T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# SEZON İÇİ VE SEZON DIŞINDA KOÇ SPERMASININ DONDURULMASINDA ANTİOKSİDANLARIN ETKİSİ

**Ali Doğan ÖMÜR**

**DOKTORA TEZİ**

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA (VET) ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Prof. Dr. Kenan ÇOYAN**

**KONYA-2011**

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# SEZON İÇİ VE SEZON DIŞINDA KOÇ SPERMASININ DONDURULMASINDA ANTİOKSİDANLARIN ETKİSİ

**Ali Doğan ÖMÜR**

**DOKTORA TEZİ**

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA (VET) ANABİLİM DALI

## Danışman

**Prof. Dr. Kenan ÇOYAN**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09102041 proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA-2011**

## ÖNSÖZ

Günümüzde genetik kaynakların saklanarak gelecek yıllara aktarılması önemli bir konudur. Üreme biyoteknolojisi, türlerin soyunun korunması ve klinik uygulamaları gibi geniş bir kullanım alanına sahip olan spermanın dondurularak saklanması işlemi, bu anlamda büyük bir öneme sahiptir.

Ayrıca insan beslenmesi için vazgeçilmez bir yer tutan hayvansal proteinin önemli bir kaynağını oluşturan kırmızı etin üretilmesi bağlamında ana faktörlerden birisi olan koyunculuğun etkin bir şekilde sürdürülebilmesi de gen kaynaklarının başarılı bir şekilde muhafaza edilebilmesine ve gelecek nesillere aktarılabilmesine bağlıdır. Koç spermasının dondurularak saklanması bu açıdan ayrı bir önem arz etmektedir.

Koç spermasının yeterli dölverimini sağlayacak şekilde dondurulması, suni tohumlama uygulamalarını daha pratik ve ekonomik yapacağı gibi daha doğru ve güvenilir pedigri kayıtlarının tutulması sağlanacaktır. Ayrıca yüksek genetik kapasiteye sahip koçların geniş populasyonlarda kullanımı olanaklı hale gelecektir.

Koç spermasının dondurulması-çözdürülmesi esnasında oluşan membran lipit faz değişimine, ozmotik-mekanik strese ve ortamda gelişen serbest oksijen radikallerine bağlı olarak membran yapılarında ve hücre organellerinde yapısal deformasyonlar, DNA'da kırılmalar oluşmakta, bu olumsuz etkiler sperma sulandırıcılarına antioksidanların ilavesiyle azaltılabilmekte ve çözüm sonu spermatozoon fonksiyonları iyileştirilmektedir.

Yaptığım tez çalışması süresince tecrübe ve birikimlerinden faydalandığım sayın;
Prof. Dr. Kenan ÇOYAN, Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN, Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR, Doç.Dr. Mustafa Numan BUCAK'a teşekkür ederim.

Yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet Emin TEKİN, Arş. Gör. Dr. Alper YILMAZ, Arş. Gör. Dr. Ali YİĞİT, Arş. Gör. Semih ALTAN, Arş. Gör. Şükrü GÜNGÖR, Arş. Gör. Caner ÖZTÜRK, Arş. Gör. Nagehan DEMİR, Uzman Avni İLİK'e ve her anlamda destek gördüğüm aileme şükranlarımı sunarım.

.

Ayrıca “Sezon içi ve sezon dışında koç spermasının dondurulmasında antioksidanların etkisi” adlı tez projesinin (Proje no: 09102041) yürütülmesinde bütçe desteği sağlayan S.Ü. BAP Koordinatörlüğü’ne teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER**

ÖNSÖZ ..... ii

İÇİNDEKİLER ..... iv

ÇİZELGE LİSTESİ ..... vi

1.GİRİŞ ..... 1

1.1.Koçlarda Spermatogenezis ..... 2

1.2. Koç Spermasının Genel Özellikleri ..... 3

1.3. Koç Spermasının Dondurulması ..... 3

1.4. Serbest Radikaller ve Etkileri ..... 4

1.4.1. Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkisi ..... 6

1.4.2. Serbest Radikallerin Spermatozoon Üzerine Etkileri ..... 7

1.5. Antioksidanların İşlevi ..... 9

1.6. Antioksidanların Sınıflandırılması ..... 10

1.6.1. Primer antioksidanlar ..... 11

1.6.2. Sekonder antioksidanlar ..... 11

Şelat yapıcı ajanlar ..... 12

Oksijen tutucu ajanlar ..... 12

1.7. Antioksidanların Sperma Dondurulmasındaki Etkileri ..... 12

1.7.1. Curcumin, Ellagik asit ve Metiyoninin Antioksidatif Etkinliği ..... 16

2. GEREÇ VE YÖNTEM ..... 19

2.1. Gereç ..... 19

2.2. Yöntem ..... 19

2.2.1. İstatistiki Hesaplamalar ..... 20

3. BULGULAR ..... 21

3.1. Sperma Numunelerinde Sezon İçi Sulandırma Sonu Bulgular ..... 21

3.2. Sperma Numunelerinde Sezon İçi Ekilibrasyon Sonu Bulgular ..... 21

3.3. Sperma Numunelerinde Sezon İçi Dondurma-Çözdürme Sonu Bulgular .....22
3.4. Sperma Numunelerinde Sezon Dışı Sulandırma Sonu Bulgular.....23
3.5. Sperma Numunelerinde Sezon Dışı Ekilibrasyon Sonu Bulgular .....24
3.6. Sperma Numunelerinde Sezon Dışı Dondurma-Çözdürme Sonu Bulgular.....25

4.TARTIŞMA .....27
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....36

6.ÖZET .....38

7. SUMMARY .....40

8. KAYNAKLAR.....41

9. EKLER.....49
EK. A: Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Kararı.....49

10. ÖZGEÇMİŞ .....50

# ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1. : Sezon içi sulandırma sonrasına ait spermatolojik parametreler (x±S) ..... 21

Çizelge 1.2. : Sezon içi ekilibrasyon sonrasına ait spermatolojik parametreler (x±S) ..... 22

Çizelge 1.3. : Sezon içi dondurma-çözdürme sonrasına ait spermatolojik parametreler (x±S)..... 23

Çizelge 2.1. : Sezon dışı sulandırma sonrasına ait spermatolojik parametreler (x±S) ..... 24

Çizelge 2.2. : Sezon dışı ekilibrasyon sonrasına ait spermatolojik parametreler (x±S) ..... 25

Çizelge 2.3. : Sezon dışı dondurma-çözdürme sonrasına ait spermatolojik parametreler (x±S)..... 26

# 1. GİRİŞ

Koyunculuk Anadolu insanının tarih boyunca uğraştığı en önemli hayvan yetiştiriciliği dallarından biridir. Koyun yetiştiriciliği et, süt ve süt ürünleri, yün ve deri üretimi açısından ülkemiz ekonomisinde önemli yer tutmaktadır. Kırsal alanda yaşayan halkımız için kolay bir uğraş alanı ve aynı zamanda ekonomik güvence olan koyunculuk en eski hayvansal üretim alanlarından biridir. Koyun yetiştiriciliği köyden kente göçün önlenmesi, işsizlik ve ekonomik krizden çıkışa katkısı açısından da önemlidir. Yakın tarihimizde koyunculuğun özellikle Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgeleri'nde yaşayan halkımızın önemli bir geçim kaynağını oluşturduğunu da görüyoruz (TESK 2010).

Koyunculuk alanında biyoteknolojik yöntemlerden de faydalanılarak verimi arttırmak ve yüksek verimli yavrular elde edebilmek için, suni tohumlama, seksüel siklus senkronizasyonu, embriyo nakli, embriyoların dondurulması, ikizlik oranının artırılması, embriyoda veya spermada cinsiyet tayini gibi bir takım yöntemler gittikçe yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İster birim hayvan başına verimi artırmak, ister mevcut hayvanların verimlerini koruyup sürekliliğini sağlamak konusunda olsun uygulanan bu biyoteknolojik yöntemlerin ana amacı verim yönünden üstün erkek ya da dişi genotipinin yaygınlaştırılması şeklinde olmuştur (Akyol 2001). Bu yöntemlerden birisi de spermanın dondurulması işlemidir.

Koç spermasının dondurulması ve dondurulmuş spermalarla ilk suni tohumlama uygulamaları Sovyetler Birliği'nde başlamış, daha sonra Avrupa ülkelerine geçmiştir. Türkiye'de ise Cumhuriyet'in ilk yıllarında başlatılan koyun ıslahı çalışmaları günümüzde henüz istenen başarıya ulaşamamıştır (Tekin ve ark 2006). Türkiye, 22 000 000 civarında koyun varlığı ile hayvancılık sektöründe önemli bir yere sahipken, verim açısından istenen düzeye ulaşamamıştır (TUİK 2010). Bunun çeşitli nedenleri olmakla birlikte, koç spermasının dondurulmasının zorluğu ve koyunlarda suni tohumlamanın etkin yapılamaması sayılabilir. Bu nedenle araştırıcılar koç spermasının dondurma teknik ve yöntemleri üzerinde yoğunlaşmışlardır (Windsor ve ark 1994).

## 1.1.Koçlarda Spermatogenezis

Koçlarda spermatogenezisi ırk, yaş, ısı, nem, bakım ve gün ışığının uzunluğu gibi çevre faktörlerinin etkilediği ve bu faktörlerin spermatolojik özelliklerde büyük varyasyonlar oluşturduğu bildirilmektedir (Saleh 1997). Özellikle koçlardaki reprodüktif aktivitenin yılın belli dönemlerinde etkilendiği bildirilmiştir (Karagiannidis ve ark 2000). Koç ve tekede cinsel aktivitenin yıl boyunca süreklilik göstermesine karşın, aktivasyon yaz ve sonbaharda, kış ve ilkbahara göre daha yüksek olmaktadır (Delgadillo ve ark 1991).

Spermatogenezis koçlarda 46-49 gün kadar sürmektedir. Epididimal taşınma ise yaklaşık olarak 12-14 gün arasında değişmektedir. Sertoli hücrelerinden ayrılarak tubulus seminiferus lümenine geçen spermatozoonlar rete testis aracılığı ile epididimise taşınırlar. Spermatozoonlar epididimal göç sırasında olgunlaşırlar. Bu göç sırasında spermatozoonda membran permeabilitesinin artması, akrozomda büyüme ve gelişme, kuyruk organellerinin biçim ve yerlerinde değişimler, kromatinde yoğunlaşma, proteinlere bağlanma ve başın büyümesi gibi yapısal değişiklikler görülür. Ayrıca spermatozoonlar epididimal göç sırasında sitoplazmik damlacıklarını kaybederler ve motilite yeteneğini de bu geçiş sırasında kazanırlar. Ejakülasyon sırasında eklenti bezleri salgıları spermatozoonlar ile karışarak ejakülatı oluştururlar (Çoyan ve ark 2002) .

Koç ve tekede spermatogenezisin bir göstergesi olan testis ağırlığı da yıl boyunca önemli değişim göstermektedir. Testis ağırlığı, ilkbaharda genel olarak en düşük iken, yaz sonuna doğru maksimum düzeye ulaşmaktadır. Testis ağırlığı Ile – de - France ırkı koçlarda Şubat – Mart'ta 200 g, Temmuz'da 350 g ve Alpin ırkı tekelerde geç Mayıs – erken Haziran'da 100 g, geç Ekim – Kasım ortasında ise 150 g olarak saptanmıştır (Delgadillo ve ark 1991, Cheminau ve ark 1992). Koç ve tekelerde testis ağırlığı bakımından görülen farklılıklar, spermatogenezis bakımından görülen mevsimsel değişim ile ilişkilidir. Örneğin, ilkbaharda testis parankimasının gramı başına ortalama $8.5x10^6$ spermatozoa üretilirken, sonbaharda $12,2x10^6$ spermatozoa üretilmektedir (Ortavant 1959). Yine, koçlarda rete testislerden çıkan günlük sperm miktarının ilkbaharda minumum ($1x10^9$), yazın sonunda ise maksimum ($4.8x10^9$) olduğu belirlenmiştir (Dacheux ve ark 1981).

## 1.2. Koç Spermasının Genel Özellikleri

Diğer çiftlik hayvanları ile kıyaslandığında ırk, yaş, beslenme, sperma alma yöntemi, sperma alma sıklığı, sperma alma zamanı ve mevsim gibi faktörlere bağlı olmak ile birlikte koç ve tekelerde ejakulat hacmi çok düşüktür. Koç ejakulat hacmi ortalama 1 ml dir. Sağlıklı bir koç ejakulatın rengi gri-beyazdan krem rengine kadar değişim gösterebilir. Koç sperması normalde koyu kıvamlı ve düşük vizkoziteye sahiptir. Spermanın kıvamı ile yoğunluğu arasında doğrusal bir ilişki olduğu bildirilmektedir. Koç spermasının motilitesi ortalama %70, pH sı 6.2-6.9 arasında değişmekte olup $3x10^9$ /ml yoğunluğunda ve ortalama %20 anormal spermatozoon oranına sahip olduğu belirtilmektedir (Evans ve Maxwell 1987).

## 1.3. Koç Spermasının Dondurulması

Damızlık koçların spermalarının uzak mesafelerdeki hayvanlarda kullanılabilme imkanı sağlamasının yanında değerli koçların spermasının alınıp saklanmasının gerekliliği gibi faktörlere de bağlı olarak sperma dondurma çalışmaları başlatılmıştır (Emsen ve Koşum 2009).

Koç sperması dondurmaya karşı oldukça hassastır. Bu durumun temel nedeni spermatozoa membranının önemli bir kısmını doymamış yağ asitlerinin (fosfolipitler) oluşturmasıdır. Buna bağlı olarak spermatozoanın dondurulması sırasında yapılan soğutma işlemleri spermatozoa membranının geriye dönüşümü olmayan sıvı fazdan jel fazına geçmesine neden olmakta ve membran içi enzimlerin kinetiğinde değişimlere yol açarak çözüm sonu canlılığın azalmasına sebebiyet verdiği öne sürülmektedir (Watson 1995).

Spermatozoonlarda dondurmaya bağlı olarak meydana gelen hasarlar fiziksel, biyokimyasal veya fonksiyonel olabilmektedir. Fiziksel hasarlar, plazma ve akrozom membranlarında veya mitokondrial kılıfta yani spermatozoonun orta kısmında meydana gelmektedir. Koç spermatozoonlarında daha çok fiziksel hasarlara rastlanılmaktadır (Bailey ve ark 2000, Salamon ve Maxwell 2000).

Plazma ve akrozom membranları, nukleus (çekirdek) ve lokomotor denilen orta kısıma göre daha hassastırlar. Akrozomun dış membranı içteki membrana göre daha kolay hasar görmektedir (Salamon ve Maxwell 2000).

Dondurulmuş-çözdürülmüş koç spermasından elde edilen düşük fertilite oranları, araştırmacıları bu konuda çalışmaya yönlendirmiş ve farklı sulandırıcı formulasyonları, sulandırıcıya çeşitli hormon, vitamin, şeker, antioksidan maddelerin ilave edilmesine yöneltmiştir (Gökçen ve ark 1985, Chen ve ark 1993).

Sulandırıcıya katılan çeşitli kryoprotektif maddeler ise dondurulmuş-çözdürülmüş spermanın fertilitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Dolayısı ile gliserol gibi kontraseptif özelliğe sahip kryoprotektanların oranının azaltılabilmesi sulandırıcı içerisine katılacak antioksidanlara bağlı olduğu öne sürülmektedir ( Purdy 2006, Bucak ve ark 2007).

Diğer taraftan koç spermasının dondurulma başarısında aşım mevsimine geçiş döneminin ve aşım mevsimin önemli etkisinin olduğu da bildirilmistir. Koçlarda mevsimsel değişikliklerin sperma parametreleri üzerine etkili olduğunu ve dolayısıyla seminal plazmadaki spesifik proteinlerin yokluğunun ve toplam protein konsantrasyonlarındaki azalmanın donmuş spermadaki düşük motilite ile bağlantılı olabileceği bildirilmiştir (Smith ve ark 1993). Buna ek olarak yapılan çalışmalarda sezon içinde alınan koç spermasının dondurulabilme başarısının daha yüksek oldugu bildirilmiştir (Fıser ve ark 1986, Öztürkler ve ark 1999).

### 1.4. Serbest Radikaller ve Etkileri

Serbest radikaller, dış orbitalinde tek sayıda elektron bulunan atom veya moleküller olup hem organik hem de inorganik yapılarda bulunurlar. Eğer elektron eşleşmemiş ise molekül daha reaktif duruma gelir ve kararsızlaşır. Serbest radikaller yapıları, fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücresel kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli klinik durumların patogenezinde rol oynarlar (Halliwell ve Chirico 1993).

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

Yaşamın devamlılığı için gerekli oksijenin metabolitleri olan reaktif oksijen türleri, hücre fonksiyonlarında bozukluklara neden olmaktadır**.** Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin artışına ve antioksidan koruma mekanizmasında azalmaya sebep olarak üreme fonksiyonunun bozulmasına yol açmaktadır (Ulutaş ve ark 2005).

Spermatozoon tarafından düşük oranlarda üretilen serbest radikaller ise kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunun başlatılabilmesi için gereklidir (Zini ve ark 2000).

Hücrelerde reaktif oksijen türlerinin kaynakları; aktifleşmiş fagositler, antineoplastik ajanlar (bleomisin, doxurobisin, andriamisin), radyasyon, alışkanlık yapan maddeler (alkol, uyuşturucu), çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasallar, pestisitler, sigaradumanı, anestezikler), stres (streste artan katekolamin sonucu katekolaminlerin oksidasyonu), Küçük moleküllerin oksidasyonu (tiyoller, hidrokarbonlar, katekolaminler, flavinler), enzimler ve proteinler (ksantin oksidaz, triptofan dehidrojenaz, hemoglobin), mitokondrial elektron transport zinciri, endoplazmik retikulum (ER) ve nükleer membran transport sistemi (sitokrom $P_{450}$, sitokrom b5), peroksizomlar (oksidazlar, flavoproteinler), plazma membranı (lipooksijenaz, lipid peroksidasyonu, fagositlerde NADPH oksidaz), oksidatif stres yapıcı durumlar (iskemi, travma, intoksikasyon) şeklinde sıralanabilir (Kappus 1987, Cheesman ve Slater 1993, Akkuş 1995, Ozcan Oruc ve ark 2004).

Serbest radikaller, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, alerji, diabet, katarakt gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynayan ve bu nedenle son zamanlarda üzerinde en çok çalışılan konular arasında yer almaktadır. Mitokondrial, endoplazmik ve nüklear elektron transport sistemlerinde (sitokrom P-450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar sırasında bol miktarda serbest radikal üretilir. Bu radikallerin oluşumunu ve meydana getireceği hasarı önlemek için vücutta bir çok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Eğer bu radikaller savunma mekanizmalarının kapasitesini aşarlarsa hücrelerin lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli bileşenlerinde hasara neden olurlar (Aydilek ve Aksakal 2003).

Ayrıca serbest radikaller mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırır. Proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, lipooksijenaz, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktifleştirirken alfa-1-antitripsin gibi bazı savunma sistemlerini inaktive ederler (Akkuş 1995).

### 1.4.1. Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkisi

Membran lipidleri oksidanların en önemli hedeflerindendir. Hücre membranı serbest radikaller için kritik bir bariyerdir, çünkü serbest radikaller hücre komponentleri ile etkileşim için bu bariyeri geçmek zorundadır. Membran lipid peroksidasyonu sonucu membran bütünlüğü bozulması ile membran proteinleri, reseptörleri ve ayrıca bunlara bağlanan enzimler inaktive olurlar. Lipid peroksidasyonu, yağların özellikle poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif oksijen bağımlı yıkımı olarak tarif edilir ve dallanan bir zincir reaksiyonudur. Olayda genelde bir enzim varlığı gerekli olmamasına rağmen demir, bakır gibi metaller tarafından katalizlenir. Lipid peroksidasyonu, hücre zarında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin alfa-metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla başlatılmaktadır (Southorn ve Powis 1988, Del Maestro 1991, Young ve Parthasarathy 1994). Hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla yağ asidi lipid radikali halini alır. Yapıda molekül içi çift bağların yer değiştirmesi ve ardından moleküler oksijenle etkileşim sonucunda lipid peroksil radikali ortaya çıkar. Bunlar da yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de lipid hidroperoksitlerine dönüşmektedir. Lipid hidroperoksitleri yıkımlanarak biyolojik olarak aktif yapılar olan aldehit ve karbonil bileşiklerine dönüşür. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehid (MDA) dir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (Porter 1984, Placer ve ark 1990, Kalender ve ark 2002, Mercan 2004).

Ayrıca hücre yüzeyindeki hormon reseptörleri, glukoz 6 fosfat dehidrogenaz ve $Na^{+}K^{+}$-ATPaz gibi enzimler LPO sırasında inaktive olur. Böylece LPO hücrelerde dejeneratif, mutajenik ve karsinojenik bozukluklara neden olabilir (Halliwell ve Gutteridge 1996).

### 1.4.2. Serbest Radikallerin Spermatozoon Üzerine Etkileri

Sperma fonksiyonlarının aksaması ve infertilite üzerine birçok çevresel, fizyolojik ve genetik faktör etkilidir. Bu faktörlerden spermatozoonlar üzerine etkili olan serbest radikaller tarafından oluşturulan oksidatif hasar önem kazanmaktadır (Sikka 1996). Son yıllarda dondurulma ve çözdürülme esnasında spermatozoonlarda ortaya çıkan hasarlar mikro düzeyde ortaya konabilmiş, dondurulma sırasında oluşan oksidatif stresin önemli hasarlara yol açtığı bildirilmiştir (Potts ve ark 2000). Bu faktörlerin sperma fonksiyonları üzerine etki mekanizmasının anlaşılması, yeni ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi açısından önem arz etmektedir.

Oksidatif stresin normal spermatozoon fonksiyonlarını bozabileceği, spermanın yüksek oksijen basıncı altında inkubasyonu ile spermatozoon motilitesinin hızlı bir şekilde azaldığının görülmesiyle ortaya konulmuştur (MacLeod 1943). Aynı araştırmacı spermatozoonların, spermada bulunan çeşitli ajanların etkisiyle hidrojen peroksit üretebileceğini ve üretilen hidrojen peroksitin de katalaz enzimi tarafından ortadan kaldırılabileceğini belirtmiştir (O'Flaherty ve ark 1997).

Birçok türün spermasında üretilen başlıca radikalin süperoksit radikali olduğu çoğu araştırmacı tarafından belirtilmektedir (Holland ve ark 1982, Alvarez ve Storey 1983b, Alvarez ve ark 1987, Aitken ve Clarkson 1988).

Artan seminal oksidatif stres ürünleri spermatozoon DNA'sındaki hasarla birlikte spermatozoonun plazma membranında lipid peroksidasyona, spermatozoon motilitesi, metabolizması ve fertilizasyon kapasitesinde ise azalmalara neden olarak spermatozoonun fonksiyonunu engellemektedir (Armstrong ve ark 1999).

Serbest oksijen radikalleri sınırlı seviyede olduğunda spermatozoanın kapasitasyonunda fizyolojik role sahiptir (Thundathil ve ark 2003).

Spermatozoonların serbest radikallerin neden olduğu lipit peroksidasyona oldukça duyarlı olmasının nedeni, plazma membranının doymamış yağ asitleri bakımından oldukça zengin bir yapıya sahip olmasıdır. Serbest oksijen radikalleri, spermatozoon membranında yaptığı değişikliklerle membranlardaki akışkanlığı etkiler ve dejeneratif bir etki oluşturur. Çünkü membrandaki akışkanlığı sağlayan esas öğe, plazma membranında bulunan doymamış yağ yapısıdır. Lipit peroksidasyonun çok düşük oranlarda şekillenmesi bile membran akışkanlığında ani bir azalmaya neden olur. Bu durum, spermatozoonun akrozom reaksiyonu ve ovum katmanlarına penetrasyon oranını azaltır (Hammerstedt 1993, Dalvit ve ark 1998, Potts ve ark 1999, Zini ve ark 2000).

Peroksidasyonun bir sonucu olarak plazma membranı içerisinde yüksek ve düşük akışkanlığa sahip multifazik bölgelerin oluşması Fosfolipaz $A_2$ enzimini aktive eder. Aktivasyon sonucunda membranda yağ asitlerinin kaybı ve lipit tabakası üzerine zararlı etkileri olan lisofosfolipitler ortaya çıkar (Aitken ve ark 1989). Böylece peroksidatif hasar membran üzerinde yayılır ve spermatozoonların motilite ve canlılığında önemli kayıplar şekillenir (Aitken ve ark 1989, Hammerstedt 1993, Watson 2000).

Aerobik ve yarı aerobik ortamlarda oksijen radikallerinin üremesi kaçınılmazdır. Kısa süreli saklamada ağzı kapatılmış tüp içerisinde tutulan spermanın yüzeyi ile tüpün ağız kısmı arasında bulunan oksijen, aerobik metabolizmanın oluşabilmesi için yeterlidir. Buzdolabı ısısında saklanan spermatozoonların metabolizması tamamen kaybolmadığı gibi, serbest radikalleri içeren toksik ürünlerin birikimi de spermatozoonlara zarar verebilmektedir. Kısa süreli saklama sırasında ortaya çıkabilecek peroksidasyonun spermatozoon üzerinde irreverzible motilite kaybı ve plazma membranında yapısal hasar gibi olumsuz etkileri vardır (Hammerstedt 1993, Windsor ve ark 1993, Vishwanath ve Sahannon 1997).

Blesbois ve ark (1999), bekleme süresine bağlı olarak şekillenen oksidatif stresin spermatolojik özellikler üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada; horoz spermasını iki gün süreyle +2 ila +5 $^{o}$C'de saklayarak motilite, ölü-canlı, morfolojik yönden normal spermatozoon oranı ve lipit yapısındaki değişimleri izlemişlerdir. Çalışma sonunda motilite oranı %87'den %46'ya, canlı oranı %96'dan %89'a, normal spermatozoon oranı %84'den %47'ye ve toplam lipit oranı ise 820 $\mu g/10^{9}$'

dan 620 μg/$10^9$'a düşmüştür. Araştırmacılar seminal plazmada bulunan lipit miktarındaki değişimin önemli olmadığını ifade ederlerken spermatozoon membranında bulunan toplam lipit miktarındaki değişimin ise istatistiksel olarak önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Serbest oksijen türlerinin detoksifiye edilmesine yönelik olarak sperma içerisinde bulunan doğal antioksidanların (glutatyon peroksidaz, glutatyon, vitamin C, taurin) düzeyleri spermatozoada donma-çözünme sırasında oluşan (soğuk şoku, ozmotik değişim, lipit peroksidasyonu gibi) hasarları engelleyememektedir (Griveau ve ark 1995, Bilodeau ve ark 2000).

Özellikle yetersiz antioksidan madde içeren tris-yumurta sarısı gibi sulandırıcılar, dondurma-çözdürme sırasında ortaya çıkan oksidatif stres ve reaktif oksijen radikallerine karşı spermatozoaya yeterli koruma sağlayamamaktadır (Parrish ve ark 1986).

Bu olumsuz etkilere ilave olarak hücre organellerinde gözlenen yapısal değişiklikler ile DNA kırılmalarına karşı çeşitli antioksidanlar sperma sulandırıcılarına eklenmeye başlamıştır (Bucak ve ark 2007).

Antioksidanlar genel anlamda serbest radikallerin şekillenmesini inhibe ederek organizmayı zararlı etkilerinden korumakta ve bu sayede hücreler oksidatif hasara karşı vital fonksiyonlarını sürdürmektedirler (Özata ve ark 2003).

### 1.5. Antioksidanların İşlevi

Serbest oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak bilinirler (Akkuş 1995).

Genel olarak antioksidan maddelerin görevi; serbest radikallerin hidrojen koparıp çalmasında kendilerini ortaya atarak serbest radikallere hidrojen verip etkinliklerini durdurmaktır. Yani antioksidan maddeler, serbest radikalleri daha başlangıçta doyurarak onların devamlı etkinliklerine mani olmaktadır. Fakat serbest radikal oluşumu ışık ve metaller nedeniyle devam ediyorsa buna bağlı olarak antioksidan madde gittikçe harcanıp tüketilecektir. Eğer gerekli tedbirler alınıp da

yeterli miktarda antioksidan katılmış ise daha önce serbest radikaller durdurulmuş olacaktır ve antioksidan etki uzun süre devam edecektir (Çakmak 2003).

Antioksidanların serbest oksijen radikallerine karşı etkileri; zincir reaksiyonun başlamasını durdurmaları, başlayan radikal zincir reaksiyonunu kırmaları, radikal oluşumunun başlamasına engel olmaları, peroksitleri parçalamaları ve lokal oksijen yoğunluğunu azaltmaları suretiyle şekillenmektedir (Cheeseman ve Slater 1993).

Her antioksidan farklı serbest radikale etkilidir ve antioksidanlar kombine edildiklerinde birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler (Vishwanath ve Sahannon 1997, Upreti ve ark 1997).

Antioksidatif savunma mekanizmaları; A, E, C vitaminleri, β-karoten, indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi bazı vitamin ve kimyasal maddeler ile çeşitli antioksidan ve enzimlerden oluşur. E vitamini, yapısındaki fenolik hidroksil grubundan dolayı güçlü bir antioksidan özellik gösterir. Zincir kırıcı antioksidatif etkinliği ile membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA) serbest radikal hasarından koruyan ilk savunma hattını oluşturur (Aydilek ve Aksakal 2003). Vitamin E'nin en önemli fonksiyonlarından birisi intrasellüler antioksidan olarak işlev görmesidir. Hücre zarlarındaki doymamış bağ taşıyan lipitlerin oksidasyonunu önleyerek zar yapısının bozulmasını engeller. Aynı zamanda metabolik reaksiyonlar esnasında meydana gelen ve oldukça zararlı olan serbest radikalleri nötralize ederek toksik etkilerini önler. Bir molekül Vit. E, 100 molekül doymamış yağ asidinin peroksidasyonunu önleyebilmektedir (Başpınar ve Kurtoğlu 2003).

En önemli antioksidan enzimler; süperoksit anyonunu $H_2O_2$'ye dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve $H_2O_2$'yi suya indirgeyen katalazdır (Guemouri ve ark 1991).

### 1.6. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar genel olarak primer ve sekonder (antioksidan sinerjistleri) olmak üzere iki şekilde sınıflandırılırlar.

### 1.6.1.Primer antioksidanlar

Birincil ya da diğer adıyla zincir parçalayan antioksidanlar; lipid radikalleri ile ortamdaki oksijeni kullanarak daha kararlı bir ürün oluşumunu sağlamaktadırlar. Bu bileşenler, fenolik yapıda olup, serbest radikal zincirlerinin lipid oksidasyonunu engellemektedirler. Doğal ve sentetik tokoferoller, alkil galatlar, BHA, BHT, tersiyer bütil hidrokinon bu gruba bağlı olarak fonksiyon göstermektedirler (Djarmati ve ark 1991).

Sağlıklı dokuda oksijen, atmosfere göre daha düşük oranda olduğundan biyolojik dokularda oksijen basıncı önemlidir. Çoğu gıda antioksidanları lipid otooksidanlarını engellemektedirler. Ayrıca fenolik antioksidanlar, indüksiyon periyot süresinin uzamasında etkilidirler. Yağ içerisine katılmaları durumunda, büyük oranda bozunmayı geciktirirler (Cuvelier 1994).

Otooksidasyon reaksiyonları üzerinde antioksidan konsantrasyonlarının etkisi pek çok faktöre bağlıdır. Bunlar arasında antioksidanların yapısı, oksidasyon koşulları, oksidasyona uğramış yapıdaki değişimler sayılabilir. Fenolik antioksidanların, antioksidan aktivitesi yüksek konsantrasyonlarda etkinliğini yitirmektedir. Bunlar prooksidant yapı kazanırlar. Bu durum aşağıdaki reaksiyonlarda açıklanmaktadır:

$AH + O_2 \rightarrow A + HOO$

$AH + ROOH \rightarrow RO + H_2O + A$

Endo (1985), klorofilin karanlıkta antioksidan etkisini bu mekanizma ile açıklamaya çalışmıştır.

### 1.6.2. Sekonder antioksidanlar

Sekonder antioksidanlar diğer adı ile antioksidan sinerjistleri, ortamda primer antioksidanlar bulunmadığı durumda aktivite gösteremezken tersi durumda lipidlerin otooksidasyon reaksiyonunu geciktiren, otooksidasyon zincirinin, serbest radikallerden kararlı türlere dönüşümünü sağlayan bileşikler haline dönüşürler. Bunlar, metal iyonları ile reaksiyon sonucunda etkili hale gelmektedirler. İndirgen ajanlardan askorbik asit, ortamda tokoferollerin ya da diğer fenolik maddelerin bulunması ile sinerjist etki gösterebilmektedir (Özdalyan 1998).

***Şelat yapıcı ajanlar***

Bunlar, prooksidan ortamdaki, metal iyonlarını bağlayarak, hidroperoksitlerin bozunması sonucunda radikal olmayan türlerin elde edilmesini içerirler. Gıda lipidleri genellikle iz miktarda metal iyonları içermektedir. İyonlar ortamda enzimler ya da bunların bozunma ürünlerinin bulunuşu ile artmaktadır. Metal iyonları, rafinasyon ekipmanlarında, metal kaplarda ya da hidrojenasyon süreçlerinde yoğun olarak bulunmaktadır. Örneğin sitrik asit, amino asit, etilen diamin tetra asetikasit (EDTA) bunlar arasında sayılabilir. Metalik iyonlarla, örneğin bakır ve demir katalitik olaylarda lipid oksidasyonunu hızlandırırlar. Kelatlar bazen sinerjist etki gösterebilirler. Bunlar genellikle fenolik antioksidanların aktivitesini desteklerler. Ayrıca bunlardan bazıları prooksidan aktiviteye sahiptirler (Rossel 1983).

***Oksijen tutucu ajanlar***

UV radyasyonunu absorplayarak ya da tekli oksijeni kullanarak aktivite gösterirler. Bu gruba örnek olarak verilen askorbik asit (vitamin C), askorbil palmitat, izo askorbik asit ve sodyum tuzları yağ içeren gıdalarda stabiliteyi sağlamak amacıyla kullanılırlar. Askorbil palmitatın % 0.01 oranında katılması bitkisel yağlardaki acılığı giderme yönünden BHA ve BHT' den çok daha etkilidir. Oksijen tutucu özellikteki askorbik asitin aktivitesi, şişelenmiş ve kutulanmış ürünlerde etkilidir. Ancak yağlı gıdalarda kullanımı önerilen askorbil palmitat, yağ fazında çözünürlüğü arttırıcı etkisi nedeniyle kullanılmaktadır (Cuvelier ve ark 1992).

## 1.7. Antioksidanların Sperma Dondurulmasındaki Etkileri

Dondurulmuş/çözdürülmüş spermatozoanın kolay lipit peroksidasyonuna uğraması ve membranların büyük oranda lipit içermesi gelişen peroksidatif hasara ve sperm disfonksiyonlarına karşı etkili antioksidan sistemlerinin araştırılmasına yol açmıştır (Alvarez ve Storey 1983a, Bilodeu ve ark 2000).

Memeli hayvanların vücut sıvıları ve reprodüktif dokularında yüksek oranlarda bulunan antioksidan maddeler, eksojen olarak sperma sulandırıcılarına katıldığında spermadaki serbest radikallerin neden olduğu hücre membranlarındaki yağ asitleri ve fosfolipitlerin peroksidasyonunu minimuma indirmektedir. Böylece

lipit peroksidasyonunun spermatozoon akrozomunda neden olduğu hasar azaltılabilmekte ve dolayısıyla elde edilen döl verimi önemli ölçüde yükseltilebilmektedir (Aitken ve ark 1989, Beconi ve ark 1991, Vishwanath ve Sahannon 1997, Donnelly ve ark 2000).

Koç spermatozoası diğer türlere göre daha yüksek oranda lipit içermektedir. Bu durum donma esnasında meydana gelen oksidatif strese duyarlılığı artırmakta, spermatozoon plazma membran hasarlarına, motilite kaybına, akrozom bütünlüğünün bozulmasına ve fertilite kayıplarına yol açmaktadır. Son yıllarda doğal olarak epididymis ve seminal plazmanın yapısında yüksek konsantrasyonlarda bulunan inositol, taurin, hipotaurin, askorbik asit, desferal, prolin, alfa-tokoferol, BHT, SOD, katalaz gibi maddelerin antioksidan özelliklerinden faydalanma yoluna gidilmiştir (Pomares ve ark 1994). Antioksidan özelliği olan maddeler in vitro koşullarda koç spermasının kısa ve uzun süreli saklanmasında lipid peroksidasyona karşı spermatozoon motilitesini ve spermatozoanın membran bütünlüğünü korumaktadır (Dziuk ve ark 1972).

Seminal plazma, içerdiği antioksidan etkili maddeler ile spermatozoonları oksidatif strese karşı korur. Spermatozoonun DNA'sı ise oksidatif strese karşı kendisinin güçlü yapısı ve seminal plazmada bulunan antioksidan maddeler tarafından korunmaktadır ( Saleh ve Agarwal 2002).

Birçok araştırıcı çeşitli antioksidanları kullanarak farklı yöntemlerle koç spermasını kısa süreli saklamışlar ve dondurmuşlardır.

Dondurulmuş koç spermasından döl verimini artırmak amacıyla özellikle dondurma aşamasında spermaya antioksidanlar, vitaminler ve hormonlar katılmaktadır. Vit. E'nin koç spermatozoonlarının membran bütünlüğünü koruyarak ve membran dayanıklılığını artırarak akrozom bozukluklarının oluşmasını önlediği ve bu nedenle Vit E katılarak dondurulmuş koç spermalarıyla daha iyi döl verimi sağlandığı belirtilmiştir ( Gökçen ve ark 1985). Ayrıca, Vit E'nin bulunduğu ortamda peroksitlerin yıkımlandığı ya da üretimlerinin azaldığı ve oksidasyonun yavaşladığı bildirilmektedir (Tümen ve ark 1991).

Sanchez-Partida ve ark (1997), koç spermasının dondurulmasında 100 mM ve üzeri konsantrasyonlarda kullanılan taurinin daha düşük dozlarının tersine spermatozoa motilitesini önemli ölçüde düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Gökçen ve ark (1985), koçlarda ejakülatın bir bölümüne $PGF_2\alpha$, bir bölümüne Vit E katmışlar ve bir bölümünü ise kontrol olarak bırakmışlardır. Spermayı dondurup çözdürdüklerinde, çözdürme sonrası akrozom bozukluğu oranının Vit E katılan grupta diğer gruplara göre önemli derecede düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Uysal ve Bucak (2007)'ın koç spermasını 5 mM, 10 mM ve 20 mM sistein ekledikleri ve sisteinsiz tris (kontrol) sulandırıcılarıyla dondurdukları çalışmadan elde ettikleri spermatozoa motilitesi, 10 mM sistein içeren sulandırıcı grubu hariç paralellik göstermektedir.

Sarlós ve ark (2002), koç spermasına antioksidan kattıkları çalışmalarında 48. saate kadar antioksidanın koruyucu etkili olduğunu, bu saatten sonra ise motilitede belirgin bir düşüş görüldüğünü bildirmektedirler.

Uysal ve ark (2007) farklı antioksidanlar eklenmiş sulandırıcıyla boğa spermasını dondurmuşlar ve hyaluronik asit ve sistein eklenmiş gruplarda anormal spermatozoa oranlarını sırasıyla % 8.1 ve % 11 olarak tespit etmişlerdir.

Bucak ve ark (2007), koç spermasını kısa süreli sakladıkları bir çalışmada, hipoozmotik şişme testi (HOS-test) yönüyle değerlendirmişler ve saklamanın 24. saatinde taurin (50 mM), glutatyon (5 mM), trehaloz (50 mM) gruplarının, 24. ve 30. saatte ise sadece trehaloz (50 mM) içeren grubun (%60.0±1.2 ve %58.1±1.8), diğer gruplara göre önemli oranda spermatozoon plazma membran bütünlüğünü sağladığını belirtmişlerdir.

Pomares ve ark (1994) yaptıkları çalışmalarında, sperma sulandırıcısına glutatyon peroksidaz katarak dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası akrozom bozukluklarının azaldığını tespit etmişlerdir.

Uysal ve ark (2000), farklı antioksidanlarla dondurdukları koç spermalarından çözdürme sonrası en yüksek spermatozoa motilitesini (%62.83) ve en düşük anormal spermatozoa oranı (%15.83) ile ölü spermatozoa oranını (%32.77) 50 mM taurin

bulunduran Hepes sulandırıcısıyla elde etmişlerdir. Yine Uysal ve ark (2000), 10 mM Vitamin C veya 50 mM taurin içeren Tris ve Hepes sulandırıcılarıyla dondurdukları Akkaraman ırkı koçlardan çözdürme sonrası en iyi sonuçları hepes+taurinle elde etmişlerdir.

Maxwell ve Stojanov (1996), koç spermasına kattıkları SOD, katalaz, sitokrom-c ve glutatyon peroksidazın spermatozoa motilitesinde zamana bağlı olarak şekillenen düşüşü azalttığını ve akrozom bütünlüğünü koruduğunu bildirmişlerdir.

Tekin ve ark (2006), koç spermasını 20, 50 ve 80 mM taurin içeren ve taurin içermeyen (kontrol) tris sulandırıcısıyla sulandırmışlar ve dondurma-çözdürme sonrası spermatozoa motilitesini sırasıyla % 38.7, 31.1, 26.5 ve 34.4 ve anormal spermatozoa oranını % 18.7, 18.4, 17.0 ve 19.0 olarak bulmuşlardır.

Çoyan ve ark (2010), yaptıkları bir çalışmada koç spermasını tris sulandırıcısıyla sulandırarak metiyonin (1,2,4 mM) içeren grupları + 5 $^{0}$C'de 24, 48 ve 72 saat süreyle ekilibre etmişler ve 1 mM metiyoninin (%77 ± 1.2) 72 saat sonunda motilite oranı verdiğini vurgulamışlardır.

Berlinguer ve ark (2007), koç spermasına trehaloz katarak sulandırmışlar ve muhafaza süresi boyunca yaptıkları kontrollerde antioksidanların spermatozoon canlılığı üzerine olumlu etkisi olduğunu saptamışlardır.

Ateşşahin ve ark (2008) Ankara teke spermasını 5 mM, 10 mM ve 15 mM sistein ekledikleri ve sisteinsiz tris (kontrol) sulandırıcılarıyla dondurdukları çalışmadan elde ettikleri akrozoma bağlı anormal spermatozoa oranlarını sırasıyla % 9, % 9.5, % 6.6 ve % 8.7 olarak bulmuşlardır.

Bucak ve Uysal (2008) Saanen teke spermasını 5 mM sistein, 25 mM taurin, 50 mM trehaloz katılan ve antioksidan kullanılmayan tris kontrol grubu sulandırıcılarıyla dondurdukları spermalardan çözdürme sonrası sırasıyla % 64, % 46, % 54, % 53'lük motilite elde etmişlerdir.

Sanchez-Partida ve ark (1997), yaptıkları bir çalışmada koç spermasında çözdürme sonrası spermatozoa motilitesini, 50 mM taurin katılmış % 3-5 gliserol bulunduran Tris sulandırıcısıyla % 60' ın üzerinde bulduklarını belirlemişlerdir.

Pena ve ark (2004) sperma sulandırıcılarına hyaluronik asit katılmasının motilite kaybını azalttığı ve spermatozoon membran bütünlüğünü daha iyi koruduğunu saptamışlardır. Mara ve ark. (2007) teke spermasını yağsız süt tozu, tempol ve tempol+hyaluronik asit sulandırıcıları kullanarak 4$^{o}$C 'de 24 saat kısa süreli olarak saklamışlar ve hyaluronik asit eklenmiş sulandırıcı grubunun spermatozoa motilitesini daha iyi koruduğunu bildirmişlerdir

### 1.7.1. Curcumin, Ellagik asit ve Metiyoninin Antioksidatif Etkinliği

Curcumin, polifenolik yapıda olup içeriğindeki hidroksil grupları antioksidan özellik kazandırmaktadır (Gupta ve ark 2009). Curcumin serbest radikalleri tutarak DNA'yı oksidatif hasardan korur (Ahsan ve ark 1999). Radyasyona karşı koruyucu etkisi, antioksidan özelliğinden kaynaklanmaktadır. Radyasyon hasarında ortaya çıkan serbest radikalleri bağlar (Sreejayan ve ark 1997).

Curcuminin hidroksi ve azotdioksit radikalleri içeren farklı reaktif oksijen türlerini giderdiği belirtilmiştir. Aynı zamanda farklı hayvan modellerinde de lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği görülmüştür (Reddy ve Lokesh 1994, Sreejayan ve Rao 1994, Unnikrishnan ve Rao 1995).

Curcuminin kuvvetli bir antioksidan olduğu kadar antiviral, antikarsinojen, antimikrobiyal, antiparaziter, yangı giderici, kolesterolü düşürücü etkisi ve immun sistemi destekleyici etkisi olduğu görülmüştür. Ayrıca curcuminin GST adı verilen kanserojen maddelerin vücuttan atılmasında görev alan ve DNA zararına karşı dokuları koruduğu düşünülen enzimi faaliyete geçirdiği bildirilmektedir (Sharma ve ark 2001, Koo ve ark 2004).

Bucak ve ark (2010a) yaptıkları bir çalışmada Ankara keçisi spermasını curcumin (2.5, 5, 10 mM), inositol (2.5, 5, 10 mM), karnitin (2.5, 5, 10 mM) içeren ve antioksidan içermeyen tris sulandırıcısıyla sulandırmışlar ve dondurma-çözdürme sonrası 2.5 mM curcuminin % 65±3 motilite verdiğini görmüşler ve kontrol, inositol (2.5, 5, 10 mM) ve 10 mM karnitine göre anlamlı oranda yüksek sonuç verdiğini kaydetmişlerdir.

Sisteinle birlikte standart 20 aminoasit arasında sülfür atomu içeren aminoasitlerden bir diğeri de metiyonindir. Metiyonin türevi olan S-adenozil metiyonin, enzimatik reaksiyonlarda metil grubu vericisidir. Metiyonin, transsülfürasyon reaksiyonlarındaki katkısıyla sistein, karnitin ve taurin sentezinde rol alır. Ayrıca fosfatidilkolin ve diğer fosfolipidlerin sentezinde de kullanılır. Metiyoninin vücutta yanlış dönüşümü ateroskleroza yol açabilir. Standart genetik kodda sadece bir kodona sahip olan iki aminoasitten biri metiyonin (AUG), diğeri ise triptofandır (UGG). Metiyonin kodonunun diğer bir özelliği, ribozomların mRNA'dan protein sentezleme işlemine başlayabilmeleri için başlangıç sinyalini taşımasıdır (Kahraman 2008).

Metiyonin hücreleri oksidatif hasardan korur ve detoksifikasyonda önemli bir rol oynayarak şelatları dokulardan uzaklaştırır (Patra ve ark 2001). Ayrıca metiyoninin önemli bir etkisi de serbest oksijen radikallerinin redüksiyonunda önemli bir rol oynamasıdır (Liu ve ark 2008).

Tuncer ve ark (2010), Angora tekesi spermasını rafinoz (2.5, 5, 10 mM) ve metiyonin (2.5, 5, 10 mM) içeren ve antioksidan içermeyen tris sulandırıcısıyla sulandırmışlar ve dondurma-çözdürme sonrası 2.5 mM ve 5 mM metiyoninin özellikle kontrole göre sırasıyla % 63,6 ± 7 ve 63,4 ± 3.1 motilite oranlarıyla yüksek bulmuşlardır.

Çoyan ve ark (2010) yaptıkları bir çalışmada koç spermasını tris sulandırıcısıyla sulandırarak metiyonin (1,2,4 mM), ditiyoeritritol (0.5, 1, 2 mM) ve kontrol içeren grupları + 5 $^{0}$C'de 24, 48 ve 72 saat süreyle ekilibre etmişler ve 1 mM metiyoninin (%77 ± 1.2) 72 saat sonunda kontrol grubuna (%66 ± 4.9) göre anlamlı oranda yüksek motilite oranı bulmuşlardır.

Doğal bitki fenolü içeren ellagik asit ise kuvvetli bir antioksidan olup aynı zamanda antimutajenik ve antikarsinojenik özellikler içerir. Özellikle pankreatik kanser hücrelerinde üremeyi baskılayıcı ve apoptozisi indükleyici etkisi vardır (Edderkaoui ve ark 2008).

Yapılan bir çalışmada ellagik asit ve quersetin gibi fenolik maddelerin farelerin akciğerlerinde antikarsinojenik etki gösterdiği belirtilmiştir (Khanduja ve ark 1999).

Yapılan başka bir çalışmada ise ratların karaciğer dokusunda mikrosomal proteinlere bağlanan ellagik asitin lipid peroksidasyonunu engellediği bildirilmiştir (Priyadarsini ve ark 2002).

Özkaya ve ark (2010) yaptıkları bir çalışmada ellagik asitin, alüminyum klorür ($AlCl_3$)'ün ratların karaciğerinde oluşturduğu oksidatif stresi azalttığı, glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) aktivitelerini ise artırdığı vurgulanmıştır.

Türk ve ark (2008), ratlarda yaptıkları bir çalışmada ellagik asitin epididimal sperm yoğunluğunu ve sperm motilitesini artırdığını ve anormal sperm oranlarında artışa sebep olan cisplatinin etkinliğini azalttığını belirtmişlerdir.

Benzer bir çalışmada da Çeribaşı ve ark (2011), ratlarda adriamisinin epididimal sperm parametreleri üzerine gösterdiği olumsuz etkilere ve testislerde oluşturduğu lipid peroksidasyon ve apoptozise karşı ellagik asitin koruyucu etki gösterdiğini vurgulamışlardır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

Çalışmada 2-5 yaşlı 4 baş ergin Konya-Merinos koçtan alınan ejakülatlar kullanıldı. Koçların bakım ve beslemesi Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Arastırma ve Uygulama Çiftliğinde standart yetiştirme koşullarında yapıldı.

### 2.2. Yöntem

Ejakülatlar, aşım sezonunda (sonbahar) ve aşım sezon dışında (ilkbahar) suni vajen yardımıyla haftada iki kez, 4 hafta süresince alındı. Alınan ejakülatlardan uygun özellik (sperma yoğunluğu $\geq 3\times10^9$ spermatozoa/ml; motilite $\geq$% 80) gösterenler pooling yapılarak spermanın sulandırılması ve dondurulması işleminde kullanıldı.

Spermaların sulandırılmasında temel Tris sulandırıcısına (297.58 mM tris, 96.32 mM sitrik asit, 82.66 mM fruktoz) %15 yumurta sarısı, gliserol %5, penisilin 500 IU/ml, streptomisin 500 IU/ml ilave edildi. Hazırlanan sulandırıcının pH'sı 6,8-7,0 olarak ayarlandı. Pooling yapılan ejakülatlar 32ºC'ta 10 eşit hacme bölünerek curcumin (1 mM, 2 mM, 4 mM), ellagik asit (1 mM, 2 mM, 4 mM), methionin (1 mM, 2 mM, 4 mM) içeren ve antioksidan içermeyen (kontrol) Tris sulandırıcısıyla ml'de yaklaşık $4\times10^8$ spermatozoa olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırma işlemini takiben sperma numuneleri 10 dakika oda ısısında tutuldu. Ardından 0.25 ml'lik payetlere çekilerek yaklaşık 120-150 dakika +5$^o$C'ta ekilibrasyona bırakıldı ve ekilibrasyonu izleyen süreçte sıvı azot buharında (~-120$^o$C) 10 dakika dondurularak -196$^o$C'taki sıvı azotta saklandı. Çalışma aşım sezonunda 8, aşım sezonu dışında 8, toplamda 16 replikasyondan oluştu.

Çalışmada antioksidan içeren ve içermeyen sperma numuneleri, sulandırma, ekilibrasyon ve dondurma/çözdürme sonrası spermatolojik muayenelerden spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa oranı ve hipoozmotik şişme testi (HOST) yönüyle değerlendirildi. Spermalar en az 48 saat sıvı azotta bekletilen payetlerin 37$^o$C'ta 30 saniye bekletilmesiyle çözdürüldü.

Spermatozoa motilitesi 37$^o$C'ta ısıtma tablalı faz kontrast mikroskobun 400x büyütmesinde lam-lamel arasına alınan bir damla sperma numunesinde en az 3 mikroskop sahasına bakıldı, sahalardaki motilite değerlerinin ortalaması % motilite

oranı olarak kaydedildi. Anormal spermatozoa oranı Hancock sıvısına alınan sperma numunesinin faz kontrast mikroskopun immersiyon objektifinde lam-lamel arasına alınan bir damlasında spermatozoa baş, akrozom ve kuyruk anomalilerinin % olarak tespit edilmesiyle belirlendi. Plazma membranının fonksiyonel bütünlüğünün belirlenmesi için HOS-test uygulandı. HOS-test, 100 mOsM hipoozmotik sıvının 300 µl'sinin 30 µl sperma numunesiyle karıştırılarak 37$^{o}$C'ta bir saat bekletilmesiyle yapıldı. Bu karışımdan yapılan frotide faz kontrast mikroskopun 400x büyütmesinde toplam 400 spermatozoa sayıldı, bunlardan kıvrık ve şişmiş kuyruğa sahip olanlar % olarak ifade edildi.

### 2.2.1. İstatistiki Hesaplamalar

İstatistik analizlerde farklı grupların karşılaştırılmasında varyans analizi, aralarında önemli farklılık bulunan ikiden fazla grubu karşılaştırmak için de Post Hoc Tukey HSD testi uygulandı. İstatistik programı olarak SPSS 15.0 for Windows Evaluation Version kullanıldı. Farklılığın $P<0.05$ düzeyde olması önemli kabul edildi.

## 3. BULGULAR

### 3.1. Sperma Numunelerinde Sezon İçi Sulandırma Sonu Bulgular

Elde edilen bulgular Çizelge 1.1.'de verildi. Motilite bulguları açısından antioksidan içeren gruplar kontrol grubuna göre belirgin bir üstünlük sağladı (P<0.05). Anormal spermatozoa oranları değerlendirildiğinde baş ve akrozom dışındaki diğer bölgeler açısından C 4 mM (10,1 ±0.6), kontrol(12,6 ±0.9) grubuna göre koruma gösterdi (P<0.05). Gruplar arasında HOST, anormal baş ve anormal akrozom düzeyleri yönünden önemli bir fark görülmedi (P>0.05).

Çizelge 1.1. :Sezon içi sulandırma sonrasına ait spermatolojik parametreler (x±SEM)

| **Sezon İçi Sulandırma Sonu Parametreler** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Gruplar** | **Motilite** % | **Host** % | **Anormal Spermatozoa Oranı** % | | |
| | | | **Baş** | **Akrozom** | **Diğer** |
| Kontrol | 75,0 ± 0,0 [b] | 68.1 ± 2.5 | 2.5 ± 0.9 | 1.3 ± 0.5 | 12.6 ± 0.9 [a] |
| Metiyonin 1 mM | 83,1± 2,5 [a] | 66.8 ± 3.7 | 3.0 ± 0.5 | 1.2 ± 0.4 | 11.7 ±1.9 [ab] |
| Metiyonin 2 mM | 79,3 ± 4,9 [a] | 65.0 ± 2.6 | 2.8 ± 0.6 | 1.6 ± 0.5 | 11.8 ±1.3 [ab] |
| Metiyonin 4 mM | 79,3 ± 6,2 [a] | 66.8 ± 3.7 | 3.0 ± 0.5 | 2.0 ± 0.5 | 10.5 ±1.5 [ab] |
| Curcumin 1mM | 82,5 ± 3,7 [a] | 65.6 ± 4.1 | 2.5 ± 0.7 | 1.5 ± 0.5 | 11.5 ±1.6 [ab] |
| Curcumin 2 mM | 81,8 ± 5,3 [a] | 66.8 ± 3.7 | 2.2 ± 0.8 | 1.6 ± 0.7 | 11.7 ±1.6 [ab] |
| Curcumin 4 mM | 81,8 ± 2,5 [a] | 66.2 ± 3.5 | 2.3 ± 0.5 | 1.5 ± 0.7 | 10.1 ± 0.6 [b] |
| Ellagikasit 1mM | 80,6 ± 5,6 [a] | 66.8 ± 3.7 | 2.0 ± 0.9 | 1.2 ± 0.4 | 11.8 ± 0.9 [ab] |
| Ellagikasit 2 mM | 82,5 ± 2,6 [a] | 68.7 ± 2.3 | 2.0 ± 0.9 | 1.5 ± 0.5 | 10.8 ±1.2 [ab] |
| Ellagikasit 4 mM | 81,8 ± 4,5 [a] | 67.5 ± 2.6 | 2.6 ± 0.7 | 1.6 ± 0.7 | 10.5 ± 0.9 [ab] |
| p | * | - | - | - | * |

a-b: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir

(*: P<0.05).

-: Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05).

### 3.2. Sperma Numunelerinde Sezon İçi Ekilibrasyon Sonu Bulgular

Elde edilen bulgular Çizelge 1.2.'de verildi. HOST değerleri açısından M 2 mM ( 65,0 ±2.6), kontrol (58,1 ±3.7)'e göre daha yüksek membran koruyucu etkinlik sağladı (P<0.05). Anormal baş oranları açısından E 1 mM ( 2,1 ±0.8), kontrol ( 3,2

±0.4) grubuna nazaran düşük değer gösterirken (P<0.05) , diğer gruplar arasındaki farklılık önemsizdi. (P>0.05). Motilite, anormal akrozom ve diğer bölgelerdeki anomali oranları gruplar arasında bir farklılık göstermedi (P>0.05).

Çizelge 1.2.:Sezon içi ekilibrasyon sonrasına ait spermatolojik parametreler(x±SEM)

| **Sezon İçi Ekilibrasyon Sonu Parametreler** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Gruplar** | **Motilite %** | **Host %** | **Anormal Spermatozoa Oranı %** | | |
| | | | **Baş** | **Akrozom** | **Diğer** |
| Kontrol | 78.1 ± 5.3 | 58.1 ±3.7 [b] | 3.2 ± 0.4 [a] | 2.2 ±0.4 | 12.8 ±1.1 |
| Metiyonin 1 mM | 75.6 ± 4.1 | 61.8 ±2.5 [ab] | 3.1 ± 0.3 [ab] | 2.0 ±0.7 | 12.8 ±1.1 |
| Metiyonin 2 mM | 70.0 ± 8.4 | 65.0 ±2.6 [a] | 3.0 ± 0.5 [ab] | 2.2 ±0.7 | 12.7 ±0.8 |
| Metiyonin 4 mM | 70.0 ±10.3 | 60.6 ±4.1 [ab] | 2.6 ± 0.7 [ab] | 2.7 ±0.4 | 11.7 ±1.0 |
| Curcumin 1 mM | 73.7 ± 7.4 | 60.0 ±3.7 [ab] | 2.6 ± 0.5 [ab] | 2.1 ±0.6 | 12.2 ±1.2 |
| Curcumin 2 mM | 75.0 ± 7.0 | 61.2 ±3.5 [ab] | 2.5 ± 0.7 [ab] | 2.5 ±0.5 | 12.0 ±1.6 |
| Curcumin 4 mM | 72.5 ± 8.4 | 61.2 ±3.5 [ab] | 2.3 ± 0.5 [ab] | 2.3 ±0.5 | 11.2 ±0.7 |
| Ellagik asit 1 mM | 72.5 ± 5.9 | 61.8 ±3.7 [ab] | 2.1 ± 0.8 [b] | 2.2 ±0.4 | 12.8 ±0.9 |
| Ellagik asit 2 mM | 73.7 ± 6.4 | 62.5 ±2.6 [ab] | 2.5 ± 0.5 [ab] | 2.0 ±0.7 | 12.0 ±0.7 |
| Ellagik asit 4 mM | 73.7 ± 5.1 | 61.8 ±2.5 [ab] | 2.7 ± 0.7 [ab] | 2.2 ±0.4 | 11.6 ±0.5 |
| p | - | * | * | - | - |

a-b: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir

(*: P<0.05).

-: Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05).

### 3.3. Sperma Numunelerinde Sezon İçi Dondurma-Çözdürme Sonu Bulgular

Elde edilen bulgular Çizelge 1.3.'de verildi. HOST ve anormal akrozom düzeyleri gruplar arasında anlamlı bir fark göstermedi (P>0.05). Motilite oranlarına bakıldığında kontrol (45,0 ±5,9) grubu, antioksidan gruplarına göre daha düşük spermatozoa motilitesi oranı verdi. Anormal baş oranı açısından E 1 mM (2,3 ±0.9), kontrol (3,6 ±0.9)'e göre daha düşük değer gösterdi (P<0.05). Ayrıca baş ve akrozom dışındaki diğer bölgeler açısından anormal spermatozoa düzeyleri için C 4 mM (12,2 ±0.4) ve E 4 mM (12,2 ±0.7) gruplarının, kontrol (13,7 ±1.0) ve M 1 mM (13,8 ±0.8) 'a göre önemli ölçüde koruma sağladığı belirlendi (P<0.05).

Çizelge 1.3. : Sezon içi dondurma-çözdürme sonrasına ait spermatolojik parametreler (x±SEM)

| Sezon İçi Dondurma-Çözdürme Sonu Parametreler | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Gruplar** | **Motilite %** | **Host %** | **Anormal Spermatozoa Oranı %** | | |
| | | | **Baş** | **Akrozom** | **Diğer** |
| Kontrol | 45.0 ± 5.9 [b] | 52.5 ± 2.6 | 3.6 ± 0.9 [a] | 2.5 ± 0.5 | 13.7 ± 1.0 [a] |
| Metiyonin 1 mM | 58.7 ± 8.7 [a] | 54.3 ± 3.2 | 3.1 ± 0.3 [ab] | 2.7 ± 0.4 | 13.8 ± 0.8 [a] |
| Metiyonin 2 mM | 51.2 ± 9.1 [a] | 51.8 ± 2.5 | 3.3 ± 0.5 [ab] | 3.0 ± 0.7 | 13.6 ± 1.1 [ab] |
| Metiyonin 4 mM | 53.1 ± 12.2 [a] | 51.8 ± 3.7 | 3.2 ± 0.7 [ab] | 3.1 ± 0.6 | 13.5 ± 0.7 [ab] |
| Curcumin 1 mM | 53.7 ± 7.4 [a] | 51.8 ± 4.5 | 2.8 ± 0.6 [ab] | 3.0 ± 0.5 | 13.0 ± 1.0 [ab] |
| Curcumin 2 mM | 55.0 ± 3.7 [a] | 51.8 ± 2.5 | 2.6 ± 0.7 [ab] | 3.3 ± 0.5 | 13.5 ± 0.9 [ab] |
| Curcumin 4 mM | 50.6 ± 4.9 [a] | 52.5 ± 2.6 | 2.8 ± 0.6 [ab] | 3.1 ± 0.6 | 12.2 ± 0.4 [b] |
| Ellagik asit 1 mM | 54.3 ± 5.6 [a] | 52.5 ± 2.6 | 2.3 ± 0.9 [b] | 3.2 ± 0.7 | 13.6 ± 0.9 [ab] |
| Ellagik asit 2 mM | 56.2 ± 8.3 [a] | 53.7 ± 3.5 | 3.0 ± 0.7 [ab] | 2.7 ± 1.1 | 13.3 ± 0.7 [ab] |
| Ellagik asit 4 mM | 54.3 ± 8.2 [a] | 52.5 ± 2.6 | 2.8 ± 0.8 [ab] | 3.2 ± 0.4 | 12.2 ± 0.7 [b] |
| p | * | - | * | - | * |

a-b: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir (*: P<0.05).

-: Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05).

### 3.4. Sperma Numunelerinde Sezon Dışı Sulandırma Sonu Bulgular

Elde edilen bulgular Çizelge 2.1.'de verildi. Motilite bulguları kontrol (61,8 ±7.0) grubuna göre M 1 mM (70,0 ±5.3), M 2 mM (72,5 ±2.6), M 4 mM (75,0 ±2.6), C 1mM (71,8 ±5.3), C 4 mM (70,0 ±3.7), E 2 mM (70,6 ±3.2), E 4 mM (71,2 ±6.4) gruplarında daha yüksek sonuç verdi (P<0.05). HOST değerlerine bakıldığında M 2 mM (64,3 ±1.7 ), C 2 mM (58,1 ±2.5) ve kontrol (56,8 ±3.7) gruplarına nazaran daha iyi membran koruyucu etkinlik sağladı (P<0.05). Ancak diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmedi (P>0.05). Anormal baş oranları incelendiğinde M 4 mM (2,5 ±0.5), kontrol (3,5 ±0.5) grubuna göre düşük oran verirken (P<0.05), diğer gruplar için önemli bir fark görülmedi (P>0.05). Anormal akrozom oranları gruplar arasında bir farklılık göstermezken baş ve akrozom dışındaki diğer bölgelerdeki anormal spermatozoa oranlarında C 4 mM (15,6 ±1.0), C 2 mM (17,3 ±0.7) ve kontrol (17,5 ±0.5) gruplarına göre düşük sonuç verdi.

Çizelge 2.1.:Sezon dışı sulandırma sonrasına ait spermatolojik parametreler (x±SEM)

| Sezon Dışı Sulandırma Sonu Parametreler | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Gruplar** | **Motilite %** | **Host %** | **Anormal Spermatozoa Oranı %** | | |
| | | | **Baş** | **Akrozom** | **Diğer** |
| Kontrol | 61.8 ± 7.0 [c] | 56.8 ± 3.7 [b] | 3.5 ± 0.5 [a] | 3.0 ± 0.5 | 17.5 ± 0.5 [a] |
| Metiyonin 1 mM | 70.0 ± 5.3 [ab] | 61.8 ±3.7 [ab] | 2.7 ± 0.7 [ab] | 2.5 ± 0.7 | 16.0 ±1.3 [bc] |
| Metiyonin 2 mM | 72.5 ± 2.6 [ab] | 64.3 ±1.7 [a] | 2.7 ± 0.7 [ab] | 2.6 ± 0.5 | 15.8 ± 0.8 [bc] |
| Metiyonin 4 mM | 75.0 ± 2.6 [a] | 61.8± 2.5 [ab] | 2.5 ± 0.5 [b] | 2.2 ± 0.7 | 15.8 ±1.2 [bc] |
| Curcumin 1 mM | 71.8 ± 5.3 [ab] | 61.8± 3.7 [ab] | 2.8 ± 0.6 [ab] | 2.6 ± 0.9 | 16.7 ±1.2 [bc] |
| Curcumin 2 mM | 68.1 ± 3.7 [bc] | 58.1 ± 2.5 [b] | 2.7 ± 0.7 [ab] | 2.6± 0.5 | 17.3 ± 0.7 [ab] |
| Curcumin 4 mM | 70.0 ± 3.7 [ab] | 61.2± 3.5 [ab] | 2.7 ± 0.4 [ab] | 2.3 ± 0.7 | 15.6 ±1.0 [c] |
| Ellagikasit 1 mM | 66.2 ± 3.5 [bc] | 59.3± 3.2 [ab] | 2.8 ± 0.6 [ab] | 2.8 ± 0.3 | 16.3 ± 0.5 [bc] |
| Ellagikasit 2 mM | 70.6 ± 3.2 [ab] | 59.3± 3.2 [ab] | 2.7 ± 0.4 [ab] | 2.3 ± 0.5 | 17.0 ± 0.7 [bc] |
| Ellagikasit 4 mM | 71.2 ± 6.4 [ab] | 60.0± 3.7 [ab] | 3.0 ± 0.0 [ab] | 2.5 ± 0.5 | 17.0 ± 0.7 [bc] |
| p | * | * | * | - | * |

a-b-c: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir

(*: P<0.05).

-: Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05).

### 3.5. Sperma Numunelerinde Sezon Dışı Ekilibrasyon Sonu Bulgular

Elde edilen bulgular Çizelge 2.2.'de verildi. Motilite değerleri yönünden kontrol (46,2 ±2.3); M 1 mM (58,1 ±5.9), M 2 mM (58,7 ±3.5), M 4 mM (62,5 ±5.3), C 1mM (59,3 ±7.7), C 4 mM (56,2 ±3.5), E 2 mM (55,6 ±4.9) gruplarına göre daha düşük spermatozoa motilitesi oranı verdi (P<0.05). Ayrıca M 4 mM (62,5 ±5.3) ve C 1mM (59,3 ±7.7) grupları ile C 2 mM (50,6 ±3.2) grubu arasında istatistiksel açıdan fark gözlendi (P<0.05). HOST değerlerine bakıldığında M 4 mM ve C 1mM (55,0 ±3.7) (56,8 ±2.5) grupları, kontrol (49,3 ±4.9) grubuna göre daha iyi membran koruyucu etkinlik sağlarken (P<0.05), diğer gruplar arasındaki farklılıklar önemsizdi (P>0.05). Anormal spermatozoa oranlarında baş ve akrozom anomalileri açısından gruplar arasında önemli farklılıklar görülmedi (P>0.05). Diğer bölgelerdeki anomaliler yönünden C1 mM (16,3 ±0.7); E 4 mM(17,1 ±0.8), E 2 mM(17,2 ±0.4) ve

E 1 mM (17,5 ±0.7) grupları hariç diğer gruplara göre daha düşük oran verdi (P<0.05).

Çizelge 2.2.:Sezon dışı ekilibrasyon sonrasına ait spermatolojik parametreler (x±SEM)

| **Sezon Dışı Ekilibrasyon Sonu Parametreler** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Gruplar** | **Motilite %** | **Host %** | **Anormal Spermatozoa Oranı %** | | |
| | | | **Baş** | **Akrozom** | **Diğer** |
| Kontrol | 46.2 ± 2.3 $^{d}$ | 49.3 ± 4.9 $^{b}$ | 3.7 ± 0.4 | 3.3 ± 0.5 | 17.6 ± 0.7 $^{a}$ |
| Metiyonin 1 mM | 58.1 ± 5.9 $^{abc}$ | 52.5 ± 4.6 $^{ab}$ | 3.7 ± 0.4 | 3.1 ± 0.6 | 17.8 ± 0.9 $^{a}$ |
| Metiyonin 2 mM | 58.7 ± 3.5 $^{abc}$ | 52.5 ± 2.6 $^{ab}$ | 3.1 ± 0.3 | 3.0 ± 0.5 | 18.1 ± 0.6 $^{a}$ |
| Metiyonin 4 mM | 62.5 ± 5.3 $^{a}$ | 56.8 ± 2.5 $^{a}$ | 3.0 ± 0.0 | 3.1 ± 0.6 | 17.8 ± 0.6 $^{a}$ |
| Curcumin 1 mM | 59.3 ± 7.7 $^{ab}$ | 55.0 ± 3.7 $^{a}$ | 3.2 ± 0.4 | 2.8 ± 0.6 | 16.3 ± 0.7 $^{b}$ |
| Curcumin 2 mM | 50.6 ± 3.2 $^{cd}$ | 51.8 ± 2.5 $^{ab}$ | 3.6 ± 0.5 | 3.3 ± 0.5 | 17.8 ± 0.6 $^{a}$ |
| Curcumin 4 mM | 56.2 ± 3.5 $^{abc}$ | 53.1 ± 2.5 $^{ab}$ | 3.6 ± 0.5 | 3.1 ± 0.6 | 17.8 ± 0.8 $^{a}$ |
| Ellagik asit 1 mM | 51.2 ± 6.4 $^{bcd}$ | 51.8 ± 2.5 $^{ab}$ | 3.5 ± 0.5 | 3.1 ± 0.8 | 17.5 ± 0.7 $^{ab}$ |
| Ellagik asit 2 mM | 55.6 ± 4.9 $^{abc}$ | 52.5 ± 2.6 $^{ab}$ | 3.3 ± 0.5 | 3.1 ± 0.3 | 17.2 ± 0.4 $^{ab}$ |
| Ellagik asit 4 mM | 53.7 ± 4.4 $^{bcd}$ | 53.1 ± 2.5 $^{ab}$ | 3.5 ± 0.5 | 3.1 ± 0.6 | 17.1 ± 0.8 $^{ab}$ |
| p | * | * | - | - | * |

a-b-c-d: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir

(*: P<0.05).

-: Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05).

### 3.6. Sperma Numunelerinde Sezon Dışı Dondurma-Çözdürme Sonu Bulgular

Elde edilen bulgular Çizelge 2.3.'de verildi. Motilite bulgularında M 4 mM ( 43,1 ±3.7), M 2 mM (45,6 ±5.6), M 1 mM (44,3 ±8.2) , C 4 mM ( 43,1 ±4.5), C 1mM (40,0 ±7.5), değerleri kontrol (29,3 ±4.9)'e göre daha yüksek spermatozoa motilitesi oranı verdi. (P<0.05). HOST değerleri incelendiğinde C 4 mM (48,1 ±2.5) , kontrol (41,2 ±3.5) ve E 4 mM (40,6 ±4.1) gruplarına göre daha iyi membran koruyucu etkinlik gösterdi (P<0.05). Diğer gruplar arasında HOST değerleri yönüyle anlamlı bir fark görülmedi (P>0.05). Anormal baş oranlarında M 2 mM (3,0 ±0.0) değeri, kontrol (4,3 ±0.5), C 2 mM (4,0 ±0.5), E 1 mM (4,3 ±0.5), E 2 mM (4,2 ±0.4)

ve E 4 mM (4,1 ±0.8) değerlerine göre daha iyi koruma sağladı. Baş ve akrozom dışında kalan bölgelerdeki anormal spermatozoa oranlarına bakıldığında, kontrol (20,0 ±1.3) grubu, M 1 mM (17,8 ±1.1), M 2 mM (17,6 ±0.7) ve C 4 mM (18,3 ±1.1) gruplarına göre daha yüksek oran verdi (P<0.05).

Çizelge 2.3.:Sezon dışı dondurma-çözdürme sonrasına ait spermatolojik parametreler (x±SEM)

| **Sezon Dışı Dondurma-Çözdürme Sonu Parametreler** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Gruplar** | **Motilite** % | **Host** % | **Anormal Spermatozoa Oranı** % | | |
| | | | **Baş** | **Akrozom** | **Diğer** |
| Kontrol | 29.3 ± 4.9 $^{c}$ | 41.2± 3.5 $^{bc}$ | 4.3 ± 0.5 $^{a}$ | 3.7 ±0.4 | 20.0 ± 1.3 $^{a}$ |
| Metiyonin 1 mM | 44.3 ± 8.2 $^{a}$ | 47.5± 5.3 $^{ab}$ | 3.6± 0.5 $^{ab}$ | 3.6 ±0.5 | 17.8 ± 1.1 $^{bc}$ |
| Metiyonin 2 mM | 45.6 ± 5.6 $^{a}$ | 47.5± 2.6 $^{ab}$ | 3.0 ± 0.0 $^{b}$ | 3.3 ±0.5 | 17.6 ± 0.7 $^{c}$ |
| Metiyonin 4 mM | 43.1 ± 3.7 $^{a}$ | 46.8± 4.5 $^{abc}$ | 3.5 ± 0.5 $^{ab}$ | 3.6 ±0.5 | 18.7 ± 0.7 $^{abc}$ |
| Curcumin 1 mM | 40.0 ± 7.5 $^{ab}$ | 45.0± 3.7 $^{abc}$ | 3.8 ± 0.6 $^{ab}$ | 3.5 ±0.7 | 19.1 ± 0.6 $^{abc}$ |
| Curcumin 2 mM | 33.1 ± 5.3 $^{bc}$ | 42.5± 2.6 $^{abc}$ | 4.0 ± 0.5 $^{a}$ | 3.8 ±0.3 | 19.1 ± 0.9 $^{abc}$ |
| Curcumin 4 mM | 43.1 ± 4.5 $^{a}$ | 48.1 ± 2.5 $^{a}$ | 3.7 ± 0.7 $^{ab}$ | 3.3 ±0.5 | 18.3 ± 1.1 $^{bc}$ |
| Ellagik asit 1 mM | 36.2± 6.4 $^{abc}$ | 41.8± 4.5 $^{abc}$ | 4.3 ± 0.5 $^{a}$ | 3.8 ±0.6 | 18.5 ± 0.5 $^{abc}$ |
| Ellagik asit 2 mM | 38.7± 4.4 $^{abc}$ | 43.7± 3.5 $^{abc}$ | 4.2 ± 0.4 $^{a}$ | 3.6 ±0.5 | 18.8 ± 0.8 $^{abc}$ |
| Ellagik asit 4 mM | 36.2± 6.4 $^{abc}$ | 40.6 ± 4.1 $^{c}$ | 4.1 ± 0.8 $^{a}$ | 4.0 ±0.5 | 19.3 ± 1.4 $^{ab}$ |
| p | * | * | * | - | * |

a-b-c: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir

(*: P<0.05).

-: Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05).

## 4.TARTIŞMA

Koç spermasının başarılı bir şekilde dondurularak tohumlamada kullanılması entansif koyun yetiştiriciliğini ve ıslahını doğrudan etkilemektedir. Koç spermatozoonu plazma membranının doymamış yağ asitlerinden zengin olması nedeniyle reaktif oksijen türlerince oluşturulan lipit peroksidasyonuna son derece duyarlıdır. Spermanın dondurulması, donma işlemi sırasında gelişen soğuk şokunu, membran yapılarındaki faz değişimine bağlı hasarı ve oksidatif stresi doğurmakta, gelişen oksidatif stres ve oluşan sitotoksik aldehitler (malondialdehid vb.) spermatozoon fonksiyonlarının hasar görmesine neden olmaktadır (Aitken 1994). Bu nedenle sperma sulandırıcılarına katılan kriyoprotektif ve antioksidatif özellikli kimi katkı maddeleriyle ortamda gelişen soğuk şoku hasarı minimize edilebilmektedir. Antioksidan bileşiklerin aynı zamanda kriyoprotektan özelliklerinin de olması, bu maddelerle dondurulan spermalardan daha iyi sonuçlar alınmasını sağlamaktadır (Alvarez ve ark 1983, Kobayashi ve ark 1991, Bucak ve ark 2010b).

Sunulan tez çalışmasında 1, 2 ve 4 mM dozlarında sulandırıcıya katılan curcumin, ellagik asit ve metiyoninin sezon içi ve sezon dışı sulandırma, ekilibrasyon ve dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik parametrelerden motilite, HOST ve anormal spermatozoa oranları üzerine etkileri araştırıldı.

Sperma numunesinde ileriye doğru düzgün doğrusal hareket eden spermatozoonların, hareketsiz veya diğer hareket biçimi gösteren spermatozoonlara oranı motilite oranı olarak tanımlanmaktadır. Spermatozoonların dişi genital kanalında ilerleyebilmeleri kuyruklarının yapacağı kamçı hareketlerine ve frekansına bağlıdır (Çoyan ve ark 2002). Motiliteyi regüle eden bir diğer faktör ise cAMP'dir. cAMP konsantrasyonunun artması, protein kinaz aktivasyonunu artırmakta ve bunun sonucunda aksonem proteini fosforolize olarak spermatozoon motilitesinde artışa ve hiperaktivasyona neden olmaktadır (Vitt 1997).

Sunulan tez çalışması motilite bulguları yönünden değerlendirildiğinde, sezon içi sulandırma sonrasında kontrol grubu, diğer gruplara göre daha düşük oran verdi. Sezon içi ekilibrasyon sonrasında motilite oranlarında gruplar arasında önemli bir

fark görülmezken, sezon içi dondurma-çözdürme sonrasında motilite oranı, kontrol grubunda diğer gruplara oranla anlamlı ölçüde düşük olarak belirlendi.

Sezon dışı sulandırma sonrasında motilite bulguları açısından kontrol değeri; C1 mM, C4 mM, M1 mM, M2 mM, M4 mM, E2 mM, E4 mM gruplarına oranla anlamlı ölçüde düşük bulundu. Sezon dışı ekilibrasyon sonrasında motilite değerleri yönünden kontrol; C1 mM, C4 mM, M1 mM, M2 mM, M4 mM, E2 mM gruplarına göre daha düşük değer gösterdi. Sezon dışı dondurma-çözdürme sonrasında ise motilite bulguları açısından C4 mM, C1 mM, M4 mM, M2 mM, M1 mM grupları kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

Çalışmada sezon içi ve sezon dışı sulandırma, ekilibrasyon ve dondurma-çözdürme sonunda antioksidanların etkilerinin farklı sonuçlarla kendini göstermesi, sezon içinde ve sezon dışında sperma bileşenlerindeki değişimlere bağlanabilir.

Sunulan tez çalışmasında spermatolojik parametreler üzerine etkinliği değerlendirilen antioksidanlardan curcumin, polifenolik yapıda doğal bir antioksidan olarak apoptozisi önleyici, yangı giderici, antitoksik ve antikanserojen etkilere sahiptir (Surh ve ark 2001, Goa ve ark 2004). Curcumin, yüksek kriyoprotektif ve anioksidatif etkilerinden dolayı çeşitli hücre sistemlerini soğuk şoku ve oksidatif hasara karşı korumaktadır (Abuarqoub ve ark 2007). Diğer yandan curcuminin hemoglobin molekülünü azotdioksit radikalleri içeren reaktif oksijen türlerine ve ratların beyin ve karaciğer hücrelerini lipit peroksidasyonuna karşı koruduğu vurgulanmıştır (Sreejayan ve Rao 1994, Reddy ve Lokesh 1994, Unnikrishnan ve Rao 1995).

Curcuminin yara iyileşmesinde antioksidan rolünü ortaya koyan keratonistler ve fibroblastlardaki hidrojen peroksitin sebep olduğu hasarı önlediği belirtilmektedir (Phan ve ark 2001).

Bucak ve ark (2010a) yaptıkları bir çalışmada Ankara keçisi spermasını curcumin (2.5, 5, 10 mM) içeren tris sulandırıcısıyla sulandırmışlar ve dondurma-çözdürme sonrası 2.5 mM curcuminin % 65±3 motilite verdiğini belirtmişlerdir.

Sunulan tez çalışmasında sezon içi dondurma-çözdürme sonrası 2 mM curcuminin %55,0±3,7 olarak verdiği motilite değeri, Bucak ve ark (2010a)'nın

bulduğu 2.5 mM curcuminin %65±3 olarak verdiği motilite değerinden düşük bulunmuştur. Bu durum çalışmalarda kullanılan hayvan türüne ve kullanılan antioksidan dozuna bağlanabilir.

Curcumin hücrelere hızlıca penetre olmakta ve lipofilik özelliklerinden dolayı plazma membranı gibi membranöz yapıların içinde yoğunlaşmaktadır (Jaruga ve ark 1998). Koç spermatozoonu plazma membranının doymamış yağ asitlerinden zengin olması nedeniyle serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu lipit peroksidasyonuna son derece duyarlı olduğu düşünüldüğünde curcuminin plazma membranı içinde yoğunlaşması dolayısıyla reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerini minimize etmesi, sunulan çalışmada da bu yönde etkinlik gösterdiğini düşündürmektedir.

Sunulan çalışmada spermatolojik parametreler üzerine etkinliği değerlendirilen bir diğer antioksidan da metiyonindir. Metiyonin yapısında sülfür grubu taşıması nedeniyle, oksidatif strese sebep olan kurşun gibi metallerle şelat oluşturabilmektedir (Parcell 2002). Bu durum metiyoninin oksidatif stres altındaki doku ve hücrelerin oksidasyondan korunması için antioksidan savunma sistemi olarak görev yaptığını göstermektedir (Atmaca 2004, Stadtman ve ark 2005).

Patra ve ark (2001), sıçanlara dört hafta boyunca kurşun asetat ve izleyen beşinci hafta boyunca oral yolla metiyonin vermişler, kan serumunda kurşun; karaciğer, böbrek ve beyinde ise malondialdehid (MDA) düzeylerinin düştüğünü tespit etmişlerdir.

Metiyoninin hücreleri oksidatif hasardan koruduğu ve detoksifikasyonda önemli bir rol oynadığı farklı araştırmacılar tarafından da vurgulanmaktadır (Patra ve ark 2001, Liu ve ark 2008).

Tuncer ve ark (2010), sezon içinde Angora keçisi spermasını metiyonin (2.5, 5, 10 mM) içeren tris sulandırıcısıyla sulandırmışlar ve dondurma-çözdürme sonrası 2.5 mM ve 5 mM metiyoninin sırasıyla % 63,6 ± 7 ve 63,4 ± 3.1 motilite oranı verdiğini belirtmişlerdir.

Bucak ve ark (2010b), boğa spermasını metiyonin içeren (2.5, 7.5 mM) tris sulandırıcısıyla sulandırmışlar ve dondurma-çözdürme sonrası 2.5 mM metiyoninin % 41.3 ± 1.8 motilite oranı verdiğini bulmuşlardır.

Sunulan tez çalışmasında sezon içinde dondurma-çözdürme sonrası 2 mM metiyonin için elde edilen % 51.2 ± 9.1'lik motilite değeri, Bucak ve ark. (2010b)'nın 2.5 mM metiyonin için elde ettikleri % 41.3 ± 1.8'lik değerden yüksek, Tuncer ve ark. (2010)'nın 2.5 mM metiyonin için elde ettikleri % 63,6 ± 7 oranındaki motilite değerinden ise düşük bulunmuştur. Bunun nedeni çalışmalarda kullanılan antioksidanın farklı dozlarından kaynaklanabileceği gibi, sperması değerlendirilen hayvanların türe özgü farklı spermatolojik özelliklerine sahip olması ve kullanılan sperma sulandırıcılarının içeriklerinin farklı oranlarda olması gibi faktörlere bağlanabilir. Ayrıca yapılan çalışmalardan da görüldüğü gibi antioksidanların etkilerinin spermatozoa motilitesi üzerinde gösterdiği farklı etkiler, spermanın sulandırılması ve dondurulması sırasında uygulanan protokollerden kaynaklanmış olabilir. Sunulan tez çalışmasında kullanılan antioksidanların spermatozoa motilitesi üzerinde farklı oranlarda farklı etki göstermesi de Bucak ve ark (2010b) ve Tuncer ve ark (2010)'nın çalışmalarında elde edilen bulgularla uyumluluk göstermektedir.

Sunulan tez çalışmasında spermatolojik parametreler üzerine etkinliği değerlendirilen ellagik asit ise kuvvetli bir antioksidan olup doğal bitki fenolü içerir ve aynı zamanda antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklere sahiptir. Özellikle pankreatik kanser hücrelerinde üremeyi baskılayıcı ve apoptozisi indükleyici etkisi vardır (Edderkaoui ve ark 2008).

Fenolik bileşiklerin multiple hidroksil gruplarından özellikle 3',4'-o-dihidroksi gruplarına sahip olanlarının oksidatif strese karşı en etkili antioksidan oldukları bildirilmektedir. Bu antioksidanlardan birisi de ellagik asittir (Anne ve ark 1998).

Yapılan bir çalışmada ellagik asit ve quersetin gibi fenolik maddelerin farelerin akciğerlerinde antikarsinojenik etki de gösterdiği belirtilmiştir (Khanduja ve ark 1999).

Yapılan başka bir çalışmada ise ratların karaciğer dokusunda mikrosomal proteinlere bağlanan ellagik asitin lipid peroksidasyonunu engellediği bildirilmiştir (Priyadarsini ve ark 2002).

Özkaya ve ark (2010), ellagik asitin alüminyum klorür ($AlCl_3$)'ün ratların karaciğerinde oluşturduğu oksidatif stresi azalttığını, glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) aktivitelerini ise artırdığını vurgulamışlardır.

Ellagik asitin sahip olduğu fenol yapısı nedeniyle serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı savunma rolü üstlendiği düşünülmektedir.

Türk ve ark (2008), ratlarda yaptıkları bir çalışmada ellagik asitin epididimal spermatozoon yoğunluğunu ve motilitesini artırdığını, anormal spermatozoon oranlarında artışa sebep olan cisplatinin etkinliğini ise azalttığını belirtmişlerdir. Benzer bir çalışmada da Çeribaşı ve ark (2011), ratlarda adriamisinin epididimal sperm parametreleri üzerine gösterdiği olumsuz etkilere ve testislerde oluşturduğu lipid peroksidasyonu ve apoptozise karşı ellagik asitin koruyucu etkinlik gösterdiğini vurgulamışlardır.

Ellagik asitin, adriamisin ve cisplatinin sperma hücreleri üzerinde olumlu etkiler sağlaması, sunulan tez çalışmasındaki etkisiyle paralellik göstermektedir.

Hipo-osmotik şişme testi (HOST), spermatozoonun hücre zarı bütünlüğünü ve işlevselliğini ölçer. Spermatozoon membran bütünlüğü sadece metabolik faaliyetler için değil, aynı zamanda kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve oosit yüzeyine spermatozoonun tutunma olayının gerçekleşmesinde de fonksiyonel bir öneme sahiptir. Bu nedenle membran fonksiyonunun belirlenmesi, spermatozoonun fertilizasyon kapasitesinin bir göstergesidir (Jeyendran ve ark 1984). Sperma hücreleri hipoozmotik bir ortama konulduğunda fonksiyonel hücrelerin kuyrukları şişer ve kıvrılır. Şöyle ki; HOS test, farklı ozmotik basınca sahip iki ortam arasında ozmotik basınç dengeleninceye kadar fonksiyonel bütünlüğü bozulmamış aktif bir membrandan suyun taşınması esasına dayanmaktadır (Jeyendran ve ark 1992). Hipoozmotik bir medyuma bırakılan sperma hücreleri içerisine suyun girmesi neticesinde hipoozmotik bir stres oluşur. Fonksiyonel bir sperma plazma membranı, HOS testi boyunca intraselüler ve ekstraselüler sıvı arasında ozmotik basıncı

dengelemeye çalışır. Bu sırada spermatozoon içerisine suyun girmesiyle hacimde bir artış meydana gelerek şişmeye başladığı ve kuyruklarının kıvrıldığı gözlenir (Jeyendran ve ark 1984, Jeyendran ve ark 1992, Sliwa 1993, Correa ve Zavos 1994, Lagares ve ark 2000, Nie ve Wenzel 2001). Spermatozoon kuyruğunun fibriler kısmını saran hücre zarı baş kısmını saran membran bölümüne göre daha gevşektir. Bu nedenden kuyruk kısmı diğer bölgelere göre daha bariz şekilde şişer. Kıvrılma plazma membranının şişmesinden ileri gelir. Düşük ozmotik basınca sahip ortamlarda kimyasal ve fiziksel yönden sağlam spermatozoonun kuyruk kısmında şişmeler oluşurken, kuyruk membranında işlevsel bozukluk olan hücrelerde herhangi bir değişiklik meydana gelmez (Ahmadi ve Soon-Chye 1997).

Sunulan tez çalışması hipo-ozmotik şişme testi yönünden değerlendirildiğinde, sezon içi sulandırma, dondurma ve çözdürme sonrasında gruplar arası önemli bir farklılık görülmezken sezon içi ekilibrasyon sonrasında M2 mM grubu, kontrole göre daha yüksek oranda membran koruyucu etki gösterdi. Sezon dışında ise HOST bulguları açısından sulandırma, ekilibrasyon ve dondurma-çözdürme sonrası gruplar arasında anlamlı ölçülerde farklı sonuçlar elde edildi. Sezon dışı sulandırma sonrasında M2 mM grubu HOST değeri, C2 mM ve kontrol gruplarına göre, sezon dışı ekilibrasyon sonrasında M4 mM ve C1 mM grupları HOST değerleri kontrole göre ve sezon dışı dondurma-çözdürme sonrasında ise C4 mM grubu HOST değeri, E4 mM ve kontrol gruplarına göre membranın fonksiyonel bütünlüğünü daha yüksek oranda koruduğu görüldü.

Jeyendran ve ark (1992), yaptıkları bir çalışmada HOST sonuçları % 60'dan yukarı olan ejakülatları normal, %50 ve altında olan ejakülatları anormal olarak sınıflandırmışlardır.

Sunulan tez çalışmasında sezon içi sulandırma ve ekilibrasyon sonrası ve sezon dışı sulandırma sonrası gruplarda genel olarak HOST sonuçlarının % 60'dan yukarı gözlenmesi, kullanılan spermanın kalitesinin yüksek olduğunu ve kullanılan antioksidanların spermatozoanın fonksiyonel membran bütünlüğünü iyileştirdiğini göstermiştir. Bu özellikteki spermatozoonların uygun tohumlama zamanında etkinlikle kullanılması, başarılı sonuçlar verebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca sonuçlarımıza göre ellagik asitin, curcumin ve metiyonine göre membran bütünlüğü bakımından düşük etkinlik gösterdiği gözlendi.

Spermatozoonların normal formundan ayrılması fekondasyon kabiliyetinin azalmasına neden olur. Özellikle ejakülattaki anormal spermatozoonların oranının %20'yi aşması fertiliteyi olumsuz yönde etkiler. Anormal spermatozoonların genel oranı düşük olsa bile başa bağlı bozuklukların oranının %5'in, akrozoma bağlı bozuklukların oranının %10'un, proksimal sitoplazmik damlacıkların oranının %3'ün üzerinde olmaması gerekmektedir.

Anormal spermatozoonlar oluşumuna göre primer, sekonder ve tersiyer olarak tanımlanır. Primer bozukluklar genellikle spermatogenezis sırasında oluşur. Sekonder bozukluklar epididmal geçiş esnasında, tersiyer anomaliler ise ejakülasyon sonrasında spermaya yapılan işlemler sırasında oluşur. Spermatozoonlarda görülen bozukluklar primer nedenlerden kaynaklanıyorsa orta kısım ve kuyruk formunda anomaliler mevcuttur. Sekonder anomalileri ise çözülmüş baş, proksimal ve distal protoplazmik damlacıklar, kuyruğun başa ve orta kısıma sarılması ve akrozom çözülmesi gibi durumlar oluşturur (Çoyan ve ark 2002).

Ayrıca anormal spermatozoonların oluşum nedenleri olarak seksüel dinlenme, mevsim, ejakülasyon sıklığı, kalıtım, hormonal bozukluklar, testislerdeki patolojik lezyonlar, spermanın uygun olmayan şekilde işlenmesi (sulandırma, soğutma, dondurma, çözdürmedeki aksaklıklar), çevresel faktörler, röntgen ve radyoaktif ışınlar, enfeksiyöz hastalıklar, skrotum üzerinde etkili olan sıcak ve soğuk, kalıtsal testis hipoplazisi, edinsel testis dejenerasyonu, epididimisin disfonksiyonu, ırk ve yaşın ilerlemesi de gösterilebilir (Arthur ve ark 1989). Ayrıca lokal hipoksi, leydig ve sertoli hücrelerinin beslenmesini engelleyen metabolik bozukluklar, yetersiz beslenme, iz element eksikliği, ilaçlar (kemoterapotikler, barbitüratlar, kafein, Hı reseptör blokörleri, hexan), kurşun, kadmiyum, civa gibi ağır metaller de anormal spermatozoon oluşumuna neden olurlar (Çoyan ve ark 2002).

Sunulan tez çalışması anormal spermatozoa oranları yönünden değerlendirildiğinde sezon içi sulandırma sonrasında baş ve akrozom dışındaki diğer bölgelerdeki anormal spermatozoa oranları açısından C4 mM, kontrol grubuna göre daha olumlu sonuçlar verdi. Sezon içi ekilibrasyon sonrasında anormal baş oranları açısından E1 mM, kontrole göre daha iyi koruyucu etkinlik sağladı. Sezon içi dondurma-çözdürme sonrasında anormal baş oranı açısından E1 mM, kontrole göre

anlamlı ölçüde olumlu değer gösterdi. Ayrıca baş ve akrozom dışındaki diğer bölgeler açısından anormal spermatozoa düzeyleri için C4 mM ve E4 mM grupları, kontrol ve M1 mM gruplarına nazaran daha iyi koruyucu etki gösterdi.

Anormal spermatozoa oranlarında sezon dışı elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ise sulandırma sonrasında anormal baş oranları açısından M4 mM, kontrole göre daha iyi etkinlik gösterdi. Baş ve akrozom dışındaki diğer bölgelerdeki anormal spermatozoa oranlarına bakıldığında C4 mM'ın, C2 mM ve kontrole göre koruyucu etkinliği daha yüksekti. Ekilibrasyon sonrasında anormal spermatozoa oranları açısından baş ve akrozom dışındaki diğer bölgelerde anomalite yönünden C1 mM'ın, E4 mM, E2 mM ve E1 mM grupları hariç diğer gruplara göre koruyucu etkinliği yüksek bulundu. Dondurma-çözdürme sonrasında anormal baş oranları açısından M2 mM grubu, kontrol, C2 mM, E1 mM, E2 mM ve E4 mM gruplarına göre daha iyi sonuç verdi. Baş ve akrozom dışındaki diğer bölgelerdeki anormal spermatozoa oranlarına bakıldığında M2 mM ve C4 mM gruplarının kontrol grubuna kıyasla koruyucu etkinlikleri yüksekti.

Tuncer ve ark (2010), sezon içinde Angora keçisi spermasını metiyonin (2.5, 5, 10 mM) içeren tris sulandırıcısıyla sulandırmışlar ve dondurma-çözdürme sonrası metiyonin (2.5 mM)'in % 7.8 ± 1.3'lik oranla akrozoma bağlı anormal spermatozoa gösterdiğini bulmuşlardır. Sunulan tez çalışmasında ise metiyonin (2 mM)'ın % 3.0 ± 0.7 oranı ile akrozoma bağlı anormal spermatozoa verdiği görülmüş olup bu değer Tuncer ve ark. (2010)'nın bulduğu değerden düşük gözükmüştür. Yine Bucak ve ark. (2010a), sezon içinde Angora keçisi spermasını curcumin (2.5, 5, 10 mM) içeren tris sulandırıcısıyla sulandırmışlar ve dondurma-çözdürme sonrası curcumin (2.5 mM)'in %7.8 ± 1.5'lik oranla akrozoma bağlı anormal spermatozoa gösterdiğini bulmuşlardır. Sunulan tez çalışmasında ise curcumin (2 mM)'ın % 3.3 ± 0.5 ile akrozoma bağlı anormal spermatozoa oranı verdiği görülmüştür. Bu oran, Bucak ve ark.(2010a)'nın bulduğu orandan düşük olmuştur.

Yapılan başka bir çalışmada curcuminin Langerhans adacıklarında kriyoprezervasyonun sebep olduğu reaktif oksijen türlerini engellediği ve bunun da dondurma-çözdürme sonunda adacıklarda daha iyi morfolojik bütünlük sağladığı belirlenmiştir (Kanitkar ve Bhonde 2008). Curcuminin anılan etkisi yapılan tez çalışmasında akrozom üzerine gösterdiği koruyucu etkisiyle örtüşmektedir.

Sulandırma, ekilibrasyon ve dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik parametrelerde elde edilen bulgular, spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan tekniklere, çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimlere veya analizi yapan kişiye bağlı olarak değişim göstermektedir. Tüm bu faktörlerin yanında, tür, ırk, mevsim ve birey gibi etkenler de spermatozoon motilitesi, HOST değeri ve anormal oranları üzerine önemli etkinliklere sahiptir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Koçlarda dondurulmuş spermanın fertilite yeteneğini artırmak için, sulandırıcılara bazı antioksidan maddeler katılmaktadır. Genel olarak olumlu etkileri olmakla birlikte, antioksidanların etkinlikleri hayvan türüne, sulandırıcı bileşenlerine ve dondurma protokollerine göre değişmektedir.

Spermatozoonda mitokondriyel kılıf tarafından sarılan aksonem ve fibrilar yapıların spermatozoon motilitesi için gerekli ATP üretimini sağladığından hareketle (Garner ve Hafez 1993), sunulan tez çalışmasında sperma sulandırıcısına katılan antioksidanlardan metiyoninin spermatozoonların fonksiyonel membran yapılarını koruyarak genel anlamda özellikle sezon dışı sulandırma, ekilibrasyon ve dondurma-çözdürme sonrası motiliteyi iyileştirdiği, curcumin ve ellagik asite göre daha etkin işlev gördüğü sonucu çıkartılabilir.

Sezon içi ve sezon dışı ekilibrasyon sonrasında ve sezon dışı sulandırma sonrasında metiyoninin, sezon dışı ekilibrasyon ve dondurma-çözdürme sonrasında ise curcuminin daha yüksek oranda membran bütünlüğünde koruyucu etki sağladığı görüldü.

Anormal spermatozoa baş oranlarında sezon içinde ellagik asitin, curcumin ve metiyonine göre daha iyi koruyucu etkinlik gösterdiği gözlenirken sezon dışında ise metiyoninin, curcumin ve ellagik asite göre daha iyi sonuçlar verdiği görüldü.

Sezon içi ve sezon dışında baş ve akrozom dışındaki diğer bölgeler açısından anormal spermatozoa düzeyleri için curcuminin özellikle C 4 mM dozunun en iyi sonuç verdiği görüldü.

Sonuç olarak, sezon içi ve sezon dışı dönemlerde farklı antioksidanların ve dozlarının, spermatolojik parametreler üzerinde farklı etkinlikler gösterdiği belirlendi. Bu durum, yapılan tez çalışmasının antioksidanların spermatolojik parametreler üzerine olumlu etkinlikler oluşturduğu yönünde bir fikir verebilmesi açısından anlamlı olduğunu göstermiştir.

Ayrıca tez çalışmasında kullanılan antioksidanların genel olarak spermatolojik parametreler üzerine sezon dışında sezon içine göre daha olumlu etkileri olduğu görüldü. Bu sonuçla da koçlarda sezon dışında, sezon içine göre spermatolojik parametrelerin doğal olarak optimum değerlerden sapma gösterdiği (D'Alessandro ve Martemucci 2003) göz önüne alındığında, antioksidanların etkinliklerini sezon dışında daha belirgin bir şekilde gösterdiği anlaşılabilir.

Literatür taramalarında söz konusu antioksidanların spermatolojik parametrelere dair verilerine fazlaca rastlanmadığından, konuyla ilgili başka çalışmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca yapılacak araştırmalarda in vitro muayene parametrelerinin, in vitro/vivo fertilite parametreleriyle de desteklenmesi gerekmektedir.

# 6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## Sezon İçi ve Sezon Dışında Koç Spermasının Dondurulmasında Antioksidanların Etkisi

**Ali Doğan ÖMÜR**

**Dölerme ve Suni Tohumlama (Vet) Anabilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ / KONYA-2011**

Sunulan tez çalışmasında, koç sperması sulandırıcısına katılan farklı antioksidanların spermanın sulandırma, ekilibrasyon ve dondurma-çözdürme sonrası bazı spermatolojik parametreler üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Merinos koçlardan suni vajen yardımıyla alınan ejakülatlar birleştirilerek 10 eşit hacme bölündü ve curcumin, ellagik asit ve metiyoninin 1, 2 ve 4 mM dozlarını içeren ve içermeyen (kontrol) Tris temelli sulandırıcısıyla 32ºC'ta sulandırıldı. Sulandırılan numuneler 5$^{o}$C'ta 3 saat ekilibrasyona bırakıldı. Ekilibrasyon sonrası sıvı azot buharında dondurulan sperma numuneleri sıvı azotta (-196ºC) saklandı. Sulandırma, ekilibrasyon ve dondurma/çözdürme sonrası numuneler spermatolojik parametreler yönünden değerlendirildi.

Sezon içi sulandırma sonrası sperma numunelerinde, baş ve akrozom dışındaki diğer bölgeler açısından anormal spermatozoa oranında en düşük değeri C4 mM (10,1 ±0.6) gösterdi.

Sezon içi ekilibrasyon sonrasında HOST değerleri açısından M 2 mM ( 65,0 ±2.6), kontrol (58,1 ±3.7) grubuna göre yüksek sonuç verdi (P<0.05). Anormal baş oranları açısından en düşük değeri E1 mM ( 2,1 ±0.8) gösterdi (P<0.05).

Sezon içi dondurma-çözdürme sonrasında, anormal baş oranı açısından E1 mM (2,3 ±0.9) en düşük değeri gösterdi. Ayrıca baş ve akrozom dışındaki diğer bölgeler açısından anormal spermatozoa düzeyleri için kontrol (13,7 ±1.0) ve M1 mM (13,8 ±0.8) grupları, C4 mM (12,2 ±0.4) ve E4 mM (12,2 ±0.7) gruplarına nazaran önemli ölçüde yüksek belirlendi (P<0.05).

Sezon dışı sulandırma sonrasında HOST değerlerine bakıldığında M2 mM (64,3 ± 1.7 ) en yüksek değeri gösterdi. Anormal baş oranları incelendiğinde M 4 mM (2,5 ±0.5) ile kontrol (3,5 ±0.5) grupları arasında fark gözlendi (P<0.05). Baş ve akrozom dışındaki diğer bölgelerdeki anormal spermatozoa oranlarına bakıldığında, C4 mM (15,6 ± 1.0) en düşük değeri verdi.

Sezon dışı ekilibrasyon sonrasında motilite bulguları açısından C2 mM (50,6 ±3.2) ile C1 mM (59,3 ±7.7) ve M4 mM (62,5 ±5.3) arasında istatistiki açıdan fark gözlendi (P<0.05). HOST değerlerine bakıldığında kontrol (49,3 ±4.9) grubu; C1 mM (55,0 ±3.7) ve M4 mM (56,8 ±2.5) gruplarına göre düşük bulundu (P<0.05). Diğer bölgelerde ise anomalite yönünden C1 mM (16,3 ±0.7) en düşük değer gösterdi (P<0.05).

Sezon dışı dondurma-çözdürme sonrasında HOST değerleri incelendiğinde C4 mM (48,1 ±2.5) grubu, E4 mM (40,6 ±4.1) ve kontrol (41,2 ±3.5) gruplarına göre yüksek sonuç verdi (P<0.05). Anormal baş oranları açısından M2 mM (3,0 ±0.0) grubu en düşük oran verdi. Baş ve akrozom

dışındaki diğer bölgelerdeki anormal spermatozoa oranlarına bakıldığında, kontrol (20,0 ±1.3) grubu, M1 mM (17,8 ±1.1), M2 mM (17,6 ±0.7) ve C4 mM (18,3 ±1.1) gruplarına göre yüksek düzeyde farklı bulundu ($P<0.05$).

Sonuç olarak, sezon içi ve sezon dışı dönemlerde farklı antioksidanların ve dozlarının, spermatolojik parametreler üzerinde farklı etkinlikler gösterdiği belirlendi.

**Anahtar Sözcükler:** Antioksidan, koç sperması, spermanın dondurulması, spermatolojik parametreler

# 7. SUMMARY

## Effect of Antioxidants on Cryopreservation of Ram Semen in and out of Breeding Season

The aim of this study was to investigate the effects of different antioxidants added into ram semen extender on some spermatologic parameters following the dilution, equilibration and freeze-thawing of semen.

Ejaculates collected using the artificial vagina from Merino rams were pooled, then splitting into 10 equal aliquots. The aliquots were diluted in a Tris-base extender containing curcumin, ellagic acid and methionine at doses of 1, 2 and 4 mM, and no additive (control) at 32ºC. Diluted samples were equilibrated at 5$^{o}$C for 3 h. After equilibration the samples were frozen in liquid nitrogen vapour, plunged into liquid nitrogen (-196ºC) for storage. Following the dilution, equilibration and freeze-thawing, semen samples were evaluated for spermatologic parameters.

Following the dilution in the samples of the breeding season, C4 mM (10,1 ±0.6) led to the lowest abnormal spermatozoa value except head and acrosomal district.

Following the equilibration in the samples of the breeding season, M 2 mM ( 65,0 ±2.6) led to higher hos-test level, compared to control (58,1 ±3.7) . E1 mM ( 2,1 ±0.8) led to the lowest abnormal head structure rate (P<0.05).

Following the freeze-thawing in the samples of the breeding season, E1 mM (2,3 ±0.9) led to the lowest abnormal head structure rate (P<0.05). Furthermore, control (13,7 ±1.0) and M1 mM (13,8 ±0.8) groups, led to the significantly highest abnormal spermatozoa levels except head and acrosomal district, compared to C4 mM (12,2 ±0.4) and E4 mM (12,2 ±0.7).

Following the dilution in the samples of the non-breeding season, M2 mM (64,3 ±1.7 ) led to the highest hos-test level. There was statistical difference between M4 mM (2,5 ±0.5) with control (3,5 ±0.5) in terms of abnormal head structure datas. C4 mM (15,6 ±1.0) led to the lowest abnormal spermatozoa levels except head and acrosomal district, compared to the other groups (P<0.05).

Following the equilibration in the samples of the of the non-breeding season, there was statistical difference between C2 mM (50,6 ±3.2) with C1mM (59,3 ±7.7) and M4 mM(62,5 ±5.3) related to motility. Control group (49,3 ±4.9) led to lower hos-test level compared to C1mM (55,0 ±3.7) and M4 mM (56,8 ±2.5). C1 mM(16,3 ±0.7) led to the lowest abnormal spermatozoa level except head and acrosomal district compared to the other groups (P<0.05).

Following the freeze-thawing in the samples of the non-breeding season, C4 mM (48,1 ±2.5) led to higher hos-test level, compared to E4 mM (40,6 ±4.1) and control (41,2 ±3.5). M 2 mM (3,0 ±0.0) led to the lowest abnormal head structure level compared to the other groups (P<0.05). Control group (20,0 ±1.3) led to higher abnormal spermatozoa level except head and acrosomal district compared to M1 mM (17,8 ±1.1), M2 mM (17,6 ±0.7) and C4 mM (18,3 ±1.1) .

In conclusion, different antioxidants and their doses marked different efficiencies on the spermatologic parameters in and out of breeding seasons.

**Key Words:** Antioxidant, ram semen, semen cryopreservation, spermatologic parameters

# 8. KAYNAKLAR


1. Abuarqoub H, Green CJ, Foresti R, Motterlini R. Curcumin reduces cold-storage-induced damage in human cardiac myoblasts. Exp Mol Med. 2007; 39, 139–148.

2. Ahmadi A, Soon-Chye NG. The single sperm curling test, a modified hypoosmotic swelling test, as a potential technique for the selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection. Fertility and Sterility. 1997; 68: 346-350.

3. Ahsan H, Parveen N, Khan N, Hadi SM. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. Chemico-Biological Interactions. 1999; 121(2): 161-175

4. Aitken RJ. Pathophysiology of human spermatozoa. Curr Opin Obstet Gynecol. 1994; 6: 128-135.

5. Aitken RJ , Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J Androl. 1988; 9(6):367-76.

6. Aitken RJ, Clarkson JS , Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. Biol Reprod. 1989; 41(1):183-97.

7. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 1995; 32.

8. Akyol N. Sığır embriyo transferinde hormon kullanımı. Lalahan Hay Arşt Derg. 2001; 4 (1): 95-104.

9. Alvarez JG, Storey BT. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. Biol Reprod. 1983a; 29:548-55.

10. Alvarez JG, Storey BT. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from $O_2$ toxicity due to lipid peroxidation. Biol Reprod. 1983b; 28: 1129-1136.

11. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. J Androl. 1987; 8(5):338-48.

12. Anne S, Meyer Heinonen M, Edwin N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, cafeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. Food Chemistry. 1998; 61 :71-75.

13. Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. Free Radical Biology & Medicine. 1999; 26 (7/8): 869–880.

14. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H. Reproductive abnormalities of male animals. In "Veterinary Reproduction and Obstetrics" Biailiere Tindall. London. 1989; 525-567.

15. Ateşşahin A, Bucak MN, Tuncer PB, Kızıl M. Effect of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freze-thawing process. Small Rum Res. 2008; 77: 38-44.

16. Atmaca G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. Yonsei Med J 2004; 45: 776-788.

17. Aydilek N, Aksakal M. Testosteronun Tavşanlarda Karaciğer Antioksidan Sistemi Üzerine Etkisi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2003; 2: 22-25

18. Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. J Androl. 2000; 21(1):1-7.

19. Başpınar N, Kurtoğlu F. Vitaminler. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi. Konya: 2003

20. Beconi MT, Affranchino MA, Schang LM , Beorlegui NB. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. Biochem Int. 1991; 23(3):545-53.

21. Berlinguer F, Leoni GG, Succu S, Mossa F, Galioto M, Madeddu M, Naitana S. Cryopreservation of European Mouflon (Ovis Gmelini Musimon) semen during the non-breeding season is enhanced by the use of trehalose. Reprod Domest Anim. 2007;42(2):202-207.

22. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sırard MA ,Gagnon C . Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Mol Reprod Dev. 2000; 55:282-88.

23. Blesbois E, Grasseau I , Hermier D. Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2 to 5 degrees C. Theriogenology. 1999; 15;52(2):325-34.

24. Bucak MN, Tekin N, Kulaksız R. Koç Spermasının Kısa Süreli Saklanmasında Antioksidanların Etkisi. Lalahan Hay Araşt Enst Derg. 2007; 47 (2): 15-21.

25. Bucak MN, Ateşşahin A, Varışlı Ö, Yüce A, Tekin N, Akçay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. Theriogenology. 2007; 60: 1060-1067.

26. Bucak MN, Uysal O. The role of antioxidants in freezing of Saanen goat semen. Indian Vet J. 2008; 85: 148-150.

27. Bucak MN, Sarıözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A, Kulaksız R, Çevik M. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircus ancryrensis) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. Small Rum Res. 2010a; 89: 24-30.

28. Bucak MN, Tuncer PB, Sarıözkan S, Başpınar N, Taşpınar M, Çoyan K, Bilgili A, Akalın PP, Büyükleblebici S, Aydos S, Ilgaz S, Sunguroğlu A, Öztuna D. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stres parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. Cryobiology. 2010b; 61(3):248-53.

29. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull. 1993; 49(3):481-93.

30. Cheminau P, Malpaux B, Delgadillo J, Gucrin Y, Ravault JP, Thimonier J, Pelletier J. Control of Sheep and Goat Reproduction: Use of Light and Melatonin. Anim Reprod Sci. 1992; 30:157-184.

31. Chen Y, Foote RH , Brockett CC. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. Cryobiology. Aug. 1993;30(4):423-31.

32. Correa JR, Zavos PM. The Hypoosmotic Swelling Test: Its Employment as an Assay to Evaluate the Functional Integrity of The Frozen-Thawed Bovine Sperm Membrane. Theriogenology. 1994; 42: 351-360.

33. Cuvelier ME, Richard H, Berset C. Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-Phenols Structure-Activity Relationship. Biosci Biotech Biochem. 1992;56(2): 324-325.

34. Cuvelier ME. Antioxidant Constituents in Sage. J Agr Food Chem. 1994; 42: 665-669.

35. Çakmak B. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi NRA Bülteni. 2003; Sayı 28.

36. Çeribaşı AO, Sakin F, Türk G, Sönmez M, Ateşşahin A. Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages Experimental and Toxicologic Pathology. Available online 3 February 2011. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21295454

37. Çoyan K, Ataman MB, Kaya A, Karaca F. Evcil Hayvanlarda Dölerme ve Suni Tohumlama Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi. 2002

38. Çoyan K, Başpınar N, Bucak MN, Akalın PP, Ataman MB, Ömür AD, Güngör Ş, Küçükgünay S, Özkalp B, Sarıözkan S. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. Res Vet Sci. 2010; 89 (3):426-431.

39. Dacheux J, Pisselet C, Blanc M, Hochereau-de Reveiers MT, Court M. Seasonal Variations in Rete Testis Fluid Secretion and Sperm Production in Different Breeds of Ram. J Reprod Fertil. 1981; 61: 363- 371.

40. D'Alessandro AG, Martemucci G. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. Anim Reprod Sci. 2003; 79: 93–102.

41. Dalvit GC, Cetica PD , Beconi MT. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. Theriogenology. 1998; 49(3):619-27.

42. Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P. Decrease in Seasonality of Sexual Behavior and Sperm Reproduction in Bucks by Exposure to Short Photoperiodic Cycles. Theriogenology. 1991; 36; No 5: 755- 769.

43. Del Maestro R. Trace elements, micronutrients and free radicals. Dreosti IE(ed). Humano Press Inc Cliton. 1991;25-51.

44. Djarmati Z, Jankov RM, Schwırtlıch E, Djulınac B, Djordjevic A. High Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Sage by Supercritical CO2 Extraction. JAOCS. 1991; 68(10):731-734.

45. Donnelly ET, McClure N , Lewis SE . Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. Mutagenesis. 2000; 15(1):61-8.

46. Dziuk PT, Lewis JM, Graham EF, Moyer RH. Comparison between natural service and artificial insemination with fresh or frozen semen at an appointed time in the ewe. J Anim Sci. 1972; 35: 572-575.

47. Edderkaoui M, Odinokova I, Ohno I, Gukovsky I, Go VL, Pandol SJ, Gukovskaya AS . Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor kappa B in pancreatic cancer cells World J Gastroenterol. 2008; 21;14(23):3672-80.

48. Emsen E, Koşum N. Koyunculukta Yeni Üretim Teknikleri. U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi. 2009; 23(2): 33-42.

49. Endo Y. Antioxidant Effects on Chlorophyl and Pheophytin on the Autoxidation of Oils. JAOCS. 1985; 62(9): 1387-1390.

50. Evans G, Maxwell WMC. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. 1987; 22-30

51. Fehrenbach E, Northoff H. Free radicals, exercise, apoptozis and heat shock proteins. Exerc Immunol Rev. 2001; 7: 66-89

52. Fiser PS, Fairful RW, Marcus GJ. The effect of thawing velocity on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa frozen at optimal rates in straws. Cryobiology. 1986; 23: 141-149.

53. Garner DL, Hafez ESE. Spermatozoa and seminal plasma. In: Hafez ESE, editor. Reproduction in farm animals. Philadelphia: Lea&Febier. 1993; 167–82.

54. Goa X, Kuo JH, Deeb Jiang D, Liu Y, Divine G, Chapman RA, Dulchavsky SA, Gautam SC. Immunomodilatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell mediated cytotoxicity, and cytokine production in vitro. Biochem Pharmacol. 2004; 68: 51–61.

55. Gökçen H, Aştı RN, Çekgül E, Şener E. Prostaglandin $F_2$ alfa ve Vit. E katılarak dondurulan koç spermalarında akrozom morfolojisi ve dölverimi üzerinde araştırmalar. U Ü Vet Fak Derg. 1985; 4: 1-2-3.

56. Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. J Reprod Fertil. 1995; 103: 17-26.

57. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. Clin Chem. 1991; 37(11): 1932-1937.

58. Gupta A, Vij G, Sharma S, Tirkey N, Rishi P,Chopra K. Curcumin, a polyphenolic antioxidant, attenuates chronic fatigue syndrome in murine water immersion stress model. Immunobiology. 2009; 214(1): 33-39.

59. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement and significance. Am J Clin Nutr. 1993;57: 715-725.

60. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd Edition Clarendon Pres. Oxford: 1996

61. Hammerstedt RH . Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. Reprod Fertil Dev. 1993; 5(6):675-90.

62. Hayvansal üretim istatistikleri 2010; [cited 2010 June 03]. Available from URL: http://www.tuik.gov.tr

63. Holland MK, Alvarez JG, Storey BT. Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa. Biology of Reproduction. 1982; 27: 1109-1118.

64. Jaruga E, Salvioli S, Dobrucki J, Chrul S, Bandorowicz-Pikula J, Sikora E et al. Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes. FEBS Lett 1998; 433 (3): 287-93.

65. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an Assay to Assess The Functional Integrity of the Human Sperm Membrane and Its Relationship to Other Semen Characteristics. J Reprod Fertil. 1984; 70: 219-228.

66. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJD. The Hypoosmotic Swelling Test: An Update. Arch Androl. 1992; 29, 105-116.

67. Kahraman A. Yumurta tavuğu karma yemlerine katılan metiyonin ve magnezyumun yumurta verimi ve kalitesi ile kan parametrelerine etkisi. E Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları AD. Yüksek Lisans Tezi. 2008;10

68. Kalender S, Kalender Y, Öğütçü A, Uzunhisarcıklı M, Durak D, Açıkgöz F. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. Toxicology. 2002;202:227-235.

69. Kanitkar M, Bhonde RR. Curcumin treatment enhances islet recovery by induction of heat shock response proteins, Hsp70 and heme oxygenase-1, during cryopreservation. Life Sci. 2008; 82: 182–189

70. Kappus H. A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. Chem Phys Lipids. 1987; 45: 105-115

71. Karagiannidis A, Varsakeli S, Alexopoulos C, Amarantidis I. Seasonal Variation in Semen Characteristics of Chios and Friesian Rams in Greec. Small Rum Res. 2000; 37: 125-130.

72. Khanduja KL, Gandhi RK, Pathania V, Syal N. Prevention of N- Nitrosodiethylamine- induced Lung Tumorigenesis by Ellagic Acid and Quercetin in Mice. Food Chem Toxicol. 1999; 37: 313-318.

73. Kobayashi T, Miyasaki T, Natori M, Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: Superoxide dismutase activiy and lipid peroxidase in human seminal plasma and spermatozoa. Hum Reprod. 1991; 6: 987-991.

74. Koo JY, Kim HJ, Jung KO, Park KY. Curcumin inhibits the growth of AGS human gastric carcinoma cells in vitro and shows synergism with 5-flourouracil. J Med Food. 2004; 7: 117–121.

75. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2004; 15(1-2):91-96.

76. Lagares MA, Petzoldt R, Sieme H, Klug E. Assesing Equine Sperm-Membrane Integrity. Andrologia. 2000; 32: 163-167.

77. Liu F, Hindupur J, Nguyen JL, Ruf KJ, Zhu J, Schieler JL, Bonham CC, Wood KV, Davisson VJ , Rochet JC. Methionine sulfoxide reductase A protects dopaminergic cells from Parkinson's disease-related insults. Free Radic Biol Med. 2008; 1;45(3):242-55.

78. MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. Am J Physiol. 1943;138:512–518.

79. Mara L, Dattena M, Pilichi S, Sana D, Branca A, Cappai P. Effect of different diluents on goat semen fertility. Anim Reprod Sci. 2007; 102, 152-157.

80. Maxwell WM, Stojanov T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. Reprod Fertil Dev. 1996; 8(6):1013-20.

81. Nie GJ, Wenzel JGW. Adaptation of the Hypoosmotic Swelling Test to Assess Functional Integrity of Stallion Spermatozoal Plasma Membranes. Theriogenology. 2001; 55: 1005-1018.

82. O'Flaherty CM, Beconi MT, Beorlegui NB. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. Andrologia.1997; 29: 269-275.

83. Ortavant R. Spermatogenesis and Morphology of the Spermatozoon. In' Reprod Domest Anim. Eds. H. H. 1959

84. Ozcan Oruc E, Sevgiler Y, Uner N. Tissue-specific Oxidative Stress Responces in Fish Exposed to 2,4-D and Azinphosmethyl. Comp. Biochem. Physiol Part C. 2004; 137, 43-51

85. Özata M, Yılmaz Mİ, Mergen M, Öktenli Ç, Aydın A. Erkek obezitesinde bozulmuş antioksidan kapasite ve hipoçinkonemi. Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism. 2003; (2) : 47-51.

86. Özkaya A, Çelik S, Yüce A, Şahin Z, Yılmaz Ö. The effects of ellagic acid on some biochemical parameters in the liver of rats against oxidative stress induced by aluminum. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2010; 16 (2): 263-268.

87. Özdalyan N. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon Yöntemi ile Elde Olunan Adaçayı Ekstraktının Antioksidan Özellikleri Üzerine Bir Çalışma. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul. 1998; 5-37.

88. Öztürkler Y, Ak K, İleri İK. Koç spermasının yoğun gliserollü sulandırıcılarda dondurulması. İstanbul Üniv Vet Fak Derg. 1999; 25 (2): 399-414.

89. Parcell S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. Altern Med Rev. 2002; 7: 22-44.

90. Parrish JJ, Susko- Parrish JL, Leibfried- Rutledge ML, Criester ES, Eyestone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology. 1986; 25: 591-600.

91. Patra RC, Swarup D , Dwivedi SK . Antioxidant effects of alpha tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. Toxicology. 2001; 162: 81-88.

92. Pena FJ, Johannisson AM, Rodriguez-Martines H. Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipit architecture status after cryopreservation. Theriogenology. 2004; 61: 63-70.

93. Phan TT, See P, Lee ST, Chan SY. Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing. Journal of Trauma. 2001; 51 (5): 927–931.

94. Placer CA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (Malondy Dialdehyde) in biochemical systems. Anal Biochem. 1990; 16: 259-264.

95. Pomares CC, Stojanov T, Epplenton J, Maxwell WMC. Effect of glutathion peroxidase on the survival of goat and ram spermatozoa during liquid storage. Proc 7 th. Int Symp Spermatol Abstr.1994; 9: 24-28.

96. Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1984;105:273-283.

97. Potts RJ, Jefferies TM ,Notarianni LJ. Antioxidant capacity of the epididymis. Hum Reprod Oct. 1999; 14(10):2513-6.

98. Potts RJ, Notarianni LJ, Jefferies TM. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. Mutat Res-Fund Mol M. 2000; 447: 249-256.

99. Priyadarsini KI, KhopdeSM, Kumar SS, Mohan H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. J Agric Chem. 2002; 50 (7):2200-6

100. Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. Small Rum Res. 2006; 63: 215-225.

101. Reddy AC, Lokesh BR. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. Molecular and Cellular Biochemistry. 1994; 137 (1): 1–8.

102. Rossel JB. Rancidity in Foods. Hamilton Applied Science Publishers. London, 1983;21.

103. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. Anim Reprod Sci. 2000; 62: 77-111.

104.Saleh AI. Seasonal Variation in Semen Quality of Local and Crossbred Rams Raised in the United Arab Emirates. Anim Reprod Sci. 1997; 49: 161-167.

105.Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. J Androl. 2002; 23(6):737-52.

106.Sanchez-Partida LG, Setchell BP, Maxwell MC. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. Reprod Fertil Dev. 1997; 9: 689-696.

107.Sarlós P, Molnár A, Kókai M, Gábor G ,Rátky J . Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. Acta Vet Hung. 2002;50(2):235-45.

108.Sharma RA, Ireson CR, Verschoyle RD et al. Effects of Dietary Curcumin on Glutathione *S*-Transferase and Malondialdehyde-DNA Adducts in Rat Liver and Colon Mucosa. Clin Cancer Res. 2001; 7: 1452-1458.

109.Sikka SC . Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front Biosci. 1996; 1;1:e78-86.

110.Sliwa L. Usability of the Hypoosmotic Swelling "Water-test"- A Simple Method to Assess Sperm Membrane Integrity in Mouse Spermatozoa. Folia Biol. (Krakow). 1993; 41: 29-31.

111.Smith JF, Asher GW, Briggs RM, Murray GR, Morrow CJ, Oliver JE, Parr J, Veldheuizen FA, Upreti GC. Effect of diluent and storage time on pregnancy rate in ewes after intrauterine insemination. Proc N Z Soc Anim Prod. 1993; 53: 295-298.

112.Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. Mayo Clin Proc. 1988;63(4):381-389

113.Sreejayan N, Rao MN. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. J Pharm Pharmacol. 1994; 46 (12): 1013–1016.

114.Sreejayan N, Rao MN, Priyadarsini KI, Devasagayam TPA. Inhibition of radiation-induced lipid perxidation by curcumin. Int J Pharm. 1997; 151 (1): 127-130.

115.Stadtman ER, Van Remmen H, Richardson A, Wehr NB, Levine RL. Methionine oxidation and aging. Biochim Biophys Acta. 2005; 1703: 135-140.

116.Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of antiflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. Mutat Res. 2001; (480) 243–268.

117.Tekin N, Uysal O, Akçay E, Yavaş İ. Farklı taurin dozlarının ve dondurma hızının koç spermasının dondurulması üzerine etkileri. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2006; 53, 179-184.

118.Thundathil J, de Lamirande E, Gagnon C. Nitric oxide regulates the phosphorylation of the threonine-glutamine-tyrosine motif in proteins of human spermatozoa during capacitation. Biol Reprod. 2003; 68(4):1291-8.

119.Tuncer PB, Bucak MN, Sarıözkan S, Sakin F, Yeni D, Çiğerci İH, Ateşşahin A, Avdatek F, Gündoğan M, Büyükleblebici O. The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (Capra hircus ancryrensis) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. Cryobiology. 2010; 61: 89-93.

120.Tümen H, Gökçen H, Soylu MK, Doğan İ. Değişik düzeylerde vitamin-E katılarak sulandırılan koç spermasının spermatolojik özellikleri ve dölverimi üzerinde araştırmalar. U Ü Vet Fak Derg. 1991; 10 (1-2-3): 91-98.

121.Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Çeribaşi AO, Yüce A. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. Fertility and Sterility. 2008; 89 (5): 1474-1481.

122. Türkiye'de Koyunculuk, Ülke Ekonomisine Etkisi, Sorunları, Çözüm Önerileri. 2010; [cited 2010 Oct 03]. Available from URL: http://www.tesk.org.tr/tr/calisma/gida/rapor1.pdf

123. Ulutaş PA, Serin İ, Ceylan A. Horozlarda seminal plazma lipid peroksidasyonu ve ekstraselüler antioksidanlar ile bazı spermatolojik özellikler arasındaki ilişkiler. İstanbul Üni Vet Fak Derg. Yayınları Makale 7, 2005.

124. Unnikrishnan MK., Rao MN. Curcumin inhibits nitrogen dioxide induced oxidation of hemoglobin. Molecular and Cellular Biochemistry. 1995;146 (1): 35–37.

125. Upreti GC, Jensen K, Oliver JE, Duganzich DM, Munday R , Smith JF . Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. Anim Reprod Sci. 1997; 48(2-4): 269-78.

126. Uysal O, Kinet H, Çevik M, Çetinkaya S. Değişik antioksidanlar içeren farklı sulandırıcılarla dondurulmuş koç spermalarından elde edilen dölverimi. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2000; 47;177-189.

127. Uysal O, Bucak MN. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. Acta Vet Brno. 2007; 76: 383-390.

128. Uysal O, Bucak MN, Yavaş İ, Varışlı Ö. Effects of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. J Anim Vet Adv. 2007; 6: 1362-1366.

129. Vishwanath R, Shannon P . Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. Reprod Fertil Dev. 1997; 9(3):321-31.

130. Vitt U. Fruchtbarkeitskriterien aufgetauter Bullenspermien in vitro und die Beeinflussung dieser durch Seminalplasmaaustausch vor der Gefrierkonservierung Diss. Vet Med Freien Universitat Berlin. 1997.

131. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post- thawing function. Reprod Fertil Dev. 1995; 7: 871-91.

132. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci. 2000;2;60-61: 481-92

133. Windsor DP, White IG, Selley ML, Swan MA. Effects of the lipid peroxidation product (E)-4-hydroxy-2-nonenal on ram sperm function. J Reprod Fertil. 1993; 99(2):359-66.

134. Windsor PP, Szell AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton TTB, Buchrell BC. Transcervical artificial insemination of Western Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. Theriogenology. 1994; 42: 147-157.

135. Young SG, Parthasarathy S. Why are low density lipoproteins atherojenic? West J Med. 1994;160(2):153-164.

136. Zini A, Garrels K, Phang D. Antioxidant activity in the semen of fertil and infertil men. Urology. 2000; 55: 922-926.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

17.11.1980 tarihinde Göle'de doğdu. İlkokulu 1992 yılında Gazi Ahmet Muhtar Paşa İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimini Kars Anadolu İmam Hatip Lisesi'nde 1999 yılında tamamladı. Aynı yıl Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandı ve 2004 yılında bu fakülteden mezun oldu. Mezun olduğu sene Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı. 2006 yılında Yükseköğretim Kurulu kanalıyla kadrosunun aktarıldığı Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda doktora programına başladı. 2009 yılında 3 ay süreyle Erasmus programı çerçevesinde İtalya'da, Torino Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde eğitim gördü. Halen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda görev yapmaktadır.