupların motilite sonuçları CASA sistemi ile değerlendirildi ve istatistik analize tabi tutuldu. Çözdürme sonrası en iyi motilite sağlayan doz grupları belirlendi.



Şekil 2.2. Tez çalışması ı. bölümündeki gruplar ve antioksidan dozları.

*CLC (Kolesterol yüklü siklodekstrin) içermektedir.

***II. Bölüm*:** Birinci bölümde belirlenen en iyi doz grupları kullanıldı. Çalışmanın bu bölümü için aynı laboratuarda sperma özelikleri belirlenen üç adet sabit boğa seçildi. Her boğadan 3 ml ejakülat alındı. Her boğanın ejakülatı melatonin (1 mM/ml), katalaz (150 IU/ml), kolesterol (2,5 µg/ml), melatonin (1 mM/ml) + katalaz (150 IU/ml), melatonin (1 mM/ml) + kolesterol (2,5 µg/ml), katalaz (150 IU/ml) + kolesterol (2,5 µg/ml), melatonin (1 mM/ml) + katalaz (150 IU/ml) + kolesterol (2,5 µg/ml) dozları ve kontrol grubu olmak üzere sekiz eşit gruba ayrıldı. Bu çalışma bir hafta ara ile üç kez tekrarlandı. Çözdürme sonrası grupların motilite sonuçları CASA sistemi ile değerlendirildi ve istatistik analize tabi tutuldu.



Şekil 2.3. Tez çalışması ıı. bölümündeki A, B ve C boğalarının grupları ve antioksidan dozları. *CLC (Kolesterol yüklü siklodekstrin) içermektedir.

İkinci bölümde en iyi motilite sonuçlarını veren iki grup (katalaz 150 IU/ml ve kolesterol 2,5 µg/ml) için;

a) Flow sitometri (plazma membran ve akrozom bütünlüğü, ölü canlı oranı, mitokondrial oksidatif stres, reaktif oksijen türleri) muayeneleri yapıldı.
b) Payetlerin çözdürülmesini takiben spermalar 2 ml ependorf tüpe aktarıldı, 0. ve 2. saatlerde CASA sistemi ile motilite muayeneleri gerçekleştirildi.
c) Dondurulmuş-çözdürülmüş boğa spermaları ile her tekrarın her grubu için 13 inek veya düve tohumlandı.

2.3. Spermanın Alınması

Çalışma boyunca spermalar suni vajen yöntemi kullanılarak elde edildi. Ön doz çalışmalarında haftada bir kez beş hafta, çalışmada kullanılacak dozlar belirlendikten sonra haftada bir kez üç hafta süre ile spermalar elde edildi.

2.4. Spermanın Muayenesi

Sperma almadan önce çalışmada kullanılan cam malzemeler pastör etüvünde (Memmert/ Minitüb /Almanya) 250 ^{o}C'de 2,5 saat bekletilerek sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. CASA lamı ise motilite tayinleri öncesi mikroskobun ısıtma

tablasında 37 ºC'de ısıtıldıktan sonra kullanıldı. Spermaların motiliteleri ve yoğunlukları CASA (SpermVision 3.8/ Minitüb / Almanya) sistemi ile belirlendi.

2.4.1. Spermanın Mikroskopik Muayenesi

Motilite muayenesi amacıyla faz-kontrast ısıtma tablalı ışık mikroskobu (Carl Zeiss Microlmaging GmbH, Almanya) kullanıldı. Spermada mikroskopik olarak motilite yoğunluk ve morfolojik muayeneler gerçekleştirildi.

Spermatozoon Motilitesi

Bu çalışmada spermaların motilitelerinin değerlendirilmesi için CASA (SpermVision 3.8/Minitüb/Almanya) sistemi kullanıldı. Her bir örnekten CASA lamına 5 µl damlatılarak muayenesi gerçekleştirildi. Motilite oranı yüzde (%) olarak belirlendi.

Spermatozoon Yoğunluğu

Spermanın yoğunluğunu CASA (SpermVision 3.8/Minitüb/ Almanya) sistemi ile belirlendi.

2.5. Sulandırıcının Hazırlanması

2.5.1. TRİS Hazırlanması

1000 ml Tris ana solüsyonu (TAS) hazırlamak için;

Dereceli mezüre (1000 ml) 200 ml distile su eklendi (oda sıcaklığında), Tris (Sigma-Aldrich T6791, 254 mM) 30,76 gr, Sitrik asit (Sigma-Aldrich C-0706, 78 mM) 16,39 gr, Fruktoz (Sigma-Aldrich F-2543, 70 mM) 12,61 gr ayrı ayrı tartılıp eklendi. Karışımın üzerine 1000 ml'ye tamamlanana kadar distile su eklendi ve homojen bir karışım elde edinceye kadar karıştırıldı (Bucak ve ark 2007).

Elde edilen solüsyonunun pH'sı 7,14 (Basic 20 pH Crison, İspanya) ve ozmotik basınç, ~300 mOsm/kg olacak şekilde ayarlandı.

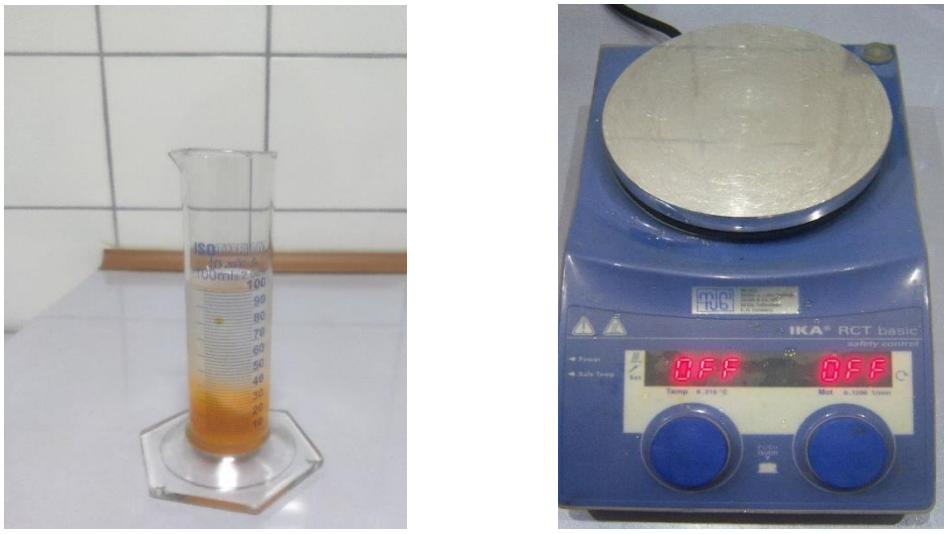
2.5.1.1. TRİS Sulandırıcısına Yumurta Sarısının Eklenmesi

Sperma alma günlerinde tris ana solüsyonuna %20 oranında taze yumurta sarısı eklendi.

Yumurta sarısının hazırlanması;

a) Çalışmada günlük olarak elde edilen yumurtalar kullanıldı. Yumurtalar iyice temizlendikten sonra %70'lik etil alkol ile kabukları sterilize edildi ve kurulandı. Steril bistüri ile yumurta kabuğu düzgün kenarlı iki eşit parçaya ayrıldı.
b) Kabuktan kabuğa aktarmak suretiyle yumurtanın beyaz kısmı atılıp, sarısı steril kurutma kağıdı üzerine aktarıldı. Yumurta sarısı yavaşça kağıdın üzerinde gezdirilerek beyaz kısım yumurta sarısından uzaklaştırıldı.
c) Süzgeç kağıdı üzerindeki yumurta sarısının membranı steril bir baget ile delinerek, içerisinde 20 ml tris ana solüsyonu bulunan dereceli mezüre 20 ml yumurta sarısı olacak şekilde ilave edildi. Dereceli mezür 100 ml seviyesine kadar tris ana solüsyonu ile tamamlandı. Böylece %20 yumurta sarısı içeren tris solüsyonu elde edilmiş oldu. Hazırlanan solüsyonun homojen olması için manyetik karıştırıcı ile (IKA, RCT basic/minitüb/Almanya) 20 dakika karıştırıldı.
d) Karışım içerisindeki partiküllerin çökmesi için 20 dakika boyunca 4000 devir/dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant başka bir mezüre alındı ve çökelti kısmı atıldı.
e) Elde edilen 100 ml %20 yumurta sarısı içeren karışımdan 6 ml'si alındı. Yerine 6 ml gliserol ilave edildi. Sulandırıcıya gentamisin (500 IU/ml) ilave edildi. Böylelikle %20 yumurta sarısı %6 gliserol içeren tris solüsyonu elde edilmiş oldu.

Hazırlanan bu sulandırıcı 37^{o}C'deki benmariye alındı.



Şekil 2.4. Tris içerisine %20 yumurta sarısı eklenmesi ve manyetik karıştırıcı.

2.6. Spermanın Sulandırılması

Doz belirleme bölümü için; çalışmanın olduğu gün önceden hazırlanan tris stok solusyonundan alındı. Üzerine %20 oranında taze yumurta sarısı, 6 ml gliserol ve gentamisin (500 IU/ml) ilave edilerek 100 ml tris solusyonu elde edildi. Boğalardan alınan 3 ml ($1,25x10^9$/ml %80 motilite) nativ sperma için;

Sulandırıcı Miktar Hesabı (ml):

$$\text{Payet Sayısı} = \frac{\text{Sperma Hacmi x Yoğunluk x Motilite}}{\text{Payet Yoğunluğu}}$$

Payet Sayısı x Payet Hacmi = Sulandırıcı + Nativ Sperma Hacmi

Sulandırıcı Miktarı = (Sulandırıcı + Nativ Sperma Hacmi) - Nativ Sperma Hacmi

Bu bölüm için ihtiyacımız olan sulandırıcı miktarı (ml):

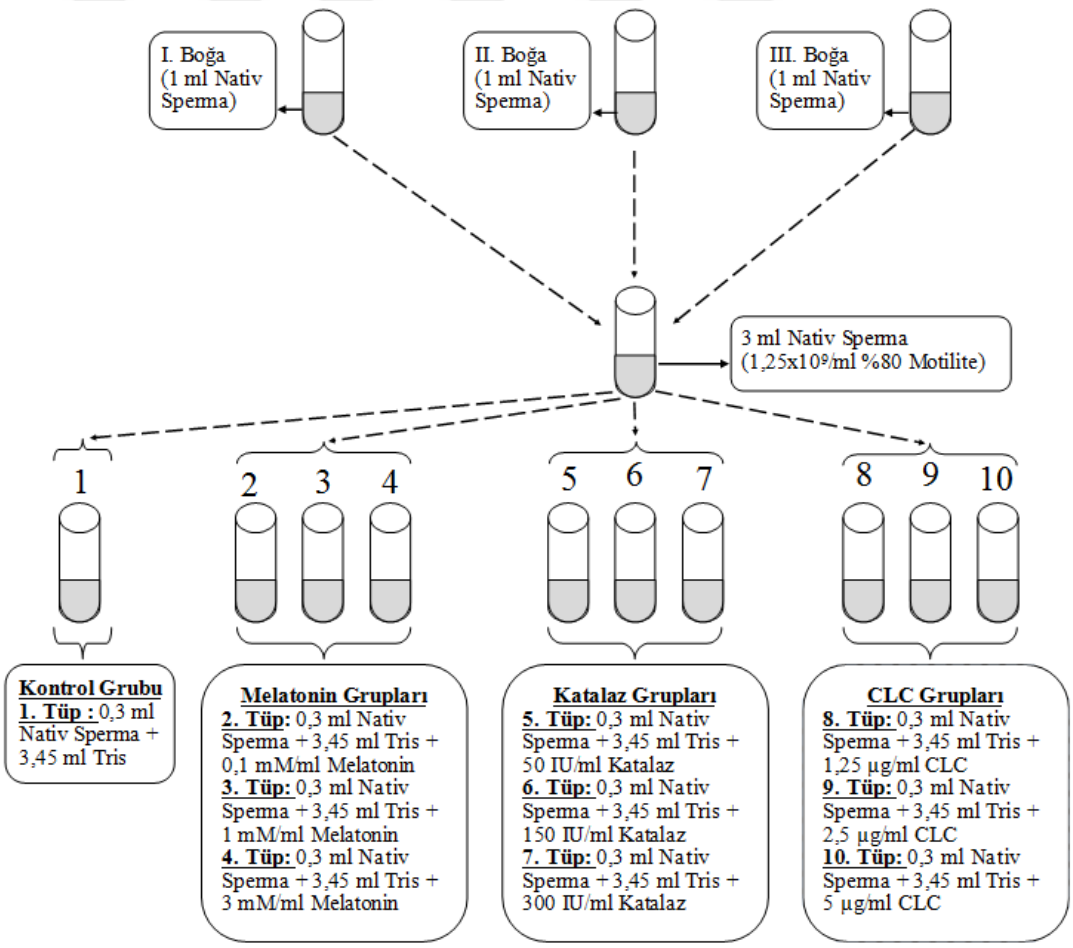
3 ml x $1,25x10^9$/ml x %80 (motilite) / 20.000.000 (spermatozoon) = 150 payet

150 (payet) x 0,25 ml = 37,5 ml (sulandırıcı + nativ sperma hacmi)

37,5 - 3 ml (nativ sperma) = 34,5 ml (sulandırıcı miktarı) olarak hesaplanmıştır.

Bu solüsyondan 34,5 ml alındıktan sonra 10,35 ml (CLC içeren gruplar için) ve 24,15 ml (CLC içermeyen gruplar için) olmak üzere ikiye ayrıldı. Daha sonra 37ºC'de bulunan benmariye alındı. Boğalardan alınan toplam 3 ml ($1,25x10^9$/ml; %80 motilite) nativ sperma otomatik pipet yardımı ile 0,9 ml (CLC içeren gruplar için) +

2,1 ml (CLC içermeyen gruplar için) olarak ikiye ayrıldı. Daha sonra 2,1 ml sperma 24,15 ml olarak ayrılan tris sulandırcısı ile sulandırıldı ve 37°C benmari içinde bulunan 15 ml falkon tüplere dağıtılarak yedi eşit gruba ayrıldı. Şekil 2.5'de belirtilen melatonin ve katalaz dozları otomatik pipetle gruplara ilave edildikten sonra falkon tüpler kapatıldı. Birkaç defa tüpler alt üst yapılarak homojen karışmaları sağlandı ve ekilibrasyona alındı. Kolesterol-siklodekstrin (CLC) grupları için; ayrılan 0,9 ml sperma otomatik pipet ile üç eşit miktara bölündükten sonra 37°C'de benmari içerisinde bulunan falkon tüplere alındı. Spermaların üzerine CLC'nin farklı dozları eklendi ve falkon tüpler kapatılıp 37°C'de 15 dakika beklemeye alındı. Önceden ayrılan 10,35 ml tris sulandırıcısı ile 15 dakika sonunda bu üç grubun sperması eşit miktarda sulandırıldı. Falkon tüpler kapatıldıktan sonra birkaç defa alt üst yapılarak homojen karışmaları sağlandı ve ekilibrasyona alındı.



Şekil 2.5. Tez çalışması I. bölümündeki gruplar.

CLC (Kolesterol yüklü siklodekstrin) içermektedir.

Ana çalışmada doz belirlendikten sonraki bölüm için; A, B ve C boğalarının her biri için çalışmanın olduğu gün önceden hazırlanan tris stok solusyonundan alındı. Üzerine %20 oranında taze yumurta sarısı, 6 ml gliserol ve gentamisin (500 IU/ml) ilave edilerek 100 ml tris solusyonu elde edildi.

A boğasından alınan 3 ml ($1,1x10^9$/ml; %80 motilite) nativ sperma için gerekli olan sulandırıcı miktarı (ml):

3 ml x $1,1x10^9$/ml x %80 (motilite) / 20.000.000 (spermatozoon) = 132 payet

132 (payet) x 0,25 ml = 33 ml (sulandırıcı + nativ sperma hacmi)

33 - 3 ml (nativ sperma) = 30 ml (sulandırıcı miktarı) olarak hesaplanmıştır. Bu miktar 15'er ml olarak (CLC içeren ve içermeyen gruplar için) ikiye ayrıldı.

B boğasından alınan 3 ml ($1,2x10^9$/ml; %80 motilite) nativ sperma için gerekli olan sulandırıcı miktarı;

3 ml x $1,2x10^9$/ml x %80 (motilite) / 20.000.000 (spermatozoon) = 144 payet

144 (payet) x 0,25 ml = 36 ml (sulandırıcı + nativ sperma hacmi)

36 - 3 ml (nativ sperma) = 33 ml (sulandırıcı miktarı) olarak hesaplanmıştır. Bu miktar 16,5'şer ml olarak (CLC içeren ve içermeyen gruplar için) ikiye ayrıldı.

C boğasından alınan 3 ml ($1,4x10^9$ %80 motilite) nativ sperma için gerekli olan sulandırıcı miktarı:

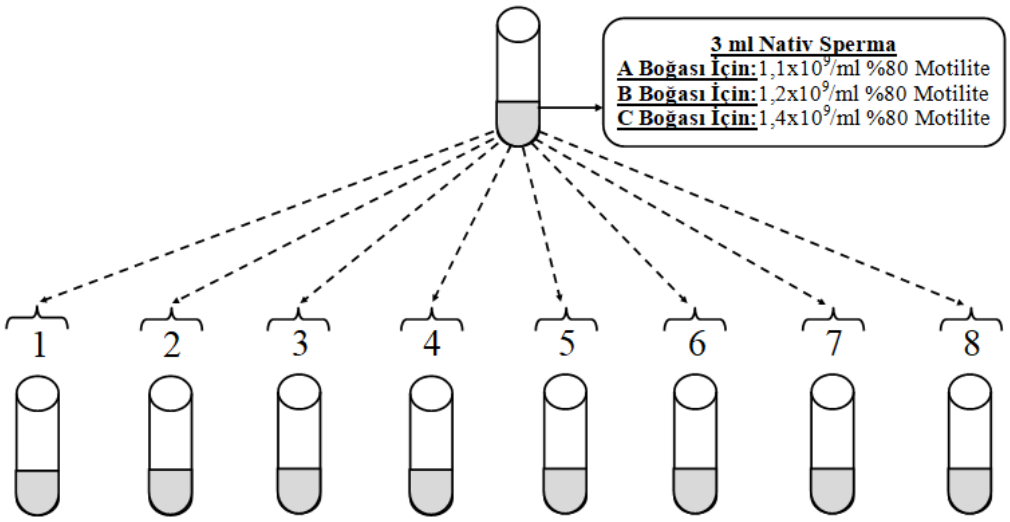
3 ml x $1,4x10^9$/ml x %80 (motilite) / 20.000.000 (spermatozoon) = 168 payet

168 (payet) x 0,25 ml = 42 ml (sulandırıcı + nativ sperma Hacmi)

42 - 3 ml (nativ sperma) = 39 ml (sulandırıcı miktarı) olarak hesaplanmıştır. Bu miktar 19,5'er ml olarak (CLC içeren ve içermeyen gruplar için) ikiye ayrıldı.

A boğası için 3 ml spermadan 1,5 ml alınarak 15 ml tris sulandırıcısı ile sulandırıldı. B boğası için 3 ml spermadan 1,5 ml alınarak 16,5 ml tris sulandırıcısı ile sulandırıldı. C boğası için 3 ml spermadan 1,5 ml alınarak 19,5 ml tris sulandırıcısı ile sulandırıldı. Benmaride (37^oC) bulunan 15 ml falkon tüplere dağıtılarak dört eşit gruba ayrıldı. Şekil 2.6'da belirtilen, içerisinde CLC olmayan melatonin ve katalaz dozları otomatik pipetle gruplara ilave edildikten sonra falkon tüpler kapatıldı. Birkaç defa tüpler alt üst yapılarak homojen karışmaları sağlandı ve ekilibrasyona alındı. İçerisinde kolesterol-siklodekstrin (CLC) bulunan gruplar için; A, B ve C boğalarının 1,5 ml spermaları otomatik pipet ile dört eşit miktara bölündükten sonra 37^oC benmaride bulunan falkon tüplere alındı. Spermaların üzerine CLC'nin farklı dozları eklendi ve falkon tüpler kapatılıp 37^oC'de 15 dakika beklemeye alındı. A boğası için 15 ml, B boğası için 16,5 ml ve C boğası içinde 19,5 ml tris 15 dakika sonunda her boğanın dört grup spermasına

eşit miktarda eklendi. Gruplara gerekli katalaz ve melatonin dozlarıda eklendi. Falkon tüpler kapatıldıktan sonra birkaç defa alt üst yapılarak homojen karışmaları sağlandı ve ekilibrasyona alındı.



Şekil 2.6. Tez çalışması II. bölümündeki A, B ve C boğalarına ait gruplar.

*CLC (Kolesterol yüklü siklodekstrin) içermektedir.

1. Tüp Kontrol Grubu:

A Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 3,75 ml Tris

B Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,125 ml Tris

C Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,875 ml Tris

2. Tüp Melatonin Grubu:

A Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 3,75 ml Tris + 1 mM/ml Melatonin

B Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,125 ml Tris + 1 mM/ml Melatonin

C Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,875 ml Tris + 1 mM/ml Melatonin

3. Tüp Katalaz Grubu:

A Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 3,75 ml Tris + 150 IU/ml Katalaz

B Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,125 ml Tris + 150 IU/ml Katalaz

C Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,875 ml Tris + 150 IU/ml Katalaz

4. Tüp CLC Grubu:

A Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 3,75 ml Tris + 2,5 µg/ml CLC

B Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,125 ml Tris + 2,5 µg/ml CLC

C Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,875 ml Tris + 2,5 µg/ml CLC

5. Tüp Melatonin + Katalaz Grubu:

A Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 3,75 ml Tris + 1 mM/ml Melatonin + 150 IU/ml Katalaz

B Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,125 ml Tris + 1 mM/ml Melatonin + 150 IU/ml Katalaz

C Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,875 ml Tris + 1 mM/ml Melatonin + 150 IU/ml Katalaz

6. Tüp Melatonin + CLC Grubu:

A Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 3,75 ml Tris + 1 mM/ml Melatonin + 2,5 µg/ml CLC

B Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,125 ml Tris + 1 mM/ml Melatonin + 2,5 µg/ml CLC

C Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,875 ml Tris + 1 mM/ml Melatonin + 2,5 µg/ml CLC

7. Tüp Katalaz + CLC Grubu:

A Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 3,75 ml Tris + 150 IU/ml Katalaz + 2,5 µg/ml CLC

B Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,125 ml Tris + 150 IU/ml Katalaz + 2,5 µg/ml CLC

C Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,875 ml Tris + 150 IU/ml Katalaz + 2,5 µg/ml CLC

8. Tüp Melatonin + Katalaz + CLC Grubu:

A Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 3,75 ml Tris + 1 mM/ml Melatonin + 150 IU/ml Katalaz + 2,5 µg/ml CLC

B Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,125 ml Tris + 1 mM/ml Melatonin + 150 IU/ml Katalaz + 2,5 µg/ml CLC

C Boğası İçin: 0,375 ml Nativ Sperma + 4,875 ml Tris + 1 mM/ml Melatonin + 150 IU/ml Katalaz + 2,5 µg/ml CLC

2.7. Ekilibrasyon (Alışım)

Falcon tüplerde sulandırması yapılmış spermaların ısıları soğutma kabininde +4ºC'ye düşürüldü. Spermalar +4 ºC'de 4 saat süresince ekilibrasyona bırakıldı. Dört saatlik süre sonunda payetleme işlemi gerçekleşti ve payetler payet tereklerine yerleştirildikten sonra +4ºC'de 2 saat daha ekilibrasyona tabi tutuldu.

2.8. Spermanın Dondurulması

Ekilibrasyondan sonra payetler sıvı azot seviyesinden 4-6 cm yükseklikte azot buharına maruz olacak şekilde yerleştirildi, 15 dakika süre ile azot buharına maruz bırakıldı. Daha sonra payetler -196ºC'lik azot buharına daldırılmak suretiyle donduruldu ve gobletlere yerleştirildi. Payetler suni tohumlama yapılıncaya kadar azot tankları içinde saklandı.

2.9. Spermanın Çözdürülmesi

Dondurulmuş boğa spermalarının bulunduğu payetler (her gruptan üç payet) 38±2 ºC su banyosunda 25-30 saniye bekletilerek ve suyun içerisinde biraz hareket ettirilerek çözdürüldü.

2.10. CASA ile Motilite Oranlarının Belirlenmesi

Dondurma-çözdürme sonrası spermatozoon motilite oranlarai CASA (Süpervision 3.2/Minitüb/Almanya) sistemi kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten CASA lamına 5 µl damlatılarak muayenesi gerçekleştirildi. Motilite oranı yüzde (%) olarak belirlendi.

2.11. Flow Sitometri Muayeneleri

Flow sitometri analizleri Cytoflex Flow sitometri (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) cihazı ile gerçekleştirildi. Sperma örnekleri 488 nm (50 mW laser output)'lik tek lazer ve üç renkli 525±40, 585±42, 610±20 nm filtreler ile değerlendirildi. Çalışma solüsyonları 100 µg/mL fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin 100 µg/ml FITC-PNA [L7381, sigma], 2.99 mM propidium iodide, 1:10 SYBR [L7011 molecular probes, Invitrogen], 1.53 mM, 5 µM Bodipy [D38611 molecular probes, Invitrogen], 5 mM MitoSOX Red (M36008, molecular probes, Invitrogen) Dimetil Sülfoksit (DMSO) ile hazırlanarak 0.22 µM Millipore Millex CV filtrelerden geçirildikten sonra -20 ºC'de saklandı.



Şekil 2.7. Cytoflex flow sitometre cihazı (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).



Şekil 2.8. Cytoflex flow sitometre boyamalarının hazırlanması.

2.11.1. Spermatozoon Canlılık Oranının Belirlenmesi

SYBR-14 ile Propidium Iodide (PI) boyama ile spermada ölü-canlı oranı değerlendirildi. Ependorf tüp içine 5 µL SYBR-14, 3 µL PI (2.99 mM) ve 482 µL buffer solusyonu eklendi, daha sonra 10 µL sperma fosfat buffer solüsyonuna eklenerek finalde $5x10^6$ sperm/mL konsantrasyonunda olacak şekilde sulandırıldı. Sperma örnekleri 37ºC'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Debris (sperma olmayan alanlar) uzaklaştırıldıktan sonra CytExpert 2.3 software (Beckman Coulter) analizi ile değerlendirildi (Inanc ve ark 2022). SYBR-14 ile PI boyalarının her ikisinin de nükleik asitlere affinitesi bulunmaktadır. SYBR-14, canlı spermatozoonların çekirdeklerinden yeşil floresan yayılmasını sağlarken, PI membran bütünlüğünü kaybetmiş dejenere spermatozoonlardan kırmızı floresan yayılmasını sağlamaktadır. Ayrıca PI, membranın bozulması üzerine SYBR-14 tarafından sergilenen floresanı bastırmaktadır (Riedy ve ark 1991, Garner ve ark 1994, Garner ve Johnson 1995, Garner 1997, Gillan ve ark 2005).

2.11.2. Spermatozoon Plazma Membran ve Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Çift boyama yönteminin kullanıldığı FITC-PNA/PI boyamada spermada akrozom ve plazma membran bütünlüğünü değerlendirebilmek için bir ependorf tüp içine 5 µL FITC-PNA, 3 µL PI, ve 482 µL PBS eklendi, daha sonra 10 µL sperma PBS solüsyonuna eklenerek finalde $5x10^6$ sperm/mL konsantrasyonu olacak şekilde sulandırıldı. Sperma örnekleri 37ºC'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.

Debris (sperma olmayan alanlar) uzaklaştırıldıktan sonra CytExpert 2.3 software (Beckman Coulter) analizi ile değerlendirildi (İnanç ve ark 2021). Hasarlı akrozomlarda, PSA lektin akrozomdaki α-D-glukozil ve α-D-mannosil kalıntılarını tanıyıp ve akrozomal matrisi boyadığında, PSA dış akrozomal membrana bağlanmış olmaktadır. Yeşil renk canlı hücreleri, kırmızı renk ölü hücreleri, mavi renk ölmekte olan spermatozoonları (ölü olarak değerlendirilirler) göstermektedir (Cross ve ark 1986, Hossain ve ark 2011, Korkmaz ve Çil 2020). Plazma membran bütünlüğünün ve akrozomal bütünlüğün aynı anda değerlendirilmesi için FITC-PSA ve PI sık kullanılan florokrom kombinasyonlarındandır (Pena ve ark 2003).

2.11.3. Spermatozoon Mitokondrial Oksidatif Stresin Belirlenmesi (Mitosox/PI)

Çift boyama yönteminin kullanıldığı Mitosox/PI boyamada spermada oksidatif stres değerlendirildi. Ependorf tüp içine 5 µL Mitosox, 3 µL PI ve 482 µL PBS eklendi, daha sonra 10 µL sperma PBS solüsyonuna eklenerek finalde $5x10^6$ sperm/mL konsantrasyonunda olacak şekilde sulandırıldı. Sperma örnekleri 37ºC'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Debris (sperma olmayan alanlar) uzaklaştırıldıktan sonra CytExpert 2.3 software (Beckman Coulter) analizi ile değerlendirildi (Avdatek ve ark 2020). Yüksek membran potansiyeline sahip mitokondri kırmızı-turuncu floresan, düşük ile orta membran potansiyeline sahip olanlar ise yeşil floresan ışık yaymaktadırlar (Garner ve ark 1997, Kalyanaraman ve ark 2012).

2.11.4. Spermatozoonlarda Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi

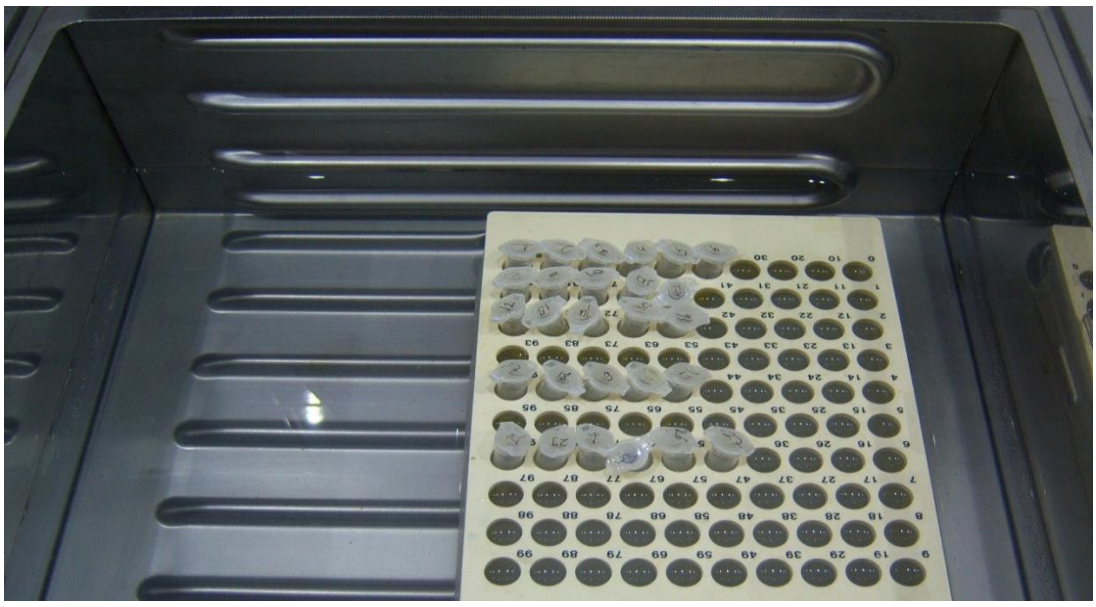
Sitozolik ROS Bodipy boyaması ile tespit edildi. Hücrelerdeki ROS'un göstergesi olarak kullanılan, kimyasal olarak indirgenmiş bir floresein formudur. Bu boyama yönteminde ependorf tüp içine 2.5 µL Bodipy, 3 µL Sybr-14 ve 484,5 µL PBS eklendi, daha sonra 10 µL sperma PBS solüsyonuna eklenerek finalde $5x10^6$ sperm/mL konsantrasyonunda olacak şekilde sulandırıldı. Sperma örnekleri 37 ºC'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Debris (sperma olmayan alanlar) uzaklaştırıldıktan sonra CytExpert 2.3 software (Beckman Coulter) analizi ile değerlendirildi (Trevizan ve ark 2018; Korkmaz ve ark., 2017).



Şekil 2.9. Cytoflex flow sitometre cihazında kullanılan kimyasallar.

2.12. Çözdürme Sonrası 2. Saat Motilite Muayeneleri

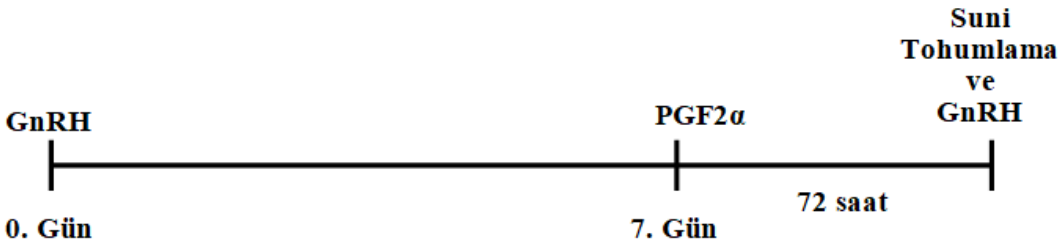
Payetlerin çözdürülmesini takiben 2. saatteki motilite oranları CASA sistem ile belirlendi.



Şekil 2.10. Çözdürülen spermaların 37 ºC su banyosunda bekletilmeleri.

2.13. Suni Tohumlama Uygulamaları

Çalışmanın ikinci bölümünde kullanılan boğalardan elde edilen payetler ile simental ırkı inek ve düvelerde tohumlamalar gerçekleştirildi. Çalışmanın her tekrarındaki gruplarından ve kontrol grubundan 13'er adet tohumlama olmak üzere her grup için toplam 39 suni tohumlama yapıldı. Tohumlama uygulamaları Sivas ili Zara ilçesinde bulunan serbest Veteriner Hekim tarafından gerçekleştirildi. Hayvanları senkronize etmek amacıyla cosynch72 protokolü uygulandı (Şekil 2.9). Gebelikler tohumlamaları takiben 60. günde rektal palpasyon ile suni tohumlamayı yapan Veteriner Hekim tarafından belirlendi.



Şekil 2.11. Cosynch72 protokolü uygulama şekli (Stevenson ve Britt 2017).

2.14. İstatistiksel Analizler

Çalışmada istatistiksel analizler IBM SPSS Statistics 25.0 (IBM, New York, USA) programında One way ANOVA testi kullanılarak yapıldı. Grupların varyans homojenliği Levene testi ile gerçekleştirildi. Gruplar arası farklılıklar Duncan testi kullanılarak belirlendi. P <0,05 düzeyinde farklılığın olması istatistik açıdan önemli kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Çalışmanın I. Bölümünde Dondurulan Payetlerin Çözdürme Sonrası Motilite Değerleri

Çalışmada çözdürme sonrası motilite değerleri tablo 3.1'de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Çalışmanın I. bölümünde dondurulan payetlerin çözdürme sonrası motilite değerleri.

GRUPLAR *	**MOTİLİTE (%) *****
Kontrol Grubu	58,18±3,10
Melatonin 0,1mM/ml	59,97±2,71
Melatonin 1 mM /ml	61,20 ±2,77
Melatonin 3 mM/ml	53,17±2,86
Katalaz 50 IU/ml	65,73±1,41
Katalaz 150 IU/ml	74,19±2,27
Katalaz 300 IU/ml	66,64±3,81
Kolesterol (CLC) 1,25 µg/ml**	57,60±1,59
Kolesterol (CLC) 2,5 µg/ml**	57,56±1,46
Kolesterol (CLC) 5 µg/ml**	55,35±3,51
p değeri	0,248

*Gruplar arası farklılık önemsizdir (p>0,05).

** CLC (kolesterol yüklü siklodekstrin) içermektedir.

***SEM: Ortalama standart hata.

Motilite sonuçları açısından gruplar arasında herhangi bir istatistiki farklılık tespit edilmedi (p> 0,05).

Melatonin, katalaz ve kolesterol-siklodekstrin (CLC) ilave edilen gruplar arasında herhangi bir istatistiki farklılık elde edilememesine rağmen, melatonin grupları içerisinde en yüksek motilite oranı 1 mM/ml melatonin grubundan elde edildi. Katalaz grupları içerisinde en yüksek motilite oranı 150 IU/ml katalaz grubundan elde edildi. Kolesterol grupları içerisinde en yüksek motilite oranı ve 2,5 µg/ml kolesterol-siklodekstrin (CLC) ilave edilen gruptan elde edildi.

Elde edilen sonuçlar göz önüne alınarak melatoninin 1 mM/ml, katalaz 150 IU/ml, kolesterol-siklodekstrin (CLC) 2,5 µg/ml dozlarının ikinci bölüm için en uygun dozlar olduğuna karar verildi ve çalışmanın ikinci bölümünde bu dozlar kullanıldı.

3.2 Çalışmanın II. Bölümünde A, B, C Boğalarından Elde Edilen Payetlerin Çözdürme Sonrası Motilite Değerleri

Çalışmanın bu bölümünde çözünme sonrası motiliteler CASA analiz sistemi ile belirlendi.

Tablo 3.2. A boğasına ait çözdürme sonrası motilite değerleri.

A BOĞASI GRUPLARI*	**MOTİLİTE (%) *****
Kontrol	66,19±1,14
Melatonin 1 mM/ml	71,29±1,93
Katalaz 150 IU/ml	76,94±1,81
Kolesterol (CLC) 2,5 µg/ml	71,95±2,15
Melatonin 1mM/ml + Katalaz 150 IU/ml	71,98±2,62
Melatonin 1mM/ml + Kolesterol (CLC) 2,5 µg/ml**	62,84±3,17
Katalaz 150 IU/ml + Kolesterol (CLC) 2,5 µg/ml**	67,27±1,24
Melatonin 1mM/ml + Katalaz 150 IU/ml + Kolesterol (CLC) 2,5 µg/ml**	58,69±2,87
p değeri	0,093

*Gruplar arası farklılık önemsizdir (p>0,05).

** CLC (kolesterol yüklü siklodekstrin) içermektedir.

***SEM: Ortalama standart hata.

A boğasına ait motilite değerleri açısından gruplar arasında herhangi bir istatistiki farklılık tespit edilmedi (p>0,05).

Tablo 3.3. B boğasına ait çözdürme sonrası motilite değerleri.

B BOĞASI GRUPLARI	**MOTİLİTE (%) ****
Kontrol	65,70±0,87^{bc}
Melatonin 1 mM/ml	71,81±1,95^{a}
Katalaz 150 IU/ml	71,44±1,30^{a}
Kolesterol (CLC) 2,5 µg/ml	70,16±1,15^{ab}
Melatonin 1mM/ml + Katalaz 150 IU/ml	70,11±2,89^{ab}
Melatonin 1mM/ml + Kolesterol* (CLC) 2,5 µg/ml	62,89±2,03^{cd}
Katalaz 150 IU/ml + Kolesterol* (CLC) 2,5 µg/ml	67,00±0,62^{abc}
Melatonin 1mM/ml + Katalaz 150 IU/ml + Kolesterol*(CLC) 2,5 µg/ml	59,49±0,63^{d}
p değeri	0,000

a,b,c,d harfleri sütunlar içerisindeki istatistiki farkı ifade etmektedir (p<0,05).

a,b harfleri aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan gruplar arası farklılıklar önemlidir (p<0,05).

* CLC (Kolesterol Yüklü Siklodekstrin) içermektedir.

**SEM: Ortalama standart hata.

B boğasından elde edilen payetlerin çözdürme sonu motilite değerleri açısından; kontrol grubu ile melatonin (1 mM/ml) grubu, kontrol grubu ile katalaz (150 IU/ml) grubu, kontrol grubu ile melatonin (1mM/ml) + katalaz (150 IU/ml) +

kolestreol (2,5 µg/ml) grubu arasındaki istatistiki farklılıklar önemli bulundu (p<0,05). Melatonin (1 mM/ml) grubu ile melatonin (1mM/ml) + kolestreol (2,5 µg/ml) grubu, melatonin (1 mM/ml) grubu ile melatonin (1mM/ml) + katalaz (150 IU/ml) + kolestreol (2,5 µg/ml) grubu arasındaki istatistiki farklılıklar önemli bulundu (p<0,05). Katalaz (150 IU/ml) grubu ile melatonin (1mM/ml) + kolestreol (2,5 µg/ml) grubu, katalaz (150 IU/ml) grubu ile melatonin (1mM/ml) + katalaz (150 IU/ml) + kolestreol (2,5 µg/ml) grubu arasındaki istatistiki farklılıklar önemli bulundu (p<0,05). Kolestreol (2,5 µg/ml) grubu ile melatonin (1mM/ml) + kolestreol (2,5 µg/ml) grubu, kolestreol (2,5 µg/ml) grubu ile melatonin (1mM/ml) + katalaz (150 IU/ml) + kolestreol (2,5 µg/ml) grubu arasındaki istatistiki farklılıklar önemli bulundu (p<0,05). Melatonin (1mM/ml) + katalaz (150 IU/ml) grubu ile melatonin (1mM/ml) + kolestreol (2,5 µg/ml) grubu, melatonin (1mM/ml) + katalaz (150 IU/ml) grubu ile melatonin (1mM/ml) + katalaz (150 IU/ml) + kolestreol (2,5 µg/ml) grubu arasındaki istatistiki farklılıklar önemli bulundu (p<0,05). Katalaz (150 IU/ml) + kolestreol (2,5 µg/ml) grubu ile melatonin (1mM/ml) + katalaz (150 IU/ml) + kolestreol (2,5 µg/ml) grubu ile arasındaki istatistiki farklılıklar önemli bulundu (p<0,05). Diğer gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemsiz (p>0,05) olarak belirlendi.

Tablo 3.4. C boğasına ait çözdürme sonrası motilite değerleri.

C BOĞASI GRUPLARI*	**MOTİLİTE (%) *** **
Kontrol	65,97±1,54
Melatonin 1 mM/ml	71,01±1,81
Katalaz 150 IU/ml	73,90±1,71
Kolesterol (CLC) 2,5 µg/ml	68,26±2,13
Melatonin 1mM/ml + Katalaz 150 IU/ml	67,84±4,26
Melatonin 1mM/ml + Kolesterol (CLC) 2,5 µg/ml**	65,42±4,48
Katalaz 150 IU/ml + Kolesterol (CLC) 2,5 µg/ml**	68,21±1,83
Melatonin 1mM/ml + Katalaz 150 IU/ml + Kolesterol (CLC) 2,5 µg/ml**	58,25±4,22
p değeri	0,08

*Gruplar arası farklılık önemsizdir (p>0,05).

**Kolesterol CLC (Kolesterol yüklü siklodekstrin) içermektedir.

***SEM: Ortalama standart hata.

C boğası açısından gruplar arasında herhangi bir istatistiki farklılık tespit edilmedi (p>0,05).

Sonuç olarak; çalışmanın ikinci bölümünde A ve C boğalarından elde edilen antioksidan gruplar arasında istatistiki açıdan fark belirlenemezken (p>0,05), B boğasına ait antioksidan grupları arasında istatistiki açıdan farklılık belirlendi

(p<0,05). Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında kombine grupların motilite oranlarının düşük olması ve melatonin grubunun B boğasında katalaz ile benzer sonuç vermesinden dolayı bu gruplar haricindeki kontrol, katalaz 150 IU/ml, kolesterol-siklodekstrin (CLC) 2,5 µg/ml gruplarının flow sitometri analizleri ve suni tohumlama için en uygun gruplar olduğuna karar verildi.

3.3. Flow Sitometri Muayene Sonuçları

Tablo 3.5. A boğasının flow sitometri sonuçları.

	FITCH-PI-	SYBR+	MITOSOX+	BODIPY+
A BOĞASI	**(%) Oranı***	**(%) Oranı***	**(%) Oranı***	**(%) Oranı***
Kontrol	50,10±0,72	48,45±0,38^{b}	50,04±0,20	51,17±1,15
Katalaz 150 IU/ml	58,37±1,27	61,18±1,17^{a}	41,04±1,44	46,91±3,49
Kolesterol (CLC) 2,5 µg /ml	47,55±3,73	45,33±2,41^{b}	52,40±2,05	51,92±4,83
p değeri	0,279	0,021	0,115	0,890

a,b harfleri sütunlar içerisindeki istatistiki farkı ifade etmektedir (p<0,05).

a,b harfleri aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan gruplar arası farklılıklar önemlidir (p<0,05).

*SEM: Ortalama standart hata.

A boğasına ait payetlerin flow-sitometri sonuçlarının istatistik analizinde; canlı spermatozoon muayenesi açısından (SYBR+), katalaz (150 IU/ml) grubu ile kontrol ve kolesterol (2,5 µg /ml) grupları arasında farklılık istatistiki açıdan önemli bulundu (p<0,05). Öte yanda plazma membran ve akrozom bütünlüğü (FITCH-PI-), mitokondriyal oksidatif stres (MITOSOX+) ve ROS değerleri (BODIPY+) açısından gruplar arasında istatistiki bir farklılık gözlenmedi (p>0,05).

Tablo 3.6. B boğasının flow sitometri sonuçları.

	FITCH-PI-*	SYBR+*	MITOSOX+*	BODIPY+*
B BOĞASI	**(%) Oranı****	**(%) Oranı****	**(%) Oranı****	**(%) Oranı****
Kontrol	64,38±0,92	58,25±2,19	36,20±1,45	55,02±1,03
Katalaz 150 IU/ml	61,07±1,12	57,72±0,26	41,04±1,26	43,44±2,16
Kolesterol CLC 2,5 µg/ml	56,64±3,67	50,37±1,97	49,94±3,79	54,45±3,32
p Değeri	0,464	0,335	0,150	0,416

*(p>0,05).

**SEM: Ortalama standart hata.

B boğasına ait payetlerin flow-sitometri sonuçlarının istatistik analizinde; plazma membran ve akrozom bütünlüğü (FITCH-PI-), canlı spermatozoon muayenesi (SYBR+), mitokondriyal oksidatif stres (MITOSOX+) ve ROS değerleri (BODIPY+) açısından gruplar arasında istatistiki bir farklılık gözlenmedi (p>0,05).

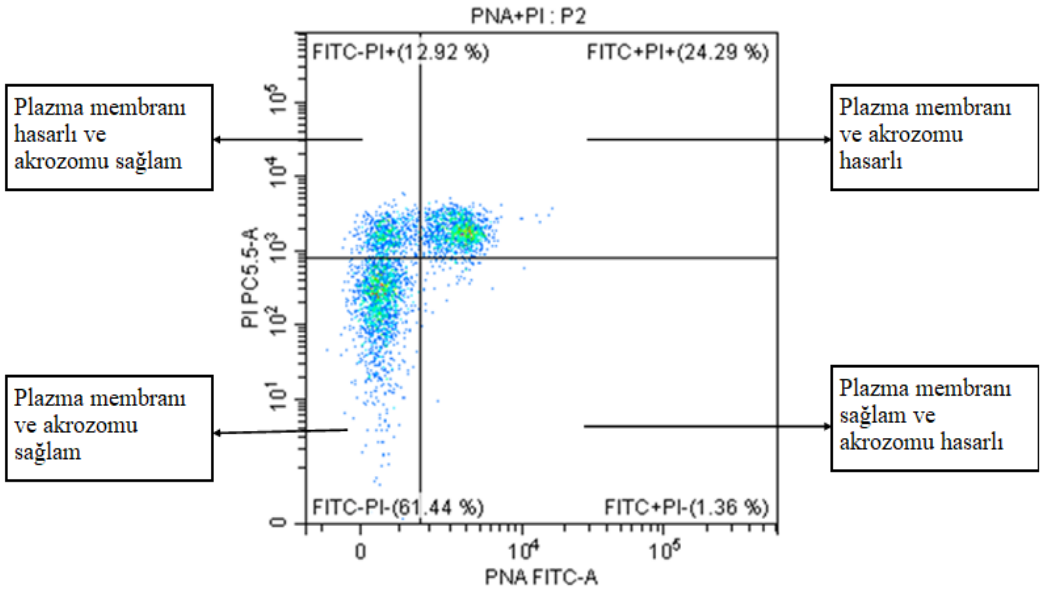
Tablo 3.7. C boğasına ait flow sitometri sonuçları.

	FITCH-PI-*	SYBR+*	MITOSOX+*	BODIPY+*
C BOĞASI	**(%) Oranı****	**(%) Oranı****	**(%) Oranı****	**(%) Oranı****
Kontrol	62,27±0,66	63,61±0,51	39,42±1,17	39,23±1,26
Katalaz 150 IU/ml	63,60±2,25	59,47±3,64	35,03±2,14	38,63±2,03
Kolesterol CLC 2,5 µg/ml	62,94±2,97	53,55±2,83	36,67±1,09	40,17±3,45
p Değeri	0,937	0,622	0,535	0,987

*(p>0,05).

**SEM: Ortalama standart hata.

C boğasına ait payetlerin flow-sitometri sonuçlarının istatistik analizinde; plazma membran ve akrozom bütünlüğü (FITCH-PI-), canlı spermatozoon muayenesi (SYBR+), mitokondriyal oksidatif stres (MITOSOX+) ve ROS değerleri (BODIPY+) açısından gruplar arasında istatistiki bir farklılık gözlenmedi (p>0,05).



Şekil 3.1. Dondurulup çözdürülen boğa spermasının FITC-PNA/PI ile boyanması

FITC PNA, FITC-PI-: Q1-LL, FITC+PI-: Q1-LR, FITC+PI+: Q1-UR, FITC-PI+: Q1-UL

FITC-A = Fluorescein isothiocyanate-conjugated axis;

FITC-PNA/PI = Fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin/propidium iodide;

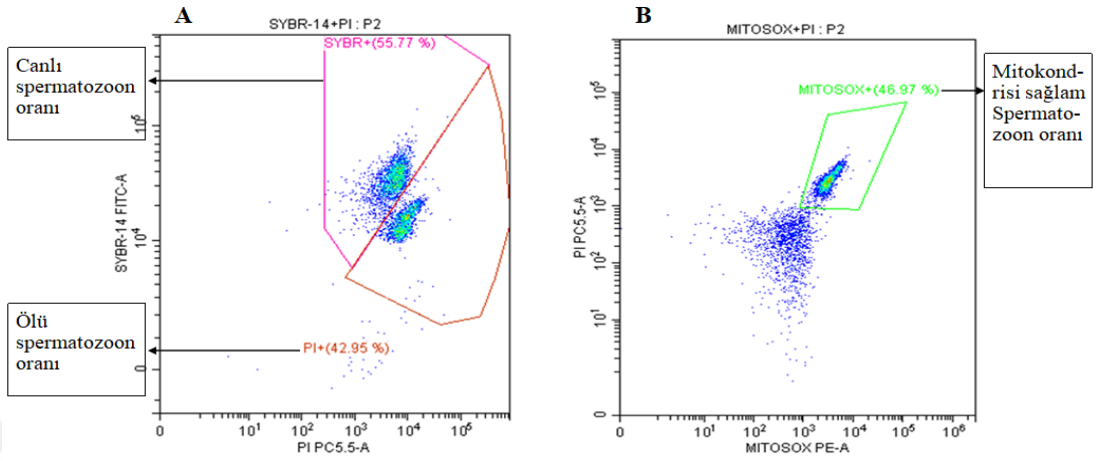
FITC - PI - = Plazma membranı ve akrozomu sağlam;

FITC - PI + = Plazma membranı hasarlı ve akrozomu sağlam;

FITC + PI - = Plazma membranı sağlam ve akrozomu hasarlı;

FITC + PI + = Plazma membranı ve akrozomu hasarlı;

PE-A = Propidium iodide axis (Inanc ve ark 2019).



Şekil 3.2. Dondurulup çözdürülen boğa spermasının A: SYBR-14/PI, ve B: MITOSOX ile boyamasının flow sitometrede analizi

A: SYBR14+PI= SYBR14+ Canlı spermatozoon oranı, PI+ ölü spermatozoon oranı

B: MITOSOX+PI= Mitokondriyal oksidatif stresin belirlenmesinde MITOSOX+ mitokondrisi sağlam Spermatozoon oranı, PI Mitokondrisi hasarlı spermatozoon oranı

3.4. Çözdürme Sonrası 2. Saat Motilite Değerleri

Tablo 3.8. A boğasının çözdürme sonrası 2. saat motilite değerleri.

A BOĞASI	**0.Saat Motilite Oranı (%)***	**2.Saat Motilite Oranı (%)***
Kontrol	66,19±1,96^{b}	23,03±1,53^{b}
Katalaz 150 IU/ml	76,94±2,51^{a}	54,63±2,07^{a}
Kolesterol (CLC) 2,5 µg /ml	71,95±2,15^{ab}	54,20±1,73^{a}
p değeri	0,041	0,012

a,b harfleri sütunlar içerisindeki istatistiki farkı ifade etmektedir ($p<0,05$).

a,b harfleri aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan gruplar arası farklılıklar önemlidir ($p<0,05$).

*SEM: Ortalama standart hata.

A boğasına ait payetlerin çözdürme sonrası 0. saate ilişkin değerlerde katalaz (150 IU/ml) grubu ile kontrol grubu arasındaki farklılık istatistiki açıdan önemli olarak bulundu ($p<0,05$). Çözdürme sonrası 2. saat değerleri açısından katalaz (150 IU/ml) grubu ile kontrol grubu ve kolesterol (2,5 µg /ml) grubu ile kontrol grubu arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli olarak bulundu ($p<0,05$). Motilite değerleri

açısından diğer gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemsiz olarak belirlendi (p>0,05).

Tablo 3.9. B boğasının çözdürme sonrası 2. saat motilite değerleri.

B BOĞASI	**0.Saat Motilite Oranı (%)***	**2. Saat Motilite Oranı (%)***
Kontrol	65,70±0,87[b]	28,16±0,59[b]
Katalaz 150 IU/ml	71,44±1,30[a]	49,03±1,37[a]
Kolesterol (CLC) 2,5 µg /ml	70,16±1,15[a]	50,50±1,22[a]
p değeri	0,025	0,008

a,b harfleri sütunlar içerisindeki istatistiki farkı ifade etmektedir (p<0,05).

a,b harfleri aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan gruplar arası farklılıklar önemlidir (p<0,05).

*SEM: Ortalama standart hata.

B boğasına ait payetlerin çözdürme sonrası gerek 0. gerekse 2. saatteki motilite değerleri açısından katalaz (150 IU/ml) grubu ile kontrol grubu ve kolesterol (2,5 µg /ml) grubu ile kontrol grubu arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli olarak bulundu (p<0,05). Motilite değerleri açısından diğer gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemsiz olarak belirlendi (p>0,05).

Tablo 3.10. C boğasının çözdürme sonrası 2. saat motilite değerleri.

C BOĞASI	**0.Saat Motilite Oranı (%)***	**2.Saat Motilite Oranı (%)***
Kontrol	65,97±1,54[b]	31,60±0,56[b]
Katalaz 150 IU/ml	73,90±1,71[a]	45,07±1,30[a]
Kolesterol (CLC) 2,5 µg /ml	68,26±2,13[a]	45,84±1,70[a]
p değeri	0,006	0,002

a,b harfleri sütunlar içerisindeki istatistiki farkı ifade etmektedir (p<0,05).

a,b harfleri aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan gruplar arası farklılıklar önemlidir (p<0,05).

*SEM: Ortalama standart hata.

C boğasına ait payetlerin çözdürmesini takiben 0. saat ve 2. saat motilite değerleri açısından katalaz (150 IU/ml) grubu ile kontrol grubu ve kolesterol (2,5 µg /ml) grubu ile kontrol grubu arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli olarak bulundu (p<0,05). Motilite değerleri açısından diğer gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemsiz olarak belirlendi (p>0,05).

3.5. Fertilite Sonuçları

Tablo 3.11. A boğasına ait fertilite sonuçları.

A BOĞASI	Pozitif Gebelik Sayısı*	Pozitif Gebelik Oranı* (%)
Kontrol	12/39	30,77±1,36
Katalaz 150 IU/ml	22/39	56,41±2,54
Kolesterol (CLC) 2,5 µg /ml	21/39	53,85±3,12
p değeri	0,57	

* (p>0,05).

A boğasına ait spermalarla yapılan tohumlamaları takiben elde edilen gebelik oranlarında istatistiki açıdan herhangi bir farklılık elde edilmedi (p>0,05).

Tablo 3.12. B Boğasına Ait Fertilite Sonuçları.

B BOĞASI	Pozitif Gebelik Sayısı*	Pozitif Gebelik Oranı* (%)
Kontrol	22/39	56,41±2,47
Katalaz 150 IU/ml	25/39	64,10±1,18
Kolesterol (CLC) 2,5 µg /ml	20/39	51,28±2,23
p değeri	0,28	

*(p>0,05).

B boğasına ait spermalarla yapılan tohumlamaları takiben elde edilen gebelik oranlarında istatistiki açıdan herhangi bir farklılık elde edilmedi (p>0,05).

Tablo 3.13. B Boğasına Ait Fertilite Sonuçları.

C BOĞASI	Pozitif Gebelik Sayısı*	Pozitif Gebelik Oranı* (%)
Kontrol	19/39	48,72±2,79
Katalaz 150 IU/ml	19/39	48,72±4,09
Kolesterol (CLC) 2,5 µg /ml	24/39	61,54±1,15
p değeri	0,527	

*(p>0,05).

C boğasına ait spermalarla yapılan tohumlamaları takiben elde edilen gebelik oranlarında istatistiki açıdan herhangi bir farklılık elde edilmedi (p>0,05).

4. TARTIŞMA

Katalaz ile dondurulmuş spermatozoonların çözdürülme sonrası motilitesi

Sing ve ark (2020); Holstein ırkı boğalardan elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı ve %7 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya katalazı 100 IU/ml dozda eklemişler ve kontrol grubu dahil iki grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu kontrol grubunda %48,00±2,49 ve 100 IU/ml katalaz eklenen grupta %58,00±1,33 motilite oranları tespit edilmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile 100 IU/ml katalaz eklenen grubun motilite değerleri arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla 100 IU/ml katalaz ilavesinin motiliteyi koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedirler. Asadpour ve ark (2011); Holstein ırkı boğalardan elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı ile %7 gliserol içeren tris sulandırıcısı ve sodyum sitrat sulandırıcısı olmak üzere iki ayrı sulandırıcı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar her iki sulandırıcıya farklı dozlarda katalaz (100 IU/ml ve 200 IU/ml) ilave etmişler ve kontrol grubu dahil altı grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucunda sitrat-yumurta sarısı içeren sulandırıcıdan elde edilen motilite oranları sırasıyla kontrol grubunda %40,70±1,15; 100 IU/ml katalaz eklenen grupta %46,70±2,89 ve 200 IU/ml katalaz eklenen grupta %43,30±3,00 olarak tespit edilmiştir. Çalışmanın tris-yumurta sarısı içeren sulandırıcısından elde edilen motilite oranları ise sırasıyla kontrol grubunda %44,00±1,73; 100 IU/ml katalaz eklenen grupta %46,70±2,90 ve 200 IU/ml katalaz eklenen grupta %44,00±2,00 olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar tris sulandırıcısına eklenen katalazın sodyum sitrat sulandırıcısına eklenen katalaza göre motilite kaybını daha iyi önlediğini belirtmektedirler. Arslan ve ark (2019); boğalardan elde ettikleri spermayı Triladyl sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya farklı dozlarda katalaz (5 IU/ml; 10 IU/ml; 15 IU/ml; 20 IU/ml) ekleyip kontrol grubu dahil beş grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu kontrol grubunda %44,66±13,30; 5 IU/ml katalaz eklenen grupta %45,49±15,34; 10 IU/ml katalaz eklenen grupta %44,60±15,87; 15 IU/ml katalaz eklenen grupta %45,76±14,50 ve 20 IU/ml katalaz eklenen grupta %45,39±15,69 motilite oranları tespit edilmiştir. Araştırmacılar boğa spermalarının dondurulmasında Trilady sulandırıcısına eklenen katalaz dozlarının motilite kaybını önleyici etkisi olduğunu belirtmektedirler. Bansal ve ark (2016); Buffalo boğalarından elde ettikleri spermayı yumurta sarısı içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya katalazın farklı dozlarını (100 µM/ml; 200 µM/ml) ilave

etmişler ve kontrol grubu dahil üç grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu kontrol grubunda %53,75; 100 µM/ml katalaz eklenen grupta %57,50 ve 200 µM/ml katalaz eklenen grupta %63,75 motilite oranları tespit edilmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile 200 µM/ml katalaz eklenen grubun motilite değerleri arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini dolayısıyla, 200 µM/ml katalaz ilavesinin motiliteyi koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedirler. Sunulan tez çalışmasının I. bölümünde motilite oranları kontrol grubunda %58,18±3,10; 50 IU/ml katalaz eklenen grupta %65,73±1,41; 150 IU/ml katalaz eklenen grupta %74,19±2,27 ve 300 IU/ml katalaz eklenen grupta ise %66,64 % ±3,81 olarak elde edilmiştir. Tez çalışmasının II. bölümünde A boğasının kontrol grubunda %66,19±1,14 ve 150 IU/ml katalaz eklenen grubunda %76,94±1,81 motilite oranları elde edilmiştir. B boğasının kontrol grubunda %65,70±0,87; 150 IU/ml katalaz eklenen grubunda %71,44±1,30 motilite oranları elde edilmiştir. C boğasının kontrol grubunda %65,97±1,54; 150 IU/ml katalaz eklenen grubunda %73,90±1,71 motilite oranları elde edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen motilite sonuçları Sing ve ark (2020)'nın bulguları ile oransal olarak benzerlik gösterirken, Asadpour ve ark (2011), Arslan ve ark (2019)'nın bulguları ile farklılık göstermektedir. Bansal ve ark. (2016)'nın bulguları ile I. bölüm motilite sonuçları benzerlik gösterirken, II. bölümden elde edilen motilite sonuçları ise farklılık göstermektedir. Katalazın H_2O_2 parçalayıcı etkisinden dolayı, tris sulandırıcısına ilave edilen 150 IU/ml katalaz ortamda bulunan ROS'ların zararlı etkisini azaltmak süretiyle motilite oranını koruduğu, ayrıca boğa spermaları için düşük miktar katalazın ortamda bulunan ROS miktarları için yetersiz olabileceği ve yüksek miktar katalazın ise boğa spermaları için toksik olabileceği ifade edilmektedir (Tarın ve ark 1998, Aitken ve ark 2013). Sunulan tez çalışmasında motilite oranlarının diğer çalışmalara göre daha yüksek elde edilmesi, çalışmada kullanılan katalaz dozlarının, sulandırıcıların (Trilady, sodyum sitrat, tris) kimyasal içeriklerinin ve boğa ırklarının (Holstein, Simental) farklı olması ile boğaların beslenme düzeylerine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Melatonin ile dondurulmuş spermanın çözdürülme sonrası motilitesi

Chaundhary ve ark (2021); Buffalo boğalarından elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı ve %6,4 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya melatoninin 1 mM/ml dozunu ilave etmişler ve kontrol

grubu dahil iki grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu kontrol grubunda %35,12±1,66 ve 1 mM/ml melatonin eklenen grupta %43,18±1,62 motilite oranları tespit edilmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile 1 mM/ml melatonin eklenen grubun motilite değerleri arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla 1 mM/ml melatonin ilavesinin motiliteyi koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedirler. ChaithraShree ve ark (2020); boğalardan elde ettikleri spermayı yumurta sarısı ve gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya melatoninin farklı dozlarını (0,1 mM/ml; 0,2 mM/ml; 0,25 mM/ml) eklemişler ve kontrol grubu dahil beş grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu kontrol grubunda %62,00±10,16; 0,1 mM/ml melatonin eklenen grupta %74,00±8,25; 0,2 mM/ml melatonin eklenen grupta %50,25±7,79 ve 0,25 mM/ml melatonin eklenen grupta %84,00±7,47 motilite oranları tespit edilmiştir. Sperma sulandırıcısına 0,1 mM/ml ve 0,25 mM/ml melatonin eklenmesinin diğer gruplara göre motiliteyı koruyucu etkisi olduğu araştırmacılar tarafından belirtilmektedir. Asrafi ve ark (2013); Holstein ırkı boğalardan elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı ve %7 gliserol içeren sodyum sitrat sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya melatoninin farklı dozlarını (0,1 mM/ml; 1 mM/ml; 2 mM/ml; 4 mM/ml) ilave etmişler ve kontrol grubu dahil beş grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu kontrol grubunda %43,00±2,40; 0,1 mM/ml melatonin eklenen grupta %51,70±2,00; 1 mM/ml melatonin eklenen grupta %60,80±4,0; 2 mM/ml melatonin eklenen grupta ise %62,50±4,20; 3 mM/ml melatonin eklenen grupta %55,40±3,40 ve 4 mM/ml melatonin eklenen grupta %47,50±2,80 motilite oranları tespit edilmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile 0,1 mM/ml, 1 mM/ml, 2 mM/ml, 3 mM/ml ve 4 mM/ml melatonin eklenen grupların motilite değerleri arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini belirtmişlerdir. Sperma sulandırıcısına 1 mM/ml ve 2 mM/ml melatonin eklenmesinin diğer gruplara göre motiliteyı daha iyi koruyucu etkisi olduğu araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır. Sunulan tez çalışmasının I. bölümünde motilite oranları kontrol grubunda %58,18±3,10; 0,1 mM/ml melatonin eklenen grupta %59,97±2,71; 1 mM/ml melatonin eklenen grupta %61,20±2,77 ve 3 mM/ml melatonin eklenen grupta ise %53,17±2,86 olarak elde edilmiştir. Tez çalışmasının II. bölümünde A boğasının kontrol grubunda %66,19±1,14 ve 1 mM/ml melatonin eklenen grubunda %71,29±1,93 motilite oranları elde edilmiştir. B boğasının kontrol grubunda %65,70±0,87 ve 1 mM/ml melatonin eklenen grubunda %71,81±1,95 motilite oranları elde edilmiştir. C boğasının kontrol grubunda %65,97±1,54 ve 1 mM/ml melatonin

eklenen grubunda ise %71,01±1,81 motilite oranları elde edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen motilite sonuçları Chaundhary ve ark (2021)'nın bulgularından yüksek olarak belirlenmiş, ChaithraShree ve ark (2020)'nın bulguları ile yakınlık göstermektedir. Asrafi ve ark (2013)'nın bulguları ile I. bölüm motilite sonuçları benzerlik gösterirken, II. bölümde A ve B boğalarının sonuçları farklılık, C boğasının sonuçları ise benzerlik göstermektedir. Bu farklılıkların kullanılan boğa ırklarının (Holstein, Simental), sulandırıcıların (Trilady, tris, sodyum sitrat) kimyasal içeriklerinin ve gliserol dozlarının (%6,4; %7) farklı olması ile mevsimsel farklılıklardan kaynaklı olabileceği ifade edilebilir. Melatonin antioksidan olarak; glutathione peroxidase (GSH-Px) enzimini aktive ederek, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini artırarak, oksidatif stres esnasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önleyerek ve nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe ederek dolaylı bir etki göstermektedir (Reiter ve ark 2009). Serbest radikaller üzerindeki dolaylı etkisinden kaynaklı olarak boğa sperma sulandırıcılarına eklenen 1 mM/ml melatonin dozunun spermatozoonların korunmasında daha etkili olduğu, ayrıca melatoninin spermatozoonlar üzerindeki koruyucu etkisinin, toplam antioksidan kapasitesinin ve antioksidan enzimleri aktivitesinin artmasının bir sonucu olarak LPO miktarını azaltmasıyla ilişkili olabileceği ifade edilebilir.

Kolesterol-siklodekstrin (CLC) ile dondurulmuş spermanın çözdürülme sonrası motilitesi

Purdy ve Graham (2004); Holstein ırkı boğalardan elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı %14 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya kolesterolün farklı dozlarını (0,75 mg/ml; 1,5 mg/ml; 3 mg/ml; 4,5 mg/ml; 6 mg/ml; 7,5 mg/ml) ilave etmişler ve kontrol grubu dahil yedi grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu kontrol grubunda %42,00; 0,75 mg/ml CLC eklenen grupta %58,00; 1,5 mg/ml CLC eklenen grupta %60,00; 3 mg/ml CLC eklenen grupta %57,00; 4,5 mg/ml CLC eklenen grupta %54,00; 6 mg/ml CLC eklenen grupta %53 ve 7,5 mg/ml CLC eklenen grupta ise %48,00 motilite oranları tespit edilmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile 1,5 mg/ml CLC eklenen grubun motilite değerleri arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla 1,5 mg/ml CLC ilavesinin motiliteyi koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedirler. Amorim ve ark (2009); Holstein ırkı boğalardan elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı

içeren ve gliserol eklemedikleri tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya kolesterol 1,5 mg/ml dozunu ilave etmişlerdir. Çalışma sonucu kontrol grubunda %40,00±12,00; 1,5 mg/ml CLC eklenen grupta %55,00±11,00 motilite oranları tespit edilmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile 1,5 mg/ml CLC eklenen grubun motilite değerleri arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla 1,5 mg/ml CLC ilavesinin motiliteyi koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedirler. Yang ve ark (2021); Simental ırkı boğalardan elde ettikleri spermayı sulandırmak için iki ayrı sulandırıcı kullanmışladır. Araştırmacılar kontrol grubu için %20 yumurta sarısı ile %7 gliserol içeren tris sulandırıcısı kullanmışlardır. Deney gruplarında ise %14 gliserol içeren tris (yumurta sarısı içermeyen) sulandırıcısı kullanmışlardır. Deney grupları için %14 gliserol içeren tris sulandırıcısına 1 mg/ml ve 2 mg/ml kolesterol-siklodekstrin (CLC) ilave ederek boğa spermasını sulandırmışlardır. Çalışma sonucu kontrol grubunda %57,81±6,20; 1 mg/ml CLC eklenen grupta %50,60±3,90 ve 2 mg/ml CLC eklenen grupta ise %48,90±6,70 motilite oranları tespit edilmiştir. Araştırmacılar daha sonra %20 yumurta sarısı %7 gliserol içeren tris sulandırıcısı kullanarak üç farklı boğadan ayrı ayrı sperma elde edip her boğa için kontrol grubu, yumurta sarısı içermeyen fakat %14 gliserol içeren tris sulandırıcılarından da 0,5 mg/ml CLC grubu ve 1 mg/ml CLC grupları oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu A boğasının kontrol grubunda %69,80±2,70; 0,5 mg/ml CLC eklenen grubunda %67,90±3,30; ve 1 mg/ml CLC eklenen grubunda ise %66,70±4,70 motilite oranları tespit edilmiştir. B boğasının kontrol grubunda %58,10±5,30; 0,5 mg/ml CLC eklenen grubunda %47,20±5,90 ve 1 mg/ml CLC eklenen grubunda ise %63,20±3,20 motilite oranları tespit edilmiştir. C boğasının kontrol grubunda %52,00±4,00; 0,5 mg/ml CLC eklenen grubunda %20,80±5,90 ve 1 mg/ml CLC eklenen grubunda ise %29,00±6,50 motilite oranları tespit edilmiştir. Araştırmacılar 1 mg/ml CLC ilavesinin motiliteyi koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedirler. Sunulan tez çalışmasının I. bölümünde motilite oranları kontrol grubunda %58,18±3,10; 1,25 µg/ml CLC eklenen grupta %57,60±1,59; 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta %57,56±1,46 ve 5 µg/ml CLC eklenen grupta ise %52,16±3,51 olarak elde edilmiştir. Tez çalışmasının II. bölümünde A boğasının kontrol grubunda %66,19±1,14 ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta %71,95±2,15 motilite oranları elde edilmiştir. B boğasının kontrol grubunda %65,70±0,87 ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta %70,16±1,15 motilite oranları elde edilmiştir. C boğasının kontrol grubunda %65,97±1,54 ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta %68,26±2,13 motilite oranları elde edilmiştir. Tez çalışmasının I. bölümünden

elde edilen motilite değerleri Amorim ve ark (2009), Purdy ve Graham (2004)'ın bulgularıyla benzerlik gösterirken, II. bölümünden elde edilen motilite değerleri ise farklılık göstermektedir. Tez çalışmasının I. ve II. bölümünden elde edilen motilite değerleri Yang ve ark (2021)'nın bulguları ile farklılık göstermektedir. Çalışmanın II. bölümünden elde edilen motilite değerleri diğer araştırmacıların motilite değerlerinden yüksek olarak tespit edilmiştir. Motilite değerleri arasındaki farklılıklara kullanılan kolesterol dozlarının, boğa ırklarının (Holstein, Simental) ve gliserol oranlarının (0; %7; %14) farklı olması ile yumurta sarısı gibi membran koruyucuların ilave edilmemesinin sebep olabileceği düşünülmektedir.

Melatonin- katalaz ile dondurulmuş spermanın çözdürülme sonrası motilitesi

Sunulan tez çalışmasında sulandırıcıya 1 mM/ml melatonin + 150 IU/ml katalaz ilavesini takiben çözdürme sonrası, A boğasına ait örneklerin kontrol grubunda %66,19±1,14 ve 1 mM/ml melatonin + 150 IU/ml katalaz eklenen grupta %71,98±2,62 motilite oranları elde edildi. B boğasına ait örneklerin kontrol grubunda %65,70±0,87 ve 1 mM/ml melatonin + 150 IU/ml katalaz eklenen grupta %70,11±2,89 motilite oranları tespit edildi. C boğası örneklerinde ise motilite oranları kontrol grubunda %65,97±1,54 ve 1 mM/ml melatonin + 150 IU/ml katalaz eklenen grupta %67,84±4,26 olarak belirlendi. Konu ile ilgili yapılan literatür araştırmalarında boğa sperması sulandırıcılarına antioksidan olarak melatonin ve katalaz kombinasyonun eklendiği çalışmalar bulunmaması sebebiyle, elde edilen sonuçların karşılaştırması yapılamamıştır. Dolayısıyla konu kendi bulgularımız çerçevesinde tartışılmıştır. Melatonin dolaylı olarak oksidatif stres esnasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önlediği için (Reiter ve ark 2009) katalazın etkisini artırarak spermatozoonların motilite kaybını engelleyeceği ifade edilebilir. Ayrıca antioksidanların kombine olarak uygulanmasının spermatozoon kalitesini korumadaki rolünü net bir şekilde anlamak ve aydınlatmak için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Melatonin- kolesterol-siklodekstrin (CLC) ile dondurulmuş spermanın çözdürülme sonrası motilitesi

Sunulan tez çalışmasında sulandırıcıya 1mM/ml melatonin + 2,5 µg/ml kolesterol (CLC) ilavesini takiben çözdürme sonrası, A boğasına ait örneklerin kontrol grubunda %66,19±1,14 ve 1mM/ml melatonin + 2,5 µg/ml kolesterol (CLC) eklenen

grupta %62,84±3,17 motilite oranları elde edildi. B boğasına ait örneklerin kontrol grubunda %65,70±0,87 ve 1mM/ml melatonin + 2,5 µg/ml kolesterol eklenen grupta %62,89±2,03 motilite oranları elde edildi. C boğası örneklerinde ise motilite oranları kontrol grubunda %65,97±1,54 ve 1 mM/ml melatonin + 2,5 µg/ml kolesterol eklenen grubunda %65,42±4,48 olarak belirlendi. Günümüze kadar yapılan araştırmalarda boğa sperması sulandırıcılarına antioksidan olarak melatonin ve CLC'nin kombine eklendiği çalışmalara rastlanılmamıştır. Dolayısıyla konu kendi bulgularımız çerçevesinde tartışılmıştır. Melatoninin oksidatif stres esnasında anioksidanların aktivitesindeki azalmayı önlediği ve ve ortamda bulunan antioksidanların etkisinin dolaylı olarak artırdığı ifade edilmiştir (Reiter ve ark 2009). CLC ise spermatozoon membranında bulunan Ca iyonlarının artışı ile membran bütünlüğünün korunmasını sağlamaktadır (Yu ve ark 2006). Sonuç olarak bu iki antioksidanın kombine kullanımı spermatozoonların motilite kaybını azaltabileceği, fakat ortamda fazla miktarda antioksidan bulunmasının spermatozoonlar üzerine toksik etkiye sahip olabileceğide belirtilmektedir (Tarın ve ark 1998). Sunulan çalışmada sulandırıcıya eklenen melatonin ve CLC dozlarının motiliteyi önemli ölçüde koruyucu etkiye sahip olmamasına rağmen, motilite oranları açısından tatmin edici sonuçlar sağladığı söylenebilir.

Katalaz- kolesterol- siklodekstrin (clc) ile dondurulmuş spermanın çözdürülme sonrası motilitesi

Sunulan tez çalışmasında sulandırıcıya 150 IU/ml katalaz + 2,5 µg/ml kolesterol (CLC) ilavesini takiben çözdürme sonrası, A boğasına ait örneklerin motilite oranları kontrol grubunda %66,19±1,14 ve 150 IU/ml katalaz + 2,5 µg/ml kolesterol (CLC) eklenen grupta %67,27±1,24 olarak elde edildi. B boğasına ait örneklerin motilite oranları kontrol grubunda %65,70±0,87 ve 150 IU/ml katalaz + 2,5 µg/ml kolesterol eklenen grupta %67,00±0,62 olarak belirlendi. C boğasına ait örneklerde ise kontrol grubunda %65,97±1,54 ve 150 IU/ml katalaz + 2,5 µg/ml kolesterol eklenen grupta %68,21±1,83 motilite oranları elde edildi. Konu ile ilgili yapılan literatür araştırmalarında boğa sperması sulandırıcılarına antioksidan olarak katalaz ve CLC kombinasyonun eklendiği çalışmalar bulunmaması sebebiyle, elde edilen sonuçların karşılaştırması yapılamamıştır. Dolayısıyla konu kendi bulgularımız çerçevesinde tartışılmıştır. Sunulan çalışmada elde edilen motilite sonuçlarının

benzerliği, çalışmada kullanılan boğaların ejakülatlarının dondurma ve çözdürme işlemlerine karşı olan duyarlılıklarının az olmasına bağlanabilir. Kimi boğaların ejakülatları dondurma çözdürme işlemi aşamalarından oldukça fazla olumsuz etkilenirken kimileri ise daha dirençli olabilmektedir. Bununla birlikte kombine antioksidan uygulamalarının doza bağlı etkisini ortaya koyabilmek için daha düşük doz aralıklı çalışmalara ihtiyaç olduğu aşikârdır.

Katalaz – melatonin- kolesterol- siklodekstrin (clc) ile dondurulmuş spermanın çözdürülme sonrası motilitesi

Sunulan tez çalışmasında sulandırıcıya 1mM/ml melatonin + 150 IU/ml katalaz + 2,5 µg/ml kolesterol (CLC) ilavesini takiben çözdürme sonrası, A boğasına ait örneklerin kontrol grubunda %66,19±1,14 ve 1mM/ml melatonin + 150 IU/ml katalaz + 2,5 µg/ml kolesterol (CLC) eklenen grupta %58,69±2,87 motilite oranları elde edildi. B boğasına ait örneklerin motilite oranları kontrol grubunda %65,70±0,87 ve 1mM/ml melatonin + 150 IU/ml katalaz + 2,5 µg/ml kolesterol (CLC) eklenen grupta %59,49±0,63 olarak tespit edildi. Aynı çalışmada C boğasına ait örneklerin kontrol grubunda %65,97±1,54 ve 1mM/ml melatonin + 150 IU/ml katalaz + 2,5 µg/ml kolesterol (CLC) eklenen grupta ise %58,25±4,22 motilite oranları belirlendi. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda boğa spermasına antioksidan olarak melatonin, katalaz ve CLC'nin kombine eklendiği araştırmalara rastlanılmamıştır. Dolayısıyla konu kendi bulgularımız çerçevesinde tartışılmıştır. Çalışma sonucunda bulgular değerlendirildiğinde A, B ve C boğalarının kontrol gruplarına göre motilite oranlarında azalmalar olduğu belirlendi. Bu azalmanın çalışmada kullanılan antioksidan dozlarının yüksek olmasına bağlı olarak yeterli etkiyi gösteremediği buna sebep olarakta ortamda fazla miktarda antioksidan bulunmasının olumsuz etkiye sahip olabileceği ifade edilebilir. Nitekim Tarin ve ark. (1998) ortamda fazla miktarda antioksidan bulunmasının spermatozoonlar için toksik etkiye sahip olabileceğini vurgulamaktadırlar. Ortamda bulunan antioksidanların etki mekanizmalarının sonuçları etkileyebileceği de ayrıca göz önünde bulundurulması gereken unsurlardandır.

Plazma membran bütünlüğü ve akrozom hasarı (FITCH/PI)

Paudel ve ark (2010); boğalardan elde ettikleri spermayı içerisinde %20 yumurta sarısı ve %7 gliserol bulunan tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya 200 IU/ml katalaz dozunu ilave etmişlerdir. Çalışma sonucu plazma membran ve akrozom bütünlüğü sağlam olan spermatozoonların oranı kontrol grubunda %31,50±1,30; 200 IU/ml katalaz eklenen grupta ise %35,90±1,40 olarak elde edilmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile 200 IU/ml katalaz eklenen grubun değerleri arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla 200 IU/ml katalaz ilavesinin kriyohasarlara karşı plazma membran ve akrozom bütünlüğü üzerine koruyucu etkiye sahip olduğunu belirtmektedirler. Hakoueu ve ark (2019); Holstein ırkı boğalardan aldıkları spermayı %25 yumurta sarısı içeren sodyum sitrat sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya katalazın farklı dozlarını (50 IU/ml; 100 IU/ml; 150 IU/ml; 200 IU/ml; 250 IU/ml; 300 IU/ml) ilave etmişler ve kontrol grubu dahil yedi grup oluşturmuşlardır. Araştırmacılar sulandırılmış spermayı 5^{o}C muhafaza ederek günlük olarak plazma membran ve akrozom bütünlüğü oranlarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonucu 6. ile 7. günlerde 200 IU/ml katalaz eklenen grubun plazma membran ve akrozom bütünlüğünü sağlam olan spermatozoonların oranının %50'nin üzerinde (6. gün %56) kalmaya devam ettiğini ve diğer grupların %50'nin altında olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar 200 IU/ml katalaz ilavesinin plazma membran ve akrozom bütünlüğünü üzerine koruyucu etkisi olduğunu vurgulamaktadırlar. Güngör ve ark (2019); Holstein ırkı boğalardan elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı ve %7 gliserol içeren tris suladırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya 400 µg/ml katalaz dozunu ilave etmişlerdir. Çalışma sonucu plazma membran ve akrozom bütünlüğü sağlam olan spermatozoonların oranı sırasıyla kontrol grubunda %43,40 ± 0,50; 400 µg /ml katalaz eklenen grupta %41,00 ± 3,70 olarak elde edilmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile 400 µg /ml katalaz eklenen grubun plazma membran ve akrozom bütünlüğü değerleri arasında istatistiki olarak farklılık elde etmediklerini dolayısıyla 400 µg /ml katalaz ilavesinin plazma membran ve akrozom bütünlüğünü koruyucu etkisinin olmadığını belirtmektedirler. Sunulan tez çalışmasının II. bölümünde plazma membran ve akrozom bütünlüğü sağlam olan spermatozoonların oranı sırasıyla A boğasının kontrol grubunda %50,10±0,72 ve 150 IU/ml katalaz eklenen grubunda %58,37±1,27 olarak, B boğasının kontrol grubunda %64,38±0,92 ve 150 IU/ml

katalaz eklenen grubunda %61,07±1,12 olarak, C boğasının kontrol grubunda %62,27±0,66 ve 150 IU/ml katalaz eklenen grubunda %63,60±2,25 olarak elde edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen plazma membran ve akrozom bütünlüğü sağlam olan spermatozoonların oranı Paudel ve ark (2010), Hakoueu ve ark (2019), Güngör ve ark (2019)'nın bulguları ile farklılık göstermektedir. Bu farklılıklara çalışmada kullanılan sulandırıcıların içeriklerinin (sodyum sitrat, yumurta sarısı, gliserol) ve antioksidan dozlarının farklı olması ile spermin dondurulması yerine kısa süreli olarak muhafaza edilmesi ayrıca çalışmaların farklı bölgelerde ve şartlarda yapılmasının etkili olabileceği ifade edilebilir.

Anzar ve ark (2019); boğalardan elde ettikleri spermayı tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar kontrol grubu için sulandırıcıya %20 yumurta sarısı ve %7 gliserol, deney grubu için ise 2mg/ml CLC ve %7 gliserol ilave etmişler (yumurta sarısı eklememişler) ve kontrol grubu dahil iki grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu plazma membran ve akrozom bütünlüğü sağlam olan spermatozoonların oranı sırasıyla kontrol grubunda %40,00±3,70; 2mg/ml CLC eklenen grupta %33,00±3,20 olarak elde edilmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile 2mg/ml CLC eklenen grup arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini belirtmektedirler. Yadav ve ark (2018); Hariana ırkı boğalardan elde ettikleri spermayı yumurta sarısı ve gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya kolesterolün farklı dozlarını (0,5 mg/ml; 1,0 mg/ml; 2 mg/ml) ilave etmişler ve kontrol grubu dahil dört grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu plazma membranı sağlam olan spermatozoonların oranı sırasıyla kontrol grubunda %60,80±0,80; 0,5 mg/ml CLC eklenen grupta %72,10±0,70; 1 mg/ml CLC eklenen grupta %66,20±0,70 ve 2,0 mg/ml CLC eklenen grupta %59,40±0,70 olarak elde edilmiştir. Akrozom bütünlüğü sağlam olan spermatozoonların oranı sırasıyla kontrol grubunda %74,90±0,50; 0,5 mg/ml CLC eklenen grupta %83,10±0,50; 1 mg/ml CLC eklenen grupta %78,90±0,40 ve 2,0 mg/ml CLC eklenen grupta %75,20±0,50 olarak elde edilmiştir. Araştırmacılar 1,0 mg/ml CLC eklenen grup ile kontrol grubu, 0,5 ve 2,0 mg/ml CLC eklenen grupların değerleri arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla 1,0 mg/ml CLC ilavesinin plazma membran ve akrozom bütünlüğünü koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedirler. Sunulan tez çalışmasının II. bölümünde plazma membran ve akrozom bütünlüğü sağlam olan spermatozoonların oranı sırasıyla A boğasının kontrol grubunda %50,10±0,72 ve 2,5 µg/ml CLC eklenen

grubunda %47,55±3,73 olarak, B boğasının kontrol grubunda %64,38±0,92 ve 2,5 CLC µg/ml eklenen grubunda %56,64±3,67 olarak, C boğasının kontrol grubunda %62,27±0,66 ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grubunda ise %62,94±2,97 olarak elde edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen plazma membran ve akrozom bütünlüğü sağlam olan spermatozoonların oranı Anzar ve ark (2019)'nın bulguları ile farklılık arz ederken, Yadav ve ark (2018)'nın bulgularından oldukça düşük olarak belirlenmiştir. Bu farklılıkların kullanın boğa ırklarının (Hariana, Simental) ve CLC dozlarının farklı olmasına ile boğaların bireysel farklılıklar göstermesine bağlı olabileceği ifade edilebilir.

Canlılık Oranı (SBYR/PI)

Asadpour ve ark (2011); Holstein ırkı boğalardan elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı ve %7 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcılara katalazın farklı dozlarını (100 IU/ml ve 200 IU/ml) ilave etmişler ve kontrol grubu dahil üç grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu sırasıyla kontrol grubunda %46,00±2,00; 100 IU/ml katalaz eklenen grupta %51,70±2,90; 200 IU/ml katalaz eklenen grupta %51,00±2,90 canlılık oranları elde edilmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile katalazın 100 IU/ml ve 200 IU/ml ilave edilen grupları arasında canlılık oranları açısından istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla 100 IU/ml veya 200 IU/ml katalaz ilavesinin canlılığı koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedirler. Fernández-Santos ve ark (2009); boğalardan elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı içeren Biladyl sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya 200 IU/ml katalaz dozunu ilave etmişlerdir. Çalışma sonucunda spermaların çözdürülmesinden iki saat sonra sırasıyla kontrol grubunda %55,00±21,10; 200 IU/ml katalaz eklenen grupta %54,60±18,10 canlılık oranları elde edilmiştir. Altıncı saat sonunda ise canlılık oranı sırasıyla kontrol grubunda %45,70±15,50; 200 IU/ml katalaz eklenen grupta %59,00±23,90 olarak elde edilmiştir. Araştırmacılar çözdürmeden sonra uzun süre bekleme sonucunda katalazın ortamda oluşan antioksidanları parçalaması ile spermatozoonların canlılığını koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedirler. Singh ve ark (2020); boğalardan elde ettikleri spermayı yumurta sarısı ve gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya katalaz 100 IU/ml dozunu ilave etmişler ve kontrol grubu dahil iki grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu canlılık oranları sırasıyla kontrol

grubununda %50,80±1,17; 100 IU/ml katalaz eklenen grupta % 60,80±1,14 olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile katalaz ilave edilen grup arasında canlılık oranları açısından istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini belirtmektedirler. Bansal ve ark (2016); Buffalo boğalarından elde ettikleri spermayı yumurta sarısı içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya katalazın farklı dozlarını (100 µM/ml; 200 µM/ml) ilave etmişler ve kontrol grubu dahil üç grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucunda sırasıyla kontrol grubunda %57; 100 µM/ml katalaz eklenen grupta %61,69 ve 200 µM/ml katalaz eklenen grupta %62,17 canlılık oranları elde edilmiştir. Araştırmacılar 100 µM/ml ve 200 µM/ml katalaz ilavesinin canlılığı koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedirler. Sunulan tez çalışmasının II. bölümünde sırasıyla A boğasının kontrol grubunda %48,45±0,38 ve 150 IU/ml katalaz eklenen grupta %61,18±1,17; B boğasının kontrol grubunda %58,25±2,19 ve 150 IU/ml katalaz eklenen grupta %57,72±0,26; C boğasının kontrol grubunda %63,61±0,51 ve 150 IU/ml katalaz eklenen grupta ise %59,47±3,64 canlılık oranı elde edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen canlılık sonuçları Fernández-Santos ve ark (2009), Bansal ve ark (2016), ve Singh ve ark (2020)'nın bulguları ile benzerlik gösterirken, Asadpour ve ark (2011)'nın bulguları ile farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar kullanılan antioksidan dozlarının, sulandırıcıların (Biladyl, tris) kimyasal içeriklerinin ve çalışmadaki boğa ırklarının (Simental, Holstein) farklı olmasına bağlanabilir.

Amorim ve ark (2009); Holstein ırkı boğalardan elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı içeren gliserol eklemedikleri tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır ve sulandırıcıya kolesterol 1,5 mg/ml dozunu ilave etmişlerdir. Araştırmacılar sırasıyla kontrol grubununda %30,00 ve 1,5 mg/ml kolestreol (CLC) eklenen grupta %45,00 canlılık oranları elde etmişlerdir. Araştırmacılar kontrol grubu ile 1,5 mg/ml CLC eklenen grubun canlılık değerleri arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla 1,5 mg/ml CLC ilavesinin spermatozoonların canlılığını koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedirler. Purdy ve Graham (2004); Holstein ırkı boğalardan elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı %14 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya kolesterolün farklı dozlarını (0,75 mg/ml; 1,5 mg/ml; 3 mg/ml; 4,5 mg/ml; 6 mg/ml; 7,5 mg/ml) ilave etmişler ve kontrol grubu dahil yedi grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu sırasıyla kontrol grubunda %46,00; 0,75 mg/ml CLC eklenen grupta %52,00; 1,5 mg/ml CLC eklenen grupta

%55; 3,0 mg/ml CLC eklenen grupta %60,00; 4,5 mg/ml CLC eklenen grupta %57,00; 6,0 mg/ml CLC eklenen grupta %50,00 ve 7,5 mg/ml CLC eklenen grupta %45,00 canlılık oranları elde edilmiştir. Araştırmacılar canlılık oranları açısından kontrol grubu ile 1,5 mg/ml CLC, 3 mg/ml CLC ve 4,5 mg/ml CLC gruplarının arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla 1,5 mg/ml; 3,0 mg/ml ve 4,5 mg/ml CLC ilavesinin spermatozoonların canlılığını koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedirler. Mocé ve ark (2014); Holstein ırkı boğalardan elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı ve %8 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya kolesterolü (CLC) 2 mg/ml dozundan eklemişler ve kontrol grubu dahil iki grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu sırasıyla kontrol grubunda %62,80; 2 mg/ml kolestreol (CLC) eklenen grupta %74,20 canlılık oranları elde edilmiştir. Araştırmacılar gruplar arasında canlılık oranları açısından istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla 2,0 mg/ml CLC ilavesinin spermatozoonların canlılığını koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedirler. Sunulan tez çalışmasının II. bölümünde sırasıyla A boğasının kontrol grubunda %48,45±0,38 ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta %45,33±2,41; B boğasının kontrol grubunda %58,25±2,19 ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta %50,37±1,97; C boğasının kontrol grubunda %63,61±0,51 ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta ise %53,55±2,83 canlılık oranları elde edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen A boğasına ait canlılık oranı Amorim ve ark (2009)'nın bulguları ile benzerlik gösterirken, B ve C boğalarına ait canlılık oranları farklılık arz etmektedir. A boğasının canlılık oranı Purdy ve ark (2004)'nın bulguları ile paralellik arz ederken, B ve C boğalarına ait canlılık oranları benzerlik göstermektedir. A, B ve C boğalarına ait canlılık oranları Mocé ve ark (2014)'nın bulgularından oldukça düşük olarak belirlenmiştir. Bu farklılıkların kullanılan boğa ırklarının (Holstein, Simental), gliserol oranlarının (0; %8; %14) ve CLC dozlarının farklı olması ve boğalarda görülen bireysel farklılıklardan kaynaklanabileceği ifade edilebilir.

Mitokondriyal oksidatif stres (MITOSOX/PI)

Bastos ve ark (2021); Nellore ırkı boğalardan elde ettikleri spermayı %7 gliserol içeren Botubov sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya 51,5 µg/ml dozunda katalaz ilave etmişler ve kontrol grubu dahil iki grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu mitokondriyal oksidatif stres oranları (MITOSOX

+) sırasıyla kontrol grubunda %63,10 ve katalaz grubunda %62,60 olarak elde edilmiştir. Araştırmacılar kontrol ile katalaz gruplarının mitokondriyal oksidatif stres oranları arasında istatistiki olarak farklılık elde etmediklerini belirtmişlerdir. Sunulan tez çalışmasının II. bölüm sonucu mitokondriyal oksidatif stres oranları sırasıyla A boğasının kontrol grubunda %50,04±0,20; 150 IU/ml katalaz eklenen grupta %41,04±1,44; B boğasının kontrol grubunda %36,20±1,45; 150 IU/ml katalaz eklenen grupta %41,04±1,26; C boğasının kontrol grubunda %39,42±1,17; 150 IU/ml katalaz eklenen grupta ise %35,03±2,14 olarak elde edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen mitokondriyal oksidatif stres oranları Bastos ve ark (2021)'nın bulgularından oldukça düşük olarak belirlenmiştir. Bu farklılıkların kullanılan boğa ırklarının (Nellore, Simental), sulandırıcıların (Botubov, tris) kimyasal içeriğinin ve sulandırıcılara ilave edilen antioksidan ajanların dozlarının farklı olmasından kaynaklı olabileceği ifade edilebilir.

Campos ve ark (2020); aygırlardan elde ettikleri spermayı yağsız süt bazlı sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya kolesterol 1,5 mg/ml dozunu eklemişlerdir. Çalışma sonucu mitokondriyal oksidatif stres oranları (MITOSOX red) sırasıyla kontrol grubunda %51,50±5,4; kolesterol 1,5 mg/ml grubunda %56,50±5,6 olarak elde edilmiştir. Araştırmacılar kontrol ile kolesterol gruplarının mitokondriyal oksidatif stres oranları arasında istatistiki olarak farklılık elde etmediklerini belirtmişlerdir. Sunulan tez çalışmasının II. bölümünde mitokondriyal oksidatif stres değerleri sırasıyla A boğasının kontrol grubunda %50,04±0,20 ve kolesterol 2,5 µg/ml eklenen grupta %52,40±2,05; B boğasının kontrol grubunda %36,20±1,45 ve kolesterol 2,5 µg/ml eklenen grupta %49,94±3,79; C boğasının kontrol grubunda %39,42±1,17 ve kolesterol 2,5 µg/ml eklenen grupta ise %36,67±1,09 olarak elde edilmiştir. Tez çalışmasında A, B ve C boğalarından elde edilen mitokondriyal oksidatif stres değerlerinin Campos ve ark (2020)'nın aygır spermasını kullanarak yapmış oldukları çalışmasındaki gibi spermatoozoonlar üzerinde koruyucu bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Koruyucu etkinin olmamasının kullanılan sulandırıcıların (yağsız süt, tris) ve sulandırıcılara ilave edilen kolesterol dozlarının farklı olması ile diğer araştırmada aygır spermasının kullanılmasından dolayı tür farklılığından ve mevsimsel farklılıklardan kaynaklı olabileceği ifade edilebilir.

Reaktif oksijen türleri ROS (SYBR 14/BODIPY)

Roca ve ark (2005); domuzlardan elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı içeren β-laktoz solüsyonu ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya katalaz (200 IU/ml; 400 IU/ml) dozlarını ilave etmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar kontrol grubu ile 150 IU/ml ve 400 IU/ml katalaz eklenen gruplarda ROS değerleri açısından istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla 150 IU/ml ve 400 IU/ml katalaz ilavesinin dondurulup çözdürülmüş spermalarda ROS seviyelerini azalttığını belirlemişlerdir. Shafiei ve ark (2005); tekelerden elde ettikleri spermayı Andromed sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya katalaz (200 IU/ml; 400 IU/ml) dozlarını ilave etmişlerdir. Çalışmada ROS seviyeleri sırasıyla kontrol grubunda %51±1,15; 200 IU/ml katalaz eklenen grupta %48±0,58; 400 IU/ml katalaz eklenen grupta %35,66±0,33 olarak elde edilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar 400 IU/ml katalaz eklenen grup ile kontrol grubu ve 200 IU/ml katalaz eklenen grubunun ROS değerleri arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla 400 IU/ml katalaz ilavesinin dondurulup çözdürülmüş spermalarda ROS miktarını azalttığını belirlemişlerdir. Sunulan tez çalışmasının II. bölümünde ROS (BODIPY+) seviyeleri sırasıyla A boğasının kontrol grubunda %51,17±1,15 ve 150 IU/ml katalaz eklenen grupta %46,91±3,49; B boğasının kontrol grubunda %55,02±1,03 ve 150 IU/ml katalaz eklenen grupta %43,44±2,16; C boğasının kontrol grubunda %39,23±1,26 ve 150 IU/ml katalaz eklenen grupta ise %38,63±2,03 olarak elde edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen ROS oranları Roca ve ark (2005)'nın bulguları ile farklılık arz etmektedir. A ve B boğalarının ROS oranları ve Shafiei ve ark (2005)'nın bulguları ile benzerlik gösterirken, C boğasının bulguları farklılık arz etmektedir. Bu farklılıkların kullanılan hayvan türleri (domuz, teke, boğa), sulandırıcı (β-laktoz, Andromed, tris) içerikleri ve sulandırıcılara ilave edilen antioksidan dozlarının farklı olmasından kaynaklanabileceği söylenebilir. Ayrıca çalışmaların sonuçlarının rakamsal karşılaştırılmasında ROS etkisine karşı spermatozoonlarda koruma sağlanması, farklı sulandırıcılarda kullanılan antioksidanın domuz, teke ve boğada aynı etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Lone ve ark (2016); Buffalo boğalarından aldıkları spermayı yumurta sarısı ve gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya 3 mg/ml CLC dozunu ilave etmişler ve kontrol grubu dahil iki grup oluşturmuşlardır.

Çalışma sonunda ROS değerleri sırasıyla kontrol grubunda 197,91±3,2 ve 3 mg/ml CLC eklenen grupta 150,20±4,13 olarak elde edilmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile 3 mg/ml CLC eklenen grubun ROS değerleri arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla 3 mg/ml CLC ilavesinin ROS seviyesini azaltarak spermatozoonları koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedirler. Sunulan tez çalışmasının II. bölümünde ROS (BODIPY+) seviyeleri sırasıyla A boğasının kontrol grubunda %51,17±1,15 ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta %51,92±4,83; B boğasının kontrol grubunda %55,02±1,03 ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta %54,45±3,32; C boğasının kontrol grubunda %39,23±1,29 ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta ise %40,17±3,45 olarak elde edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen ROS değerlerinin rakamsal sonuçlarının istatistiki karşılaştırılması Lone ve ark (2016)'nın bulguları ile farklılık göstermektedir. Bu farklılıkların çalışmada kullanılan hayvan türlerinin (Buffalo, Simental) ve sulandırıcılara ilave edilen antioksidan dozlarının farklı olmasından kaynaklı olabileceği ifade edilebilir.

Çözdürme sonrası 2. saat motilite değerleri

Arslan ve ark (2019); boğalardan elde ettikleri spermayı Triladyl sulandırıcısı ile sulandırarak beş eşit parçaya ayırmışlardır. Araştırmacılar katalazın farklı (5 IU/ml; 10 IU/ml; 15 IU/ml; 20 IU/ml) dozlarını ilave etmişler ve kontrol grubu dahil beş grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucunda çözdürülen spermalar 37^{o}C benmaride üç saat bekletildikten sonra sırasıyla kontrol grubunda %33,32±21,91; 5 IU/ml katalaz eklenen grupta %43,78±14,67; 10 IU/ml katalaz eklenen grupta %43,74±14,18; 15 IU/ml katalaz eklenen grupta %43,66±14,63 ve 20 IU/ml katalaz eklenen grupta %42,66±14,80 motilite oranları elde edilmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile 5 IU/ml, 10 IU/ml, 15 IU/ml ve 20 IU/ml katalaz grupları motilite oranları arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla farklı dozlarda ilave edilen katalazın motiliteyi koruyucu etkiye sahip olduğunu belirtmektedirler. Fernández-Santos ve ark (2009); boğalardan elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı ile %6 gliserol içeren Biladyl sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya 200 IU/ml katalaz dozunu ilave etmişlerdir. Çalışma sonucunda çözdürülen spermalar 37^{o}C benmaride iki saat bekletildikten sonra sırasıyla kontrol grubunda %24,20±8,0; 200 IU/ml katalaz eklenen grupta ise %30,80±9,5 motilite oranları elde edilmiştir. Araştırmacılar 200 IU/ml katalaz eklenmesinin motiliteyi koruyucu etkiye sahip

olduğunu belirtmektedirler. Sunulan tez çalışmasının II. bölümünde çözdürme sonrası 2. saat motilite oranları sırasıyla A boğasının kontrol grubunda %23,03±1,53 ve 150 IU/ml katalaz eklenen grupta %54,63±2,07; B boğasının kontrol grubunda %28,16±0,59 ve 150 IU/ml katalaz eklenen grupta %49,03±1,37; C boğasının kontrol grubunda %31,60±0,56 ve 150 IU/ml katalaz eklenen grupta ise %45,07±1,30 olarak elde edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen motilite sonuçları Arslan ve ark (2019)'nın bulguları ile benzerlik gösterirken Fernández-Santos ve ark (2009)'nın bulgularından yüksek olarak elde edilmiştir. Bu farklılıkların kullanılan katalaz dozları ve sulandırıcıların (Bilady, Trilady, tris) farklı olmasından kaynaklı olabileceği ifade edilebilir. Ancak tüm çalışmalarda kullanılan antioksidanların motiliteyi koruyucu etki göstermesi antioksidanların olumlu etkiye sahip olmalarının bir sonucudur.

De Souza ve ark (2016); tekelerden elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı ve %2 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya CLC'nin (0,75 mg/ml; 1,5 mg/ml; 3 mg/ml; 4,5 mg/ml; 6 mg/ml; 7,5 mg/ml) dozlarını ilave etmişler ve kontrol grubu dahil yedi grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucunda çözdürülen spermalar 37^{o}C benmaride 2 saat bekletildikten sonra sırasıyla kontrol grubunda %15,50; 0,75 mg/ml CLC eklenen grupta %33,75; 1,5 mg/ml CLC eklenen grupta %25,25; 3 mg/ml CLC eklenen grupta %30,00; 4,5 mg/ml CLC eklenen grupta %22,00; 6,0 mg/ml CLC eklenen grupta %18,75 ve 7,5 mg/ml CLC eklenen grupta %24,10 motilite oranları belirlenmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile 0,75 mg/ml CLC, 1,5 mg/ml CLC, 3mg/ml CLC ve 7,5 mg/ml CLC eklenen grupların motilite oranları arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, bununla birlikte 0,75 mg/ml CLC ilavesinin motiliteyi koruyucu etkisinin diğer gruplardan daha iyi olduğunu belirtmektedirler. Behera ve ark (2015); tekelerden elde ettikleri spermayı %10 yumurta sarısı ve %5 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya CLC'nin (1 mg/ml; 2 mg/ml) dozlarını ilave etmişler ve kontrol grubu dahil üç grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucunda çözdürülen spermalar 37^{o}C benmaride 2 saat bekletildikten sonra sırasıyla kontrol grubunda %13,00±1,91; 1 mg/ml CLC eklenen grupta %23,38±2,98 ve 2 mg/ml CLC eklenen grupta %22,88±3,87 motilite oranları tespit edilmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile 1 mg/ml CLC ve 2 mg/ml CLC eklenen grupların motilite oranları arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla 1 mg/ml CLC ile 2 mg/ml CLC ilavesinin motiliteyi koruyucu etkisinin kontrol grubundan daha iyi olduğunu

belirtmektedirler. Pamornsakda ve ark (2011); aygırlardan elde ettikleri spermayı %4 gliserol içeren glukoz-EDTA sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya CLC'nin (1,5 mg/ml; 3 mg/ml; 6 mg/ml) dozlarını ilave etmişler ve kontrol grubu dahil dört grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucunda çözdürülen spermalar 37^{o}C benmaride 45 dakika bekletilmesini takiben sırasıyla kontrol grubunda %70,00; 1,5 mg/ml CLC eklenen grupta %73,30±1,7; 3 mg/ml CLC eklenen grupta %53,30±3,30 ve 6 mg/ml CLC eklenen grupta %20 motilite oranları belirlenmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ve 1,5 mg/ml CLC eklenen grup ile 3 mg/ml CLC ve 6 mg/ml CLC eklenen grupların motilite oranları arasında istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini, dolayısıyla 1,5 mg/ml CLC ilavesinin motiliteyi koruyucu etkisinin 3 mg/ml CLC ve 6 mg/ml CLC gruplarından daha iyi olduğunu belirtmektedirler. Sunulan tez çalışmasının II. bölümünde çözdürme sonrası 2. saat motilite oranları sırasıyla A boğasının kontrol grubunda %23,03±1,53 ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta %54,20±1,73; B boğasının kontrol grubunda %28,16±0,59 ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta %50,50±1,22; C boğasının kontrol grubunda %31,60±0,56 ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta ise %45,84±1,70 olarak elde edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen motilite sonuçları Pamornsakda ve ark (2011), Behera ve ark (2015) ve De Souza ve ark (2016)'nın bulguları ile rakamsal farklılıklar göstermekte ancak çözüm sonu motilite kayıplarını önlemede kullanılan antioksidanlar açısından benzerlik göstermektedir. Sulandırıcıya ilave edilen antioksidanların ortamda ROS oluşumunu engelleyerek ve oluşan ROS'ları ortamdan uzaklaştırarak motilite kaybını engellemesi yukarıda geçen çalışmaların ortak bir sonucu olması olağandır.

Fertilite Sonuçları

Ranjan ve ark (2020); tekelerden elde ettikleri spermayı %10 yumurta sarısı ve %6 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya katalazın farklı dozlarını (200 IU/ml; 400 IU/ml; 600 IU/ml; 800 IU/ml; 1000 IU/ml) dozlarını ilave etmişler ve kontrol grubu dahil altı grup oluşturmuşlardır. Araştırmacılar motilite yönünden en iyi sonuç aldıkları grup ile kontrol grubunun fertilite oranlarını karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucu sırasıyla kontrol grubunda ise %35,00 (7/20); 800 IU/ml katalaz eklenen grupta %40,00 (8/20) fertilite oranları elde edilmiştir. Roca ve ark (2005); domuzlardan elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı içeren B-laktoz solüsyonu ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya

katalaz (200 IU/ml; 400 IU/ml) dozlarını ilave etmişlerdir. Çalışma sonucunda sırayla kontrol grubunda %24,29 (51/210); 200 IU/ml katalaz eklenen grupta %30,95 (65/210) ve 400 IU/ml katalaz eklenen grupta %45,71 (96/210) fertilite oranları elde edilmiştir. Araştırmacılar 400 IU/ml katalaz grubu ile kontrol ve 200 IU/ml katalaz gruplar arasında fertilite oranları açısından istatistiki olarak farklılık elde ettiklerini dolayısıyla 400 IU/ml katalaz eklenmesinin fertiliteyi artırıcı etkisi olduğunu belirtmektedirler. Sunulan tez çalışmasının II. bölümünde sırasıyla A boğasının kontrol grubunda %30,77±1,36 (12/39) ve 150 IU/ml katalaz eklenen grupta %56,41±2,54 (22/39); B boğasının kontrol grubunda %56,41±2,47 (22/39) ve 150 IU/ml katalaz eklenen grupta %64,10±1,18 (25/39); C boğasının kontrol grubunda %48,72±2,79 (19/39) ve 150 IU/ml katalaz eklenen grupta ise %48,72±4,09 (19/39) fertilite oranları elde edildi. Tez çalışmasında elde edilen fertilite oranları arasında herhangi bir istatistiki bir farklılık elde edilememiştir. Ancak antioksidan gruplarında kontrol grubuna kıyasla daha yüksek gebelik oranları elde edilmesi bakımından diğer araştırmacıların bulguları ile benzerlikler göstermektedir. Çalışmada kullanılan hayvan sayısının az olmasının istatistiki farklılığı önlemesi muhtemeldir.

Yang ve ark (2021); Simental ırkı boğalardan elde ettikleri spermayı sulandırmak için iki ayrı sulandırıcı kullanmışladır. Araştırmacılar kontrol grubu için %20 yumurta sarısı ile %7 gliserol içeren tris sulandırıcısı kullanmışlardır. Deney gruplarında ise %14 gliserol içeren tris (yumurta sarısı içermeyen) sulandırıcısı kullanmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında üç farklı boğa kullanmışlar, sulandırıcıya kolesterolün farklı (0,5 mg/ml; 1 mg/ml) dozlarını ilave etmişler ve kontrol grubu dahil üç grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucu sırasıyla A boğasının kontrol grupta %63,00 (15/24); 0,5 mg/ml CLC eklenen grupta %60,00 (15/25) ve 1 mg/ml CLC eklenen grupta ise %15,00 (3/20) fertilite oranları elde edilmiştir. B boğasının kontrol grubunda %45,00 (10/22); 0,5 mg/ml CLC eklenen grubunda %52,00 (11/21) ve 1 mg/ml CLC eklenen grubunda ise %49,00 (10/20) fertilite oranları elde edilmiştir. Araştırmacılar 0,5 mg/ml CLC eklenen grubun diğer gruplara göre fertiliteyi koruyucu etkisi olduğunu belirtmektedirler. Anzar ve ark (2019); boğalardan elde ettikleri spermayı %20 yumurta sarısı ve %7 gliserol içeren tris sulandırıcısı ile sulandırmışlardır. Araştırmacılar sulandırıcıya 2mg/ml CLC dozunu ilave etmişler ve kontrol grubu dahil iki grup oluşturmuşlardır. Çalışma sonucunda sırasıyla kontrol grubunda %54,00±8,10; 2mg/ml CLC eklenen grupta %54,00±6,30

fertilite oranları elde edilmiştir. Araştırmacılar gruplar arasında istatistiki farklılık elde etmediklerini belirtmişlerdir. Sunulan tez çalışmasının II. bölümünde sırasıyla A boğasının kontrol grubunda %30,77±1,36 (12/39) ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta %53,85±3,12 (21/39); B boğasının kontrol grubunda %56,41±2,47 (22/39) ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta %51,28±2,23 (20/39); C boğasının kontrol grubunda %48,72±2,79 (19/39) ve 2,5 µg/ml CLC eklenen grupta ise %61,54±1,15 (24/39) fertilite oranları elde edildi. Tez çalışmasında elde edilen fertilite sonuçları Yang ve ark (2021)'nın bulguları ile benzerlik göstermektedir. A ve B boğalarından elde edilen fertilite sonuçları Anzar ve ark (2019)'nın bulguları ile benzerlik gösterirken C boğasından elde edilen fertilite sonuçları farklılık göstermektedir. Bu farklılıklara kullanılan antioksidan ajanların dozlarının, boğalar ile tohumlamada kullanılan dişi hayvanların (inek, düve) bireysel farklılıklarının ve çalışmada cosynch72 senkronizasyon yönteminin kullanılmasının sebep olabileceği söylenebilir. Gebe kalma oranları sadece spermaya bağlı olmayıp tohumlaması gerçekleştirilen dişi hayvana (inek, düve) bağlı birçok faktörden etkilenmektedir. Ancak antioksidan gruplarında istatistiksel açıdan farklılık gösteren sonuçlar elde edilmemiş olsa bile oransal olarak yüksek gebelik oranları elde edilmesi dikkat çekicidir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak katalazın boğa spermatozoonlarına eklenmesinin plazma ve akrozomal membran bütünlüğünü koruduğu; katalaz ve CLC'nin spermatozoonların motilite kaybını engelleyici etkiye sahip olduğu sonucuna varıldı. Spermatozoon sulandırıcılarına antioksidan olarak katılan melatonin, katalaz ve CLC'in boğa spermatozoonlarına eklenmesinin spermatozoon kalitesini koruduğu ve dondurarak saklamadan sonra spermatozoon üzerindeki oksidatif stresi en aza indirdiği, daha yüksek oranda motil spermatozoonların geri kazanımı sağladığı sonucuna varılmıştır. Fertilizasyon değerlendirmesinde kontrol gruplarına göre gözle görülür bir artış sağlanmıştır. Daha sağlıklı veriler için bu kapsamda çalışmalarının artırılması önerilmektedir.

Yumurta sarısının oluşturduğu partikülleri minimize etmek amacıyla tris + yumurta sarısı sulandırıcısı ne kadar santrifüj edilsede ister istemez partikül oluşmakta ve bu partiküller CASA analizinde ölü spermatozoon olarak değerlendirilmektedir, bu olumsuz sonucu ortadan kaldıracak araştırmalarda yapılması önerilebilir.

Melatonin, katalaz ve kolesterolun kombinasyonlarının spermatozoon sulandırıcılarına kombine olarak katılması, ayrı ayrı katılmalarına göre motilite üzerine olumsuz etkilerinin olduğu gözlenmiştir. Kombinasyonlarda birbirlerine sinerjik etki sağlayacak en iyi dozların bulunması ve biyokimyasal açıdan birbirlerine karşı etkileri üzerine araştırmaların yapılması önerilmektedir.

Sunulan tez çalışmasında elde edilen bulgularda %20 yumurta sarısı ile %6 gliserol içeren tris spermatozoon sulandırıcısına antioksidan olarak eklenen katalaz, ve kolesterolün reaktif oksijen türlerinin zararlı etkileriyle mücadele etmek ve spermatozoon kalitesini koruyabilmek için kullanılacak uygun antioksidan konsantrasyonu hakkında daha fazla araştırma yapılmasını önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

Acott TS, Hoskins DD, 1978. Bovine sperm forward motility protein. Partial purification and characterization. Journal of Biological Chemistry, 253, 19, 6744-50.

Aitken R, Smith T, Lord T, Kuczera L, Koppers A, Naumovski N, Connaughton H, Baker M, De Iuliis G, 2013. On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. Andrology, 1, 2, 192-205.

Aitken RJ, 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reproduction, Fertility and Development, 7, 4, 659-68.

Almquist J, Zaugg N, 1974. Fertility of bovine semen in milk diluent containing combinations of penicillin-neomycin and lincomycin-spectinomycin. Journal of dairy science, 57, 10, 1211-3.

Alvarez JG, Storey BT, 1984. Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. Biology of reproduction, 30, 2, 323-31.

Amidi F, Pazhohan A, Nashtaei MS, Khodarahmian M, Nekoonam S, 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. Cell and tissue banking, 17, 4, 745-56.

Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, Anton M, 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. Theriogenology, 61, 5, 895-907.

Amorim E, Graham J, Spizziri B, Meyers M, Torres C, 2009. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. Cryobiology, 58, 2, 210-4.

Andrabi S, 2009. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa. Reproduction in domestic animals, 44, 3, 552-69.

Andrabi SMH, 2014. 14 Applied Andrology in Water Buffalo. Animal andrology: theories and applications, 380.

Anzar M, Rajapaksha K, Boswall L, 2019. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. PloS one, 14, 10, e0223977.

Ari U, Ozturkler Y, 2015. Oxidative stress during long and short term storage of sperm and usage of antioxidant. Turkiye Klinikleri J. Reprod. Artif. Insemin.-Special Topics, 1, 3, 1621.

Arslan HO, Herrera C, Malama E, Siuda M, Leiding C, Bollwein H, 2019. Effect of the addition of different catalase concentrations to a TRIS-egg yolk extender on quality and in vitro fertilization rate of frozen-thawed bull sperm'. Cryobiology, 91, 40-52.

Arthur G, Noakes D, Pearson D, Parkinson T, 1996. Pregnancy and its diagnosis. Veterinary reproduction and obstetrics (GH Arthur, DE Noakes, DE Pearson, and TJ Parkinson, eds.). Saunders, London, United Kingdom, 63-10.

Arthur GH, 1996. Veterinary reproduction and obstetrics, p.

Asadpour R, Jafari R, TAYEFI NH. Effect of various levels of catalase antioxidant in semen extenders on lipid peroxidation and semen quality after the freeze-thawing bull semen.

Ashrafi I, Kohram H, Ardabili FF, 2013. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. Animal reproduction science, 139, 1-4, 25-30.

Avdatek F, İnanç M, Deniz Y, Güngör Ş, Abuzer A, Ayhan A, 2020. Koç spermasının dondurulmasına alfa lipoik asit ve trehalozun etkisi. Journal of Advances in VetBio Science and Techniques, 5, 3, 121-7.

Ax R, Dally M, Didion B, Lenz R, Love C, Varner D, Hafez B, Bellin M, 2000. Semen evaluation. Reproduction in farm animals, 363-75.

Bailey JL, Bilodeau J, Cormier N, 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. Journal of andrology, 21, 1, 1-7.

Ball PJ, Peters AR, 2008. Artificial Insemination. In: Reproduction in cattle. Eds: Ball PJ, Peters AR: John Wiley & Sons, p. 124-139.

Bansal AK, Bilaspuri GS, 2010. Effect of vitamin E and Mn2+ on the thiol status of cattle bull spermatozoa under induced oxidative stress. Animal Science Papers and Reports, 28, 4, 335-45.

Bansal AK, Cheema RS, 2016. Effect of catalase on sperm function tests, lipid peroxidation and superoxide dismutase enzyme activity during cryopreservation of buffalo bull semen. International Research Journal of Natural and Applied Sciences, 3, 11, 168-84.

Barbas J, Mascarenhas R, 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell and tissue banking, 10, 1, 49-62.

Bastos NM, Rossi GF, da Silva Leão BC, Negrão F, Ferreira CR, Vrisman DP, Rodrigues NN, Zorzetto MF, de Paula Freitas-Dell'Aqua C, Vantini R, 2021. Effects of paternal diet and antioxidant addition to the semen extender on bovine semen characteristics and on the phenotype of the resulting embryo. Theriogenology, 175, 23-33.

Baust JG, Gao D, Baust JM, 2009. Cryopreservation: An emerging paradigm change. Organogenesis, 5, 3, 90-6.

Behera S, Harshan HM, Bhai KL, Ghosh KA, 2015. Effect of cholesterol supplementation on cryosurvival of goat spermatozoa. Veterinary World, 8, 12, 1386.

Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P, 2007. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. Biology of reproduction, 77, 1, 120-6.

Bergeron A, Manjunath P, 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. Molecular reproduction and development, 73, 10, 1338-44.

Berra B, Rizzo AM, 2009. Melatonin: circadian rhythm regulator, chronobiotic, antioxidant and beyond. Clinics in dermatology, 27, 2, 202-9.

Bilodeau J-F, Blanchette S, Gagnon C, Sirard M-A, 2001. Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology, 56, 2, 275-86.

Blackshaw A, 1954. The prevention of temperature shock of bull and ram semen. Australian journal of biological sciences, 7, 4, 573-82.

Bratton R, Foote R, Cruthers JC, 1955. Preliminary fertility results with frozen bovine spermatozoa. Journal of Dairy Science, 38, 1, 40-6.

Bucak MN, Ateşşahin A, Varışlı Ö, Yüce A, Tekin N, Akçay A, 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. Theriogenology, 67, 5, 1060-7.

Bucak MN, Tekin N, 2007. Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 54, 1, 67-72.

Bucak MN, Tuncer PB, Sarıözkan S, Başpınar N, Taşpınar M, Çoyan K, Bilgili A, Akalın PP, Büyükleblebici S, Aydos S, 2010. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. Cryobiology, 61, 3, 248-53

Bucak M, Ataman M, Başpınar N, Uysal O, Taşpınar M, Bilgili A, Öztürk C, Güngör Ş, Inanc M, Akal E, 2015. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. Andrologia, 47, 5, 545-52.

Bucak MN, Akalın PP, Keskin N, Bodu M, Öztürk AE, İli P, Özkan H, Topraggaleh TR, Arslan HO, Başpınar N, 2021. Combination of fetuin and trehalose in presence of low glycerol has beneficial effects on freeze-thawed ram spermatozoa. Andrology, 9, 3, 1000-9.

Büyükleblebici S, Tuncer PB, Bucak MN, Eken A, Sarıözkan S, Taşdemir U, Endirlik BÜ, 2014. Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. Animal reproduction science, 150, 3-4, 77-83.

Campos GA, Garcia VF, Freitas-Dell'Aqua CP, Segabinazzi LG, Maciel LF, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'Aqua Jr JA, 2020. Sodium Caseinate and Cholesterol Improve Bad Cooler Stallion Fertility. Journal of Equine Veterinary Science, 93, 103201.

Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. Reproduction, 121, 3, 395-401.

ChaithraShree A, Ingole SD, Dighe VD, Nagvekar AS, Bharucha SV, Dagli NR, Kekan PM, Kharde SD, 2020. Effect of melatonin on bovine sperm characteristics and ultrastructure changes following cryopreservation. Veterinary medicine and science, 6, 2, 177-86.

Chatterjee S, de Lamirande E, Gagnon C, 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 60, 4, 498-506.

Chatterjee S, Gagnon C, 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 59, 4, 451-8.

Chaudhary S, Aeksiri N, Wanangkarn A, Liao Y, Inyawilert W, 2021. Effects of melatonin on cryopreserved semen parameters and apoptosis of thai swamp buffalo bull (bubalus bubalis) in different thawing conditions Adv. Anim. Vet. Sci, 9, 2, 238-45.

Cheeseman K, 1993. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. Molecular Aspects of Medicine, 14, 3, 191-7.

Chelikani P, Fita I, Loewen PC, 2004. Diversity of structures and properties among catalases. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 61, 2, 192-208.

Chenoweth PJ, Lorton S, 2014. Animal Andrology: Theories and Applications, Cabi, p. 3-7.

Choi Y-H, Toyoda Y, 1998. Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein-free medium. Biology of reproduction, 59, 6, 1328-33.

Chung E, Nayan N, Nasir N, Hing P, Ramli S, Rahman M, Kamalludin M, 2019. Effect of honey as an additive for cryopreservation on bull semen quality from different cattle breeds under tropical condition. J. Anim. Health Prod, 7, 4, 171-8.

Chupin D, Schuh H, 1993. Survey of present status of the use of artificial insemination in developing countries. World Animal Review, 74, 75, 26-35.

Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW, 1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. Gamete Research, 15, 3, 213-26.

Cruz MHC, Leal CLV, da Cruz JF, Tan D-X, Reiter RJ, 2014. Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: a brief review. Animal reproduction science, 145, 3-4, 150-60.

Cummins J, Woodall P, 1985. On mammalian sperm dimensions. Reproduction, 75, 1, 153-75.

Çoyan K, Ataman M, Kaya A, Karaca F, 2002. Evcil hayvanlarda dölerme ve sun'i tohumlama. SÜ Vet Fak Yayın Ünitesi, 42031.

Dana S, Kanbid B, 1998. Impact of knowledge on attitude of livestock owners towards artificial insemination in cattle. Indian veterinary journal, 75, 6, 572-3.

Darin-Bennett A, White I, 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. Cryobiology, 14, 4, 466-70.

De Castro LS, De Assis PM, Siqueira AF, Hamilton TR, Mendes CM, Losano JD, Nichi M, Visintin JA, Assumpção ME, 2016. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016.

De Souza WL, Moraes EA, Costa JMS, Graham JK, 2016. Cholesterol-loaded cyclodextrin in fresh goat sperm improves cryosurvival rates. Revista Brasileira de Ciência Veterinária, 23, 1/2, 93-8.

Dott H, 1974. The effects of bovine seminal plasma on the impedance change frequency and glycolysis of bovine epididymal spermatozoa. Reproduction, 38, 1, 147-56.

Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH, 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. Journal of Experimental Zoology, 265, 4, 432-7.

Ehrenwald E, Parks JE, Foote RH, 1988. Cholesterol efflux from bovine sperm. I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. Gamete research, 20, 2, 145-57.

Evans G, Maxwell WC, 1987. Salamons' artificial insemination of sheep and goats. Ed. 2, Butterworths, p.

Evans RJ, Bauer DH, Bandemer SL, Vaghefi SB, Flegal CJ, 1973. Structure of egg yolk very low density lipoprotein. Polydispersity of the very low density lipoprotein and the role of lipovitellenin in the structure. Archives of biochemistry and biophysics, 154, 2, 493-500.

Félix F, Oliveira CC, Cabrita E, 2021. Antioxidants in Fish Sperm and the Potential Role of Melatonin. Antioxidants, 10, 1, 36.

Fernández-Santos MR, Domínguez-Rebolledo A, Esteso M, Garde J, Martínez-Pastor F, 2009. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. International Journal of Andrology, 32, 4, 353-9.

Foote R, 1962. Survival of bull sperm in milk and yolk extenders with added catalase. Journal of Dairy Science, 45, 7, 907-10.

Foote R, 1970. Fertility of bull semen at high extension rates in Tris-buffered extenders. Journal of Dairy Science, 53, 10, 1475-7.

Foote R, 2010. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. J. Anim. Sci, 80, 1-10.

Foote R, Arriola J, 1987. Motility and fertility of bull sperm frozen-thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent. Journal of dairy science, 70, 12, 2642-7.

Foote R, Bratton R, 1950. The fertility of bovine semen in extenders containing sulfanilamide, penicillin, streptomycin and polymyxin. Journal of Dairy Science, 33, 8, 544-7.

Foote R, Kaproth M, 1997. Sperm numbers inseminated in dairy cattle and nonreturn rates revisited. Journal of dairy science, 80, 11, 3072-6.

Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT, 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. Animal reproduction science, 71, 1-2, 13-23.

Ford W, Rees JM, 1990. The bioenergetics of mammalian sperm motility. Controls of sperm motility: biological and clinical aspects, 175-202.

Fuller BJ, 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. CryoLetters, 25, 6, 375-88.

Gadea J, 2003. Semen extenders used in the artificial inseminarion of swine. Spanish Journal of Agricultural Research, 1, 2, 17-27.

Garner D, Hafez E, 2000. Spermatozoa and seminal plasma. Reproduction in farm animals, 96-109.

Garner D, Johnson L, Yue S, Roth B, Haugland R, 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. Journal of andrology, 15, 6, 620-9.

Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE, 1997. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. Biology of reproduction, 57, 6, 1401-6.

Garner DL, 1997. Ancillary Tests of Bull Semen Quality. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 13, 2, 313-30.

Garner DL, Johnson LA, 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. Biology of reproduction, 53, 2, 276-84.

Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE, 1997. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. Biology of reproduction, 57, 6, 1401-6.

Gençdal F, Terin M, Yıldırım İ, 2015. Süt sığırcılığı işletmelerinde suni tohumlama yaptırma durumuna etki eden faktörlerin belirlenmesi üzerine bir araştırma: Van ili Gevaş ilçesi örneği. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 30, 3, 254-9.

Gillan L, Evans G, Maxwell W, 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. Theriogenology, 63, 2, 445-57.

Gillan L, Maxwell W, 1999. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. Journal of reproduction and fertility. Supplement, 54, 271-83.

Givan AL, 2011. Flow cytometry: an introduction. Flow cytometry protocols, 1-29.

Glorieux C, Calderon PB, 2017. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. Biological chemistry, 398, 10, 1095-108.

Graham JK, 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. Animal reproduction science, 68, 3-4, 239-47.

Güngör Ş, Ata A, Inanc ME, Kastelic JP, 2019. Effect of various antioxidants and their combinations on bull semen cryopreservation. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 43, 5, 590-5.

Gürler H, Malama E, Heppelmann M, Calisici O, Leiding C, Kastelic J, Bollwein H, 2016. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. Theriogenology, 86, 2, 562-71.

Hakoueu F, Kouamo J, Okiwah BKA, Zoli AP, 2019. Effect of different catalase concentrations on chilled Holstein bull's semen. Veterinaria, 68, 1.

Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J, Aruoma O, 1995. The characterization of antioxidants. Food and Chemical Toxicology, 33, 7, 601-17.

Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP, 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. Journal of andrology, 11, 1, 73-88.

Hancock J, 1952. The morphology of bull spermatozoa. Journal of Experimental Biology, 29, 3, 445-53.

Hardeland R, Pandi-Perumal S, Cardinali DP, 2006. Melatonin. The international journal of biochemistry & cell biology, 38, 3, 313-6.

Herman H, Mitchell J, Doak G, 1994. Evaluation of semen: live-dead staining and morphology. The Artificial Insemination and Embryo of Dairy and Beef Casttle. Danville, IL: Interstate Publishers, 81-92.

Holt W, 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology, 53, 1, 47-58.

Holt WV, Penfold LM, Chenoweth P, Lorton S, 2014. Fundamental and practical aspects of semen cryopreservation. Animal andrology: Theories and applications, 76.

Hossain MS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H, 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. Asian Journal of Andrology, 13, 3, 406.

Hu J-H, Li Q-W, Zan L-S, Jiang Z-L, An J-H, Wang L-Q, Jia Y-H, 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing–thawing. Animal reproduction science, 117, 1-2, 11-7.

Inanc ME, Gungor S, Yeni D, Avdatek F, Ipek V, Turkmen R, Corum O, Karaca H, Ata A, 2022. Protective role of the dried white mulberry extract on the reproductive damage and fertility in rats treated with carmustine. Food and Chemical Toxicology, 163, 112979.

İnanç ME, Güngör Ş, Gül E, Uslu BA, Ata A, 2021. Gallic acid improves the viability and mitochondrial membrane potential of post-thawed goat buck semen. Acta Veterinaria Hungarica, 69, 3, 291-7.

Inanc ME, Gungor S, Ozturk C, Korkmaz F, Bastan I, Cil B, 2019. Cholesterol-loaded cyclodextrin plus trehalose improves quality of frozen-thawed ram sperm. Veterinární medicína, 64, 3, 118-24.

Inanc ME, UYSAL O, Ayhan A, 2018. Cryopreservation and evaluation of Akkaraman ram semen with 7-dehydrocholesterol. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 65, 2, 187-92.

Inyawilert W, Rungruangsak J, Liao YJ, Tang PC, Paungsukpaibool V, 2021. Melatonin supplementation improved cryopreserved Thai swamp buffalo semen. Reproduction in Domestic Animals, 56, 1, 83-8.

Iritani A. Problems of freezing spermatozoa of different species. 9th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 16th-20th June 1980. I. Plenary sessions., 115-32.

Jainudeen M, Hafez E, 2000. Cattle and buffalo. Reproduction in farm animals, 157-71

Jan JE, Reiter RJ, Wong PK, Bax MC, Ribary U, Wasdell MB, 2011. Melatonin has membrane receptor-independent hypnotic action on neurons: an hypothesis. Journal of pineal research, 50, 3, 233-40.

John Aitken R, Clarkson JS, Fishel S, 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. Biology of reproduction, 41, 1, 183-97.

Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, Mann GE, Moore K, Roberts II LJ, Ischiropoulos H, 2012. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. Free radical biology and medicine, 52, 1, 1-6.

Kampschmidt RF, Mayer DT, Herman H, 1953. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. Journal of Dairy Science, 36, 7, 733-42.

Karabulut H, Gülay MŞ, 2016. Antioksidanlar. Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University, 1, 1, 65-76.

Kaya A, Birler S, Enwall L, Memili E, 2014. Determinants of sperm morphology. Animal Andrology: Theories and Applications. Wallingford, UK: CAB International, 34-56.

Khan A, Khan RU, Qureshi MS, Mobashar M, Gohar A, Ahmad S, Khan K, Khan H, Naz S, 2021. Effects of Different Equilibration Times on Post-Thaw Cryopreserved Semen Quality of Cattle and Buffalo Bulls. Pakistan Journal of Zoology, 53, 2.

Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA, 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. Biology of reproduction, 49, 6, 1202-7.

Korkmaz F, Çil B, 2020. Akış Sitometrisinin (Flow Cytometry) Sperma Kalite Analizlerinde Kullanımı. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 15, 1, 76-83.

Korkmaz F, Malama E, Siuda M, Leiding C, Bollwein H, 2017. Effects of sodium pyruvate on viability, synthesis of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA integrity of cryopreserved bovine sperm. Animal reproduction science, 185, 18-27.

Leite TG, do Vale Filho VR, de Arruda RP, de Andrade AFC, Emerick LL, Zaffalon FG, Martins JAM, de Andrade VJ, 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. Animal Reproduction Science, 120, 1-4, 31-8.

Li G, Saenz J, Godke R, Devireddy R, 2006. Effect of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on freezing-induced water loss in bovine spermatozoa. Reproduction, 131, 5, 875-86.

Lo K, Brinkman RR, Gottardo R, 2008. Automated gating of flow cytometry data via robust model-based clustering. Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology, 73, 4, 321-32.

Lone S, Prasad J, Ghosh S, Das G, Kumar N, Balamurugan B, Katiyar R, Verma M, 2016. Effect of cholesterol loaded cyclodextrin (CLC) on lipid peroxidation and reactive oxygen species levels during cryopreservation of buffalo (Bubalus bubalis) spermatozoa. Asian Pacific Journal of Reproduction, 5, 6, 476-80.

Lopes S, Jurisicova A, Sun J-G, Casper RF, 1998. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Human Reproduction (Oxford, England), 13, 4, 896-900.

Manafi M, 2011. Artificial insemination in farm animals, BoD–Books on Demand, p.

Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M, 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. Biology of Reproduction, 67, 4, 1250-8.

Mann T, 1946. Fructose as a normal constituent of seminal plasma. Site of formation and function of fructose in semen. Biochem J, 40, 4, 481-91.

Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Anel L, De Paz P, 2010. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. Reproduction in domestic animals, 45, 67-78.

Maxwell W, Stojanov T, 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. Reproduction, Fertility and Development, 8, 6, 1013-20.

Medeiros C, Forell F, Oliveira A, Rodrigues J, 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology, 57, 1, 327-44.

Medrano A, Contreras CFB, Herrera FM, Alcantar-Rodriguez AM, 2017. Melatonin as an antioxidant preserving sperm from domestic animals. Asian Pacific Journal of Reproduction, 6, 6, 241.

Miller DJ, Winer MA, Ax RL, 1990. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. Biology of Reproduction, 42, 5-6, 899-915.

Mocé E, Blanch E, Tomás C, Graham JK, 2010. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. Reproduction in Domestic Animals, 45, 57-66.

Mocé E, Tomás C, Blanch E, Graham JK, 2014. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins on bull and goat sperm processed with fast or slow cryopreservation protocols. Animal, 8, 5, 771-6.

Moore AI, Squires EL, Graham JK, 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. Cryobiology, 51, 3, 241-9.

Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ, 2006. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. Journal of andrology, 27, 2, 201-11.

Navratil AM, Bliss SP, Berghorn KA, Haughian JM, Farmerie TA, Graham JK, Clay CM, Roberson MS, 2003. Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. Journal of Biological Chemistry, 278, 34, 31593-602.

Nicolajsen H, Hvidt A, 1994. Phase behavior of the system trehalose-NaCl-water. Cryobiology, 31, 2, 199-205.

Nijs M, Creemers E, Cox A, Janssen M, Vanheusden E, Castro-Sanchez Y, Thijs H, Ombelet W, 2009. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. Reproductive biomedicine online, 19, 2, 202-6.

Nolan JP, Graham JK, Hammerstedt RH, 1992. Artificial induction of exocytosis in bull sperm. Archives of biochemistry and biophysics, 292, 1, 311-22.

Nur Z, Ak K, 2003. Donmuş spermanın saklanması ve eritilmesi.

Okatani Y, Wakatsuki A, Kaneda C, 2000. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. Journal of pineal research, 28, 2, 89-96.

Oldenhof H, Friedel K, Sieme H, Glasmacher B, Wolkers WF, 2010. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. Cryobiology, 61, 1, 115-22.

Ombelet W, Van Robays J, 2015. Artificial insemination history: hurdles and milestones. Facts, views & vision in ObGyn, 7, 2, 137.

Öztürk C, Güngör Ş, Ataman MB, Bucak MN, Başpinar N, Ili P, Inanç ME, 2017. Effects of arginine and trehalose on post-thawed bovine sperm quality. Acta Veterinaria Hungarica, 65, 3, 429-39

Öztürk AE, Bucak MN, Bodu M, Başpınar N, Çelik İ, Shu Z, Keskin N, Gao D, 2019. Cryobiology and cryopreservation of sperm. In: Cryopreservation-Current Advances and Evaluations. Eds: IntechOpen, p.

Pace M, Graham E, 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. Journal of Animal Science, 39, 6, 1144-9.

Pamornsakda T, Pojprasath T, Suwimonteerabutr J, Tharasanit T, 2011. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the quality of frozen–thawed equine epididymal sperm. Cryobiology, 63, 2, 90-5.

Parks JE, Graham JK, 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology, 38, 2, 209-22.

Parrish J, Susko-Parrish J, Graham J, 1999. In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. Theriogenology, 51, 2, 461-72.

Paudel K, Kumar S, Meur S, Kumaresan A, 2010. Ascorbic Acid, Catalase and Chlorpromazine Reduce Cryopreservation-induced Damages to Crossbred Bull Spermatozoa a. Reproduction in domestic animals, 45, 2, 256-62.

Pena F, Johannisson A, Wallgren M, Martinez HR, 2003. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. Animal reproduction science, 78, 1-2, 85-98.

Pena F, Rodríguez Martínez H, Tapia J, Ortega Ferrusola C, Gonzalez Fernandez L, Macias Garcia B, 2009. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. Reproduction in domestic animals, 44, 2, 345-9.

Percy ME, 1984. Catalase: an old enzyme with a new role? Canadian journal of biochemistry and cell biology, 62, 10, 1006-14.

Phillips PH, Lardy HA, 1940. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull sperm. Journal of Dairy Science, 23, 399-404.

Plucienniczak G, Jagiello A, Plucienniczak A, Holody D, Strzezek J, 1999. Cloning of complementary DNA encoding the pB1 component of the 54-kilodalton glycoprotein of boar seminal plasma. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 52, 3, 303-9.

Polge C, Smith AU, Parkes AS, 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, 164, 4172, 666-.

Purdy P, Graham J, 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. Cryobiology, 48, 1, 36-45.

Quinn P, 1989. Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. Journal of bioenergetics and biomembranes, 21, 1, 3-19.

Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA, 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. Journal of Biological Chemistry, 266, 32, 22028-34.

Ranjan R, Singh P, Gangwar C, Singh S, Swain D, Kharche S, 2021. Fortification of Catalase Improves Post Thaw Fertility of Goat Semen. Iranian Journal of Applied Animal Science, 11, 3, 587-93.

Reiter RJ, 1973. Comparative physiology: pineal gland. Annual Review of Physiology, 35, 1, 305-28.

Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX, 2000. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. Annals of the New York Academy of Sciences, 917, 1, 376-86.

Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, AcuñaCastroviejo D, 1995. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. Journal of pineal research, 18, 1, 1-11.

Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan D-X, 2009. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 44, 4, 175-200.

Reiter RJ, Tan D-x, Osuna C, Gitto E, 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. Journal of biomedical science, 7, 6, 444-58.

Richmond W, 1992. Analytical reviews in clinical biochemistry: the quantitative analysis of cholesterol. Annals of clinical biochemistry, 29, 6, 577-97.

Riedy M, Muirhead K, Jensen C, Stewart C, 1991. Use of a photolabeling technique to identify nonviable cells in fixed homologous or heterologous cell populations. Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 12, 2, 133-9.

Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA, 2005. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. Journal of andrology, 26, 1, 15-24.

Sabeti P, Pourmasumi S, Rahiminia T, Akyash F, Talebi AR, 2016. Etiologies of sperm oxidative stress. International Journal of Reproductive BioMedicine, 14, 4, 231.

Salamon S, Maxwell W, 2000. Storage of ram semen. Animal reproduction science, 62, 1-3, 77-111.

Salisbury G, Fuller H, Willett E, 1941. Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. Journal of Dairy Science, 24, 11, 905-10.

Salmon VM, Leclerc P, Bailey JL, 2017. Novel technical strategies to optimize cryopreservation of goat semen using cholesterol-loaded cyclodextrin. Cryobiology, 74, 19-24.

Sanocka D, Kurpisz M, 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. Reproductive Biology and Endocrinology, 2, 1, 1-7.

Sariözkan S, Tuncer PB, Bucak MN, Ulutaş PA, 2009. Influence of various antioxidants on microscopic-oxidative stress indicators and fertilizing ability of frozen-thawed bull semen. Acta Veterinaria Brno, 78, 3, 463-9.

Sarıözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Cantürk F, 2014. Influence of various antioxidants added to TCM-199 on post-thaw bovine sperm parameters, DNA integrity and fertilizing ability. Cryobiology, 68, 1, 129-33.

Sathe S, Shipley CF, 2014. Cryopreservation of semen. Bovine reproduction, 662-70.

Sevinc MA, Hafs HD, 1961. Boğa spermasının katalasz fermente ihtiva eden ve etmeyen süt, cue ve 1:1 oranında süt + cue sulandırıcılarında muhafazası. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, VIII, 1-16.

Sevinç A, 1984. Değişik Antibiyotikler Katılarak Dondurulmuş Boğa Spermalarından Elde Edilen Dölverimi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 31, 03, 491-7.

Shafiei M, Forouzanfar M, Hosseini SM, Esfahani MHN, 2015. The effect of superoxide dismutase mimetic and catalase on the quality of postthawed goat semen. Theriogenology, 83, 8, 1321-7.

Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A, 2015. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. Systems biology in reproductive medicine, 61, 1, 1-12.

Sieme H, Harrison R, Petrunkina A, 2008. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. Animal reproduction science, 107, 3-4, 276-92.

Sikka SC, 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Current medicinal chemistry, 8, 7, 851-62.

Silva P, Gadella B, 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. Theriogenology, 65, 5, 958-78.

Singh P, Agarwal S, Singh H, Sharma AK, Verma PK, Kumar S, 2020. Role of Catalase as Semen Additive in Cryopreservation of Cattle Bull Semen. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 9, 8, 2856-69.

Standerholen FB, Myromslien FD, Kommisrud E, Ropstad E, Waterhouse KE, 2014. Comparison of electronic volume and forward scatter principles of cell selection using flow cytometry for the evaluation of acrosome and plasma membrane integrity of bull spermatozoa. Cytometry Part A, 85, 8, 719-28.

Steinbach J, Foote R, 1967. Osmotic pressure and pH effects on survival of frozen bovine spermatozoa. Journal of Dairy Science, 50, 2, 205-13.

Steponkus PL, Dowgert MF, Gordon-Kamm WJ, 1983. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during a freeze-thaw cycle: the influence of cold acclimation. Cryobiology, 20, 4, 448-65.

Stevenson J, Britt J, 2017. A 100-Year Review: Practical female reproductive management. Journal of dairy science, 100, 12, 10292-313.

Tan D-x, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Hanes MA, Farley NJ, 1999. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. Life sciences, 65, 23, 2523-9.

Tao J, Critser ES, Critser JK, 1993. Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. Molecular reproduction and development, 36, 2, 183-94.

Tarın JJ, Brines J, Cano A, 1998. Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Human Reproduction, 13, 6, 1415-24.

Thérien I, Bergeron A, Bousquet D, Manjunath P, 2005. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 71, 1, 97-106.

Thérien I, Moreau R, Manjunath P, 1999. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. Biology of reproduction, 61, 3, 590-8.

Trevizan JT, Carreira JT, Carvalho IR, Kipper BH, Nagata WB, Perri SHV, Oliveira MEF, Pierucci JC, de Koivisto MB, 2018. Does lipid peroxidation and oxidative DNA damage differ in cryopreserved semen samples from young, adult and aged Nellore bulls? Animal reproduction science, 195, 8-15.

Tuncer PB, Sarıözkan S, Bucak MN, Ulutaş PA, Akalın PP, Büyükleblebici S, Canturk F, 2011. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. Theriogenology, 75, 8, 1459-65.

Ugur MR, Saber Abdelrahman A, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini RI, Purwantara B, Kaya A, Memili E, 2019. Advances in cryopreservation of bull sperm. Frontiers in veterinary science, 6, 268.

VanDemark N, Salisbury G, Bratton R, 1949. Oxygen Damage to Bull Spermatozoa and its Prevention by Catalase1. Journal of Dairy Science, 32, 4, 353-60.

Visconti PE, Kopf GS, 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. Biology of reproduction, 59, 1, 1-6.

Vishwanath R, Pitt C, Shannon P. Sperm numbers, semen age and fertility in fresh and frozen bovine semen. Proceedings-New Zealand Society of OF Animal Production, 31-3.

Vishwanath R, Shannon P, 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Animal reproduction science, 62, 1-3, 23-53.

Wafa W, El-Nagar H, Hussein Y, Saeed A, 2021. Effect of different antioxidant sources added to buffalo semen extender during cryopreservation on freezability and fertility of buffalo spermatozoa. J. Anim. Health Prod, 9, 3, 222-8.

Walters EM, Benson JD, Woods EJ, Critser JK, 2009. The history of sperm cryopreservation. Sperm banking: theory and practice. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2-10.

Watson P, 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. The effects of low temperatures on biological membranes, 189-218.

Watson PF, 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal reproduction science, 60, 481-92.

Wetterberg L, 1979. Clinical importance of melatonin. In: Progress in brain research. Eds: Elsevier, p. 539-47.

Woelders H, 1997. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. Veterinary Quarterly, 19, 3, 135-8.

Yadav HP, Kumar A, Shah N, Chauhan D, Lone S, Swain D, Saxena A, 2018. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on membrane and acrosome status of Hariana bull sperm during cryopreservation. CryoLetters, 39, 6, 386-90.

Yanagimachi R, 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. Zygote, 2, 4, 371-2.

Yang SX, Adams GP, Zwiefelhofer EM, Rajapaksha K, Anzar M, 2021. Cholesterol-cyclodextrin complex as a replacement for egg yolk in bull semen extender: sperm characteristics post-thawing and in vivo fertility. Animal Reproduction Science, 225, 106691.

Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T, 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. Theriogenology, 54, 4, 579-85.

Yoshida M, 2000. Conservation of sperms: current status and new trends. Animal Reproduction Science, 60, 349-55.

Yu Y, Chipot C, Cai W, Shao X, 2006. Molecular dynamics study of the inclusion of cholesterol into cyclodextrins. The Journal of Physical Chemistry B, 110, 12, 6372-8.

Zidovetzki R, Levitan I, 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1768, 6, 1311-24.

7. EKLER

EK-A: Etik Kurul Onayı

8. TURNİTİN RAPORU

BOĞA SPERMASININ DONDURULMASINDA YUMURTA SARISI İÇEREN TRİS SULANDIRICISINA KATALAZ, MELATONİN VE KOLESTEROL İLAVESİNİN SPERMA KALİTESİ VE FERTİLİTE ÜZERİNE ETKİSİ

Yazar Gökhan Yilmaz

Gönderim Tarihi: 17-Oca-2023 01:21PM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 1994064241

Dosya adı: G._Y_Imaz_Tez_15.01.2023_Turniten_i_in.docx (2.93M)

Kelime sayısı: 27567

Karakter sayısı: 184976

BOĞA SPERMASININ DONDURULMASINDA YUMURTA SARISI İÇEREN TRİS SULANDIRICISINA KATALAZ, MELATONİN VE KOLESTEROL İLAVESİNİN SPERMA KALİTESİ VE FERTİLİTE ÜZERİNE ETKİSİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%10	%9	%4	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
2	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	%1
3	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
5	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
6	acikerisim.aku.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
7	eprints.uniss.it İnternet Kaynağı	<%1
8	dspace.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

9	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	<%1
10	BOZKURT, Ertuğrul and TEKİN, Necmetin. "Boğa spermalarının farklı sulandırıcılar ile dondurulması ve in vitro değerlendirilmesi", Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü, 2002. Yayın	<%1
11	ercivet.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
12	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1
13	www.zora.uzh.ch İnternet Kaynağı	<%1
14	patents.google.com İnternet Kaynağı	<%1
15	www.gecekitapligi.com İnternet Kaynağı	<%1
16	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
17	archiv.ub.uni-marburg.de İnternet Kaynağı	<%1
18	Jun Yamamoto, Tsuyoshi Shimura, Ryosuke Uji, Shinya Masuda, Shuyo Watanabe, Yasunori Sakurai. "Vertical distribution of	<%1

	Todarodes pacificus (Cephalopoda: Ommastrephidae) paralarvae near the Oki Islands, southwestern Sea of Japan", Marine Biology, 2007 Yayın	
19	www.freepatentsonline.com İnternet Kaynağı	<%1
20	Submitted to University of South Florida Öğrenci Ödevi	<%1
21	app.trdizin.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
22	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<%1
23	Klaus, Daniela(Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz). "Evaluierung verschiedener Verdünner zur Flüssigkonservierung von caninem Sperma", Justus-Liebig-Universität Gießen, 2012. Yayın	<%1
24	burkonturizm.com İnternet Kaynağı	<%1
25	www.agriculturejournals.cz İnternet Kaynağı	<%1
26	pdfs.semanticscholar.org İnternet Kaynağı	<%1

27	www.science.gov İnternet Kaynağı	<%1
28	abakus.inonu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
29	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
30	journals.plos.org İnternet Kaynağı	<%1
31	Submitted to Recep Tayyip Erdogan University Öğrenci Ödevi	<%1
32	ÇEBİ ŞEN, Çiğdem, KULAKSIZ, Recai, DAŞKIN, Ali and AKÇAY, Ergun. "Koç Spermasının Dondurulmasında Bireysel Farklılıkların Etkisi", Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eyyübiye Kampüsü 63200 Şanlıurfa, 2017. Yayın	<%1
33	HÜSEYİN DEMİREL, Hasan, ERDOĞAN, Metin, UĞUZ, Cevdet, AĞCA, Yüksel, DAL, Gamze and İNCE, Sinan. "Borun ratlarda embriyo morfolojisi üzerine etkisi", Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü, 2016. Yayın	<%1
34	Masoumeh Azizi, Mohammad Moradi, Behrooz Johari, Mohammad Hessam Rafiee. "Simultaneous comparison of L-NAME and melatonin effects on RAW 264.7 cell line's	<%1

iNOS production and activity", Turkish Journal of Biochemistry, 2019
Yayın

35	ijas.iaurasht.ac.ir İnternet Kaynağı	<%1
36	KULAKSIZ, Recai and DASKIN, Ali. "Ankara teke spermasının farklı oranlarda yumurta sarısı içeren yağsız süt tozu sulandırıcısı ile dondurulması", Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü, 2010. Yayın	<%1
37	isfaw2019.isfaw.org İnternet Kaynağı	<%1
38	ÜNAL, İbrahim and ÖNDER, Mustafa. "Melezleme yöntemiyle elde edilen soya (Glycine max (L.) Merr.) hatlarının bazı tarımsal özelliklerinin belirlenmesi", Selçuk Üniversitesi, 2008. Yayın	<%1
39	"POSTER ABSTRACTS", Reproduction in Domestic Animals, 07/2008 Yayın	<%1
40	Martinez-Alborcia, Maria J., Anthony Valverde, Inmaculada Parrilla, Juan M. Vazquez, Emilio A. Martinez, and Jordi Roca. "Detrimental Effects of Non-Functional Spermatozoa on the	<%1

	Freezability of Functional Spermatozoa from Boar Ejaculate", PLoS ONE, 2012. Yayın	
41	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
42	acikerisim.selcuk.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
43	pure.eur.nl İnternet Kaynağı	<%1
44	brevets-patents.ic.gc.ca İnternet Kaynağı	<%1
45	ihslc.mehmetakif.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
46	motto.tc İnternet Kaynağı	<%1
47	nexusacademicpublishers.com İnternet Kaynağı	<%1
48	repositorio.unesp.br İnternet Kaynağı	<%1
49	www.sivaskarsiyaka.k12.tr İnternet Kaynağı	<%1
50	Deepika Kritaniya, Sarvajeet Yadav, Dilip Kumar Swain, A. Vidyasagar Reddy et al. "Freezing-thawing induces deprotamination,	<%1

	cryocapacitation-associated changes; DNA fragmentation; and reduced progesterone sensitivity in buck spermatozoa", Animal Reproduction Science, 2020 Yayın	
51	Submitted to Edmonds-Woodway High School Öğrenci Ödevi	<%1
52	Kitaji, Hideki, Shoji Ookutsu, Masahiro Sato, and Kazuchika Miyoshi. "Preincubation with green tea polyphenol extract is beneficial for attenuating sperm injury caused by freezing-thawing in swine : Green Tea Polyphenols for Freezing Boar Sperm", Animal Science Journal, 2015. Yayın	<%1
53	dergipark.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
54	hau.repository.guildhe.ac.uk İnternet Kaynağı	<%1
55	repozitorij.unizg.hr İnternet Kaynağı	<%1
56	www.scribd.com İnternet Kaynağı	<%1
57	www.vape44.com İnternet Kaynağı	<%1
58	www.yumpu.com	

İnternet Kaynağı

<%1

59	erepository.uonbi.ac.ke:8080 İnternet Kaynağı	<%1
60	esjournal.cumhuriyet.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
61	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<%1
62	Wanlu Li, Michael Osei Appiah, Jing Zhao, Hongyu Liu, Jun Wang, Wenfa Lu. "Effects of k-carrageenan supplementation or in combination with cholesterol-loaded cyclodextrin following freezing-thawing process of rooster spermatozoa", Cryobiology, 2020 Yayın	<%1
63	iksadyayinevi.com İnternet Kaynağı	<%1
64	www.adaltis.net İnternet Kaynağı	<%1
65	www.researchsquare.com İnternet Kaynağı	<%1
66	www.tarimorman.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
67	www.teses.usp.br İnternet Kaynağı	

		<%1
68	Divakar Swathi, Laxman Ramya, Santhanahalli Siddalingappa Archana, Maharajan Lavanya et al. "X chromosome-linked genes in the mature sperm influence semen quality and fertility of breeding bulls", Gene, 2022 Yayın	<%1
69	Ömer Faruk Karaşör, Mustafa Numan Bucak, Mihai Cenariu, Mustafa Bodu, Mehmet Taşpınar, Filiz Taşpınar. "The Effects of Different Doses of ROCK Inhibitor, Antifreeze Protein III, and Boron Added to Semen Extender on Semen Freezeability of Ankara Bucks", Molecules, 2022 Yayın	<%1
70	AKAL, Eser, SELÇUK, Murat and DEMİRCİ, Emre. "Epididimal boğa spermasının dondurulmasında farklı sulandırıcıların etkisi", Veteriner Hekimler Derneği, 2017. Yayın	<%1
71	K Shahzad, M Sohail, A Hamid. "Green ethanol production from cotton stalk", IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2019 Yayın	<%1
72	www.selcukmedj.org İnternet Kaynağı	<%1

9. ÖZGEÇMİŞ