

**T.C.  
TUNCELİ VE ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*)'NİN SPERM  
KRİYOPREZERVASYONUNDA (DONDURULMASI)  
ANTİOKSIDANLARIN KULLANILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Filiz KUTLUYER**

**(11111201)**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07.01.2014**

**Tezin Savunulduğu Tarih : 31.01.2014**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Murathan KAYIM (T.Ü)**

**Prof. Dr. Mevlüt ARAS (A.Ü)**

**Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. H. İbrahim HALİLOĞLU (A.Ü)**

**Doç. Dr. Mehmet KOCABAŞ (K.T.Ü)**

**Doç. Dr. Erkan CAN (T.Ü)**

**OCAK-2014**

Filiz KUTLUYER tarafından hazırlanan GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI'NIN (*Oncorhynchus mykiss*) SPERM KRİYOPREZERVASYONUNDA (DONDURULMASI) ANTİOKSİDANLARIN KULLANILMASI adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Murathan KAYIM  
Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Su Ürünleri Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. Bu tez, Tunceli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

Başkan : Prof. Dr. Mevlüt ARAS (A.Ü)

Üye : Doç. Dr. Murathan KAYIM (T.Ü)

Üye : Prof. Dr. H. İbrahim HALİLOĞLU (A.Ü)

Üye : Doç. Dr. Mehmet KOCABAŞ (K.T.Ü)

Üye : Doç. Dr. Erkan CAN (T.Ü)

Tarih : 31.01.2014

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Tunceli Üniversitesi ve Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı Doktora programında yürütülmüş, araştırma giderleri ise TÜBİTAK tarafından desteklenen 112O285 nolu “Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nın sperm kriyoprezervasyonunda (dondurulması) antioksidanların kullanılması, sperm kalite parametrelerinin, yağ asidi, protein profillerinin ve seminal plazma kompozisyonunun belirlenmesi” adlı projeden karşılanmıştır. Bu araştırma, Keban Çırçır Alabalık Üretim Tesisi’nde yürütülmüştür.

Çalışmada, ülkemizde entansif yetiştiriciliği yapılan gökkuşuğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) üretimi için önemli olan sperm muhafaza parametreleri, en uygun sulandırıcı ve antioksidanların kullanım imkanları üzerine bir etkisinin olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır.

Değerli bilgilerinizi ve yardımlarınızı esirgemeyen, eleştirileri ve önerileriyle araştırmamın sürekliliğini sağlayan ve tez yazım aşaması dahil son ana kadar danışmanlığımı yürüten, sayın Doç. Dr. Murathan KAYIM ve Prof. Dr. N. Mevlüt ARAS’a şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarda yardımlarınızı ve desteğini esirgemeyen sayın Doç. Dr. P. Barbaros TUNCER, Yrd. Doç. Dr. Fatih ÖĞRETMEN ve Yrd. Doç. Dr. Serhat BÜYÜKLEBLEBİCİ’ye, ayrıca emeği geçipte ismini saymadığım tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmada kullanılan canlı anaç ve damızlık balık temininde ve yem ve ilaç temini konusunda her türlü desteklerini esirgemeyen özel alabalık işletmesi “Çırçır Alabalık Üretim Tesisi” ve sahiplerine de ayrıca teşekkür ederim.

**Filiz KUTLUYER  
TUNCELİ – 2014**

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Genel Bilgiler .....	1
1.2. Gökkuşuğu Alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) ve Yetiştiricilikteki Önemi .....	2
1.3. Sperma ve Yapısı .....	4
1.4. Sperma Kalitesi .....	5
1.5. Kriyoprezervasyon .....	6
1.5.1. Kriyoprotektanlar .....	8
1.5.2. Kriyobiyojik saklamanın mekanizması.....	11
1.5.3. Hücre membran parametreleri.....	13
1.6. Antioksidanlar ve Kriyoprezervasyon İşleminde Kullanılması.....	13
<b>2. MATERYAL ve METOT.....</b>	<b>22</b>
2.1. Anaç temini ve sperma toplama .....	22
2.2. Spermatolojik parametrelerin belirlenmesi .....	23
2.3. Sperm Kriyoprezervasyonu ve Antioksidanların Kullanılması .....	26
2.4. Döllenme Oranı ve Açılma Oranının İzlenmesi.....	32
2.5. Veri Analizi.....	34
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>35</b>
3.1. Spermatolojik Muayene Bulguları .....	35
3.2. Spermanın Dondurulması ile İlgili Bulgular .....	35
3.2.1. Sulandırma Sonrası Elde Edilen Bulgular.....	36
3.2.2. Döllenme Oranı ve Açılma Oranının Belirlenmesi.....	42
<b>4. TARTIŞMA .....</b>	<b>44</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>50</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>52</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>67</b>

## Doktora Tezi

### ÖZET

## Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nın Sperm Kriyoprezervasyonunda (Dondurulması) Antioksidanların Kullanılması

Filiz KUTLUYER

Tunceli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Murathan KAYIM

2014, 64 Sayfa, LXVII

Çalışmada, gökkuşığı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) spermatolojik parametreleri, sperma muhafazasında sulandırıcılara antioksidanların eklenmesinin etkisi, çözüm sonrası dölleme oranları ve motiliteleri incelenmiştir. Çalışma Keban Çırçır Alabalık Üretim Tesisi'nde bulunan 2 yaş ve üzeri boy ve ağırlıkları sırasıyla  $36,6 \pm 2,23$  cm ve  $666,42 \pm 129,15$  g, 18 erkek damızlık erkek ve yumurta temininde kullanmak için 3 yaş ve üzerinde dişi anaçlar ( $43,3 \pm 2,10$  cm,  $1498 \pm 25$  g) kullanılmıştır. SCA (Sperm Class Analyser) cihazıyla 8 sperm kalite parametresi [hareketli sperma yüzdesi (%)], VCL (eğrisel hareket hızı,  $\mu \text{ ms}^{-1}$ ), VAP (ortalama hız,  $\mu \text{ ms}^{-1}$ ), VSL (doğrusal hareket hızı,  $\mu \text{ ms}^{-1}$ ), LIN [lineerlik (%)], STR (doğrusallık), ALH [yatay yer değiştirme ( $\mu \text{ m}$ )] ve BCF [sperm vuruş frekansı (Hz)] belirlenmiştir. Çalışmada motilitesi (>90) yüksek olan spermalar kullanılmıştır. Sperma standart sulandırıcı ve bu sulandırıcıya farklı antioksidanlar (katalaz, superoksit dismutaz, peroksidaz, okside glutatyon, redukte glutatyon, L-methiyonin, ürik asit, L-askorbik asit,  $\alpha$ - tokoferol,  $\beta$ -karoten ve karnitin) eklenerek oluşturulmuş 12 farklı sulandırıcıyla 1:10 oranında sulandırılmıştır. 12 sulandırıcı ile sulandırılmış olan sperma, sulandırıldıktan ve motiliteleri kaydedildikten sonra 0,25 ml'lik payetlere çekilmiş ve sıvı azot tankına yerleştirilerek dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Payetler 1, 3 ve 6 ay sonunda  $40^{\circ}\text{C}$ 'de 5 saniye sürede çözdürülmüş ve sperma kalite parametreleri belirlenmiştir. Çözdürülen spermayla yumurta dölleme işlemi yapılmıştır. Çözdürme sonucunda, L-metiyonin ve ürik asit ilavesinin motiliteyi arttırdığı belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). ( $\pm$ )- $\alpha$ -tokoferol ve ürik asit ilavesinin motilite süresini arttırdığı tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). 1., 3. ve 6. ay sonunda çözüm sonrasında elde edilen bulgularda süreye bağlı olarak motilite ve motilite süresinin düştüğü belirlenmiştir. Dölleme ve açılma oranı, muhafaza edilen spermada taze sperma ile döllenenlerden düşük olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, antioksidan ilavesi motilite parametrelerini olumlu etkilemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kriyoprezervasyon, alabalık, antioksidan, sperma.

## Doctorate Thesis

### SUMMARY

#### **Determination of the effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**

Filiz KUTLUYER

Tunceli University

The Graduate School of Natural and Applied Sciences

Fisheries Aquaculture Graduate Program

Supervisor: Assoc. Prof.Dr. Murathan KAYIM

2014, 64 pages, LXVII

In present study, it was examined whether addition of antioxidants to the cryopreservation extenders had an effect on semen post-thaw fertility and motility in rainbow trout and also the sperm characteristics post-thaw. Broods of (male: 36.6±2.23 cm, 666.42±129.15 g; female: 43.3±2.10 cm, 1498±25 g, +3 year old) were obtained from the fish farm Keban Trout Production Facility (Elazığ, Turkey). Sperm motility of the collected samples was evaluated by subjective estimations. Motility parameters were measured using an automated system, SCA (Sperm Class Analyser). Eight sperm motility parameters were chosen for analysis: MOT [percent of motile sperm (%)], VCL (curvilinear velocity,  $\mu$  ms<sup>-1</sup>), VAP (average path velocity,  $\mu$  ms<sup>-1</sup>), VSL (straight line velocity,  $\mu$  ms<sup>-1</sup>), LIN [linearity (%)], STR (straightness), ALH [amplitude of lateral head displacement ( $\mu$  m)] and BCF [beat cross frequency (Hz)]. Semen samples with a motility rate  $\geq$ 90% were excluded from the experiment. Antioxidants were separately added to the extenders (one per experimental group): catalase, superoxide dismutase, peroxidase, oxidized glutathione, reduced glutathione, L-methionine, uric acid, L-ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene and carnitine. After dilution the semen (1:10) with 12 extenders was aspirated into 0.25 ml straws, the straws were placed on the tray, frozen for 10 min, and plunged into liquid nitrogen. Semen was stored for 1, 3 and 6 months in liquid nitrogen. For thawing, the straws were taken out of the container and thawed in 40 °C water for 5 sec. Thawed semen was immediately used for motility measurements and fertilization assays. Our results indicated that the post-thaw motility rate increased in extenders supplemented with L-methionine and uric acid ( $p < 0.05$ ). It was determined that the motility duration of frozen thawed semen increased in extenders supplemented with ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocopherol and uric acid ( $p < 0.05$ ). The fertilization rate and the hatching rate of frozen sperm (1, 3 and 6 months) were lower than that of fresh sperm. Consequently, the tested antioxidants positively affected the motility parameters.

**Key Words:** Cryopreservation, trout, antioxidant, sperm.

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) .....	2
Şekil 2.1. Anaçlardan spermanın alınması .....	22
Şekil 2.2. Spermanın makroskopik muayenesi .....	23
Şekil 2.3. Spermatozoa konsantrasyonunun belirlenmesi .....	23
Şekil 2.4. pH indikatör kağıdı ile pH tayini .....	24
Şekil 2.5. Spermanın incelenmesi .....	25
Şekil 2.6. SCA cihazıyla spermatolojik özelliklerin belirlenmesi .....	26
Şekil 2.7. Sulandırıcının hazırlanmasında tartım işlemi .....	28
Şekil 2.8. Spermanın sulandırılması.....	28
Şekil 2.9. Spermanın payetlere çekilmesi .....	29
Şekil 2.10. Payetlerin polivinil alkol ile kapanması.....	30
Şekil 2.11. Payetler çelik levha üzerine yerleştirilmesi .....	30
Şekil 2.12. Strafora sıvı azot dökülmesi.....	31
Şekil 2.13. Payetlerin sıvı azot buharında tutulması .....	32
Şekil 2.14. Anaçlardan yumurta sağımı .....	33
Şekil 2.15. Kuluçka dolabına yerleştirilen döllenmiş yumurtalar .....	34

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Farklı antioksidan ilaveleri ile elde edilen sulandırıcı kombinasyonları .....	27
Tablo 3.1. Gökkuşığı alabalığında spermatolojik muayene bulguları.....	35
Tablo 3.2. Taze sperma kalite parametreleri .....	36
Tablo 3.3. 1., 3. ve 6. ay sonunda motilite değerleri (%) .....	37
Tablo 3.4. 1., 3. ve 6. ay sonunda motilite süreleri (sn) .....	38
Tablo 3.5. 1.ay sonunda belirlenen sperma kalite parametreleri.....	39
Tablo 3.6. 3.ay sonunda belirlenen sperma kalite parametreleri.....	40
Tablo 3.7. 6.ay sonunda belirlenen sperma kalite parametreleri.....	41
Tablo 3.8. 1., 3. ve 6. ay sonundaki dölleme ve açılma oranları.....	43



## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>MOT</b>	:Hareketli sperma yüzdesi
<b>VCL</b>	:Eğrisel hareket hızı
<b>VAP</b>	:Ortalama hız
<b>VSL</b>	:Doğrusal hareket hız
<b>LIN</b>	:Lineerlik
<b>STR</b>	:Doğrusallık
<b>ALH</b>	:Yatay yer değiştirme
<b>BCF</b>	:Sperm vuruş frekansı
<b>PUFA</b>	:Poly Unsaturated Fatty Acids
<b>DHA</b>	:Docosahexaenoic Acid
<b>EPA</b>	:Eicosapentaenoic Acid
<b>SCA</b>	:Sperm Class Analyser
<b>DMSO</b>	:Dimethyl Sulfoxide
<b>DMA</b>	:Dimethylacetamide

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Genel Bilgiler

Kültür balıkçılığı, nüfus artışına paralel olarak artan besin ihtiyacını karşılamak amacıyla son yıllarda gelişen sektörlerden biridir. Nüfus artışı, avlama yoluyla elde edilen su ürünleri miktarının azalması özellikle bazı balık türlerinin kontrol altındaki ortamlarda üretim ve yetiştiriciliklerinin yapılmasını zorunlu hale getirmiştir. Ancak kontrollü şartlar altında balık üretimindeki başarıyı sınırlandıran önemli faktörlerden biri dişi ve erkek balıklardaki gamet kalitesidir (Harlıoğlu ve Kutluyer, 2012).

Bir çok işletmede dişi ve erkek damızlıklarda, üreme döneminde görülen senkronizasyon problemleri nedeni ile dişi ve erkek bireylerden aynı dönemde yumurta ve sperma alınamamaktadır. Dişilerden yumurta sağımı yapıldığında damızlıklardan sperma alınmadığı için sağılan yumurta döllenememekte ve yumurtalar ziyan olmaktadır. Bazı durumlarda ise erkekler olgunlaştığı halde dişilerden yumurta alınmadığında sperma kaybı söz konusu olabilmektedir. Bu da üreticilerin ekonomik kayıplara uğramasına neden olmaktadır (Tabakoğlu, 2005).

Bir balığın damızlıkta kullanılabilmesi için spermatolojik özellikleri; kimi memeli çiftlik hayvanlarında olduğu gibi, çok iyi bilinmeli ve bu amaçla kullanılacak balıkların damızlık olarak seçilmesi ve yetiştirmede kullanılmasında bir takım kıstaslar getirilmelidir. Böylece daha ekonomik ve başarılı sonuçların alınması sağlanabilir (Tabakoğlu, 2005).

Balık yetiştiriciliğinde sperm kalitesinden daha çok yumurta kalitesi üzerinde durulmuş ve bu konuda çok sayıda araştırmalar yapılmıştır. Ancak yumurta kalitesinin sağlıklı larva ve yavru üretilmesindeki rolü kadar, erkek damızlıklardan kaliteli sperm elde edilmesi de önemli bir yere sahiptir (Vassallo-Agius vd., 2001; Lahnsteiner vd., 2009).

Biyotik ve abiyotik faktörler sperm kalitesini ve üreme fizyolojisini etkilemektedir. Özellikle, anaç balıkların beslenmesi sperm kalitesini etkileyen önemli bir faktördür (Izquierdo vd., 2001; Bobe ve Labbe, 2010). Anaç balıkların dengeli ve kaliteli yemlerle beslenmesi, döllenme oranını artırarak elde edilen larvanın sağlıklı olmasında etkili olmaktadır (Vassallo-Agius vd., 2001). Yağ asitlerinden özellikle çoklu doymamış yağ asitleri (Poly Unsaturated Fatty Acids, PUFA) içinde yer alan dokosaheksaenoik asit (DHA) ve eikosapentaenoik asit (EPA) ve n-3 serisi yağ asitleri (linolenik, stearidonik,

dokosapentaenoik asitler), döl verimi ve kalitesi üzerinde etkilidir (Bromage ve Roberts, 1995; Lahnsteiner vd., 2009; Huang and Ebersole, 2010). Bunların yanında, sperma yağ asitleri kompozisyonu ve miktarı da anaçların besin maddelerindeki yağ asitleri kompozisyonuna bağlı olarak değişmektedir (Izquierdo vd., 2001).

## 1.2. Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve Yetiştiricilikteki Önemi

Kuzey Amerika kökenli önemli bir alabalık türüdür. 1970’li yıllarda Alman Jacobi’nin suni döllemeyi başararak buradan birçok kıta’ya yayılmıştır. Önce Avrupa’ya 1880, daha sonra da ülkemize 1970’li yıllarda getirilmiştir. Denize göçen alttürleri vardır. Vücut, uzamış ve az basık olup, sırtta bir yağ yüzgeci mevcuttur. Sırt yüzgeci 10-12, anal yüzgeci ise 8-12 yumuşak ışına sahiptir. Pulları, sikloit ve küçüktür. Yanal çizgi tam, az öne doğru 100 ile 150 adet pulla kaplanmıştır. Kafanın üst kısmı ve arkası çelik mavisi, mavi- yeşil, sarı-yeşil ve hemen hemen kahverengidir. Vücut kenarları gümüşü, beyaz veya soluk sarı-yeşilden griye eğilimli olan bir renktir. Karın kısmı gümüşü beyaz veya sarıdır. Yine vücut kenarlarında bulanık pembe, mavimtrak veya geniş açık bir pembe bant ile çok sayıda küçük lekeler mevcuttur. Anaçlar yumurtlama zamanında renk çok koyu ve yanal çizgi ise çok kırmızı bir görünüm kazanır (Şekil1.1) (Anonim, 2004).



Şekil 1.1. Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

Gökkuşaağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) sistematikteki yeri şu sıraya göre ele alınmaktadır:

Alem: Animalia (Hayvanlar)

şube: Chordata (Kordalılar)

Sınıf: Actinopterygii (Işımsal yzgeçliler)

Takım: Salmoniformes

Familya: Salmonidae (Somongiller)

Cins: *Oncorhynchus*

Tr: *O. mykiss*

Gökkuşaağı alabalığı Kuzey Pasifik Okyanus civarı bölgelerde güney Kaliforniya'dan Alaska'ya (Aleutians bölgesi, Kamchatka'nın yarım adasının batı pasifik bölgeleri ve Okhotska deniz kıyısı alanları) kadar doğal olarak bulunmaktadır. Gökkuşaağı alabalıkları genellikle tatlı sularda yaşamaktadırlar, fakat doğu ve batı kuzey Pasifik anadrom stokları tespit edilmiştir. Bu stokların hayat devrelerinin Pasifik salmonla aynı olduğu görülmüştür. Pasifik salmonlar gibi bunlarda hayatlarının belli bir kısmını okyanusta geçirmektedirler ve gllere ve derelere yumurtlamak için dönerek burada hayatlarının larva ve smolt (10-20 cm boya kadar) dönemlerini geçirmektedirler (Yanık, 2009).

Gzlu yumurta naklinin kolaylığı nedeniyle dünyanın birçok bölgesine yayılan bu türün yetiştiricilikte tercih edilmesi, yüksek adaptasyon ve yemden yararlanma kabiliyeti, yüksek su sıcaklığı (26°C) ve daha düşük çözünmüş oksijen içeriğini tolere etmesi, yapay yöntemlerle yumurta alımının kolaylığı ile kuluçka sürelerinin kısalığı ve hastalıklara karşı dayanıklılıkları gibi özelliklerden kaynaklanmaktadır (Canyurt, 1985; Yanık, 2009).

Gökkuşaağı alabalığı büyüme oranları su sıcaklığına ve ortamdaki besinin varlığına bağlı olarak değişmektedir ve doğal olanları genellikle 3-4 yaşlarında cinsi olgunluğa ulaşmaktadırlar. Dişilerin çok az bir kısmı yeniden yumurtlamak için hayatta kalmayı başarabilmektedirler. Bundan dolayı yumurtlamada en fazla ilk kez yumurtlayan balıklar görülmektedir. Gökkuşaağı alabalıklarında büyüme ve olgunlaşma oldukça belirsizlik göstermektedir. Belli bir verim oranı ya da yaş yoktur. Büyüme ve olgunlaşma çevresel faktörlerin etkisi altındadır. Soğuk bölgelerdeki büyük akarsularda yaşayan balıklar sıcak

bölgelerdeki durgun sulardakinden daha uzun ömürlüdürler. Kolombiya'daki Kooteney Gölü'nden yakalanan 5-6 yaşlı balıkların maksimum ağırlıkları 17-23 kg arasında değişmektedir. Fakat derelerde yaşayan gökkuşakları ilk yaşlarında 100 g ve 3 yaşlarında ise 300-450 g'a ulaşabilmektedir (Yanık, 2009).

İlk balık yetiştiricilik denemeleri 1763 yılında alabalıklardan suni döl almış olmasından dolayı Avrupada Jacobi olarak belirtilse de Livingston Stone 1872 yılında Amerika'da ilk defa gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliğini tanımlamıştır. Ülkemizde entansif yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalığı üretimi, 1970'li yıllarda başlamış ve sonraki yıllar içerisinde ciddi bir artış meydana gelmiştir. Başlangıçta küçük aile işletmeleri şeklinde sürdürülen bu işletmecilik, 1990 yılını takiben entegre üretim tesislerine dönüşmüştür. Ülkemiz içsularında alabalık üretimi, 1999 yılında 36.870 ton iken 2009 yılında 75.657 tona ulaştığı bildirilmektedir. Bu üretim değeri, toplam su ürünleri üretimimiz içinde 2009 yılı verilerine göre %48'lik payı oluşturmaktadır (Ekici ve Timur, 2011). 2012 yılında üretim ise 111.335 tona çıkmıştır (TÜİK, 2013).

### **1.3. Sperma ve Yapısı**

Spermatozoa adı verilen erkek germ hücresi, ilk defa 1677 yılında Johann Ham tarafından gözlemlenmiştir. Bu hareketli hücre, baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır.

**Baş:** Karşıdan bakıldığında oval, yandan bakıldığında armut biçimindedir. Taze preparatlarda ışığı çok kırıcıdır, bu nedenle de parlak olarak gözükür. Boyanmış preparatlarda ise başın arka kısmı nüve boyaları ile çok koyu olarak boyanır, çünkü başın bu kısmında, çok miktarda (DNA) bulunmaktadır. Başın bu kısmının, spermatozoon epididimisinde olgunlaşırken ortaya çıkan enzimleri taşıdığı ve bu nedenle de fertilizasyonda önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Başın uç kısmı bazı hayvan türlerinde delici uç (Perforatorium) şeklinde kuvvetlendirilmiştir. Spermatozoan başı, olgunlaşmamış germ hücrelerinin nüvesine uymakta ve bu nedenle de babaya ait haploid kromozomları taşıdığı bildirilmektedir (Çevik, 2000).

**Gövde:** Boyun ve birleştirici kısım olmak üzere iki bölümden oluşmuştur. Boyun çok kısadır ve baş plağı (Noduli anteriores) ile ara kitleden (Massaintermedia) yapılmıştır. Işık mikroskopunda baş plağı; başın hemen altında yerleşmiş iki cisimcik ile onları birbirine birleştiren, enine diske bağlayan homojen bir kitle görünümündedir (Çevik, 2000).

Elektron mikroskopunda yapılan incelemelerde boynun yapısının daha karışık bir durum gösterdiği belirlenmiştir. Birleştirici kısımda şu oluşumlar vardır: 1. Enine disk (Discus transversalis), 2. Son halka, 3. Eksen ipliği, 4. Spiral iplik, 5. Sitoplasmik kılıf (Çevik, 2000).

Kuyruk: Bir uzun ana parça (Pars principalis) ile bir de kısa son parçadan (Pars terminalis) oluşmuştur. Bütün kuyruk boyunca eksen iplikçiği uzanır. Kuyruk, yılanvari hareketler ile spermatozoonun ileriye doğru hareket etmesini sağlar (Çevik, 2000).

Spermatozoon bir hücre olarak incelendiğinde; baş, bütün diğer kısımlar da hücre gövdesine uyar. Genler bulunması nedeniyle dölleme esnasında asıl önemli rolü oynayan kısım baştır, enine disk ise sadece bir motor durumundadır: Bu plağın sağlam olması spermatozoonun hareket edebilmesi için şarttır. Kuyruk, geminin pervanesi gibi sadece hareketi sağlayan bir kısımdır. Baş bulunmayan bir spermatozoon, eğer enine plağı sağlam ise hareket edebilir. Bundan anlaşılacağı üzere hareket yeteneği ile dölleme yeteneği farklı şeylerdir (Çevik, 2000).

Spermatozoa genital organlarda hareket ederler. Bu olaya pozitif (+) Rheotaxis denir. Spermatozoa, dişi genital organların bazı maddeleri tarafından çekilir. Bu olaya da pozitif (+) chemotaxis denir. Bir spermatozoonun yaşama süresi, içinde bulunduğu ortamın pH'ına bağlıdır. Spermatozoonlar asit ortamlarda çok çabuk hareket kabiliyetlerini kaybedip ölürlere (Kayalı vd., 1992; Çevik, 2000).

#### **1.4. Sperma Kalitesi**

Sperma kalitesi, sperminanın yumurtayı dölleyebilme kapasitesidir (Bozkurt ve Seçer, 2006). Sperma fizyolojisi ve kalitesinin anlaşılması ve geliştirilmesi için yapılan çalışmalarda, sperma sıvısındaki sperma hücrelerinin sayısı ve hareketliliğinin belirlenmesi sperma kalitesini tanımlamada en yaygın olarak kullanılan parametrelerdir (Bromage ve Roberts, 1995). Bununla birlikte, sperminanın dölleme kapasitesiyle doğrudan ilişkili tüm fiziksel parametrelerin potansiyel olarak sperma kalitesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda sperma yoğunluğu, osmotik yapı, sperma sıvısının pH'sı, sperma ve seminal plazmanın kimyasal yapısı, enzimatik aktiviteler, adenozintrifosfat (ATP) konsantrasyonu, hareketlilik, morfolojik yapı, dölleme kapasitesi ve diğer özellikler sperma kalitesini tanımlamada kullanılmaktadır (Billard vd., 1995; Lansteiner vd., 1998; Fauvel vd., 1998; Geffen ve Evans, 2000; Chowdhury ve Joy, 2001).

Spermanın kimyasal içeriği türe ve üreme dönemine göre farklılıklar gösterse de, genellikle sodyum (Na<sup>+</sup>) ve potasyum (K<sup>+</sup>) içeriği zengin olup ayrıca magnezyum (Mg<sup>+2</sup>) ve kalsiyum (Ca<sup>+2</sup>) da içermektedir. Spermaların organik kompozisyonu ise lipid, fosfolipid, kolesterol, trigliserid ve proteinlerin yanısıra adenin trifosfataz, fosfataz, lipaz, esteraz, oksidazlar, birçok ürikolitik enzim, malik dehidrojenaz, adenin trifosfat, laktat, piruvat, kreatin fosfat ve glukoz-6 fosfat gibi enerji metabolizmasında görevli birçok enzimden oluşmaktadır (Stoss, 1983).

Motilite, sperma kalitesi ve dölleme yeteneğini etkileyen en önemli parametredir. Spermatozoa genellikle ürogenital kanalda hareket yeteneğine sahip değildir ve bu hareket kabiliyetini ancak su ile temasa geçtikleri zaman kazanır (Rurangwa vd., 2004). Motilite süresi, spermatozoanın yer değişiminin durduğu, ancak flagellum hareketlerinin devam ettiği aşamaya kadarki toplam hareket süresi, doğrusal hareket gösterdiği toplam süre veya gözlenen spermatozoanın %50'sinin hayatta kalma süresi olarak tanımlanmaktadır (Billard vd., 1995).

Motilite süresini, ortamın kimyasal özelliği belirler. Sperm hareketi başladıktan sonra ATP kaynakları spermatozoa tarafından tüketilir (Billard, 1986). Ortamın sıcaklığı da motiliteyi etkileyen diğer bir faktördür. Düşük sıcaklığa sahip ortamda spermatozoa daha uzun süre hareketli kalırken yüksek sıcaklığa sahip ortamlarda bu süre daha kısa olmaktadır (Stoss, 1983).

## **1.5. Kriyoprezervasyon**

Balık spermasında kriyoprezervasyon, Brofeldt'in 1914 yılında alabalık spermasının soğuk ortamda daha uzun yaşadığının keşfi ile ortaya çıkmış ve balık spermasının başarılı bir şekilde dondurulması ise ilk kez 1953 yılında Blaxter tarafından ringa balığında uygulanmıştır. Bu işlem, kısa süreli ve uzun süreli olmak üzere 2 farklı muhafaza tekniği ile gerçekleştirilmektedir. Sperma kısa süreli muhafaza işleminde 1 ila 9°C'de, uzun süreli muhafaza işleminde ise derin dondurucu veya sıvı azot içerisinde 0°C ile -196°C arasında muhafaza edilmektedir (Hatipoğlu ve Akçay, 2010).

Testislerde gelişen sperma, ilerleyen zaman içerisinde kullanılmadığı takdirde yaşlanarak kalitesi düşmektedir. Kriyoprezervasyon sayesinde spermanın yaşlanmasını önlemek ve kaliteli spermaları muhafaza etmek mümkündür (Rana, 1995). Genetik ve ıslah çalışmalarıyla yıl boyu ihtiyaç duyulan sperma, saklama teknikleri sayesinde muhafaza edilebilmektedir (Suquet vd., 1998).

Sperma dondurulması işleminde gerekli olan spermanın temin edilmesinde 2 yaş ve üzerindeki gökkuşuğu alabalıkları damızlıkları kullanılmaktadır. Anaçların boy ve ağırlık ölçümleri yapıldıktan sonra, anestezi ile bayıltılarak “Abdominal masaj yöntemi” ile sağım yapılarak sperma alınmaktadır. Sağımda kontaminasyonu önlemek için, idrar ya da dışkının spermaya karışmamasına dikkat edilmektedir. Sperma örnekleri analiz ve kriyoprezervasyon işlemleri için 2-4°C arasında buz içeren plastik kaplarda muhafaza edilmektedir. Elde edilen spermanın makroskobik muayenesinde renk, kıvam ve miktar parametrelerinin muayenesi yapılarak bazı spermatolojik özellikleri belirlenmektedir. Sperma dondurulması işlemi için elde edilen spermalardan en kaliteli olanlar seçilerek, farklı sulandırıcılarla farklı oranlarda sulandırma işlemi yapılmaktadır. Sulandırma oranı türe göre değişiklik göstermektedir (Çevik 2000).

Sulandırılan sperma pellet şeklinde, payetlere çekilerek veya ampullere doldurulmaktadır. Bu yöntemlerin başarısı türe, sulandırıcıya ve dondurma yöntemine göre değişmektedir.

Dondurma işleminden önce delikli çelik levha üzerine yerleştirilen payetler sıvı Azot buharı üzerinde türe göre farklı sürelerde tutulmaktadır.

Dondurulan payetler konteynırlara konulmadan önce farklı büyüklükteki gobletlere yerleştirildikten sonra konteynırın kanisterlerine konarak sıvı azot içerisinde muhafaza edilmektedir. Konteynırlara sıvı azot takviyesi yapılmalıdır.

Farklı balık türlerinde sperma muhafazasında çeşitli sulandırıcılar ve donma işlemi için farklı maddeler kullanılmıştır. Dimethylsulphoxide (DMSO) balık türlerinin çoğunda kullanılan bir kriyoprotektandır (Suquet vd., 1998). Farklı deniz balıkları türlerinde yapılan çalışmalarda motilite, yaşama oranı ve açılmada farklı protokoller uygulanarak iyi sonuçlar elde edilmiştir. Ancak sperma kalitesinin değerlendirilmesinde, uygulanan prosedürlerde belirli bir standardizasyon yoktur. Bu yüzden farklı kombinasyonlar uygulanarak sperm muhafazası sağlanabilir. Sperma kalitesinin korunması açısından kriyoprezervasyon işlemi üretimde büyük önem taşımaktadır. Tür çeşitliliği, seleksiyon gibi faktörler kriyoprezervasyonda farklı protokoller uygulanmasını gerektirir. Şimdiye kadar, balık çiftliklerinde sperm ünitesinin entegrasyonu ile ilgili fiyat analizleri yapılmamıştır (Caffey ve Tiersch, 2000).



Sperma özellikleri, türe, stoklara, hatta aynı canlıdan farklı zamanlarda alınan örneklerde bile değişim gösterebilmektedir. Bu yüzden sperma kalitesi denemeleri ve bu kalite ile ilgili özelliklerin belirlenmesine öncelik verilmelidir. Ayrıca sperma örnekleri, kalitelerine göre dondurmada farklı eğilime sahiptirler (Cabrita vd., 2009).

Kriyoprezervasyon, plazma membranında, mitokondride ve kromotin yapısını etkileyen organellerde hasara neden olur (Watson ve Morris, 1987; Watson ve Fuller, 2001). Hem hücreler içindeki buz kristali oluşumu hem de eksternal ortamda osmotik ya da oksidatif stresten dolayı oluşan mekanik kuvvetlerden dolayı hücre hasarı meydana gelir (Watson ve Morris, 1987). Hücre yapısının ve fonksiyonelliğinin korunması kriyoprezervasyon protokolüne bağlıdır. Yumurtanın döllemesi için plazma membranının bütünlüğünün ve osmotik durumunun korunması gerekmektedir. Dahası, spermatozoanın oosite ulaşması için su içinde hareket etme kabiliyetini sürdürmesi gerekmektedir. Spermatozoa motilitesi mitokondri durumu, ATP üretimi, plazma membran kanal aktivitesi ve kamçılı yapı gibi hücrenin farklı özelliklerine bağlıdır (Cabrita vd., 2009). Motilite çeşitli türlerde sperma kalitesinin belirlenmesinde kullanılan parametrelerden biridir (Cosson vd., 2008). Türe bağlı olarak, semen içindeki hareketli hücreler %10 ile %100 arasında değişir. Ayrıca DNA bütünlüğü, döllemeden sonra başarılı embriyo gelişimi ile garantilenmelidir (Cabrita vd., 2009).

ATP içeriği, yaşayabilirlik testleri, motilitenin belirlenmesi, DNA analizleri gibi sperma kalitesinin belirlenmesinde kullanılan parametreler, kaliteli sperma örneklerinin seçiminde ve kriyoprezervasyon protokollerinin oluşturulmasında ve bu protokollerin standardizasyonunda etkili olacaktır (Cabrita vd., 2009).

### **1.5.1. Kriyoprotektanlar**

Kriyoprotektanlar hücrenin dondurulması sırasında oluşan soğuk şoku zararına, hücre içi kristal oluşumuna, çözüm esnasında dekrizalizasyona ve gelişen membransel destabilizasyona karşı koruyucu amaçlı olarak kullanılır. Genel olarak koruyucu etkilerini ortamdaki donmamış fraksiyonu artırarak ve ortamdaki iyon miktarını azaltarak gösterirler. Hücre, dondurulmadan önce kriyoprotektanlarla inkubasyona tabi tutularak, intrasellüler bakımdan dengeye gelmesi sağlanmaktadır. Kriyoprotektanların en önemli özellikleri, düşük moleküler ağırlığa sahip olmaları ve toksik etkilerinin belirli dozlarda katıldıklarında oluşmasıdır (Polge vd., 1949; Palasz ve Mapletopt, 1996; Bucak ve Tekin, 2007).

Hücrelerin başarıyla dondurulması, plazma membranından suyun ve kriyoprotektanların basit difüzyonunu ve hızlı taşınımını gerektirir. Son yıllarda membranda transport işlevli protein yapısında olan su kanalları (aquaporin) saptanmıştır. Bu proteinlerin sulandırıcıya katılmasıyla hücrenin yaşama oranı artırılmaktadır (Edashige vd., 2003; Bucak ve Tekin, 2007).

Hücrelerin kriyoprotektanlara maruz kalma süresinin kısaltılması ve geçirgenlik özelliği olmayan kriyoprotektanların kullanımı gibi uygulamalarla hücre dondurma ortamındaki kriyoprotektanların toksik etkisi azaltılmaktadır (Massip, 2001; Bucak ve Tekin, 2007). Kriyoprotektanlar işlevsel olarak permeabl ve permeabl olmayan kriyoprotektanlar olarak iki gruba ayrılmaktadır.

### **Permeabl (internal) kriyoprotektanlar**

Gliserol, Etilen Glikol [EG], Formamide, Dimetilsülfoksit (DMSO) permeabl özelliğe sahip kriyoprotektanlara örnek olarak verilebilir. Permeabl kriyoprotektanlar etkilerini, hücre zarından içeriye girerek gösterirler ve koruyucu etkileri donma esnasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltmaları, suyu uzaklaştırarak protein yapılarını korumaları ve düşük sıcaklıkların yarattığı ozmotik büzüşmeyi azaltmaları ile oluşmaktadır (Mcgann, 1978; Leeuw, 1993; Leiboand and Brandley, 1999; Holt, 2000; Bucak ve Tekin, 2007).

**Gliserol:** Gliserol yüksek oranda sulu yapı gösteren bir poliol bileşigidir. Kimyasal yapısındaki C/OH oranının eşit olması spermatozoon üzerindeki etkisini artırmaktadır. Gliserolün toksisitesi, metabolik dönüşümü esnasında oluşan methlglycosal tarafından oluşturulur. Gliserolün toksik etkisi türe bağlı olarak değişmektedir. Aygır, tavşan, kanatlı ve balık spermalarının döllemeyi engelleyici özellik göstermektedir. Hücrelerde gliserolün toksik etkisi, membran biyoenerji dengesinde değişikliğe ve ozmotik strese yol açmasıyla ortaya çıkmaktadır (Katkov vd., 1998; Alvarenga, 2000; Woods, 2000; Bucak ve Tekin, 2007).

**Etilen glikol:** Spermanın donma-çözme esnasında oluşan zarara karşı, gliserolle eşit oranda etki sağlamaktadır (Alvarenga, 2000; Ball ve Vo, 2001; Bucak ve Tekin, 2007).

**Amid türevi kriyoprotektanlar:** Amid türevi kriyoprotektanlar [(Formamid, Dimetilasetamid (DMA vb.)) özellikle aygır spermasının dondurulmasında gliserole göre daha iyi koruma sağlamakta ve daha az döllemeyi önleyici özellik göstermektedir. Sulandırıcılara %3,5-5 oranında katılması, donma zararına karşı etkili olmakta, çözüm sonu sperma kalitesinde iyileşme sağlamaktadır. Amidler, gliserole duyarlı türlerin spermalarının

muhafazasında alternatif olarak kullanılabilir (Gomes vd., 2002; Alvarenga vd., 2005; Bucak ve Tekin, 2007).

**DMSO (Dimetilsülfoksit):** DMSO, kimyasal olarak bir polar kök etrafında iki apolar baştan oluşan suyu hem seven hem sevmeyen grupları bir arada bulduran moleküldür. Bu özellik ona hem sıvı hem de organik ortamlarda çözünme imkanı sağlamaktadır. Alabalık spermasında çözüm sonu en yüksek motilite oranı, sulandırıcıya %10-15 oranında ilave eklendiğinde elde edilmektedir (Alvarenga, 2000; Ball ve Vo, 2001; Bucak ve Tekin, 2007).

### **Permeabl olmayan (eksternal) kriyoprotektanlar**

Eksternal kriyoprotektanlar, membranların sıvı ve katyonlara karşı geçirgenliğinde artış yaparak, ozmotik strese karşı hücre membranları esnek hale getirerek koruyucu etkilerini gösterirler. Bunun yanında, hücrede donma/çözünme esnasında gelişen lipid peroksidasyonunu azaltmaya çalışırlar. Sulandırıcıya eklendiklerinde düşük oranda permeabl olmayan kriyoprotektan kullanılmakta, bu işlem internal kriyoprotektanların ortaya çıkabilecek toksik etkilerini azaltmaktadır (Arav vd., 1993; Cabrita vd., 2001; Bucak ve Tekin, 2007). Eksternal kriyoprotektanlar, makromoleküller ve sakkaritler olarak ikiye ayrılır.

**Makromoleküller:** Polietilen glikol, ficoll 70, BSA, dekstran, mannitol ve polivilinil prolidon sulandırıcılarda en çok kullanılan makromoleküllerdir. Bunlardan BSA (bovine serum albumin)'nın lipid peroksidasyon inhibitörü olduğu düşünülmektedir (McGann, 1978; Kasai, 1996; Cabrita vd., 2001; Bucak ve Tekin, 2007).

**Sakkaritler:** Glukoz, sükroz, trehaloz ve rafinoz sakkaritlerdendir. Sakkaritler, lethal etkili intrasellüler kristalleşmeyi engellemek için hücrede suyu uzaklaştırır (Rudolph ve Crowe, 1985; McWilliams vd., 1995; Bucak ve Tekin, 2007). Şekerler donma ve çözüm esnasında oluşan membran zararına karşı, membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girerek yüzey artışı sağlayarak koruma sağlamakta ve çözüm işlemi esnasında da hücrelerin ozmotik şoka girmesini önlemektedir (McGann, 1978; McWilliams vd., 1995; Bucak ve Tekin, 2007).

### **Yumurta sarısı**

Yumurta sarısındaki düşük yoğunluğa sahip fosfolipidler spermatozoon yüzeyine bağlanarak hücresel adenilat siklazı aktive ederek koruyucu etki gösterirler (Holt, 2000; Bucak ve Tekin, 2007). Birçok araştırmada lipozomlardan elde edilen fosfolipitlerin koruyucu

etkileri araştırılmış, türe göre koruyucu etkili fosfolipid kaynakları belirlenmiştir (Leeuw vd., 1993; Bucak ve Tekin, 2007).

### **Antifreeze proteinler**

Antifreeze proteinlerinin farklı moleküler ağırlığa sahip, tripeptit zincirlerden oluşan üç farklı tipi mevcuttur ve bu proteinler düşük sıcaklığa sahip sulara (-1,8°C) yaşayan balıklar, böcekler, bakteriler ve bitkilerden izole edilmektedir (Payne vd., 1994; Palasz ve Mapletopt, 1996; Cheng ve Merz, 1997; Bucak ve Tekin, 2007).

### **Diğer kriyoprotektif ajanlar**

Kriyoprotektif ajanlardan soya fasülyesi ekstraktlarının, hücrenin soğutulması sırasında membran akışkanlığını azaltarak koruma sağladığı bildirilmektedir. Ayrıca pentoxifylline, kafein, sodium nitroprusside, platelet activating factor, butylhydroxytoluene (BHT) ve hyaluronic acid'in spermatozoonun çözüm sonu yaşayabilirliğine katkı sağladığı bildirilmektedir (Oehninger vd., 2000; Bucak ve Tekin, 2007).

### **1.5.2. Kriyobiyojik saklamanın mekanizması**

Hücrelerin dondurulmasında suyun biyolojik formunun değişimi söz konusudur. Yani dondurma, suyun biyolojik olarak kristalleşmesi, şekil değiştirmesi ile meydana gelmektedir. Hücrelerin dondurulma işlemi sırasında hücre dışı solüsyon/medyum kendiliğinden veya etkiye ile -5 ila -100 °C'de kristalleşir. Ancak hücre içi ortamda hücre membranının etkisiyle henüz donma söz konusu değildir. Söz konusu oluşum sırasında hücre dışı suyun buzlaşması nedeniyle ortamda bulunan maddelerin yoğunluğunda artış meydana gelir. Bu durum bazı kimyasal maddelerin hücre içinde ve dışında farklı yoğunlukta bulunmalarına neden olur. Meydana gelen farklı yapı ya da denge nedeniyle bir kısım sıvının hücre dışına çıkması (dehidrasyon) ile bu kez de hücre içinde bulunan bir kısım erimiş maddelerin yoğunluğunda artış meydana gelir ve hücre içerisinde de kristaller oluşur. Bu oluşumlar hücrelerin dondurulmasında olduğu gibi çözdürülmesinde de (ters yönde ve dekrizalizasyon halinde) soğutma hızına bağlı olarak az ya da çok meydana gelir (Mazur, 1977, 1984, 1990; Bucak ve Tekin, 2007).

Hücre (gamet) membran bütünlüğü ve normal yapısı hücrenin metabolik fonksiyonları için gereklidir. Normal vücut ısısında hücre membran yapısı lamelli, iki sıralı fosfolipid yapısında ve dizilmiş proteinlerden oluşur. Ortamın ısı değişimleri (özellikle düşme) doğrudan membran yapısını etkilemesi (soğuk şoku) ile birlikte metabolik olaylarda azalma,

sapma, düşme, hücre içi iyon ve molekül kayıplarına neden olur (Mazur, 1977, 1984; Bucak ve Tekin, 2007).

### **Soğutma zararı**

Gametlerdeki soğutma zararı, hiperozmotik stres, soğuk şoku stresi, ozmotik büzüşme-şişme sonucu oluşmaktadır. Hiperozmotik çevrenin yaratılmasında ortam pH'sı, hücresel dehidrasyonda artış, hücre membranı protein-lipid kompleksinin zayıflamasında önemli yer tutar (Gao vd., 1993). Gametlerin soğuk şokuna maruz kalmasında gelişen zararlar, hücre su kaybı, membran lipid ve proteinlerinde destabilizasyon-denatürasyon, hücre ve endoplazmik retikülümünde ozmotik şişme, plazma membranında intramembranöz kümeleşme, zona pellusida da fraktür (kırılma), akrozomal enzimlerin salınımı, soğuk şokuyla spermatozoonun sirküler hareketi ve motilite kaybı, oositlerin *in vitro* fertilizasyonunda kayıplar olarak sıralanabilir. Bunların sonucunda, hücre ölümü, serbest radikal oluşumu, ATP sentezinde aksama, dölleme kaybı, polispermi ve tetraploidi oluşmaktadır (Shaw vd., 2000; Bucak ve Tekin, 2007).

### **Kristal oluşumu**

Kristalleşme endotermik bir işlem olup, ortamda latent ısı dalgasını ortaya koymaktadır. Sıvılardaki kristalleşmeyi takiben, donmamış fraksiyondaki fiziksel özellikler değişmekte, kristalleşme sonucu oluşan gaz, ortam viskozitesini artırmakta ve pH'ta önemli değişimler meydana getirmekte ve kristalleşmenin yarattığı stres faktörü, hücrede ozmotik büzüşmeye ve polimerizasyona, membran lipid fazında değişimlere neden olmaktadır (Watson, 1995; Woods vd., 2000; Bucak ve Tekin, 2007).

### **Ozmotik stres ve ozmotik şişme**

Donma işleminde etkili en önemli faktör hücrede oluşan ozmotik streştir. Donma sırasında hiperozmotik ortam oluşmasına rağmen, çözüm esnasında kristalizasyonun ortadan kalkmasıyla bu ortam azalmaktadır. Ozmotik stres, hücre içi ve hücre dışı ortamdaki ozmotik farktan kaynaklanmaktadır. Bu ozmotik farklılığın hesaplanması, hücreden hangi oranda suyun uzaklaştırılmasının belirlenmesinde önemlidir. Suyun uzaklaştırılma oranı ise doğrudan ortama katılacak kriyoprotektan yoğunluğuyla ilişkilidir (Curry ve Watson, 1994; Bucak ve Tekin, 2007).

Kriyoprotektanların ilavesi ortamın hiperozmotik olmasına, hücre membranından içeriye girmesiyle hücrede dehidrasyonun şekillenmesine neden olmaktadır.

Kriyoprotektanların uzaklaştırılmasında hücreler tekrar şişmekte ve izozmotik hacime ulaşmaktadır (Woelders, 1997). Bu tekrarlanan değişimler kritik noktaları geçtiğinde, hiperozmotik bağıli irreversibl membran yıkımı oluşur. Ayrıca hücredeki küçük porların varlığı potasyum ve sodyum iyonlarının giriş-çıkışını sağlayarak, hücrenin hipoozmotik stres ve kolloidal ozmotik hemolize duyarlılığını artırır. Bu durumun önüne geçmek için ortama kademeli olarak kriyoprotektanların ilavesi gerektirmektedir (Gao vd., 1993; Pedro vd., 1997; Kasai, 2002; Bucak ve Tekin, 2007).

### **İki faktör hipotezi**

Mazur ve arkadaşlarının ortaya attığı iki faktör hipotezine göre; hızlı soğutma zararı, hücrede şekillenen kristalleşmeyle ilgilidir. Yavaş soğutma zararı ise hücrenin kriyoprotektaanlara uzun süre maruz kalmasında ya da aşırı büzüşmesinde oluşmaktadır (Bucak ve Tekin, 2007).

### **1.5.3. Hücre membran parametreleri**

Hücreler su içeriğine, hacmine, soğutulma duyarlılığına ve sitoplazmik membranın sıvı permeabilite katsayısına göre spesifik soğutma oranına sahiptir. Donma esnasında gamet ve embriyonun su alışverişinin hesaplanması, hücrenin donmaya ve kriyoprotektaanlara karşı ozmotik tepkinin belirlenmesi, lethal etkili intrasellüler donma insidensinin azaltılması ve kriyoprotektanların optimum katım oranlarının saptanması bazı membran parametrelerinin belirlenmesine bağılidir. Bu parametreler, ozmotik inaktif hacim, hidrolitik iletkenlik ( $L_p$ ), eriyik permeabilitesinin aktivasyon enerjisi ( $V_p$ ) ve hücre yüzeyi/hacim oranıdır (Leibo ve Brandley, 1999; Bucak ve Tekin, 2007).

### **1.6. Antioksidanlar ve Kriyoprezervasyon İşleminde Kullanılması**

Antioksidanlar serbest radikalleri uzaklaştıran moleküllerdir ve oksidasyonları engeller. Düşük antioksidan seviyeleri ya da antioksidan enzimlerinin inhibasyonu oksidatif strese neden olur ve hücrelere hasar verir ya da öldürür. Memelilerde spermatozoadaki reaktif oksijen türleri (ROS) mevcuttur (Alvarez ve Storey, 1989; Sikka vd., 1995; Tramer vd., 1998; Sikka, 2004). Spermatozoa tarafından ROS üretilmesi fizyolojik bir işlemdir. Ancak ROS oluşumu, lökosit kontaminasyonundan (Aitken vd., 1992) ve aşırı rezidüel sitoplazma içeren spermatozoa tarafından da ortaya çıkabilir (Kessopoulou vd., 1992). Spermatozoa özellikle peroksidatif hasara karşı hassastır. Çünkü stoplazmalarının çoğu spermatogenesisin son safhalarında uzaklaştırılır (Alvarez vd., 1987) ve hemen hemen ROS tarafından meydana gelen peroksidatif hasardan koruyan enzimlere sahip değildirler (Sikka, 2004). Dahası,

spermatozoanın plazma membranları serbest radikal saldırısına hassas olan doymamış yağ asitleri içerir (Alvarez vd., 1987; Sikka, 2004). Bu yüzden, ROS sperma hücre membranlarının lipid peroksidasyonuna, motilite kaybına, döllemenin engellenmesine, akrosomal reaksiyona, aksonemal yapıda hasara neden olur (Sikka vd., 1995; Tramer vd., 1998).

Oksidatif stres, organizmadaki pro-oksidan ve anti-oksidan dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır (Kopani vd., 2006). Memelilerde yapılan çeşitli çalışmalar ROS'un kriyoprezervasyon işlemi boyunca üretildiğini ve dondurulmuş-çözdürülmüş spermatozoada antioksidan seviyelerinin azaldığını ve lipid peroksidasyonuna son derece hassas olduğunu göstermiştir (Lasso vd., 1994; Chatterjee vd., 2001; Bansal and Bilaspuri, 2011). Sonuç olarak, erime sonrası motilite, yaşayabilirlik, membran bütünlüğü, akrozom fonksiyonelliği, antioksidan durumu ve dölleme oranında azalmanın olduğu belirlenmiştir (Bansal and Bilaspuri, 2011). Spermanın antioksidan kapasitesi kriyoprezervasyon işlemi boyunca meydana gelen lipid peroksidasyonun engellenmesinde yetersiz olduğundan sulandırıcılar antioksidanlarla desteklenmelidir (Cheema vd., 2009; Taylor vd., 2009; Chatterjee vd., 2001; Bansal and Bilaspuri, 2011; Gadea vd., 2009; Malo vd., 2010).

Günümüze kadar memelilerin spermasındaki antioksidan sistemleri ile ilgili çok sayıda çalışma (Alvarez ve Storey, 1989; Zini vd., 1993; Bauchè vd., 1994; Gu ve Hecht, 1996) yapılmasına rağmen teleost balıklardaki antioksidan sistemleriyle ilgili araştırmalar son yıllarda çalışılmaya başlanmıştır. Sasaki vd. (1996) 'ye göre seminal plazmadaki antioksidan potansiyeli, düşük molekül ağırlığı ile ilişkili olduğu belirtilirken, Liu vd. (1995) spermatozoal antioksidatif korumanın seminal plazma proteinleri ile ilişkili olduğunu iddia etmiştir. Askorbik asit konsantrasyonu alabalıkta seminal plazmada, kan plazmasından daha yüksek olduğundan spermada antioksidan olarak önemli bir yere sahiptir (Ciereszko ve Dabrowski, 1995). Yapılan bir çalışmada, gökkuşağı alabalığı ve ot sazının askorbik asit ya da askorbil monofosfat içeren diyetlerle beslenildiğinde sperma motilitesinin ve dölleme oranının arttığı bildirilmiştir (Metwally ve Fouad, 2009). Ayrıca tokoferol içeren diyetler ile beslenen *Salvelinus alpinus* türünün seminal plazmasında lipid peroksidasyonunu azaltmış ve seminal plazmanın antioksidan potansiyeli artmıştır. Bu yüzden teleost balıklarda antioksidan olarak kullanılabilir (Mansour vd., 2006).

Güçlü bir reduktant ajan olan ürik asit, gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), tatlı su levreği (*Perca flavescens*), turna balığı (*Esox masquinongy*, *Esox lucius*), sazan (*Cyprinus carpio*), çapak balığı (*Abramis brama*) ve yeşil sazan (*Tinca tinca*)'ın seminal plazmasında yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Bu yüzden antioksidan fonksiyonu da olabilir (Ciereszko vd., 1999).

Son zamanlarda, farklı teleost balıkların spermasındaki antioksidan sistemleri daha detaylı olarak incelenmiştir (Ciereszko vd., 1999; Lahnsteiner vd., 2010). *Lota lota* (Linnaeus 1758), *Perca fluviatilis* (Linnaeus 1758), *Alburnus alburnus* (Linnaeus 1758) ve *Salmo trutta* (Linnaeus 1758)'nın sperması antioksidanlar (askorbik asit, karnitin, glutatyon, metiyonin, tokoferol, ürik asit) ve oksidatif savunma enzimleri (katalaz, glutatyon reduktaz, peroksidaz, superoksit dismutaz) içerdiğinde, diğer enzim ve metabolitlerin konsantrasyonları/aktiviteleri düşük ya da dalgalıyken ürik asit konsantrasyonları ve SOD (superoxide dismutase) aktivitesi yüksektir (Ciereszko vd., 1999; Lahnsteiner vd., 2010). Spermatozoa inhibe edici salin solusyon spesifik antioksidan ve oksidatif savunma enzimleri ile saklandığında, sperma motilitesi ve membran bütünlüğü korunur ve lipid peroksidasyonu azalır (Lahnsteiner vd., 2010a). Yapılan çalışmalarda, spermatozoanın oksidatif saldırıya hassas olduğu ve ürik asitin sperma için en uygun antioksidan olduğu sonucu çıkarılabilir (Ciereszko vd., 1999; Lahnsteiner vd., 2010). Şimdiye kadar teleost balıkların spermatozoasının kriyoprezervasyonu ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen hala kriyoprezervasyon boyunca oksidatif zarar olup olmadığı, sulandırıcılara antioksidanların eklenmesinin sperma kalitesini artırıp artırmadığı bilinmemektedir.

### **1.7. Alabalıklarda kriyoprezervasyon ve antioksidanların etkisi**

Brofeldt'in 1914 yılında alabalık spermasının soğuk ortamda daha uzun yaşadığını keşfetmesinden sonra, sperma biyolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla 2 farklı muhafaza tekniği geliştirilmiştir (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1978). Bu tekniklerden birincisi spermanın 1 ila 9°C'de kısa süreli saklanması (soğuk saklama), diğeri derin dondurucu veya sıvı azot içerisinde 0°C ile -196°C arasında uzun süreli saklama tekniğidir (kriyoprezervasyon) (Tabakoğlu, 2005).

Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama) prosedürü bazı tatlı su balığı türlerinde özellikle salmonidler, mersin balıkları, sazanlar ve yayın balıklarında uygulanmış ve son 10 yılda deniz balıkları türlerinde araştırmalar yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar deniz ve tatlı su



balık türlerinde spesifik protokollerin uygulanmasında gerekli bilgiyi sağlamıştır (Cabrita vd., 2008).

Mersin balıkları için uygulanan protokollerin çoğu mersin morinası (*Huso huso*), çuka balığı (*Acipenser ruthenus*), solgun mersin balığı (*Scaphirhynchus albus*) Sibirya, Avrupa ve Rus mersin balığı (*A. baeri*, *A. sturio*, *A. gueldenstaedii*), kısa burunlu mersin balığı (*A. brevirostrum*) gibi ticari ve nesli tehlikede olan türlerde uygulanmıştır (Horvath vd., 2008).

Yayın balığı türleri içerisinde, Afrika ve Avrupa yayın balıkları (*Clarias gariepinus*, *Silurus glanis*), sazanlarda (*Cyprinus carpio*) ve gümüş sazanı (*Hypophthalmichthys nilotica*) üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Horvath ve Urbanyi, 2000; Alvarez vd., 2008; Maisse vd., 2008; Viveiros ve Komen, 2008).

Başarılı çalışma girişimleri kalkan (*Scophthalmus maximus*) (Suquet vd., 1998; Chereguini vd., 2003), levrek (*Sparus aurata*) (Fabbrocini vd., 2000; Cabrita vd., 2005), Avrupa levreği (*Dicentrarchus labrax*) (Fauvel vd., 1998; Sansone vd., 2002), Avrupa ve Japon yılan balığı (*Anguilla anguilla*, *A. japonica*) (Tanaka vd., 2002; Asturiano vd., 2003), çizgili levrek (*Morone saxatilis*) (He ve Woods, 2003), sivriburun karagöz (*Diplodus puntazzo*) (Taddei vd., 2001), halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Babiak vd., 2006), dil balığı (*Pleuronectes americanus*) (Rideout vd., 2003), orfoz ve taş hanisi (*Epinephelus marginatus*, *E. malabaricus*) (Gwo vd., 1999; Cabrita vd., 2009), mezgit balığı (*Gadus morhua*, *Melanogrammus aeglefinus*) (Rideout vd., 2004) gibi deniz balıkları türlerinde de yapılmıştır.

Salmonidlerde yapılan çalışmaların çoğu gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), kahverengi alabalık (*Salmo trutta*), kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) ve alp alabalığı (*S. alpinus*) üzerinde yapılmıştır (Cabrita vd., 1998; Martı'nez-Pa'ramo vd., 2009).

Gwo vd. (1999) *Oncorhynchus masou formosanus* türünün spermanın muhafazasında kriyoprotektan olarak DMSO ve DMA'yı 300 mM glukoz kombinasyonu ile birlikte kullanmıştır. Ayrıca 300 mM glukoz-DMSO ile sulandırıldıktan ve dondurma-çözme işlemi uygulandıktan sonra spermatozodaki morfolojik değişiklikleri incelemişlerdir. Çalışma sonunda, kriyoprotektan olarak DMSO kullanıldığında çözüm sonrası daha yüksek motilite ve dölleme oranı elde edildiği belirlenmiştir.

Drokin vd. (1998) gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve kahverengi alabalık (*Salmo trutta* f. *fario*) spermatozoidinin yapısı üzerinde kriyoprezervasyonun etkisini

incelemişlerdir. Elektron mikroskopunda yaptıkları incelemeler sonucunda alabalık spermatozoasının membran yapısında değişikliklerin meydana geldiğini belirlemişlerdir.

Gopalakrishnan vd. (1999) kahverengi alabalık (*Salmo trutta fario*) spermasının dondurulmasında yedi farklı sulandırıcı kullanmışlar ve spermanın etkinliğini incelemişlerdir. Yumurta sarısı (%2) ve DMSO (%10) içeren sulandırıcı kullanıldığında ( $p>0,05$ ) kontrol grubunun açılma oranlarının eşit olduğu belirlenmiştir. Çözülmüş miltin ve "Dexter" solusyonuna 5 mM theophylline eklemeyen önce sölomik sıvının uzaklaştırılmasının açılma yüzdesini arttırdığını tespit etmişlerdir.

Babiak vd. (2000) gökkuşuğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) sulandırıcı içeriğinin ve dengeleme zamanının döllenme ve dondurulmuş spermatozoanın enzimatik aktivitesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Sulandırıcı olarak Erdahl ve Graham+%10 DMA (dimethyl acetamide) + %10 yumurta sarısı ve 0,3 M glukoz+%10 DMA kullanmışlardır. Özellikle DMA ve DMSO içeren sulandırıcılara yumurta sarısının eklenmesinin yararlı olduğunu belirlemişlerdir.

Labbe ve Maisse (2001) kahverengi alabalık (*Salmo trutta f. fario*) üzerinde yaptıkları çalışmada cinsel olgunluktan 9 ay önce 30 erkek birey tatlı suda, 30 erkek birey de deniz suyunda yerleştirmişlerdir. Çalışma sonunda bireylerden sperma toplanmış ve analiz etmişlerdir. Deniz suyunda yetiştirilen balıklardan (%10-90;  $55\pm 29$  S.D.) alınan spermaların motilitesi tatlı suda yaşayan balıklara oranla (%60-95;  $89\pm 7$  S.D.) daha düşük ve değişken olduğunu belirlemişlerdir. Spermatozoa plazma membranının osmotik şoka dayanıklılığı, spermatozoanın %50'si deiyonizeye maruz kalmasına bağlı olarak propidium iodide geçirgenliği meydana gelmeden önce hesaplayarak belirlemişlerdir. Deniz suyunda yaşayan balıklardan alınan spermalardaki geçirgenlik tatlı suda yaşayan balıklara göre 2 dakika erken meydana geldiğini belirtmişlerdir. İki gruptan alınan spermalarda sperma yağ asidi profilinin aynı olduğu ve kolesterol/fosfolipid oranının ise deniz suyundakilerde  $0,526\pm 0,092$  S.D. ve tatlı sudakilerde  $0,523\pm 0,076$  S.D. olduğunu vurgulamışlardır. Kriyoprezervasyon iki grupta da spermada ATP içeriğinin aynı oranda azalmasına neden olduğu ve döllenme oranlarının farklı olmadığını belirtmişlerdir ( $27\pm 12$  ve  $32\pm 12$ ).

Cabrera vd. (2001) kriyoprezervasyon uygulanmış gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) spermasında membran stabilizatörü olarak eksternal kriyoprotektantların etkisini araştırmış ve dondurma-çözme işleminin spermatozoa hücrelerinde oluşturduğu hasarı incelemiştir. Dondurma-çözme işleminden sonra plazma membranında oluşan subletal hasarla

ilişkili olarak döllemenin azaldığını belirlemiştir. Eksternal kriyoprotektanlar sperma hücre membranını hasara karşı koruyucu olarak bilinirler. Temel dondurucu olarak #6 Erdahl ve Graham ve %7 DMSO ve yumurta sarısı, BSA ve soya-protein kompleksini (DanPro S760) ve bunların çeşitli kombinasyonlarını kullanmışlardır ve bu kriyoprotektanların etkisini değerlendirmek için 10 ve 300 mOsm hipo- ve isoosmotik solusyonlarına maruz bırakıldıktan 30 saniye, 2, 5, 10 ve 15 dakika sonra hareketli hücrelerin yüzdesini, hücrelerin propidium iodide geçirgenliği ve in vitro dölleme oranını belirlemiştir. Bazı stabilizatörler dondurma-çözme işleminden sonra motiliteyi, geçirgenliği arttırmış ve hücrenin hassaslığını azalttığını vurgulamıştır. Hipo-osmotik şoka dayanıklılık açısından incelendiğinde en iyi membran korunması, sulandırıcıya BSA ve yumurta sarısı eklendiğinde elde ettiklerini bildirmiştir. En yüksek dölleme oranına DanPro S760 yalnız ya da BSA ile kombinasyonları uygulandığında ulaşmıştır. Çalışma sonunda, soya fasulyesi konsantrasyonunun iyi bir koruma sağladığını ve dölleme oranını arttırdığını bildirmiştir.

Tekin vd. (2003) gökkuşığı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) üreme mevsiminin sonunda farklı yaş grupları oluşturarak abdominal masaj yöntemiyle 37 bireyden sperma almış ve alınan spermalarda miktar, motilite, canlılık süresi, yoğunluk, toplam spermatozoa sayısı, pH ve renk parametrelerini belirlemiştir. Spermaları sağılan balıkların canlı ağırlık ve uzunluklarını ölçerek spermatolojik özellikler ile arasındaki korelasyonlarını değerlendirmişlerdir. Kriyoprotektan olarak %10 DMSO ve yumurta sarısı içeren üç sulandırıcı (1:3 v/v) ile spermayı sulandırmışlardır. Sulandırılmış sperma 0,5 ml payetlerde paketlenmiş ve sıvı azot buharında dondurmuşlardır. Payetler 30°C'deki su banyosunda 30 saniye süreyle çözdürülmüş ve çözüm sonu motilite ve dölleme sonuçları glukoz esaslı sulandırıcıda tespit etmişlerdir. Sonuç olarak gökkuşığı alabalıklarında spermatolojik özelliklerin yaş, tür ve çevre koşulları göz önüne alınarak değerlendirilmesi gerektiğini ve canlı ağırlık ile vücut uzunluğu ölçülerinin sperma verimi ve kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılabileceğini beyan etmişlerdir.

Cabrita vd. (2005) ve Pérez-Cerezales vd. (2010) gökkuşığı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) sperma kriyoprezervasyonunun DNA'ya zararını incelemişler ve kriyoprotektan olarak LDL (low density lipoprotein=düşük yoğunluklu lipoprotein) kullanılmışlardır. Çalışma sonucunda DNA bütünlüğünde, üreme sezonu boyunca kriyoprezervasyon zararından dolayı azalma olduğunu ve LDL ile yumurta sarısının eklenmesinin koruyucu etkisi olduğunu vurgulamışlardır.

Young vd. (2009) gökkuşuğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) ilk gelişimde, taze milt ile kriyoprezervasyon uygulanmış ve miltin etkisini incelemişlerdir. Gözlenmiş yumurta, fry yaşama oranı, fry deformite oranları ve gelişimlerini karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda, kriyoprezervasyon uygulanmış grupta gözlenmiş yumurta ( $p<0,001$ ) ve fry yaşama oranında ( $p<0,001$ ) önemli bir azalma olduğunu belirlemişlerdir. Gözlenmeden fry aşamasına kadar olan sürede, yaşama oranında gruplar arasında bir farklılık görülmezken, gözlenme safhasından önceki dönemde önemli bir farklılığın olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca çalışmada, gözlenmiş safhada haploid embriyoların oranı, açılmada fry deformite oranları ve pektoral yüzgeç ışınları asimetrisindeki (FA) dalgalanmaları belirlenerek gelişimdeki farklılıklar incelenmiştir ve gruplar arasında farklılık olmadığını belirtmişlerdir.

Hatipoğlu ve Akçay (2010) endemik bir balık türü olan Abant alabalığının (*Salmo trutta abanticus*) spermatolojik parametrelerinin değerlendirilmesi ve farklı sulandırıcılarda kısa süreli saklanan spermatozoonların fertilizasyon yeteneğini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada olgunlaşmış 2 ile 5 yaş arasındaki erkek ve dişi Abant alabalıklarını üretim istasyonundan elde etmişler, 30 olgun erkek balıktan anestezi yapılmaksızın masaj yoluyla sperma alınmış, birincil spermatolojik parametreler (miktar, motilite, hareket süresi, yoğunluk ve pH) belirlendikten sonra birleştirilen örnekleri iki farklı sulandırıcı ile (0,3 M glukoz veya Ringer solusyonu) 1:2 (sperma:sulandırıcı) oranında sulandırmışlardır. Sulandırılan spermayı 4°C'de 48 saat saklamışlar, saklama işlemi esnasında 24. ve 48. saatlerde motilite değerlendirmesi yapmışlar ve dölleme denemeleri için kuru dölleme tekniğini kullanmışlardır. Yumurtaları 30 olgun dişiden masaj yoluyla almışlardır. Dölleme işlemini kuru plastik kaplarda gerçekleştirmişler ve her bir dölleme denemesi için 600 yumurta kullanmışlardır. Dölleme dozu olarak her bir yumurta için  $0,25 \times 10^6$  spermatozoa kullanmışlardır. Yumurtaların şişmesinden sonra üzerlerine kuluçka suyu (7°C) eklenerek dikey inkubasyon tepsilerine yerleştirmişlerdir. Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre taze sperma motilitesini ortalama %81,4 olarak bulmuşlardır. Saklama sonrası en yüksek motilite (24. saat: %67; 48. saat: %53) ve hareket süreleri (24. saat: 60 saniye; 48. saat: 42 saniye) glukoz sulandırıcısı ile elde etmişlerdir. Taze spermadan elde edilen fertilizasyon oranı %84,4 olarak bulunmuştur. En yüksek gözlü yumurta oranı (%80,4) 24 saat glukoz sulandırıcısında saklanan spermadan elde edildiğini bildirmişlerdir. Saklamanın 48. saatinde bu oran glukoz sulandırıcısı için %61,9'a, ringer sulandırıcısı için %43,8'e düştüğünü tespit etmişlerdir. Sonuçlara göre, Abant alabalığı spermasının kısa süreli saklanmasında glukoz esaslı sulandırıcı, Ringer sulandırıcısına oranla daha iyi koruyucu özelliklere sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Dziewulska vd. (2011) Atlantik salmon (*Salmo salar*) spermasında penetre kriyoprotektantlar [%10 DMSO ya da metanol (MeOH)]; penetre olmayan kriyoprotektantlar [glukoz (0,3 M) ya da sukroz (0,6 M)], ve 0,1 mL peletler ya da 0,25 mL payetlerde dondurma işleminde 8 farklı kombinasyon uygulamışlardır. Bütün sulandırıcılar %10 yumurta sarısı ile desteklemişlerdir. Motilite oranları, gözlenmiş yumurta, açılan yumurta ve keseli larva oranları, açılmadan iki ay sonra alevinlerin büyüme oranlarını hesaplamışlardır. Pipetlerde korunmuş olan spermatozoa motilitesi ve dölleme başarısı peletlerde muhafaza edilenlerden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Şeker tipleri arasında önemli bir fark olmadığını belirlemişlerdir. MeOH ile muamele edilen spermatozoa DMSO ile muamele edilmiş olanlara oranla daha yüksek bir dölleme oranına sahip olduğu ve gözlü embriyonun daha hızlı geliştiğini vurgulamışlardır. MeOH ile muamele edilenlerden oluşan döllerde özellikle açılmadan önce daha yüksek mortaliteye sahip oldukları ve her iki muamelede de yüzme safhasından çalışma sonuna doğru eşit sayıda bireyler elde edildiğini bildirmişlerdir. Dahası MeOH grubunda, beslenme boyunca DMSO ve kontrol grubundan daha düşük ağırlıkta larva üretilmiş olsa bile, MeOH grubunun larva ağırlığı tatmin edici olduğunu beyan etmişlerdir. Larva grupları arasında büyüklük ve kondüsyon açısından önemli bir farkın olmadığını tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda penetrate kriyoprotektanların MeOH ve DMSO nun erime sonrası sperma hızı, dölleme oranı ve bireylerin mortalite oranını etkilediği, şeker tiplerinin (glukoz, sukroz) etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Lahnsteiner vd. (2010a) kahverengi alabalığın *Salmo trutta* f. *fario* sperma sulandırıcı ortamına eklenen antioksidanların etkisini incelemişlerdir. Spermatozoa ve seminal plazmanın antioksidan ve oksidan enzimlerini analiz etmişlerdir. Antioksidan ve oksidan savunma enzimlerinin sperma fonksiyonelliği üzerinde bir etkiye sahip olup olmadığının belirlenmesi için *in vitro* deneyler uygulamışlardır. Seçilen antioksidan ve oksidan savunma enzimleri, spermatozoa motilite-inhibe edici tuz solusyonuna eklenmiş ve sperma aktivasyonu, membran bütünlüğü ve lipid peroksidasyonu belirlemişlerdir. Spermatozoa ve seminal plazmada katalaz, redukte glutatyon, metiyonin, sulfoksit reduktaz, peroksidaz ve superoksit dismutaz enzimleri, askorbik asit, glutatyon, metiyonin, tokoferol ve ürik asit metabolitleri belirlenmiş ve enzimlerden superoksit dismutazın en yüksek aktiviteye, metabolitlerden ürik asitin en yüksek konsantrasyona sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ürik asit ve katalazın sperma motilitesini ve sperma membran bütünlüğünü arttırdığını ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise sperma lipid peroksidasyonunun azalttığını tespit etmişlerdir. Ancak, katalazın sadece seminal sıvıda olandan daha yüksek bir aktiviteye sahip olduğunu

belirlemişlerdir. Azalan metiyonin, sperma motilitesi ve membran bütünlüğünü, okside metiyonin ise motiliteyi arttırdığını, ancak ne redukte ne de okside methiyonin sperma lipid peroksidasyonunu azalttığını belirlemişlerdir. Çalışma sonunda, kahverengi alabalığın spermasında ana antioksidanın ürik asit olduğu sonucuna vardıklarını belirtmişlerdir.

Lahnsteiner vd. (2011) kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) ve gökkuşığı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) kriyoprezervasyon uygulanmış sperma kalitesi üzerinde antioksidanların etkisini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada kriyoprezervasyon sulandırıcılarına antioksidanların (katalaz, superoksit dismutaz, peroksidaz, redukte glutatyon, redukte metiyonin, okside glutatyon ya da redukte metiyonin) eklenmesinin dondurma-çözme işleminde kaliteyi artırıp arttırmadığını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, antioksidanların erime sonrasında motilite parametrelerini, DNA bütünlüğünü ve döllemeyi etkilediğini ancak membran bütünlüğünü etkilemediğini belirlemişlerdir. Gözlemlenen etkilerin çoğunluğunun negatif olduğunu ve antioksidatif stres ya da hasarın kriyoprezervasyon boyunca önemli rol oynamadığını ayrıca lipid peroksidasyon testlerinde taze ve kriyoprezervasyon uygulanmış sperma arasında farklılıklar olmadığını, antioksidan desteğinin kaynak alabalığı ve gökkuşığı alabalığı için uygun olmadığını belirlemişlerdir.

Ubilla ve Valdebenito (2011) gökkuşığı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) spermasının soğuk muhafazasında sulandırıcılara farklı antioksidanların eklenmesinin sperma motilitesi ve spermatozoanın dölleme başarısını nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Kontrol grubu, G1 [(UCT sulandırıcısı), G2 (UCT-Polyphenol (0,1 g 100 mL<sup>-1</sup>)), G3 [UCT-trolax C (0,1 g 100 mL<sup>-1</sup>)), G4 [UCT- Polyphenol (0,1 g 100 mL<sup>-1</sup>)-trolax (0,1 g 100 mL<sup>-1</sup>)] ve G5 (UCT-vitamin C) olmak üzere altı grup oluşturmuşlar ve 7, 10 ve 17. gün sonra motilite ve dölleme başarısını incelemişlerdir. Çalışma sonunda, sulandırıcılara antioksidanların eklenmesinin sperma yaşayabilirliğini, motilite ve dölleme başarısını etkilediğini belirlemişlerdir.

## 2. MATERYAL ve METOT

### 2.1. Anaç temini ve sperma toplama

Çalışmada Keban Çırçır Alabalık Üretim Tesisi'nden temin edilen, morfolojisi düzgün olan ve kayıtları tutulan, verimleri bilinen, 2 yaş ve üzerindeki 18 damızlık ( $36,6\pm 2,23$  cm,  $666,42\pm 129,15$  g) ve 3 yaş ve üzerinde anaç alabalıklar ( $43,3\pm 2,10$  cm;  $1498\pm 25$  g) kullanılmıştır.

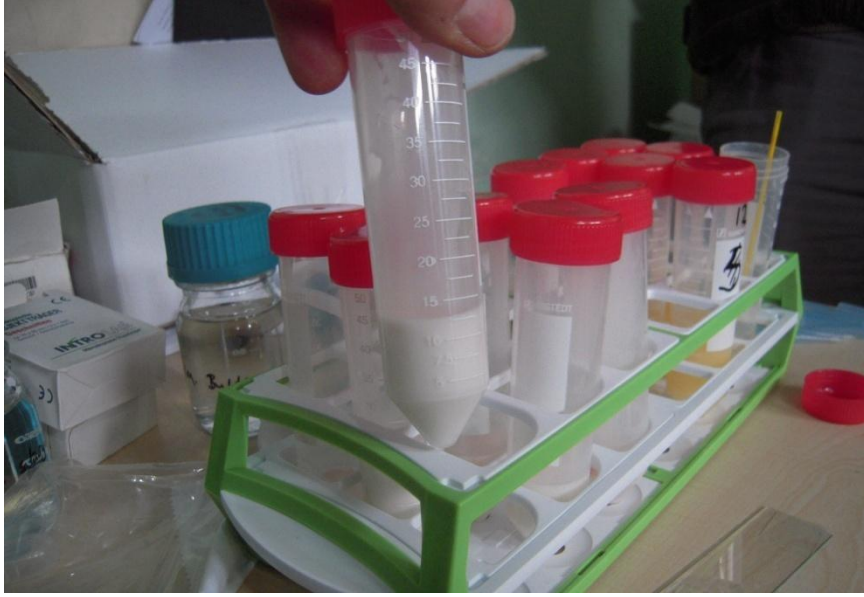
Anaçların 2-Phenoxyethanol (30 mg/L) kullanılarak anestezi ile bayıltılmış, boy ve ağırlık ölçümleri alındıktan sonra anaçlar ve “Abdominal Masaj Yöntemi” ile sağım yapılarak sperma alınmıştır (Şekil 2.1). Sağımda kontaminasyonu önlemek için, idrar ya da dışkının spermaya karışmaması için alabalıklar sağımdan 2 gün önce aç bırakılmıştır. Sperma örnekleri analiz işlemleri için ve kriyoprezervasyon işlemi için  $2-4^{\circ}\text{C}$  arasında buz içeren plastik kaplarda muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.1. Anaçlardan spermanın alınması

## 2.2. Spermatojik parametrelerin belirlenmesi

Spermanın makroskobik muayenesinde renk, kıvam ve miktar parametreleri incelenmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Spermanın makroskobik muayenesi

Spermatozoa konsantrasyonu Neubauer sayma kamarasıyla %0,8 NaCl ile 2500 X sulandırmayla belirlenmiştir (Caille vd., 2006). Hareketli spermatozoonların yüzdesi 120 mM NaHCO<sub>3</sub> ile aktivasyondan sonra 5 saniye içinde mikroskopta 250X büyütmede belirlenmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Spermatozoa konsantrasyonunun belirlenmesi



10.000Xg seminal plazma 10 dakika 4°C’de spermanın santrifüjlenmesinden elde edilmiştir.

Spermatokrit ölçümünde mikro-hematokrit kapillar tüpler (75 mm uzunluğunda, iç çapı 1 mm ve 0,1 ml kapasite) spermayla doldurulmuştur. Tüplerdeki sperma hacmi mm’de metre ölçeğinde ölçülmüş ve 10 dakika 4000 rpm (3370Xg) de santrifüjlenmiştir. Spermatokrit, spermanın toplam hacmindeki beyaz hücrelerin yüzdesi olarak tanımlanır.

Spermanın pH değeri, pH indikatör kağıdı kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 2.4). pH tayini taze sperma, sulandırma sonrası ve çözüm sonrası olmak üzere üç aşamada ayrı ayrı tayin edilmiştir. Tayin işleminde bir damla sperma indikatör kağıdına damlatıldıktan sonra, kağıt üzerindeki renk değişimine bakılarak skalaya göre okuma yapılmıştır.



Şekil 2.4. pH indikatör kağıdı ile pH tayini

% 0,1 BSA ilavesi ile aktivasyon solusyonuyla (120 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4°C) aktivasyon sağlanmıştır. Milt (1–2 µL), 400 µL aktivasyon solusyonu bulunan polietilen Eppendorf tüpe eklenmiştir. Karıştırdıktan sonra, bu sulandırıcının 1,2 µL’si lamın (12-well multi-test) (MP Biomedicals LLC, Almanya) üstüne koyulmuş ve üstü lamel ile kapatılarak incelenmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Spermmanın incelenmesi

Sperm hareketi kamera (Basler A312fc, 50 Hz negatif faz konsantrat Nikon Eclipse 50i mikroskop SCA cihazına bağlı, 250x büyütme) ile izlenmiştir. Aktivasyon sonrası 10 saniyelik filmler şeklinde kayıt yapılmıştır (Şekil 2.6). Aktivasyon ve film kayıtları en az 5 kere tekrarlanmıştır. Sperm hareketi ile ilgili özellikleri SCA (Sperm Class Analyser v. 4.0.0. by Microptic S.L., Barselona, İspanya) ile belirlenmiştir. 8 sperm özelliği analiz edilmiştir;

- 1) MOT, hareketli sperm yüzdesi
- 2) VCL, eğrisel hareket hızı ( $\mu\text{m s}^{-1}$ );
- 3) VAP, ortalama hız ( $\mu\text{m s}^{-1}$ );
- 4) VSL, doğrusal hareket hız ( $\mu\text{m s}^{-1}$ );
- 5) LIN, lineerlik ( $VSL/VCL \times 100$ );
- 6) STR, doğrusallık ( $VSL/VAP \times 100$ );
- 7) ALH, yatay yer değiştirme
- 8) BCF, sperm vuruş frekansı (Hz).

Motilitesi (>%70) yüksek olan sperm sulandırılmak için ayrılmıştır.



Şekil 2.6. SCA cihazıyla spermatolojik özelliklerin belirlenmesi

### 2.3. Sperm Kriyoprezervasyonu ve Antioksidanların Kullanılması

Sağımdan sonra elde edilen ve bütün spermatolojik özellikleri değerlendirilen sperma için ana sulandırıcı hazırlanmıştır. Standart sulandırıcıda kullanılan kimyasal malzemeler 0,0001 hassasiyetli terazi (Kern Ple 310-3N) ile tartılmıştır (Şekil 2.7).

#### Standart Sulandırıcı

NaCl	6,52 mg/ml
NaHCO <sub>3</sub>	2 mg/ml
KCl	0.8 mg/ml
Glukoz	2 mg/ml
BSA	4 mg/ml
Yumurta sarısı	%7,5
DMSO	%10

Sperma kriyoprezervasyonunda kullanılan farklı antioksidan ilaveleri ile elde edilen sulandırıcı kombinasyonları Tablo 2.1’de verilmiştir.

**Tablo 2.1.** Farklı antioksidan ilaveleri ile elde edilen sulandırıcı kombinasyonları

<b>1.sulandırıcı (Standart sulandırıcı)</b>	<b>2.sulandırıcı</b>
103 mmol/l NaCl	103 mmol/l NaCl
40 mmol/l KCl	40 mmol/l KCl
NaHCO <sub>3</sub>	NaHCO <sub>3</sub>
% 1.5 (w/v) bovine serum albumin (BSA)	% 1.5 (w/v) bovine serum albumin (BSA)
%7,5 (v/v) yumurta sarısı	%7,5 (v/v) yumurta sarısı
glukoz	glukoz
DMSO (% 10)	DMSO (% 10)
	Katalaz (250 U/l)
<b>3.sulandırıcı</b>	<b>4.sulandırıcı</b>
103 mmol/l NaCl	103 mmol/l NaCl
40 mmol/l KCl	40 mmol/l KCl
NaHCO <sub>3</sub>	NaHCO <sub>3</sub>
% 1.5 (w/v) bovine serum albumin (BSA)	% 1.5 (w/v) bovine serum albumin (BSA)
%7,5 (v/v) yumurta sarısı	%7,5 (v/v) yumurta sarısı
glukoz	glukoz
DMSO (% 10)	DMSO (% 10)
superoksit dismutaz (250 U/l)	Peroksidaz (250 U/l)
<b>5.sulandırıcı</b>	<b>6.sulandırıcı</b>
103 mmol/l NaCl	103 mmol/l NaCl
40 mmol/l KCl	40 mmol/l KCl
NaHCO <sub>3</sub>	NaHCO <sub>3</sub>
% 1.5 (w/v) bovine serum albumin (BSA)	% 1.5 (w/v) bovine serum albumin (BSA)
%7,5 (v/v) yumurta sarısı	%7,5 (v/v) yumurta sarısı
glukoz	glukoz
DMSO (% 10)	DMSO (% 10)
(-)-Glutatyon oksidaz (1.5 mmol/l)	L-Metiyonin (1.5 mmol/l)
<b>7.sulandırıcı</b>	<b>8.sulandırıcı</b>
103 mmol/l NaCl	103 mmol/l NaCl
40 mmol/l KCl	40 mmol/l KCl
NaHCO <sub>3</sub>	NaHCO <sub>3</sub>
% 1.5 (w/v) bovine serum albumin (BSA)	% 1.5 (w/v) bovine serum albumin (BSA)
%7,5 (v/v) yumurta sarısı	%7,5 (v/v) yumurta sarısı
glukoz	glukoz
DMSO (% 10)	DMSO (% 10)
Askorbik asit (0.5 mmol/l)	L-Karnitin (0.5 mmol/l)
<b>9.sulandırıcı</b>	<b>10.sulandırıcı</b>
103 mmol/l NaCl	103 mmol/l NaCl
40 mmol/l KCl	40 mmol/l KCl
NaHCO <sub>3</sub>	NaHCO <sub>3</sub>
% 1.5 (w/v) bovine serum albumin (BSA)	% 1.5 (w/v) bovine serum albumin (BSA)
%7,5 (v/v) yumurta sarısı	%7,5 (v/v) yumurta sarısı
glukoz	glukoz
DMSO (% 10)	DMSO (% 10)
B-Karoten (0.5mmol/l)	(±)-α-Tokoferol (2.0 mmol/l)
<b>11.sulandırıcı</b>	<b>12.sulandırıcı</b>
103 mmol/l NaCl	103 mmol/l NaCl
40 mmol/l KCl	40 mmol/l KCl
NaHCO <sub>3</sub>	NaHCO <sub>3</sub>
% 1.5 (w/v) bovine serum albumin (BSA)	% 1.5 (w/v) bovine serum albumin (BSA)
%7,5 (v/v) yumurta sarısı	%7,5 (v/v) yumurta sarısı
glukoz	glukoz
DMSO (% 10)	DMSO (% 10)
Ürik asit (0.25 mmol/l)	L-Glutatyon reduktaz (1.5 mmol/l)





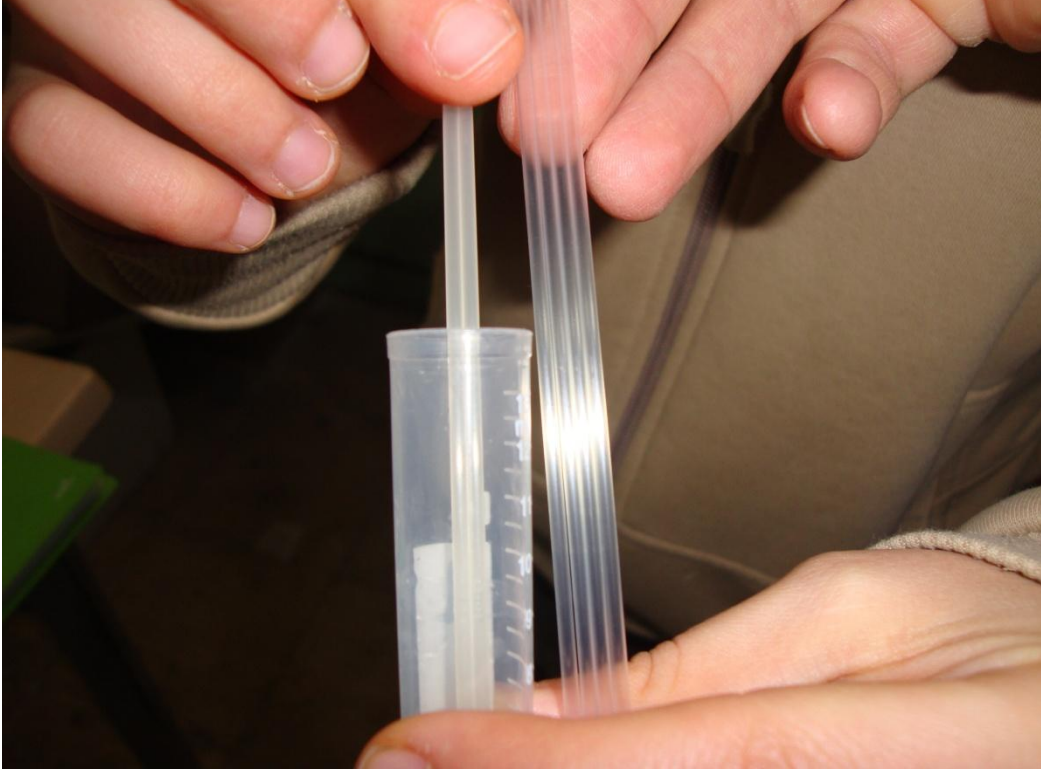
Şekil 2.7. Sulandırıcının hazırlanmasında tartım işlemi

Çalışmada kullanılacak spermalar 12 eşit kısma bölündükten sonra hazırlanmış sulandırıcılarla 1:10 oranında sulandırılmıştır (Şekil 2.8). Sulandırma işlemi yapılırken sulandırıcı ile spermaların ısılarının aynı olmasına dikkat edilmiş, sulandırıcı spermaya kademeli olarak eklenmiştir.



Şekil 2.8. Spermaların sulandırılması

Sulandırılmış sperma 0,25 ml'lik payetlere çekilmiştir (Şekil 2.9) ve payetlerin açık olan uçları Polivinil alkol ile kapatılmıştır. Sulandırılma işleminden sonra spermalar payetlere çekilmiş, payetlerin açık uçları kapatılmış ve hemen soğuk suya atılarak Polivinil alkol'ün sertleşmesi sağlanarak kapatma işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.10).

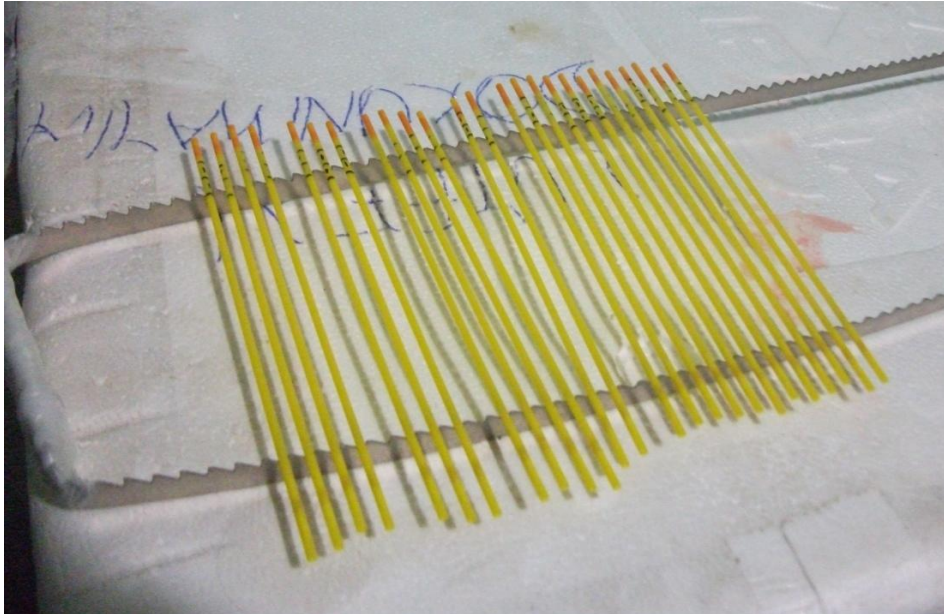


Şekil 2.9. Spermanın payetlere çekilmesi



**Şekil 2.10.** Payetlerin polivinil alkol ile kapanması

Bu işlemi takiben dondurma işlemine geçilmiştir. Payetler çelik levha üzerine yerleştirilmiş (Şekil 2.11) ve strafora sıvı azot koyulmuştur (Şekil 2.12).



**Şekil 2.11.** Payetler çelik levha üzerine yerleştirilmesi

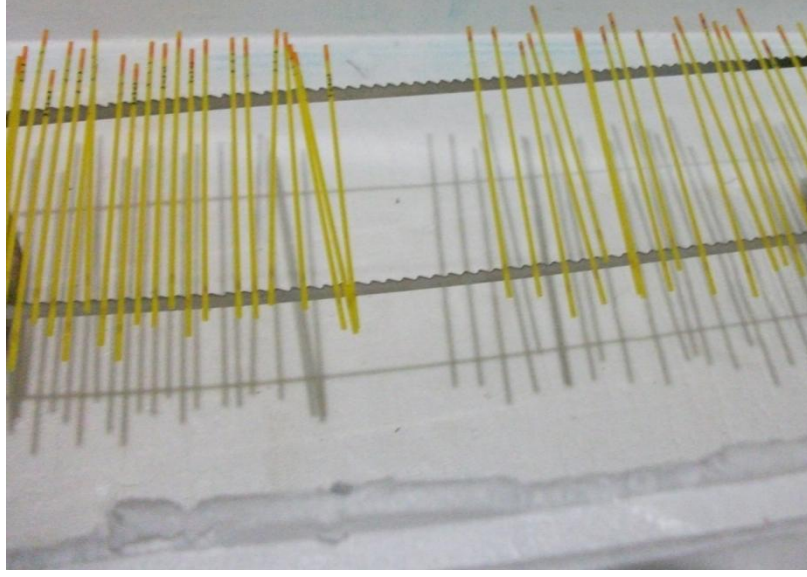




**Şekil 2.12.** Strafora sıvı azot dökülmesi

Daha sonra delikli paslanmaz çelik levha üstüne yerleştirilmiş payetler sıvı Azot buharının 3 cm üzerinde 10 dakika tutulmuştur (Şekil 2.13). Bu işlemden hemen sonra payetler sıvı azot içerisine konarak dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra payetler konteynırlara yerleştirilmiş ve dondurulan payetler belli süreler sonunda (1., 3. ve 6 ay sonunda) 40°C’de 5 saniye su banyosunda çözdürülmüş ve spermatolojik özellikleri incelenmiştir.





**Şekil 2.13.** Payetlerin sıvı azot buharında tutulması

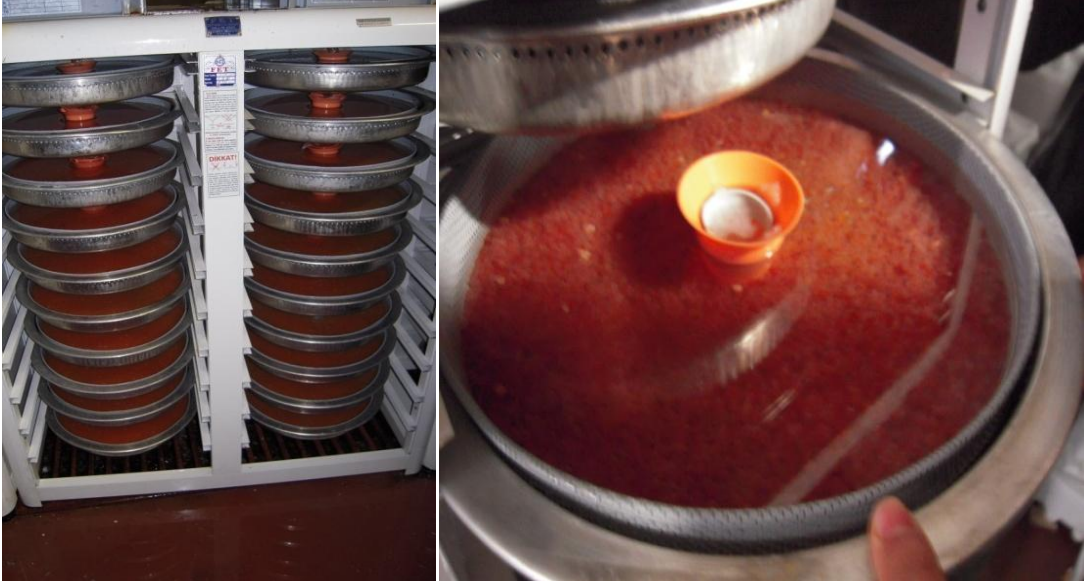
#### **2.4. Döllenme Oranı ve Açılma Oranının İzlenmesi**

Fertilizasyon denemeleri için 2,5 yaş ve üzerindeki anaçlardan yumurta sağımı yapılmıştır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Anaçlardan yumurta sağımı

Yumurta olgun balıklardan toplandıktan sonra payetlerdeki çözülmüş sperma her birinde 100 yumurta olan gruplara dökülmüştür. Yumurtaların döllenmesinde %70 motiliteye sahip olan spermalar kullanılmıştır. Çözdürülmüş sperma hemen yumurtaların üzerine dökülmüştür. Döllenme başarısı üzerinde farklı protokollerin etkisini belirlemek için düşük yumurta-sperma oranı uygulanmıştır. Sperma 20-30 saniye karıştırılmış, 2-3 dakika sonra, kuluçkada kullanılan sudan yaklaşık 50 mL eklenmiş ve sonra yumurtalar birkaç kez yıkanmış, 45-60 dakika sonra şişme sağlanmış. Yumurtalar kuluçka dolabına yerleştirilmiş ve 8-10°C'de inkübe edilmiştir (Şekil 2.15). Ölü yumurtalar düzenli aralıklarla uzaklaştırılmıştır. Döllenme oranı ve açılma oranları belirlenmiştir.



Şekil 2.15. Kuluçka dolabına yerleştirilen döllenmiş yumurtalar

## 2.5. Veri Analizi

Sperma motilite özellikleri üzerinde farklı kriyoprezervasyon protokolleri arasındaki farklılıkların analizinde four-factor ANOVA uygulanmıştır. Motilite, döllenme oranı, açılma oranı arasındaki varyasyonlarda üç yönlü tekrarlı ANOVA, taze sperma ve kriyoprezervasyon uygulanmış sperma arasında motilite özellikleri arasındaki farklılıkların belirlenmesinde tek yönlü tekrarlı ANOVA ve Duncan testi uygulanmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Spermatolojik Muayene Bulguları

Yapılan çalışmada gökkuşuğu alabalığından (n=18) elde edilen ejakulatlarda başlıca spermatolojik özelliklerden sperma miktarı, spermatozoa motilitesi, sperma pH'sı ve sperma rengi tespit edilmiştir. Taze spermada bulunan spermatolojik özelliklere ait veriler ortalama değer olarak Tablo 3.1'de verilmiştir. Alınan tüm sperma örneklerinde renk beyaz-krem olarak, pH'sı ortalama ( $\pm$ S.D).  $7,5\pm 0,00$  olarak belirlenmiştir.

**Tablo 3.1.** Gökkuşuğu alabalığında spermatolojik muayene bulguları

Örnek	Sperm miktarı (cc)	Renk	Kıvam	Motilite (%)	pH
1	32,5	Beyaz-Krem	Yoğun	70	7,5
2	12,5	Beyaz-Krem	Yoğun	80	7,5
3	10	Beyaz-Krem	Yoğun	90	7,5
4	30	Beyaz-Krem	Yoğun	90	7,5
5	28	Beyaz-Krem	Yoğun	70	7,5
6	18	Beyaz-Krem	Yoğun	75	7,5
7	17	Beyaz-Krem	Yoğun	90	7,5
8	10	Beyaz-Krem	Yoğun	65	7,5
9	15	Beyaz-Krem	Yoğun	70	7,5
10	10	Beyaz-Krem	Yoğun	70	7,5
11	7,5	Beyaz-Krem	Yoğun	90	7,5
12	25	Beyaz-Krem	Yoğun	80	7,5
13	12	Beyaz-Krem	Yoğun	90	7,5
14	12,5	Beyaz-Krem	Yoğun	85	7,5
15	11	Beyaz-Krem	Yoğun	90	7,5
16	20	Beyaz-Krem	Yoğun	90	7,5
17	10	Beyaz-Krem	Yoğun	80	7,5
18	10	Beyaz-Krem	Yoğun	90	7,5

#### 3.2. Spermanın Dondurulması ile İlgili Bulgular

Spermanın dondurulmasında 18 adet damızlık gökkuşuğu alabalığı kullanılmıştır. Rastgele olarak seçilmiş alabalıklardan abdominal masaj yöntemi ile sperma alınmıştır. Alınan örneklerden spermatolojik muayeneler yapıldıktan hemen sonra daha önce materyal ve metod kısmında da belirtilen oniki farklı sulandırıcı (katalaz, superoksit dismutaz, peroksidaz, okside glutatyon, redukte glutatyon, L-methiyonin, ürik asit, L-askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten ve karnitin) ile sulandırılmış ve sonra dondurma işlemine geçilmiştir.

### 3.2.1. Sulandırma Sonrası Elde Edilen Bulgular

Taze spermadan SCA cihazıyla elde edilen sperma kalite parametreleri 3.2’de verilmiştir.

**Tablo 3.2.** Taze sperma kalite parametreleri

Parametreler	Taze sperm (n=18)
Eğrisel hareket hızı (VCL) ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	76,44±19,53
Doğrusal hareket hızı (VCL) ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	28,8±10,00
Ortalama hız (VAP) ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	46,92±12,68
Lineerlik (LIN)	37,94±9,92
Doğrusallık (STR)	60,76±7,36
Yatay yer değiştirme (ALH)	3,14±0,93
Sperma vuruş frekansı (BCF) (Hz)	6,54±1,40

1., 3. ve 6. ay sonunda payetler çözdürülmüştür. Tespit edilen sperma motilite değerleri Tablo 3.3’te verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, çözüm sonrası elde edilen bulgularda spermatozoa motilitesi gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Çözdürme sonucunda en yüksek motilite L-metiyonin ve ürik asit ilave edilen gruptan elde edilmiştir. 1., 3. ve 6. ay sonunda çözüm sonrasında elde edilen bulgularda süreye bağlı olarak motilitenin düştüğü, farkın istatistiki olarak önemli olduğu belirlenmiştir ( $P<0,05$ ). Ancak, glutatyon oksidaz, katalaz ve peroksidaz eklenen gruplarda süreye bağlı olarak motilite düşerken, gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmamıştır.

**Tablo 3.3.** 1., 3. ve 6. ay sonunda motilite değerleri (%)

Sulandırıcı Grupları	1. ay	3. ay	6. ay	F değeri	P değeri
Standart sulandırıcı	34,00±2,65 <sup>a,x</sup>	33,00±2,12 <sup>a,x</sup>	29,00±2,54 <sup>a,x</sup>	0,0814	0,92
L-Glutatyon reduktaz	45,00±7,02 <sup>b,x</sup>	41,00±5,15 <sup>b,y</sup>	40,00±6,14 <sup>b,y</sup>	0,6958	0,53
(-)-Glutatyon oksidaz	33,00±4,73 <sup>c,x</sup>	29,00±4,25 <sup>c,x</sup>	27,00±4,62 <sup>c,x</sup>	2,2750	0,27
L-askorbik asit	35,00±3,00 <sup>d,x</sup>	34,00±2,79 <sup>d,x</sup>	30,00±2,54 <sup>d,y</sup>	0,0857	0,81
L-metiyonin	69,00±1,53 <sup>a,x</sup>	62,00±1,46 <sup>a,y</sup>	60,00±1,62 <sup>a,y</sup>	0,1304	0,98
(±)- $\alpha$ -tokoferol	58,00±3,06 <sup>a,x</sup>	51,00±3,01 <sup>a,y</sup>	49,00±3,12 <sup>a,y</sup>	0,7129	0,54
Ürik asit	69,00±4,00 <sup>bc,x</sup>	61,00±3,59 <sup>bc,y</sup>	55,00±3,46 <sup>bc,z</sup>	0,2592	0,66
L-karnitin	61,00±4,73 <sup>e,x</sup>	55,00±4,02 <sup>e,y</sup>	53,00±4,56 <sup>e,y</sup>	2,3041	0,18
$\beta$ -karoten	33,00±4,16 <sup>bc,x</sup>	25,00±4,11 <sup>bc,y</sup>	22,00±4,32 <sup>bc,y</sup>	0,6956	0,53
Superoksit dismutaz	63,00±5,69 <sup>ad,x</sup>	59,00±5,14 <sup>ad,y</sup>	55,00±5,36 <sup>ad,z</sup>	0,9032	0,35
Peroksidaz	25,00±2,65 <sup>f,x</sup>	22,00±2,14 <sup>f,x</sup>	19,00±2,37 <sup>f,x</sup>	4,3142	0,06
Katalaz	32,00±2,65 <sup>a,x</sup>	31,00±2,56 <sup>a,x</sup>	29,00±2,48 <sup>a,x</sup>	0,7056	0,53
Fdeğeri	49,54	45,52	40,36		
P değeri	0,00	0,00	0,00		

<sup>a, b, c, d, e</sup> Sulandırıcılar arasındaki farklılıkları göstermektedir.

<sup>x, y, z</sup> Süreler arasındaki farklılıkları göstermektedir.

1., 3. ve 6. ay sonunda payetler çözdürülerek belirlenen sperma motilite süreleri Tablo 3.4'te verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, çözüm sonrası elde edilen bulgularda spermatozoa motilite süresi gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $P < 0,05$ ). Çözdürme sonucunda en yüksek motilite süresi ( $\pm$ )- $\alpha$ -tokoferol ve ürik asit ilave edilen gruptan elde edilmiştir. 1., 3. ve 6. ay sonunda çözüm sonrasında elde edilen bulgularda süreye bağlı olarak motilite süresinin düştüğü, farkın istatistiki olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

**Tablo 3.4.** 1., 3. ve 6. ay sonunda motilite süreleri (sn)

Sulandırıcı Grupları	1. ay	3. ay	6. ay	F değeri	P değeri
Standart sulandırıcı	19,00±1,00 <sup>a,x</sup>	18,00±0,98 <sup>a,x</sup>	17,00±1,03 <sup>a,x</sup>	0,0714	0,93
L-Glutatyon reduktaz	22,00±1,00 <sup>b,x</sup>	21,00±1,02 <sup>b,x</sup>	20,00±1,01 <sup>b,x</sup>	0,7058	0,53
(-)-Glutatyon oksidaz	13,00±1,53 <sup>c,x</sup>	12,00±1,21 <sup>c,x</sup>	10,00±1,36 <sup>c,x</sup>	2,3750	0,17
L-askorbik asit	13,00±1,73 <sup>a,x</sup>	13,00±1,68 <sup>a,x</sup>	10,00±1,65 <sup>a,x</sup>	0,0857	0,91
L-metiyonin	25,00±2,00 <sup>a,x</sup>	23,00±1,98 <sup>a,x</sup>	21,00±2,06 <sup>a,x</sup>	0,1304	0,88
(±)- $\alpha$ -tokoferol	28,00±1,53 <sup>d,x</sup>	27,00±1,45 <sup>d,x</sup>	25,00±1,41 <sup>d,x</sup>	0,6129	0,57
Ürik asit	32,00±2,08 <sup>e,x</sup>	29,00±2,01 <sup>e,x</sup>	28,00±2,07 <sup>e,x</sup>	0,2592	0,77
L-karnitin	19,00±1,53 <sup>e,x</sup>	17,00±1,50 <sup>e,x</sup>	16,00±1,47 <sup>e,x</sup>	2,2941	0,18
$\beta$ -karoten	18,00±1,53 <sup>a,x</sup>	16,00±1,48 <sup>a,x</sup>	15,00±1,55 <sup>a,x</sup>	0,6956	0,53
Superoksit dismutaz	22,00±1,15 <sup>a,x</sup>	20,00±1,03 <sup>a,x</sup>	20,00±1,08 <sup>a,x</sup>	0,9032	0,45
Peroksidaz	17,00±1,00 <sup>e,x</sup>	16,00±0,95 <sup>e,x</sup>	15,00±1,05 <sup>e,x</sup>	3,2142	0,07
Katalaz	17,00±1,15 <sup>d,x</sup>	15,00±1,12 <sup>d,x</sup>	15,00±1,16 <sup>d,x</sup>	0,6956	0,53
F değeri	40,90	41,35	41,24		
P değeri	0,00	0,00	0,00		

<sup>a, b, c, d, e</sup> Sulandırıcılar arasındaki farklılıkları göstermektedir.

<sup>x, y, z</sup> Süreler arasındaki farklılıkları göstermektedir.

1., 3. ve 6. ay sonunda payetler çözdürülerek sperma kalite parametreleri SCA cihazı ile belirlenmiştir (Tablo 3.5, 3.6 ve 3.7). Çözüm sonrasında elde edilen bulgularda sperma parametreleri açısından sulandırıcılar arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu ve zamana bağlı olarak motilite sürelerinde düşüşlerin meydana geldiği belirlenmiştir.

**Tablo 3.5.** 1.ay sonunda belirlenen sperma kalite parametreleri

Sulandırıcı Grupları	Eğrisel hareket hızı (VCL)	Doğrusal hareket hızı (VSL)	Ortalama hız (VAP)	Lineerlik (LIN)	Doğrusallık (STR)	Wobble (WOB)	Yatay yer değiştirme (ALH)	Sperma vuruş frekansı (BCF)
Standart sulandırıcı	110,99±15,74 <sup>ab</sup>	71,51±13,50 <sup>ab</sup>	83,77±10,78 <sup>ab</sup>	66,54±18,35 <sup>ab</sup>	85,27±11,45 <sup>ab</sup>	77,08±14,79 <sup>abc</sup>	3,15±1,54 <sup>abc</sup>	8,37±2,38 <sup>ab</sup>
L-Glutatyon reduktaz	102,16±8,75 <sup>abc</sup>	71,06±25,05 <sup>ab</sup>	88,75±11,91 <sup>ab</sup>	69,36±23,98 <sup>bc</sup>	79,11±24,28 <sup>abc</sup>	86,89±9,18 <sup>bcd</sup>	2,72±1,12 <sup>bc</sup>	8,85±3,65 <sup>ab</sup>
(-)-Glutatyon oksidaz	113,85±7,83 <sup>a</sup>	40,35±33,12 <sup>a</sup>	77,73±13,92 <sup>ab</sup>	36,47±31,11 <sup>d</sup>	47,99±33,77 <sup>d</sup>	68,76±14,75 <sup>ae</sup>	6,13±2,31 <sup>de</sup>	6,03±1,85 <sup>ac</sup>
L-askorbik asit	85,06±12,16 <sup>c</sup>	82,07±9,87 <sup>a</sup>	84,09±10,25 <sup>a</sup>	96,49±9,45 <sup>d</sup>	97,60±6,78 <sup>d</sup>	98,86±7,03 <sup>abe</sup>	0,95±0,78 <sup>abde</sup>	2,27±1,31 <sup>d</sup>
L-metiyonin	120,53±26,00 <sup>a</sup>	51,59±23,24 <sup>a</sup>	79,62±17,78 <sup>ab</sup>	43,34±19,02 <sup>ad</sup>	63,25±21,97 <sup>abd</sup>	66,96±12,25 <sup>ae</sup>	5,73±1,73 <sup>ade</sup>	5,88±2,23 <sup>ac</sup>
(±)- $\alpha$ - tokoferol	107,07±20,39 <sup>abc</sup>	55,43±14,07 <sup>a</sup>	59,49±11,61 <sup>a</sup>	55,86±29,01 <sup>abd</sup>	92,48±4,73 <sup>c</sup>	59,37±26,98 <sup>e</sup>	3,94±2,33 <sup>bcdde</sup>	8,47±3,28 <sup>ab</sup>
Ürik asit	125,46±26,15 <sup>a</sup>	51,94±37,15 <sup>a</sup>	86,68±28,41 <sup>ab</sup>	46,38±37,35 <sup>abd</sup>	62,18±35,61 <sup>abd</sup>	70,57±27,21 <sup>ae</sup>	4,18±2,95 <sup>abde</sup>	3,21±3,88 <sup>cd</sup>
L-karnitin	115,63±13,61 <sup>a</sup>	104,20±16,14 <sup>b</sup>	107,50±7,84 <sup>bc</sup>	91,61±15,77 <sup>c</sup>	96,56±12,17 <sup>c</sup>	93,95±10,14 <sup>d</sup>	1,62±1,42 <sup>c</sup>	11,13±2,29 <sup>b</sup>
$\beta$ -karoten	106,09±13,45 <sup>abc</sup>	37,48±22,19 <sup>a</sup>	75,03±15,23 <sup>ab</sup>	35,05±19,90 <sup>d</sup>	48,84±24,86 <sup>d</sup>	70,86±12,85 <sup>ae</sup>	4,36±1,15 <sup>abde</sup>	5,99±2,98 <sup>ac</sup>
Superoksit dismutaz	191,92±46,69 <sup>d</sup>	107,95±60,64 <sup>b</sup>	136,67±49,64 <sup>c</sup>	55,78±2635 <sup>abd</sup>	74,82±23,25 <sup>abc</sup>	70,98±17,13 <sup>ae</sup>	6,49±3,16 <sup>d</sup>	6,23±3,21 <sup>ac</sup>
Peroksidaz	100,25±9,29 <sup>abc</sup>	52,12±20,48 <sup>a</sup>	77,44±14,37 <sup>ab</sup>	52,34±20,86 <sup>abd</sup>	66,25±18,96 <sup>abd</sup>	77,13±12,30 <sup>abc</sup>	3,60±1,07 <sup>bcdde</sup>	6,38±2,41 <sup>ac</sup>
Katalaz	97,19±32,05 <sup>bc</sup>	42,28±10,21 <sup>a</sup>	94,05±9,87 <sup>a</sup>	43,50±7,84 <sup>abd</sup>	44,96±8,03 <sup>cd</sup>	96,77±6,34 <sup>cd</sup>	1,49±0,38 <sup>bc</sup>	10,00±0,69 <sup>ac</sup>
F değeri	52,888	19,365	26,060	22,913	14,408	18,749	25,383	21,616
P değeri	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

<sup>a, b, c, d</sup> Sulandırıcılar arasındaki farklılıkları göstermektedir.



**Tablo 3.6.** 3.ay sonunda belirlenen sperma kalite parametreleri

Sulandırıcı Grupları	Eğrisel hareket hızı (VCL)	Doğrusal hareket hızı (VSL)	Ortalama hız (VAP)	Lineerlik (LIN)	Doğrusallık (STR)	Wobble (WOB)	Yatay yer değiştirme (ALH)	Sperma vuruş frekansı (BCF)
Standart sulandırıcı	87,71±4,61 <sup>a</sup>	83,67±10,11 <sup>a</sup>	84,71±8,45 <sup>ab</sup>	95,46±11,14 <sup>ab</sup>	98,47±4,46 <sup>a</sup>	96,63±8,96 <sup>a</sup>	0,80±0,59 <sup>ab</sup>	9,44±2,08 <sup>abc</sup>
L-Glutatyon reduktaz	85,16±3,12 <sup>b</sup>	66,54±21,70 <sup>ab</sup>	76,92±12,86 <sup>abc</sup>	77,99±25,07 <sup>abc</sup>	84,36±19,97 <sup>a</sup>	90,19±14,10 <sup>a</sup>	1,47±0,92 <sup>ab</sup>	8,80±4,18 <sup>abc</sup>
(-)-Glutatyon oksidaz	86,81±3,11 <sup>b</sup>	47,60±24,20 <sup>bcd</sup>	63,52±18,66 <sup>cde</sup>	55,36±28,68 <sup>bcd</sup>	70,99±21,82 <sup>a</sup>	73,73±23,50 <sup>bc</sup>	4,52±1,68 <sup>c</sup>	5,07±2,56 <sup>de</sup>
L-askorbik asit	71,30±13,16 <sup>c</sup>	9,47±9,87 <sup>cd</sup>	66,96±10,25 <sup>cde</sup>	13,29±7,41 <sup>cd</sup>	14,15±6,78 <sup>a</sup>	93,92±7,23 <sup>a</sup>	1,31±0,64 <sup>ab</sup>	1,00±1,17 <sup>de</sup>
L-metiyonin	85,17±2,74 <sup>b</sup>	41,16±21,31 <sup>bcd</sup>	61,12±11,82 <sup>def</sup>	48,36±24,90 <sup>ad</sup>	64,58±25,96 <sup>a</sup>	71,73±13,37 <sup>b</sup>	3,86±0,88 <sup>c</sup>	6,08±1,64 <sup>abe</sup>
(±)-α-tokoferol	72,60±0,65 <sup>a</sup>	58,03±16,34 <sup>a</sup>	59,96±16,17 <sup>c</sup>	79,81±21,89 <sup>b</sup>	96,52±1,53 <sup>a</sup>	82,47±21,62 <sup>a</sup>	1,77±1,00 <sup>d</sup>	8,89±1,42 <sup>bc</sup>
Ürik asit	93,59±3,54 <sup>a</sup>	33,50±11,70 <sup>c</sup>	48,54±12,39 <sup>f</sup>	35,58±11,15 <sup>d</sup>	68,17±6,69 <sup>a</sup>	51,65±11,28 <sup>d</sup>	4,26±0,02 <sup>c</sup>	11,42±0,80 <sup>c</sup>
L-karnitin	94,39±3,01 <sup>a</sup>	86,07±15,79 <sup>a</sup>	90,85±4,68 <sup>c</sup>	91,09±16,30 <sup>ab</sup>	94,26±15,09 <sup>a</sup>	96,24±3,78 <sup>a</sup>	1,20±0,46 <sup>ab</sup>	9,98±2,12 <sup>c</sup>
β-karoten	83,28±2,35 <sup>b</sup>	29,11±19,66 <sup>c</sup>	57,05±12,36 <sup>ef</sup>	35,18±24,05 <sup>d</sup>	48,55±26,28 <sup>a</sup>	68,52±14,75 <sup>b</sup>	3,52±0,93 <sup>c</sup>	5,59±3,11 <sup>be</sup>
Superoksit dismutaz	84,27±1,74 <sup>b</sup>	65,17±10,42 <sup>ab</sup>	75,78±7,10 <sup>bc</sup>	77,43±12,86 <sup>abc</sup>	86,49±14,04 <sup>a</sup>	89,84±7,11 <sup>a</sup>	1,70±0,67 <sup>bc</sup>	3,63±1,24 <sup>de</sup>
Peroksidaz	83,80±2,75 <sup>b</sup>	59,33±17,16 <sup>bc</sup>	73,42±9,79 <sup>abc</sup>	70,94±20,85 <sup>abc</sup>	80,34±18,33 <sup>a</sup>	87,77±12,31 <sup>ac</sup>	1,94±0,73 <sup>b</sup>	5,15±2,27 <sup>de</sup>
Katalaz	70,94±12,07 <sup>d</sup>	10,54±10,01 <sup>e</sup>	51,15±9,87 <sup>g</sup>	0,1485±8,83 <sup>e</sup>	20,60±8,03 <sup>b</sup>	72,10±0,35 <sup>a</sup>	4,29±5,16 <sup>bc</sup>	10,29±0,59 <sup>abe</sup>
F değeri	259,198	14,329	23,507	15,560	14,281	9,568	25,264	7,495
P değeri	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

a, b, c, d, e, f, g Sulandırıcılar arasındaki farklılıkları göstermektedir.

**Tablo 3.7.** 6.ay sonunda belirlenen sperma kalite parametreleri

Sulandırıcı Grupları	Eğrisel hareket hızı (VCL)	Doğrusal hareket hızı (VSL)	Ortalama hız (VAP)	Lineerlik (LIN)	Doğrusallık (STR)	Wobble (WOB)	Yatay yer değiştirme (ALH)	Sperma vuruş frekansı (BCF)
Standart sulandırıcı	75,96±3,13 <sup>a</sup>	73,87±4,53 <sup>a</sup>	74,48±3,87 <sup>a</sup>	97,30±5,17 <sup>a</sup>	99,15±1,64 <sup>a</sup>	98,07±3,76 <sup>a</sup>	0,70±0,32 <sup>a</sup>	9,63±1,82 <sup>ab</sup>
L-Glutatyon reduktaz	74,37±2,75 <sup>ab</sup>	63,33±16,01 <sup>a</sup>	68,56±9,25 <sup>ab</sup>	85,05±21,08 <sup>a</sup>	91,06±16,66 <sup>ab</sup>	92,11±11,55 <sup>abc</sup>	1,37±0,69 <sup>ab</sup>	10,64±3,16 <sup>b</sup>
(-)-Glutatyon oksidaz	74,79±2,34 <sup>ab</sup>	29,77±10,47 <sup>b</sup>	48,22±6,38 <sup>c</sup>	40,17±15,11 <sup>b</sup>	61,07±18,41 <sup>c</sup>	64,68±10,02 <sup>d</sup>	3,98±0,96 <sup>e</sup>	5,29±2,23 <sup>cd</sup>
L-askorbik asit	70,38±13,16 <sup>ab</sup>	23,96±10,25 <sup>b</sup>	58,66±7,41 <sup>ab</sup>	34,04±6,78 <sup>b</sup>	40,84±7,23 <sup>c</sup>	83,35±0,64 <sup>abc</sup>	2,74±1,17 <sup>abc</sup>	2,00±9,87 <sup>e</sup>
L-metiyonin	75,02±2,65 <sup>ab</sup>	42,73±17,64 <sup>bc</sup>	57,62±9,94 <sup>bcde</sup>	56,92±23,47 <sup>b</sup>	71,97±20,87 <sup>bc</sup>	76,83±13,16 <sup>bd</sup>	2,84±0,88 <sup>d</sup>	6,39±1,56 <sup>cd</sup>
(±)- $\alpha$ -tokoferol	70,60±0,15 <sup>b</sup>	62,90±8,31 <sup>a</sup>	63,58±7,84 <sup>abde</sup>	89,11±11,96 <sup>a</sup>	98,85±0,92 <sup>a</sup>	90,08±11,29 <sup>abc</sup>	1,41±0,87 <sup>ab</sup>	10,47±2,50 <sup>b</sup>
Ürik asit	84,25±5,27 <sup>c</sup>	39,53±24,72 <sup>b</sup>	53,67±24,22 <sup>bcd</sup>	46,69±29,44 <sup>b</sup>	69,54±16,76 <sup>bc</sup>	63,67±28,90 <sup>d</sup>	3,16±1,49 <sup>de</sup>	6,10±4,72 <sup>cd</sup>
L-karnitin	81,2±5,8 <sup>cd</sup>	69,5±19,3 <sup>a</sup>	75,7±9,0 <sup>a</sup>	85,58±22,62 <sup>a</sup>	90,84±20,22 <sup>ab</sup>	93,21±8,30 <sup>abc</sup>	1,36±1,08 <sup>ab</sup>	7,52±2,77 <sup>ad</sup>
$\beta$ -karoten	74,75±3,05 <sup>ab</sup>	25,74±12,77 <sup>b</sup>	51,23±9,05 <sup>bc</sup>	34,35±16,83 <sup>b</sup>	49,32±20,76 <sup>c</sup>	68,50±11,54 <sup>d</sup>	3,17±0,60 <sup>de</sup>	7,14±2,22 <sup>ad</sup>
Superoksit dismutaz	74,61±3,07 <sup>ab</sup>	35,34±29,30 <sup>b</sup>	57,62±9,53 <sup>bcde</sup>	48,29±40,00 <sup>b</sup>	60,00±49,43 <sup>c</sup>	77,27±12,80 <sup>bcd</sup>	2,18±0,98 <sup>bcd</sup>	3,60±2,00 <sup>ce</sup>
Peroksidaz	73,30±2,38 <sup>ab</sup>	60,79±15,45 <sup>ac</sup>	65,72±9,34 <sup>ab</sup>	83,04±21,29 <sup>a</sup>	91,16±15,32 <sup>ab</sup>	89,74±12,92 <sup>abc</sup>	1,41±0,84 <sup>ab</sup>	5,71±1,87 <sup>cd</sup>
Katalaz	63,80±26,15 <sup>bc</sup>	63,12±8,46 <sup>b</sup>	63,50±12,39 <sup>ab</sup>	98,93±8,16 <sup>b</sup>	99,40±5,98 <sup>c</sup>	99,53±7,41 <sup>abc</sup>	1,82±0,49 <sup>cd</sup>	8,00±0,75 <sup>cd</sup>
F değeri	6,636	15,277	11,641	15,441	12,667	12,265	20,039	12,420
P değeri	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

a, b, c, d, e Sulandırıcılar arasındaki farklılıkları göstermektedir.

### **3.2.2. Döllenme Oranı ve Açılma Oranının Belirlenmesi**

Yapılan bu çalışmada aynı zamanda antioksidanların dölemeye etkisi de araştırılmıştır. Kontrol grubundaki döllenme oranı  $91,7 \pm 1,4$ , açılma oranı ise  $87,4 \pm 1,7$  olarak belirlenmiştir. 1., 3. ve 6. ay sonundaki döllenme ve açılma oranları Tablo 3.8’de verilmiştir. Elde edilen bulgularda en yüksek döllenme ve açılma oranı L-karnitin ilave edilen sulandırıcı grubunda olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan ilave edilen gruplarda döllenme ve açılma oranı standart sulandırıcıya oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 1., 3. ve 6. ay sonunda çözüm sonrasında elde edilen bulgularda süreye bağlı olarak döllenme ve açılma oranının düştüğü, ancak farkın istatistiki olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

**Tablo 3.8.** 1., 3. ve 6. ay sonundaki dölllenme ve açılma oranları

Sulandırıcı Grupları	Dölllenme oranı (%)			Açılma oranı (%)		
	1. ay	3. ay	6. ay	1. ay	3. ay	6. ay
Standart sulandırıcı	86,71±2,11	84,02±2,11	82,19±2,51	76,75±2,16	74,02±2,12	72,19±2,45
L-Glutatyon reduktaz	87,26±2,05	85,14±2,05	84,76±2,15	77,62±2,45	75,14±2,45	74,76±2,55
(-)-Glutatyon oksidaz	88,16±2,15	86,21±2,34	84,27±2,26	78,66±2,19	76,21±2,54	74,27±2,97
L-askorbik asit	77,23±8,71	75,43±6,17	73,31±5,21	67,63±4,70	65,43±5,16	63,31±6,23
L-metiyonin	89,56±4,21	87,36±3,26	85,49±4,25	79,54±4,05	77,36±2,29	75,49±4,17
(±)-α-tokoferol	88,72±3,36	86,12±3,19	84,32±2,96	78,27±5,16	76,12±2,19	74,32±2,96
Ürik asit	88,01±4,25	85,28±4,17	84,13±4,35	78,11±4,65	75,28±4,24	74,13±4,36
L-karnitin	90,01±3,14	88,36±3,26	86,12±3,04	80,07±3,35	78,36±4,16	76,12±3,02
β-karoten	87,44±5,68	85,05±3,27	83,36±1,68	77,34±3,69	75,05±3,64	73,36±1,68
Superoksit dismutaz	89,23±3,49	87,14±2,49	85,53±3,24	79,25±3,51	77,14±2,45	75,53±3,01
Peroksidaz	88,61±5,42	86,37±3,29	84,29±4,46	78,16±5,22	76,37±3,18	74,29±4,27
Katalaz	87,12±2,16	86,03±2,15	85,25±2,06	77,32±3,36	76,03±2,03	75,25±2,65

#### 4. TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada 2 yaş ve üzerindeki 18 adet rastgele seçilmiş erkek alabalıktan abdominal masaj yöntemiyle alınan spermalarda sperma miktarı (ml), spermatozoa motilitesi (%), spermatozoa yoğunluğu ( $\times 10^9$  spp/ml), pH ve sperma rengi değerleri saptanmıştır. Çalışmada yukarıda belirtilen spermatolojik parametreler sırasıyla;  $16,17 \pm 7,79$ ,  $81,39 \pm 1,04$ ,  $18,48 \pm 6,37$ ,  $7,5 \pm 0,00$  olarak tespit edilirken, 18 ejakulatta sperma rengi gözle belirlenmiş ve anormal bir renge rastlanılmamıştır. Sperma rengi tüm ejakulatlarda beyaz-krem olarak tespit edilmiştir.

Çalışmada anaçlar 2-Fenoksietanol kullanılarak anestezi ile bayıltılmış ve “Abdominal Masaj Yöntemi” ile sağım yapılarak spermalar alınmıştır. Baynes ve Scott (1987), gökkuşağı alabalığı spermalarının dondurulması ve çözüm sonu fertilité üzerine sperma kalitesi, yumurta kalitesi ve sulandırıcı kompozisyonunun etkisini inceledikleri çalışmalarında spermayı anestezi uygulayarak (2-Fenoksietanol, 1:1000) abdominal masaj yöntemi ile almışlardır.

Yapılan çalışmada motilite süreleri; aktivasyon anındaki hızın korunduğu süre ve tüm hareketin bittiği süre (motilite süresi) olarak belirlenmiştir. Salmonlarda yapılan çalışmalarda sperma motilite sürelerinin 1–2 dakika arasında değiştiği bilinmektedir (Bromage vd., 1992; Rainis vd., 2005; Bozkurt ve Secer, 2006). Yapılan bu çalışmada sağımlarda motilite süresi  $39,00 \pm 3,00$  olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında motilite değerinin düşük olduğu belirlenmiştir. Literatür bulguları ile yapılan araştırmada saptanan bulgular arasında gözlemlenen farklılıklar kullanılan materyalin rastgele seçilmiş olmasından, çevresel faktörlerden ve işletme suyunun özellikleri ile besleme rejiminden kaynaklanabileceği gibi, kullanılan sperma sulandırıcıları ile sulandırıcıların içerdiği kriyoprotektanların miktar ve oranlarının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Bunların yanısıra spermanın sulandırılmasında ve muhafazasında kullanılan yöntemlerin de bu farklılıkların ortaya çıkmasında etkili olabileceği düşünülmektedir.

Ciereszko vd. (2010) yaptıkları çalışmada Salmonid spermalarının geniş pH aralığında (5–10,5) motil olabildiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada spermanın pH'sı  $7,5 \pm 0,00$  olarak belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen sperma miktarı ( $16,17 \pm 7,79$  ml) bazı araştırmacıların (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1984; Gjerde, 1984; Geffen ve Evans, 2000; Çevik, 2000) bulguları ile benzerlik gösterirken bazı araştırmacıların (Munkittrick ve Moccia, 1984; Munkittrick ve Moccia, 1987; Schmidt-Baulain ve Holtz, 1989; Lahnsteiner vd., 1993;

Bozkurt, 2006) bulguları ile farklılık göstermiştir. Lahnsteiner vd. (1993), gökkuşağı alabalığı spermatozoasının enerji gereksinimi üzerinde yaptıkları çalışmada masaj yöntemiyle sezon ortasında bir kez aldıkları spermada miktarı 1,5-4,5 ml olarak tespit etmişlerdir. Büyükhatoğlu ve Holtz (1984), gökkuşağı alabalığında sperma verimi üzerine sağımlar aralıkları, sağımlar zamanı, yaş ve dişi balık varlığının etkisini inceledikleri çalışmalarında sperma miktarını sezon başı, ortası ve sonunda aldıkları spermalara göre karşılaştırmışlar ve sırasıyla 24,6 ml; 13,4 ml; 8,9 ml olarak tespit etmişlerdir. Munkittrick ve Moccia (1987) gökkuşağı alabalığı spermasındaki mevsimsel değişimleri inceledikleri çalışmalarında masaj yoluyla Şubat, Mart ve Nisan aylarında aldıkları sperma miktarlarını sırasıyla  $7,2\pm 1,1$ ;  $7,0\pm 1,0$  ve  $4,7\pm 1,0$  olarak tespit etmişlerdir. Gjerde (1984) gökkuşağı alabalığının sperma verimindeki değişimleri incelediği çalışmasında ortalama sperma miktarı ve vücut ağırlığına oranını 5 ml/kg vücut ağırlığı olarak tesbit etmiştir. Ayrıca bir haftalık aralıklarla 3 kez yaptığı sağımlarda ortalama sperma miktarını sırasıyla  $10,2\pm 6,3$ ;  $6,9\pm 5,4$ ;  $5,8\pm 4,6$  olarak saptamıştır. Yapılan çalışmada bireyin vücut ağırlığı ve vücut uzunluğu ile sperma verimi arasında pozitif bir ilişkinin var olduğunu da belirlemiştir. Munkittrick ve Moccia (1984), Salmonid spermasının dondurulması ve döllemede kullanılması üzerine yaptıkları çalışmada bildirdiklerine göre olgun bir gökkuşağı alabalığı anaçlarından her 3-7 gün aralıklarla yapılan sağımlarda 2-10 ml civarında edilebildiğini bildirmektedirler. Ayrıca bu araştırmacıların bildirdiğine göre bu aşamada uygulanan anestezi özellikle MS-222 (Tricaine methane sulphonate) uygulandığı zaman spermiasyonda önemli azalmalar olduğu kaydedilmiştir. Geffen ve Evans (2000), normal ve çift cinsiyetli gökkuşağı alabalığı erkeklerinde sperma özellikleri ve fertilizasyon başarısını inceledikleri çalışmalarında normal erkeklerde sezon boyu sperma miktarını 33-69 ml alt ve üst sınırlarda; ortalama ise  $55,3\pm 10,9$  olarak saptamışlardır. Bozkurt (2006) gökkuşağı alabalığında vücut büyüklüğünün sperma kalitesi parametreleri ve dölleme başarısı arasındaki ilişkisi ile ilgili yaptığı çalışmada sperma miktarını  $9,3\pm 3,33$  olarak belirlemiştir. Sperma miktarındaki bu farklılıkların özellikle besleme şartları, besleme metodu, işletme suyunun yapısı ve diğer çevre şartlarına bağlı olarak şekillendiği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada sperma rengi beyaz-krem ve kıvamı yoğun olarak belirlenmiştir. Sperma rengi ve kıvamı üreme mevsimine, bireysel özelliklere, besleme ve çevre şartlarına göre farklılıklar göstermektedir. Aas vd. (1991) Salmonid familyasında sperma rengi beyaz renk yanısıra nadiren soluk kırmızı ve soluk sarı renk de gösterdiğini belirtmiştir. Seçer (1998) Salmonidea familyasında spermanın, diğer birçok balık türünde olduğu gibi büyük çoğunlukla beyaz-krem renge sahip olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular

araştırmacıların bildirdikleri verilerle uygunluk göstermektedir.

Sulandırma oranı sperm dondurulmasında etkili olan faktörlerdendir ve günümüze kadar yapılan çalışmalarda farklı sulandırma oranları kullanılmıştır. Munkittrick ve Moccia (1984), Salmonid spermasının dondurulması ve döllemede kullanılması üzerine yaptıkları çalışmada bildirdiklerine göre sulandırma oranı 1:1 ile 1:19 arasında değişim gösterebilmektedir. Gökkuşuğı alabalığında yapılan araştırmaların birçoğunda sulandırma oranını 1:3 olarak uygulanmıştır (McNiven vd., 1993; Lahnsteiner vd. 1996; Cabrita vd. 2001; Tekin vd., 2003; Lahnsteiner vd., 2011). Çevik (2000) gökkuşuğı alabalığında yaptığı çalışmada spermayı 1:10 oranında sulandırmıştır. Babiak vd. (2006) Atlantik halibut türünde yaptıkları çalışmada spermanın 1:6 ve 1:10 oranında sulandırılması sonucunda spermanın yaşama süresinin arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca sulandırılmış spermadaki MOT, VCL, LIN değerlerinin sulandırılmamış spermaya oranla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Martinez-Paramo vd. (2009) kahverengi alabalık (*Salmo trutta*) spermasında yaptıkları çalışmada spermayı 1:9 oranında sulandırmışlardır. Dziejulska vd. (2011) Atlantik salmon (*Salmo salar*) spermasında yaptıkları çalışmada sulandırma oranını 1:50 olarak uygulamışlardır. Yaptıkları çalışma sonunda sulandırma oranının çözdüreme sonrası aktivasyondan sonra sperma kalite parametreleri üzerinde etkileri olduğunu bildirmişler, VCL, VAP, VSL, LIN, STR değerlerinin daha yüksek ve ALH değerinin düşük olduğunu belirlemişlerdir. Ubilla ve Valdebenito (2011) gökkuşuğı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) spermininin soğuk muhafazasında sulandırıcılara farklı antioksidanların eklenmesinin sperma motilitesi ve spermatozoanın dölleme başarısı üzerindeki etkisi hakkındaki yaptıkları çalışmada sulandırma oranını 1:2 olarak uygulamışlardır. Benzer şekilde, Hatipoğlu ve Akçay (2010) endemik bir balık türü olan Abant alabalığının (*Salmo trutta abanticus*) spermatolojik parametrelerinin değerlendirilmesi ve farklı sulandırıcılarda kısa süreli saklanan spermatozoonların fertilizasyon yeteneği ile ilgili yaptıkları çalışmada spermayı 1:2 oranında sulandırmışlardır. Bu çalışmada spermanın sulandırılması ve dondurulması aşamasında spermatolojik özellikleri belirlenmiş olan spermalar 1:10 oranında sulandırılmıştır.

Balıklarda kullanılan kriyoprezervasyon metodları ile ilgili çalışmaların sayısı son 50 yılda artmıştır (Horvath vd., 2010). Yapılan bu çalışmalarda sperma küçük hacimli saklama kaplarında muhafaza edilmektedir. Sulandırılan sperma pellet tarzında, payetlere çekilerek ya da ampullerde muhafaza edilmektedir. Bu yöntemlerin başarısı türe, sulandırıcıya ve dondurma yöntemine göre değişmektedir. Bazı çalışmalarda sperma muhafazasında farklı hacimdeki saklama kapları kullanılmış ve büyük hacimdeki saklama kaplarının yetiştiricilik uygulamalarında ticari olarak önemli rol oynayacağını bildirmişlerdir. Lahnsteiner vd. (1997)

*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta* f. *fario*, *Salmo trutta* f. *lacustris* ve *Salvelinus alpinus* türlerinde yaptıkları çalışmada 1,2 ve 5 ml'lik payetlerin sperma muhafazası için uygunluğu konusunu araştırmışlar ve çözüm sonrası dölleme oranlarının benzer olduğunu tespit etmişlerdir. Brown ve Mims (1999) *Polyodon spathula* türünde yaptıkları çalışmada 5 ml'lik payetler kullanmışlar, çözüm sonrası dölleme oranını (%25-50) yeterli bulurlarken, açılma oranını (%16) düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Cabrita vd. (2001) gökkuşağı alabalığında spermayı 5 ml'lik payetlerde muhafaza ettiklerinde çözüm sonrası dölleme oranınının (%73) 0,5 ml'lik payetlerdeki dölleme oranına (%90) oranla daha düşük olduğunu saptamışlardır. Lahnsteiner vd. (2009) gökkuşağı alabalığında dondurulmuş spermanın yağ asitlerini inceledikleri çalışmada 0,5 ml'lik payet kullanmışlardır. Lahnsteiner vd. (2011) kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) ve gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) yaptıkları çalışmada 0,5 ml'lik payet kullanmışlardır. Bu çalışmada spermanın dondurulması, sıvı azot buharında  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de 0,25 ml'lik payetler kullanılarak yapılmıştır. Payetlerin ucu polivinil alkol ile kapatılmıştır. Çalışmada kullanılan yöntem olarak Baynes ve Scott (1987)'in kullandığı yöntemle aynı özellikleri taşımaktadır. Chen vd. (2010) *Pagrus major* türünde yaptıkları çalışmada uzun süreli muhafazanın dölleme üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada 1 ay ( $71,33 \pm 8,84$ ), 13 ay ( $69,22 \pm 1,02$ ) ve 26 ay ( $60,33 \pm 2,33$ ) sonundaki sonuçlarda önemli farklılıklar olmamasına rağmen 48 ay ( $47,22 \pm 3,89$ ) ve 73 ay ( $39,56 \pm 0,69$ ) sonunda dölleme oranlı önemli seviyede azaldığını belirlemişlerdir. Ding vd. (2009) *Siniperca chuatsi* türünde uzun süreli muhafazasının sperm kalitesi ve dölleme oranı üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, 1 yıl sonundaki dölleme ve açılma oranı ( $62,97 \pm 14,28$  ve  $52,58 \pm 11,17$ ) ile bir haftaki dölleme ve açılma oranı ( $62,97 \pm 14,28$  ve  $52,58 \pm 11,17$ ) arasında önemli farkın olmadığını tespit etmişlerdir.

Lahnsteiner vd. (2010) kahverengi alabalığın *Salmo trutta* f. *fario* sperma sulandırıcı ortamına eklenen antioksidanların etkisini inceledikleri çalışmada seçilen antioksidan ve oksidan savunma enzimleri (katalaz, redukte glutasyon, metiyonin, sulfoksit reduktaz, peroksidaz ve superoksit dismutaz enzimleri, askorbik asit, glutasyon, methiyonin, tokoferol ve ürik asit) spermatozoa motilite-inhibe edici tuz solusyonuna eklemişler ve sperma aktivasyonu, membran bütünlüğü ve lipid peroksidasyonu belirlemişlerdir. Ürik asit ve katalazın sperma motilitesini ve sperma membran bütünlüğünü arttırdığı ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise sperma lipid peroksidasyonunun azalttığını tespit etmişlerdir. Azalan metiyonin, sperma motilitesi ve membran bütünlüğünü, okside metiyonin ise motiliteyi arttırmıştır. Çalışma sonunda, kahverengi alabalığın spermasında ana antioksidanın ürik asit olduğu belirlemişlerdir. Lahnsteiner vd. (2010) farklı türlerde (Percidae, Salmonidae,



Cyprinidae ve Lotidae) yaptıkları çalışmada sulandırıcılara ürik asit ve metiyonin ilavesinin sperm kalite parametreleri (motilite, membran bütünlüğü ve lipid peroksidasyonu) üzerinde pozitif etkilere sahip olduğunu belirlemişlerdir. Lahnsteiner vd. (2011) kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) ve gökkuşacağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) kriyoprezervasyon uygulamış, sperma kalitesi üzerinde antioksidanların etkisini araştırmışlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlarla (katalaz, superoksit dismutaz, peroksidaz, redukte glutatyon, redukte methiyonin, okside glutatyon, redukte methiyonin) hazırlamışlar sulandırıcıların motilite parametrelerini ve döllenme oranını etkilediğini belirlemişlerdir. Ancak bazı antioksidanların olumsuz etkilerinin olduğunu, diğerlerinin ise düşük oranda etkiye sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Kaynak alabalığında glutatyon oksidaz ve reduktazın yüzme hızını arttırdığı, katalaz ve metiyoninin ise düşük oranda bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. Gökkuşacağı alabalığında yaptıkları çalışmada ise bu etkilerin fark edilebilir düzeyde olmadığını belirtmişlerdir. Martínez-Páramo (2012) levrekte (*Dicentrarchus labrax*) yaptıkları çalışmışlar ve sulandırıcılara askorbik asit ve  $\alpha$ -tokoferol eklenmesinin sperm kalitesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda sulandırıcılara askorbik asit ve  $\alpha$ -tokoferol ilavesinin sperm motilitesi, hızını ve lineerliğini arttırdığını belirlemişlerdir. Ubilla ve Valdebenito (2011) gökkuşacağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) yaptıkları çalışmada sulandırıcıya C vitamini (askorbik asit) eklenmesinin motilite ve döllenme oranı üzerinde pozitif etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, çözündürme sonucunda en yüksek motilite L-metiyonin ve ürik asit ilave edilen gruplarda olduğu belirlenmiştir. Önceki yapılan çalışmaların aksine, sulandırıcılara askorbik asit ilavesinin motilite oranı ve süresini azalttığı ve önemli bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, superoksit dismutaz, L-karnitin, ( $\pm$ )- $\alpha$ -tokoferol ve L-glutatyon reduktaz ilavesinin motiliteyi arttırdığı tespit edilmiştir. ( $\pm$ )- $\alpha$ -tokoferol ve ürik asit ilavesinin motilite süresini arttırdığı tespit etmişlerdir. 1., 3. ve 6. ay sonunda çözüm sonrasında elde edilen bulgularda süreye bağlı olarak motilite ve motilite süresinin düştüğü belirlenmiştir. Bu sonucun Ciereszko vd. (1999) sonuçlarıyla benzer olarak ürik asidin, balık spermatozoasını oksidatif hasara karşı koruyucu özelliğe sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Lahnsteiner vd. (2011) kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) ve gökkuşacağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) yaptıkları çalışmada antioksidan ilavesinin döllenme oranı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonunda, kaynak alabalığında çözüm sonrası standart sulandırıcıyla sulandırılan gruptaki döllenme oranını  $67,9 \pm 8,8$  olarak belirlerken, en yüksek döllenme oranını ( $< 75$ ) katalaz, redukte glutatyon ve metiyonin ilave edilen gruplardan elde etmişlerdir. Gökkuşacağı alabalığında ise standart sulandırıcıyla

sulandırılan gruptaki dölleme oranını  $88,9 \pm 5,9$  olarak belirlerlerken, katalaz, peroksidaz, okside ve redukte glutatyon, okside ve redukte metiyonin ilave edilen gruplarda dölleme oranının  $88-92$  arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Süperoksit dismutaz eklenen grupta ise dölleme oranı kontrol grubuna oranla düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Ubilla ve Valdebenito (2011) gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) yaptıkları çalışmada sulandırıcıya C vitamini (askorbik asit) eklenmesinin dölleme yeteneğini arttırdığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada, dondurulmuş sperma ile fertilizasyon uygulamaları sonucunda elde edilen bulgularda en yüksek dölleme ve açılma oranı L-karnitin ilave edilen sulandırıcı grubunda olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan ilave edilen gruplarda dölleme ve açılma oranı standart sulandırıcıya oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Chen vd. (2010) Pagrus major türünde yaptıkları çalışmada uzun süreli muhafazanın dölleme üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada 1 ay ( $71,33 \pm 8,84$ ), 13 ay ( $69,22 \pm 1,02$ ) ve 26 ay ( $60,33 \pm 2,33$ ) sonundaki sonuçlarda önemli farklılıklar olmamasına rağmen 48 ay ( $47,22 \pm 3,89$ ) ve 73 ay ( $39,56 \pm 0,69$ ) sonunda dölleme oranı önemli seviyede azaldığını belirlemişlerdir. Ding vd. (2009) *Siniperca chuatsi* türünde uzun süreli muhafazasının sperm kalitesi ve dölleme oranı üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, 1 yıl sonundaki dölleme ve açılma oranı ( $62,97 \pm 14,28$  ve  $52,58 \pm 11,17$ ) ile 1 haftaki dölleme ve açılma oranı ( $62,97 \pm 14,28$  ve  $52,58 \pm 11,17$ ) arasında önemli farkın olmadığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, spermanın uzun süreli muhafası (1., 3. ve 6. ay) sonucunda elde edilen bulgularda süreye bağlı olarak dölleme ve açılma oranının düştüğü, ancak farkın önemli olmadığı belirlenmiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kriyoprezervasyon günümüze kadar çeşitli alanlarda, araştırmalarda ve üretimde uygulanmıştır. Ekonomik olarak önem taşıyan alabalıkların spermasının kriyoprezervasyon yoluyla uzun sürelerde muhafaza edilerek üreme döneminde görülen senkronizasyon problemi giderilebilmekte, üretim ve yetiştiricilik çalışmalarında veriminin artmasını sağlayabilmektedir. Ülkemizde büyük miktarda tüketilen ve üretiminin büyük çoğunluğu yetiştiricilikten elde edilen alabalıklarda sperma muhafazası ile yetiştiricilik verimliliğinin artmasıyla bu canlının özellikle yarı entansif ve entansif metotlarla yetiştiriciliğini yapmak isteyen girişimciler bu uygulamalardan yararlanabilecektir.

Sperma kriyoprezervasyon yoluyla kaliteli spermaların muhafaza edilmesi, yetiştiricilik verimliliğinin artmasına ve dolayısıyla birim alandan elde edilebilecek verim miktarının da artmasına neden olacaktır. Alabalık yetiştiricilik veriminin artmasının sağlanması yurdumuzda yarı intensif ve intensif metotlarla da yetiştiricilik ve üretiminin yapılmasını teşvik edecek, buna paralel olarak toplam alabalık üretiminde bir artış sağlanacaktır. Alabalık üretimimizdeki artış ulusal ekonomiye de olumlu yönde katkıda bulunulacaktır.

Kriyoprezervasyon yoluyla, stoklar daha ekonomik olarak tutulacaktır. Erkek damızlık popülasyonunun az olması sonucu elektrik, su filtrasyonu, tank temizliği, bakım-onarım, yem ve personel giderleri en aza indirilecektir. Kriyoprezervasyon çalışmalarında kaliteli spermalar kullanıldığından hastalıklara ve ortam koşullarına dayanıklı stoklar elde edilecektir. Erkek anaçların spermalarından daha uzun süre yararlanılabilecektir. Dişi ve erkek senkronizasyon problemi nedeniyle oluşabilecek yumurta ziyanlarının engellenmesi sağlanacaktır. Yıl boyunca erkek gamet hücrelerinden yararlanılabilecektir. Erkek anaçların uzun yıllar beslenmesi külfetinden kaçınılabilecektir. Sperma kalitesindein üreme sezonu süresince oluşabilen değişimlerden etkilenebilmesi engellenecektir. Fotoperiyot uygulamalarında anaç sayısını dişi anaçlarla sınırlandırılabilir. Monoseks kültür teknolojisinde erkekleştirilmiş dişi gonadların geç olgunlaşması ile ilgili kayıpları engellenecektir. Genetik materyalin kolayca taşınması ve saklanması mümkün olacaktır.

Araştırmadan elde edilen bulguların ışığında aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

Gökkuşuğu alabalığı erkeklerinden abdominal masaj yöntemiyle alınan spermalarda miktar  $16,17 \pm 7,79$  ml; spermatozoa motilitesi  $81,39 \pm 1,04$ ; spermatozoa yoğunluğu  $18,48 \pm 6,37 \times 10^9$  spp/ml ve sperma pH'sı da  $7,5 \pm 0,00$  olarak tespit edilmiştir.

Elde edilen bu bulguların büyük çoğunluğu literatür bulguları ile birbirlerini destekler niteliktedir. Farklılıklar ise daha çok işletme şartları, hijyeni, bakım ve besleme şartlarına bağlı olarak değişmektedir.

Spermanın dondurulmasında oniki farklı sulandırıcı kullanılmıştır. Standart sulandırıcıya farklı antioksidanlar (katalaz, superoksit dismutaz, peroksidaz, glutatyon oksidaz, redukte glutatyon, L-methiyonin, ürik asit, L-askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten ve karnitin) eklenmiştir. Elde edilen motilite sonuçlarına göre ürik asit ( $69,00 \pm 4,00$ ) ve L-metiyonin ( $69,00 \pm 1,53$ ) ilave edilen sulandırıcılar diğer sulandırıcılara göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Motilite süreleri karşılaştırıldığında ise en yüksek süre ( $\pm$ )- $\alpha$ -tokoferol ve ürik asit ilave edilen sulandırıcılardan elde edilmiştir. 1., 3. ve 6. ay sonunda çözüm sonrasında elde edilen bulgularda süreye bağlı olarak motilite ve motilite süresinin düştüğü belirlenmiştir. Çözüm sonrasında elde edilen bulgularda sperma parametreleri açısından sulandırıcılar arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu ve zamana bağlı olarak düşüşlerin meydana geldiği belirlenmiştir.

Dondurulmuş sperma ile fertilizasyon uygulamaları sonucunda elde edilen bulgularda en yüksek dölleme ve açılma oranı L-karnitin ilave edilen sulandırıcı grubunda olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan ilave edilen gruplarda dölleme ve açılma oranı standart sulandırıcıya oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 1., 3. ve 6. ay sonunda çözüm sonrasında elde edilen bulgularda süreye bağlı olarak dölleme ve açılma oranının düştüğü, ancak farkın istatistiki olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

Yapılmış olan bu araştırmada beklenen sonuçlara kısmen de olsa ulaşılmıştır. Çalışma sonucunda antioksidanlardan ürik asidin ve karnitinin etkin olduğu belirlenmiş ve sperma muhafazasında sulandırıcılarda kullanılması önerilmektedir. İlerleyen zaman içerisinde bu çalışma alabalık spermasının dondurulması için uygun sulandırıcının ve kriyoprotektanın seçilmesi, dondurulmuş spermanın döllemede kullanılması çalışmalarına ışık tutacaktır.

Bu ve benzeri çalışmaların tekrarlanması sonucunda ülkemizde özellikle bu alanda başvuru yurtdışından döllemiş yumurta ithali gündemden kalkması, bu olay hem ülke ekonomisi ve hem de yetiştiricinin kar yüzdesini arttırması açısından oldukça önemli yararlar sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Aas, G.H., Refstie, T. and Gjerde, B.,** 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, **95**,125-132.
- Aitken, R.J., Buckingham, D.W. and West, K.M.,** 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J. Cell. Physiol.*, **151**, 466–477.
- Alvarenga, M.A., Landim-Alvarenga, F.C., Moreira, R.M. and Cesarino, M.M.,** 2000. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet. J.*, **32**, 541-545.
- Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L. and Storey, B.T.,** 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity *J. Androl.*, **8**. 338–348.
- Alvarez, J.G. and Storey, B.T.,** 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.*, **23**, 77–90.
- Alvarez, B., Arenal, A., Fuentes, R., Pimentel, R., Abad, Z. and Pimentel, E.,** 2008. Use of post-thaw silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) spermatozoa to increase hatchery productions. In: *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. Biology Series.* pp. 345–350, E. Cabrita, V. Robles, M. P. Herra' ez (Eds), CRCPress (Taylor and Francis group).
- Anonim,** 2004, <http://includes.gap.gov.tr/files/ek-dosyalar/proje-ve-faaliyetler/Tar%C4%B1m.%20Orman%20Ve%20K%C4%B1rsal%20Kalk%C4%B1ma/alabalik.pdf>. (24.08.2012).
- Arav, A., Hehu, D. and Mattioli, M.,** 1993. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, **99**, 353-358.

- Asturiano, J.F., Pe´ rez, L., Marco-Jime´ nez, F., Olivares, L., Vicente, J.S. and Jover, M.,** 2003. Media and methods for the cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm. *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 501–502.
- Babiak, I., Frazer, L., Dobosz, S., Goryczko, K., Kuzminski, H. and Strzezek, J.,** 2000. Computer controlled freezing of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) spermatozoa for routine programmes. *Aquacult. Res.*, **30**, 707-710.
- Babiak, I., Ottesen, O., Rudolfson, G. and Johnsen, S.,** 2006. Chilled storage of semen from Halibut, *Hippoglossus hippoglossus*: optimizing the protocol. *Theriogenology*, **66**, 2025–2035.
- Ball, B.A. and Vo, A.,** 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J. Androl.*, **22**, 1061–1069.
- Bansal, A.K. and Bilaspuri, G.S.,** 2011. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Vet. Med. Inter.*, 2011;2011: Article ID 686137, 7 pages doi:10.4061/2011/686137.
- Bauchè, F., Fouchard, M.H. and Jégou, B.,** 1994. Antioxidant systems in rat testicular cells. *FEBS Lett.*, **349**, 392–396.
- Baynes, S.M. and Scott, A.P.,** 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture*, **66**, 53-67.
- Billard, R.,** 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Dev.*, **2**, 877-920.
- Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W. and Suque, M.,** 1995. Sperm Physiology and Quality. In: Bromage, N., Roberts, R. (Eds), *Brood stock Management and Egg and Larval Quality*. pp:25-52. Blackwell, Oxford.
- Bobé, J. and Labbe, C.,** 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocr.*, **165**, 535-548.

- Bozkurt, Y.**, 2006. The relationship between body condition, sperm quality parameters and fertilization success in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Anim. Vet. Adv.*, **5**, 412-414.
- Bozkurt, Y. ve Seçer, S.**, 2006. Aynalı Sazan (*Cyprinus carpio*) Balıklarında Üreme Mevsimi Boyunca Spermatolojik Özelliklerin Belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, **23**, 195–198.
- Bromage, N., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., Duston, J. and Barker, G.**, 1992. Broodstock Management and Seed Quality–General Considerations, In: N.R. Bromage and R.J. Roberts (Editors), broodstock Management and Egg and Larval Quality, Blackwell Science, Oxford, 1–24.
- Bromage, N. and Roberts, R.**, 1995. Broodstock management and egg and larval quality. London: Blackwell Science, 424p.
- Brown, G.G. and Mims, S.D.**, 1995. Storage, transportation, and fertility of undiluted and diluted paddlefish milt. *Prog. Fish-Cult.*, **57**, 64– 69.
- Bucak, M.N. ve Tekin N.**, 2007. Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg*, **54**, 67-72.
- Büyükhatipoğlu, Ş. ve Holtz, W.**, 1978. Preservation of Trout Sperm in Liquid or Frozen State. *Aquaculture*, **14**, 45 – 49.
- Büyükhatipoğlu, Ş. ve Holtz, W.**, 1984. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)- Effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture*. **37**, 63-71.
- Cabrita, E., Alvarez, R., Anel, L., Rana, K.J. and Herraéz, M.P.**, 1998. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology*, **37**, 245–253.
- Cabrita, E., Anel, L. and Herraez, M.P.**, 2001. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, **52**, 623-635.

- Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquete, C. and Herráez, M.P., 2005.** Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*, **50**, 144–153.
- Cabrita, E., Robles, V. and Herra´ ez, M.P., 2008.** Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. pp. 547, *Biology Series*, CRCPress (Taylor and Francis group).
- Cabrita, E., Engrola, S., Conceic a˜ o, S., Lacuisse, M., Pousa˜ o-Ferreira, P. and Dinis, M.T., 2009.** Preliminary attempts on the cryopreservation of dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) sperm. *Aquaculture*, **287**, 152–157.
- Caffey, R.H. and Tiersch, T.R., 2000.** Cost analysis for integrating cryopreservation into an existing fish hatchery. *J. World Aquac. Soc.*, **31**, 51–58.
- Caille, N., Rodina, M., Kocour, M., Flajshanc, M. and Linhart, O., 2006.** Quantity, motility and fertility of tench (*Tinca tinca*) sperm in relation to LHRH analogue and carp pituitary treatment. *Aquacult. Int.*, **14**, 75–87.
- Canyurt, M.A., 1985.** Trout production (in Turkish). E.Ü. Ziraat Fakültesi Haber Bülteni. 43: 4-6.
- Chatterjee, S., De Lamirande, E. and Gagnon, C., 2001.** Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol. Reprod. Dev.*, **60**, 498–506.
- Cheema, R.S., Bansal, A.K. and Bilaspuri, G.S., 2009.** Manganese provides antioxidant protection for sperm cryopreservation that may offer new consideration for clinical fertility. *Oxid. Med. Cell. Longev*, **2**, 152–9.
- Chen, Y.K., Liu, Q.H., Li, J., Xiao, Z.Z., Xu, S.H., Shi, X.H. and Ma, D.Y., 2010.** Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Cryobiology*, **61**, 189–193.
- Cheng, A. and Merz, K.M., 1997.** Ice- binding mechanism of winter flounder antifreeze proteins. *Biophys. J.*, **73**, 2851-2873.



- Chereguini, O., Garcia de la Banda, I., Herrera, M., Martinez, C. and De la Hera, M.,** 2003. Cryopreservation of turbot *Cophthalmus maximus* (L.) sperm: fertilization and hatching rates. *Aquac. Res.*, **34**, 739–747.
- Chowdhury, I. and Joy, K.P.,** 2001. Seminal vesicle and testis secretions in *Heteropneustes fossilis* (Bloch): composition and effects on sperm motility and fertilisation. *Aquaculture*, **193**, 355–371.
- Ciereszko, A. and Dabrowski, K.,** 1995. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biol. Reprod.*, **52**, 982–988.
- Ciereszko, A., Dabrowski, K., Kucharczyk, D., Dobosz, S., Goryczko, K. and Glogowski, J.,** 1999. The presence of uric acid, an antioxidative substance, in fish seminal plasma. *Fish Physiol. Biochem.*, **21**, 313–315.
- Ciereszko, A., Dietrich, G.J., Dietrich, M.A., Nynca, J., Kuzminski, H., Dobosz, S. and Grudniewska, J.,** 2010. Effects of pH on Sperm Motility in Several Salmoniformes Species: *Oncorhynchus mykiss*, *Salvelinus fontinalis*, *Salmo trutta*, *Salmo salar* and *Thymallus thymallus*. *J. Appl. Ichthyol.*, **26**, 665–667.
- Cosson, J., Groison, A.L., Suquet, M., Fauvel, C., Dreanno, C. and Billard, R.,** 2008. Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. *Reproduction*, **136(3)**, 277-294.
- Curry, M.R. and Watson, P.F.,** 1994. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*, **31**, 39-46.
- Çevik, M.,** 2000. Freezing of rainbow trout semen and evaluation. PhD Thesis. Karadeniz Teknik University. Institute of Medical Sciences. Ankara. Turkey.
- Ding, S., Ge, J., Hao, C., Zhang, M., Yan, W., Xu, Z., Pana, J., Chenb, S., Tianb, Y. and Huangc, Y.,** 2009. Long-term cryopreservation of sperm from Mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Anim. Rep. Sci.*, **113**, 229–235.
- Drokin, S., Stein, H. and Bartscherer, H.,** 1998. Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Cryobiology*, **37**, 263–270.

- Dziewulska, K., Rzemieniecki, A., Czerniawski, R. and Domagała, J.,** 2011. Post-thawed motility and fertility from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) sperm frozen with four cryodiluents in straws or pellets. *Theriogenology*, **76**, 300–311.
- Edashige, K., Yamaji, Y., Kleinhans, F.W. and Kasai, M.,** 2003. Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biol. Reprod.*, **68**, 87-94.
- Ekici, A. ve Timur, M.,** 2011. Alabalıklarda sperma dondurma yönteminin ekonomik analizi üzerine bir çalışma. *16. Su Ürünleri Sempozyumu*, Antalya, 25-27 Ekim, s. 76.
- Fabbrocini, A., Lavadera, L., Rispoli, S. and Sansone, G.,** 2000. Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology*, **40**, 46–53.
- Fauvel, C., Savoye, O., Dreanno, C., Cosson, J. and Suquet, M.,** 1998. Characteristics of sperm of captive seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) in relation to its fertilisation potential. *J. Fish Biol.*, **54**, 356–369.
- Gadea, J., Garcia-Vazquez, F., Matas, C., Gardon, J.C., Canovas, S. and Gumbao, D.,** 2009 Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J. Androl.*, **26**, 396–404.
- Gao, D.Y., Ashworth, E., Watson, P.F., Kleinhans, F.W., Mazur, P. and Crister, J.K.,** 1993. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biol. Reprod.*, **49**, 112-123.
- Geffen, A.J. and Evans, J.P.,** 2000. Sperm traits and fertilisation success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **182**, 61–72.
- Gjerde, B.,** 1984. Variation in semen production of farmed Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture*, **40**, 109-114.
- Gomes, G.M., Jacob, J.C.F. and Medeiros, A.S.L.,** 2002. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, **58**, 277-279.

- Gopalakrishnan, A., Thakur, K.L., Ponniah, A.G., Kumar, K. and Dayal, R.,** 1999. Cryopreservation of Brown Trout (*Salmo trutta fario*) Sperm: The Influence of Extender Composition and Fertilization Procedure. *Fish. Technol.*, **36(2)**, 104-109.
- Gu, W. and Hecht, N.B.,** 1996. Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase and manganese superoxide dismutase mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *J. Androl.*, **17**, 256–262.
- Gwo, J.C., Ohta, H., Okuzawa, K. and Wu, H.C.,** 1999. Cryopreservation of sperm from the endangered Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). *Theriogenology*, **51**, 569–582.
- Harlioğlu, A.G. ve Kutluyer, F.,** 2012. Balıklarda sperm kalitesine yağ asitlerinin etkisi. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi / The Black Sea Journal of Science*, **2 (5)**, 37-45.
- Hatipoğlu, T. ve Akçay, E.,** 2010. Fertilizing ability of short-term preserved spermatozoa Abant trout (*Salmo trutta abanticus* T, 1954). *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **57**, 33-38.
- He, S.Y. and Woods, L.C., III,** 2003. Effects of glycine and alanine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. *Cryobiology*, **46**, 17–25.
- Holt, W.T.,** 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, **62**, 3-22.
- Horvath, A., Wayman, W.R., Dean, J.C., Urbanyi, B., Tiersch, T.R., Mims, S.D., Johnson, D. and Jenkins, J.A.,** 2008. Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American Acipenseriform species: a retrospective study. *J. Appl. Ichthyol.*, **24**, 443–449.
- Horvath, A. and Urbanyi, B.,** 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquac. Res.*, **31**, 317–324.
- Horvath, A., Urbanyi, B., Wang, C., Onders, R.J. and Mims, S.D.,** 2010. Cryopreservation of paddlefish sperm in 5-mL straws. *J. Appl. Ichthyol.*, **26**, 715–719.

- Huang, C.B. and Ebersole J.L.**, 2010. A novel bioactivity of omega-3 polyunsaturated fatty acids and their ester derivatives. *Mol. Oral Microbiol.*, **25**, 75–80.
- Izquierdo, M.S., Fernandes-Palacios, H. and Tacon, A.G.J.**, 2001. Effect on broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, **197**, 25-42.
- Kasai, M.**, 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, **42**, 67-75.
- Kasai, M.**, 2002. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification. *Reprod Med Biol.*, **1**, 1-9.
- Katkov, I.I., Katkova, N., Critser, J.K. and Mazur, P.**, 1998. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, **37(4)**, 325-38.
- Kayalı, H., Şatıroğlu, G. ve Taşyürekli, M.**, 1992. İnsan Embriyolojisi, Yedinci Baskı, Alfa Basım Yayım Dağıtım.
- Kessopoulou, E., Tomlinson, M.J., Barratt, C.L., Bolton, A.E. and Cooke, I.D.**, 1992. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? *J. Reprod. Fertil.*, **94**, 463–470.
- Kopani, M., Celec, P., Danixovi, L. and Michalka, P.**, 2006. Oxidative stress and electron spin resonance. *Clin. Chim. Acta*, **364**, 61–66.
- Labbe, C. and Maisse, G.**, 2001. Characteristics and freezing tolerance of brown trout spermatozoa according to rearing water salinity. *Aquaculture*, **201**, 287–299.
- Lahnsteiner, F., Patzner, R.A. and Weismann, T.**, 1993. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces,Teleostei). *Reprod. Nutr. Dev.*, **33**, 349-360.
- Lahnsteiner, F., Berger, F., Weismann, T. and Patzner, R.**, 1996. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. *J. Appl. Ichthyol.*, **12**, 99–106.

- Lahnsteiner, F., Weismanu, T. and Patzner R.A.,** 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquacult. Res.*, **28(6)**, 471–479.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismanu, T. and Patzner R.A.,** 1998. Evaluation of the semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture*, **163**, 163–81.
- Lahnsteiner, F., Mansour, N. and McNiven, M.A.,** 2009. Richardson G. F., Fatty acids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen: Composition and effects on sperm functionality. *Aquaculture*, **298**, 118–124.
- Lahnsteiner, F., Mansour, N. and Kristjan, P.,** 2010. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. *Anim. Reprod. Sci.*, **119**, 314–321.
- Lahnsteiner, F. and Mansour, N.,** 2010. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the percidae, salmonidae, cyprinidae, and lotidae for improving semen storage techniques. *Anim. Reprod. Sci.*, **307**, 130-140.
- Lahnsteiner, F., Mansour, N. and Kunz, F.A.,** 2011. The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Theriogenology*, **76**, 882–890.
- Lasso, J.L., Noiles, E.E., Alvarez, J.G. and Storey, B.T.,** 1994. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J. Androl.*, **15**, 255–65.
- Leeuw, F.E.D., Leeuw, A.M.D., Daas, J.H.G., Colenbrander, B.V. and Erkleij, A.J.,** 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, **30**, 32-44.
- Leibo, S.P. and Brandley, L.,** 1993. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: *C Gagnon (Ed), The Male Gamet*. Cache River Press, pp. 502-515. St Louis.
- Leibo, S.P. and Brandley, L.,** 1999. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: *C Gagnon (Ed), The Male Gamet*. pp. 502-515, Cache River Press, St Louis.

- Liu, L., Dabrowski, K. and Ciereszko, A.,** 1995. Protective effect of seminal plasma proteins on the degradation of ascorbic acid. *Mol. Cell. Biochem.*, **148**, 59–66.
- Maisse, G., Ogier de Balny, B. and Labbé, C.,** 2008. Cryopreservation of testicular sperm from European catfish (*Silurus glanis*). In: *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Biology Series. pp. 397–401, E. Cabrita, V. Robles, M. P. Herra' ez (Eds), CRCPress (Taylor and Francis group).
- Malo, C., Gil, L., Gonzales, N., Martinez, F., Cano, R., de Blas, I. and Espinosa, E.,** 2010. Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*, **61**, 142–7.
- Mansour, N., McNiven, M. and Richardson, G.F.,** 2006. The effect of dietary supplementation with blueberry,  $\alpha$ -tocopherol or astaxanthin on oxidative stability of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) semen. *Theriogenology*, **66**, 373–382.
- Martínez-Páramoa, S., Pérez-Cerezales, S., Go'mez-Romano, F., Blanco, G., Sánchez, J.A. and Herráez, M.P.,** 2009. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology*, **71**, 594–604.
- Martínez-Páramoa, S., Diogo, P., Dinisa, M.T., Herráezb, M.P., Sarasquetec, C. and Cabritac, E.,** 2012. Incorporation of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology*, **77**, 1129–1136.
- Massip, A.,** 2001. Cryopreservation of embryos of farm animal. *Reprod. Dom. Anim.*, **36**, 49-55.
- Mazur, P.,** 1977. The role of intercellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, **14**, 251-272.
- Mazur, P.,** 1984. Freezing of living cell: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.*, **247**, 125-142.

- Mazur, P.**, 1990. Equilibrium, quasi- equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys.*, **14**, 53-92.
- Mcgann, L.E.**, 1978. Differing action of penetrating and nonpenetrating agents. *Cryobiology*, **15**, 382-390.
- McNiven, M.A., Gallant, R.K. and Richardson, G.F.**, 1993. Dimethyl-acetamide as a cryopreservation for rainbow trout spermatozoa. *Theriogenology*, **40**, 943-948.
- McWilliams, R., Gibbons, W. and Leibo, S.**, 1995. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and di-saccharides. *Hum. Reprod.*, **10** (5), 1163-1171.
- Metwally, M.A.A. and Fouad, I.M.**, 2009. Effects of l-ascorbic acid on sperm viability in male grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Global Vet.*, **3**, 132–136.
- Munkittrick, K.R. and Moccia, R.D.**, 1984. Advances in the cryopreservation of Salmonid semen and suitability for a production-scale artificial fertilization program. *Theriogenology*, **21**(4), 645-654.
- Munkittrick, K.R. and Moccia, R.D.**, 1987. Seasonal changes in the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constituents. *Aquaculture*, **64**, 147-156.
- Oehninger, S., Duru, N.K., Srisombut, C. and Morshedi, M.**, 2000. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Mol. Cell Endocrinol.*, **169**, 3-10.
- Palasz, A.T. and Mapletopt, R.J.**, 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol Adv.*, **14**, 127-149.
- Payne, S.R., Oliver, J.E. and Upreti, G.C.**, 1994. Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, **31**, 180-184.
- Pedro, P.B., Zhu, S.E., Makino, N., Sakurai, T., Edashige, T. and Kasai, M.**, 1997. Effects of hypotonic stress on the survival of mouse oocytes and embryos at various stages. *Cryobiology*, **35**, 150-158.

- Pérez-Cerezales, S., Martínez-Páramo, S., Beirão, J. and Herráez, M.P.,** 2010. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation an use of LDL as cryoprotectant. *Theriogenology*, 74 (2), 282-9.
- Polge, C., Smith, A. and Parkes, A.,** 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, **164**, 166.
- Rainis, S., Gasco, L. and Ballestrazzi, R.,** 2005. Comparative study on milt quality features of different finfish species. *Italian J. Anim. Sci.*, **4**, 355–363.
- Rana, K.,** 1995. Preservation of Gametes. In: *Bromage, N. R., Roberts, R.J.(Eds) Broodstock management and egg and larval quality*. pp: 53-75, Blackwell, Oxford.
- Rideout, R.M., Litvak, M.K. and Trippel, E.A.,** 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. *Aquac. Res.*, **34**, 653–659.
- Rideout, R.M., Trippel, E.A. and Litvak, M.K.,** 2004. The development of haddock and Atlantic cod sperm cryopreservation techniques and the effect of sperm age on cryopreservation success. *J. Fish Biol.*, **65**, 299–311.
- Rudolph, A.S. and Crowe, J.H.,** 1985. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology*, **22**, 367–377.
- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F. and Nash, J.P.,** 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, **234**,1-28.
- Sansone, G., Fabbrocini, A., Ieropoli, S., Langellotti, A., Occidente, M. and Matassino, D.,** 2002. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) spermatozoa after thawing. *Cryobiology*, **44**, 229–239.
- Sasaki, S., Ohta, T. and Decker, E.A.,** 1996. Antioxidative activity of watersoluble fractions of salmon spermary tissue. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1682–1686.
- Schmidt-Baulain, R. and Holtz, W.,** 1989. Deepfreezing of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm at varying intervals after collection. *Theriogenology*, **32(3)**, 439-443.



- Shaw, J.M., Oranratnachai, A. and Trounson, A.O.,** 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, **53**, 59-72.
- Seçer, S.,** 1998. Su ürünleri ve balık yetiştiriciliği. *Ankara Bölge Vet. Hek. Ods. Ürt. Derg.*, **5(6)**, 26-42.
- Sikka, S.C., Rajasekaran, M. and Hellstrom, W.J.G.,** 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J. Androl.*, **16**, 464-468.
- Sikka, S.C.,** 2004. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J. Androl.*, **25**, 5-18.
- Stoss, J.,** 1983. Fish Gamete Preservation and Spermatozoan Physiology. In: *Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.(Eds), Fish Physiology*. Academic Press, New York.
- Suquet, M., Dreanno, C., Petton, B., Normant, Y., Omnes, M.H. and Billard, R.,** 1998. Long-term effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. *Aquat. Living Resour.*, **11**, 45-48.
- Tabakoğlu, Ş.S.,** 2005. Hipofiz uygulanmış ve uygulanmamış farklı boy gruplarına ait aynalı sazan (*Cyprinus carpio*)'ların sperm kalitelerinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Taddei, A.R., Barbato, F., Abelli, L., Canese, S., Moretti, F., Rana, K.J., Fausto, A.M. and Mazzini, M.,** 2001. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). *Cryobiology*, **42**, 244-255.
- Tanaka, S., Zhang, H., Horie, N., Yamada, Y., Okamura, A., Utoh, T., Mikawa, N., Oka, H.P. and Kurokura H.,** 2002. Long-term cryopreservation of sperm of Japanese eel. *J. Fish Biol.*, **60**, 139-146.
- Taylor, K., Roberts, P., Sanders, K. and Burton, P.,** 2009. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reprod. Biomed.*, **18**, 184-9.

- Tekin, N., Seer, S., Akçay, E. ve Bozkurt, Y.,** 2003. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Israeli J. Aquacult.*, **55**, 208-212.
- Tramer, F., Rocco, F., Micali, F., Sandri, G. and Panfili, E.,** 1998. Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **59**, 753-758.
- TUİK,** 2013. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/balikcilikdagitimapp/balikcilik.zul>. Erişim tarihi: 27.12.2013, 14:58.
- Ubilla A. and Valdebenito, I.,** 2011. Use of antioxidants on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) sperm diluent: effects on motility and fertilizing capability. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, **39(2)**, 338-343.
- Vassallo-agius, R., Imaizumi, H., Watanabe, T., Yamazaki, T., Satoh, S. and Kiron, V.,** 2001. The influence of astaxanthin supplemented dry pellets on spawning of striped jack. *Fish. Sci.*, **67**, 260–270.
- Viveiros, A.T.M. and Komen, J.,** 2008. Semen cryopreservation of the African catfish, *Clarias gariepinus*. In: *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Biology. Series, pp. 403–407, E. Cabrita, V. Robles, M.P., 2003. Herraez (Eds), CRCPress (Taylor and Francis group).
- Watson, P.F. and Morris, G.J.,** 1987. Cold shock injury in animal cells. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **41**, 311–340.
- Watson, P.F.,** 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, **7**, 871-891.
- Watson, P.F. and Fuller B.J.,** 2001. Principles of Cryopreservation Gametes and Embryos. In: *Cryobanking the genetic resource. Wildlife conservation for the future*. P. F. Watson, W. V. Holt (Eds), Taylor and Francis, pp. 22–46, London.
- Woelders, H.,** 1997. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet. Q.*, **19**, 135–138.

- Woods, E.J., Gilmore J.A. and Liu, J.,** 2000. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum. Reprod.*, **15**, 335-343.
- Yanık, T.,** 2009. Gökkuşığı alabalığı ve alabalıkların morfolojik özellikleri arazi çalışmaları. *Doğal Alabalık Çalıştayı, Sürdürülebilir Yetiştiricilik, Koruma ve Balıklandırma*, Trabzon, 22-23 Ekim, s. 144-148.
- Young, W.P., Frenyea, K., Wheeler, P.A. and Thorgaard, G.H.,** 2009. No increase in developmental deformities or fluctuating asymmetry in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced with cryopreserved sperm. *Aquaculture*, **289**, 13–18.
- Zini, A., de Lamirande, E. and Gagnon, C.,** 1993. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int. J. Androl.*, **16**, 183–188.

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Çankırı’da doğdu. İlk ve orta dereceli öğrenimini Manisa’da tamamladı. 2003 yılında Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi’nde öğrenim görmeye hak kazandı. 4 yıllık lisans öğrenimini tamamladıktan sonra 21 Ağustos 2008 yılında “Su Ürünleri Mühendisi” unvanıyla mezun oldu. Eylül 2008 tarihinde Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Şubat 2010 tarihinde, aynı anabilim dalında Tunceli Üniversitesi’ne Araştırma Görevlisi olarak atandı. 21 Ağustos 2010 tarihinde “Yüksek Lisans (Su Ürünleri Yüksek Mühendisi)” diplomasını almaya hak kazandı. Eylül 2011 tarihinde Tunceli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalında Doktora öğrenimine başladı.