T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANGAL KÖPEĞİ SPERMASININ DONDURULMASINDA FARKLI ANTİOKSİDANLAR VE KRİYOPROTEKTANLARIN ETKİSİ

Şükrü GÜNGÖR

DOKTORA TEZİ

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Mustafa Numan BUCAK

KONYA-2015

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANGAL KÖPEĞİ SPERMASININ DONDURULMASINDA FARKLI ANTİOKSİDANLAR VE KRİYOPROTEKTANLARIN ETKİSİ

Şükrü GÜNGÖR

DOKTORA TEZİ

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Mustafa Numan BUCAK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından **13102014** proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2015

ÖNSÖZ

Kangal köpeği (Anadolu Çoban Köpeği) Anadolu'da bekçilik, sürü koruyuculuğu, sadık bir hayvan olarak yüzyıllardır yetiştirilmektedir. Kendine has özelliklerine sahip olması nedeniyle ülkemiz ile özdeşleşmiş ve halen ülkemizde tanınan en önemli köpek ırkıdır. Hayvan sahipleri Kangal köpeğinin özelliklerini koruyabilmek adına sahip oldukları köpekleri doğal bir seleksiyon ile günümüze kadar korumaya çalışmışlardır. Ancak günümüzde bölgeler arası farklılıklardan dolayı Kangal köpeklerinin farklı köpekler ile çiftleştirilerek ırk özelliklerinin kaybolma tehlikesine neden olunmuştur.

Türün ve ırkın ıslahı ve neslin devamında spermalarının dondurulması önemli yer olmaktadır. Köpek spermasının dondurulmasına ait ilk çalışma 1954 yılında Rowson tarafından bildirilmektedir. Daha sonra bu alanda, günümüze kadar birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda başarılı bir kriyoprezervasyon işlemi için antioksidan madde ilavesinin gerekliliği ortaya konmuştur.

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 azalttığı ve sperma kalitesini iyileştirdiği bildirilmektedir.

Sunulan tez çalışmasında, Kangal köpeği spermasının dondurulmasında kuersetin, ergotiyonin ve BME (esansiyel amino asit)'in ve kriyoprotektan olarak gliserol ve etilen glikolün etkinliklerinin sulandırma sonu subjektif motilite, dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik parametreler ile (spermatozoa subjektif ve CASA motiliteleri, spermatozoa hareket özellikleri, floresan boyama yöntemleri ile spermatozoa canlılığı, mitokondriyal aktivitesi ve akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi ve COMET testi ile DNA bütünlüğünün belirlenmesi) araştırılması amaçlanmıştır.

Tez çalışmamın her aşamasında yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa Numan BUCAK başta olmak üzere, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN'a, Yrd. Doç. Dr. Pınar İLİ'ye, Arş. Gör. Caner ÖZTÜRK'e hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu dönemde de bana destek olan eşim Meral GÜNGÖR'e ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER ve KISALTMALAR ..... **v**
ÇİZELGELER ve ŞEKİLLER ..... **vi**
1. GİRİŞ **1**
1.1.Köpek Spermasının Spermatolojik Özellikleri 1
1.1.1. Spermatozoonun Morfolojik Yapısı 2
1.1.2. Ejakulat Miktarı 3
1.1.3. Spermatozoa Motilitesi 4
1.1.4. Spermatozoa Yoğunluğu 7
1.2. Oksidatif Stres 7
1.2.1 Spermatozoonun Membran Yapısı 8
1.2.2. Lipit Peroksidasyonunun Spermatozoon Üzerine Etkisi 8
1.2.3. Serbest Radikaller 9
1.2.4. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) 9
1.2.5. Reaktif Nitrojen Türleri (RNS) 10
1.2.6. Reaktif Olmayan Oksijen Türleri 11
1.2.7. Spermatozoada Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu ve Etkileri 11
1.3. Antioksidanların Oksidatif Stres Üzerine Etkileri 14
1.3.1. Enzimatik Antioksidanlar 15
1.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar 16
1.4. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması 20
1.4.1. Spermanın Sulandırılması 20
1.4.2. Spermanın Dondurulması 21
1.4.3. Kristalizasyon 22
1.4.4. Spermanın Dondurulmasında Kullanılan Kriyoprotektanlar 23
1.4.5. Köpek Spermasının Dondurulması İle İlgi Yapılan Çalışmalar 26
1.5. Kuersetin, Ergotiyonin ve Esansiyel Amino Asit Solüsyonunun (BME) Antioksidatif Etkinliği 27
2. GEREÇ ve YÖNTEM **30**
2.1. Gereç 30
2.2. Yöntem 30
2.2.1. Spermanın Alınması 30
2.2.2. Sperma Sulandırıcısının Hazırlanması 30

2.2.3. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması 32
2.3. Spermanın Değerlendirilmesi.....32
2.3.1. Spermatozoa Motilitesi.....32
2.3.2. Subjektif Motilite 32
2.3.3.Bilgisayarlı Sperma Analiz Cihazı (CASA) ile Motilite.....32
2.3.4. Spermatozoa Canlılığı 33
2.3.5. Spermatozoa Akrozom Bütünlüğü 34
2.3.6. Spermatozoa Mitokondriyal Aktivitesi 34
2.3.7. Spermatozoa DNA Bütünlüğü 35
2.4. İstatistiksel Analiz 39
3. BULGULAR.....40
3.1. Birinci Deney Grubuna Ait Verilerin Değerlendirilmesi 40
3.2. İkinci Deney Grubuna Ait Verilerin Değerlendirilmesi.....43
3.3. Üçüncü Deney Grubuna Ait Verilerin Değerlendirilmesi 45
4. TARTIŞMA.....48
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....62
6.KAYNAKLAR.....63
7. EKLER.....73
Ek A. Etik Kurul Kararı.....73
8. ÖZGEÇMİŞ 74

SİMGELER ve KISALTMALAR

BHT: Bütil hidroksitoulen

cAMP: Adenozin monofosfat

CAT: Katalaz

DMSO: Dimetil sülfo oksit

DYA: Çoklu doymamış yağ asidi

e^-: Elektron

EDTA: Etilen diamin tetra asetikasit

Fe^{+2}:Demir

GPx: Glutatyon peroksidaz

H_2O_2:Hidrojen peroksit

HOCl: Hipokloröz asit

LDL: Düşük yoğunluklu lipitler

LPO: Lipid Peroksidasyon

NO: Nitrik oksit

O_2 :Oksijen

O_2^*: Singlet Oksijen

$O_2^{\bullet -}$: Süperoksit anyon

$OH^{\bullet}$:Hidroksil radikali

$ONOO^-$: Peroksi nitrik

RNS: Reaktif Nitrojen Türleri

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SOD: Süperoksit dismutaz

ÇİZELGELER ve ŞEKİLLER

Çizelge 1.1. Kangal Çoban köpeklerinde spermatolojik muayene bulguları.....2

Çizelge 1.2. Köpek ejakulat miktarı ve sürelerine ilişkin araştırma sonuçları.....2

Çizelge 1.3. Köpek ejakulat miktarı ve sürelerine ilişkin araştırma sonuçları.....3-4

Çizelge 3.1. Farklı dozlarda kuersetin içeren köpek spermalarında sulandırma ve çözüm sonu motilite parametreleri 41

Çizelge 3.2. Farklı dozlarda kuersetin içeren köpek spermalarında çözüm sonu spermatozoon hareket (VAP, VSL, VCL, ALH, LIN) parametreleri.....42

Çizelge 3.3. Farklı dozlarda kuersetin içeren köpek spermalarında çözüm sonu floresan mikroskop (SYBR-PI, FITC-PI, JC1-PI) ve COMET değerleri.....43

Çizelge 3.4. Farklı dozlarda ergotiyonin içeren köpek spermalarında sulandırma ve çözüm sonu motilite parametreleri 43

Çizelge 3.5. Farklı dozlarda ergotiyonin içeren köpek spermalarında çözüm sonu spermatozoon hareket (VAP, VSL, VCL, ALH, LIN) parametreleri.....44

Çizelge 3.6. Farklı dozlarda ergotiyonin içeren köpek spermalarında floresan mikroskop (SYBR-14/PI, FITC/PI, JC-1/PI) ve COMET değerleri.....45

Çizelge 3.7. Farklı dozlarda BME içeren köpek spermalarında sulandırma ve çözüm sonu motilite parametreleri.....45

Çizelge 3.8. Farklı dozlarda BME içeren köpek spermalarında çözüm sonu spermatozoon hareket (VAP, VSL, VCL, ALH, LIN) parametreleri.....46

Çizelge 3.9. Farklı dozlarda BME içeren köpek spermalarında çözüm sonu floresan mikroskop (SYBR-14/PI, FITC/PI, JC-1/PI) ve COMET değerleri.....47

Şekil 2.1. Spermatozoonlarda SYBR-14/PI boyama tekniği ile ölü-canlı spermatozoa oranının değerlendirilmesi.....33

Şekil 2.2. Spermatozoonlarda FITCH-PNA/PI boyama tekniği ile akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi 34

Şekil 2.3. Spermatozoonlarda JC-1/PI boyama tekniği ile mitokondriyal aktivitenin değerlendirilmesi 35

Şekil 2.4. Spermatozoonlarda COMET tekniği ile DNA bütünlüğü değerlendirilmesi, hasarlı DNA'ya sahip spermatozoon. 38

Şekil 2.5. Spermatozoonlarda COMET tekniği ile DNA bütünlüğü değerlendirilmesi, sağlam DNA'ya sahip spermatozoon.....38

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANGAL KÖPEĞİ SPERMASININ DONDURULMASINDA FARKLI ANTİOKSİDANLAR ve KRİYOPROTEKTANLARIN ETKİSİ

Şükrü GÜNGÖR

Dölerme ve Suni Tohumlama (Vet) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2015

Sunulan tez çalışmasında, Kangal köpeklerinden alınan ejakülatlar birleştirilerek 3 farklı deney grubu oluşturuldu. Her deney grubu altı farklı alt gruptan oluştu. Deney grupları temel Tris sulandırıcısıyla (T) sulandırıldı. Birinci deney grubu, %5 gliserol (G)+kuersetin (K) 50 µM (TGK50), %5G + K 200 µM (TGK200), %5 etilen glikol (E)+ K 50 µM (TEK50), %5 E+K200 µM (TEK200), %5G (TG) ve %5E (TE) içeren Tris sulandırıcılarıyla sulandırılan spermalarla oluşturuldu. İkinci deney grubu, TG + Ergotiyonin (E) 0,5 mM (TGE0.5), TG + E 2 mM (TGE2), TE + E 0,5 mM (TEE0.5), TE + E 2 mM (TEE2), %5 TG ve %5 TE içeren Tris sulandırıcılarıyla sulandırılan spermalarla oluşturuldu. Üçüncü deney grubu, TG + BME %2,5 (TGB2.5), TG+ BME %10 (TGB10), TE+ BME %2,5 (TEB2.5), TE+ BME %10 (TEB10), % 5TG ve %5 TE içeren Tris sulandırıcılarıyla sulandırılan spermalarla oluşturuldu. Üç farklı deney gruplarında sulandırılan spermalar 4^{o}C'ta 1,5 saat ekilibrasyon sonrası sıvı azot buharında dondurularak sıvı azotta (~-196ºC) saklandı. Spermalar sulandırma ve dondurma/çözdürme sonrası subjektif spermatozoon motilitesi, çözüm sonu CASA motiliteleri, spermatozoa hareket özellikleri, spermatozoa canlılığı (SYBR-14/PI), mitokondriyal aktivitesi (JC-1/PI), akrozom bütünlüğü (FITC/PI) ve DNA bütünlüğü yönünden değerlendirildi.

Birinci deney grubunda çözüm sonu subjektif motilite değerleri TGK50 (%55,70±0,71), TGK200 (%60,00±1,09), TEK200 (%56,40±1,42) gruplarında, TG (%50,70±1,70) ve TE (%51,40±0,92) gruplarına göre yüksek bulundu. Progresif motilite TGK200 (%27,14±1,08) grubunda, TE (%20,56±1,07) grubuna göre istatiksel olarak yüksekti. TGK50 ve TGK200 grupları canlılık, akrozom bütünlüğü ve mitokondriyal aktivite oranları bakımından (sırasıyla, %59,69±1,84, %60,49±2,54; %56,68±3,17, %52,67±3,57; %58,34±6,17, %57,53±6,08) TE grubuna (sırasıyla, %48,68±2,41, %37,95±1,76, %43,25±2,10) göre istatiksel olarak üstünlük gösterdi. DNA bütünlüğü korunmasında TGK200 (%95,75±0,52) grubu, TE (%93,41±0,74) grubuna göre istatiksel olarak daha yüksek koruma sağladı ($P<0.05$).

İkinci deney grubunda çözüm sonu progresif motilite oranı TGE2 (%28,71±1,52) grubunda, TG (%15,81±0,49) ve TE (%15,23±2,39) gruplarına göre yüksek bulundu. Canlılık ve akrozom bütünlüğü TGE2 (sırasıyla, %66,37±3,24; 59,87±1,27) grubunda, TG (%58,42±2,44; 54,69±0,85) ve TE (%49,99±2,52; 47,06±1,48) gruplarına göre istatiksel olarak üstünlük gösterdi ($P<0.05$).

Üçüncü deney grubunda progresif motilite oranı TGB10 (%23,19±1,61) grubunda, TE (%14,08±3,07) grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulundu. Akrozom bütünlüğü TGB2.5 (%44,99±4,97) grubunda, TG (%14,08±3,07) grubuna göre istatiksel olarak üstünlük gösterdi ($P<0.05$).

Sonuç olarak, Kangal köpeği spermasında, farklı kriyoprotektanlarla antioksidan kombinasyonunun çözüm sonrası spermatolojik parametreler üzerinde olumlu koruma sağladığı sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan; Köpek sperması; Kriyoprotektan; Sperma dondurma

SUMMARY

REBUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALT SCIENCES INSTITUTE

The EFFECT of DIFFERENT ANTIOXIDANTS AND CRYOPROTECTANTS on FREEZING of KANGAL DOG SEMEN

Şükrü GÜNGÖR

Department of Reproduction and Artificial Insemination (Vet)

PhD THESIS / KONYA-2015

In the presented thesis, ejaculates collected from Kangal dogs were allocated to three different experimental groups. Each experimental group comprised six subgroups, which were established by dividing the collected semen into six equal aliquots. All subgroups were diluted with a Tris-based extender (T). The first experimental group included semen samples diluted with Tris-based extenders containing 5% glycerol (G)+quercetin (K) 50 µM (TGK50), 5% G+K 200 µM (TGK200), 5% ethylene glycol (E)+K 50 µM (TEK50), 5% E+K 200 µM (TEK200), 5% G (TG) and 5% E (TE). The second experimental group included semen samples diluted with Tris-based extenders containing TG+Ergothionine (E) 0.5 mM (TGE0.5), TG+E 2mM (TGE2), TE+E 0.5 mM (TEE0.5), TE+E 2 mM (TEE2), TG and TE. The third experimental group was composed of semen samples diluted with Tris-based extenders containing TG+BME 2.5% (TGB2.5), TG+BME 10% (TGB10), TE+BME 2.5% (TEB2.5), TE+BME 10% (TEB10), TG and TE. The diluted semen samples, belonging to the three different experimental groups, were equilibrated at 4°C for 1.5 hours and then frozen in liquid nitrogen vapour and stored in liquid nitrogen (~-194ºC). Following dilution and freeze-thawing, the semen samples were assessed for subjective sperm motility, post-thaw CASA motility, sperm motility parameters, sperm viability (SYBR-14/PI), mitochondrial activity (JC-1/PI), acrosome integrity (FITC/PI) and DNA integrity.

In the first experimental group, the post-thaw subjective motility values of the TGK50 (55.70±0.71%), TGK200 (60.00±1.09%), and TEK200 (56.40±1.42%) were higher than those of the TG (50.70±1.70%) and TE (51.40±0.92%). The progressive motility rate was significantly higher in TGK200 (27.14±1.08%), when compared to TE (20.56±1.07%). In TGK50 and TGK200, the viability, acrosome integrity and mitochondrial activity rates (59.69±1.84%, 60.49±2.54%; 56.68±3.17%, 52.67±3.57%; 58.34±6.17%, and 57.53±6.08%, respectively) were significantly higher than those of TE (48.68±2.41%, 37.95±1.76%, 43.25±2.10%, respectively). The DNA integrity rate was higher in TGK200 (95.75±0.52%), compared to TE (93.41±0.74%) group ($P<0.05$).

In the second experimental group, the post-thaw progressive motility rate was higher in the TGE2 (28.71±1.52%), compared to TG (15.81±0.49%) and TE (15.23±2.39%). Furthermore, the viability and acrosome integrity rates were significantly higher in TGE2 (66.37±3.24% and 59.87±1.27%, respectively) than in TG (58.42±2.44%; 54.69±0.85%) and TE (49.99±2.52%; 47.06±1.48%) ($P<0.05$).

In the third experimental group, the progressive motility rate of the TGB10 (23.19±1.61%) was significantly higher than that of the TE (14.08±3.07%). The acrosome integrity rate of the subgroup TGB2.5 (44.99±4.97%) was significantly higher than that of TG (14.08±3.07%) ($P<0.05$).

In conclusion, it was determined that different cryoprotectant and antioxidant combinations improved the post-thaw quality of Kangal dog semen.

Keywords: Antioxidant; Canine semen; Cryoprotectant; Sperm freezing

1. GİRİŞ

Türkiye'nin en yaygın tanınan köpek ırkı, Anadolu çoban köpeğidir. Bu çoban köpekleri, bekçi köpeği olarak yetiştirildikleri büyük şehirler dışında, koyun yetiştiriciliğinin yapıldığı yerlerde de bulunmaktadır. Akkaraman yetiştiriciliğinin yapıldığı yerlerde açık boz renkli Kangal ve Akbaş, Morkaraman yetiştiriciliğinin yapıldığı yerlerde ise koyu, sarı, dalkır (çizgili) renkli Kangal ve Kars Çoban köpeği olarak yetiştirilmektedir (Yılmaz 2005).

İsmini, çoğunlukla bulunduğu Sivas'ın Kangal ilçesinden almış olan Kangal köpek ırkı, iyi bir bekçi ve çoban köpeği olarak bu amaçlarla yetiştirilmiştir. Kangal köpeğinin belli bir amaçla yetiştirilmiş olması, bu köpekle ilgili soy kütüğü çalışması yapılmamış olmasına rağmen örnek bir tip için seleksiyonuna yol açmıştır. Bu sayede Kangal köpeğine ait tip standartları gelişmiş ve neslinin devamlılığı sağlanmıştır (Özbeyaz 1994, Akçay 2000)

Kangal köpeği, yüksek yapılı bir köpek olup, yerden omuz yüksekliği 70-85 cm, canlı ağırlığı 45-65 kg arasındadır. Kangal köpeği dişileri 7-8 aylık olduklarında, erkekler ise genellikle 9-12 aylık iken cinsel olgunluğa (Pubertas) erişirtikleri belirtilmektedir (Cupps 1991, Akçay 2000). Köpeklerde dişiler mevsime bağlı monoöstrik hayvanlardır. Kangal köpeği dişileri 6-8 ayda bir kızgınlık gösterirler ve iyi bakım-besleme koşullarında bir batında ortalama 6-8 yavru doğururlar; 8-10 yaşına kadar yavru verebilirler. Kangal köpeği erkeği ise yıl boyunca seksüel aktivite gösterirken mevsimsel etkiler minimumdur (Özgüneş ve Çiftçi 1993, Özbeyaz 1994).

1.1.Köpek Spermasının Spermatolojik Özellikleri

Erkek hayvanların damızlık değerinin belirlenmesinde ve yetiştiriciliğinde spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi önemlidir. Spermatolojik özelliklerden herhangi birinde oluşan olumsuzluk, fertilizasyonu doğrudan etkilemekte ve diğer verim özellikleri yönünden olumlu görülen damızlık değerlerini kaybetmektedir. Özellikle erkek damızlıkların değerlendirildiği suni tohumlama uygulamalarında spermatolojik özellikler erkek hayvanların dölleme yeteneklerini (potentia generandi) ortaya koyan önemli bir kriterdir (Tekin 1994). Kangal köpeklerinde ırka ait spermatolojik parametrelerin araştırıldığı çalışmada yaşa göre spermatolojik

özelliklerde farklılıklar çıktığı saptanmış olmasına karşın, genel olarak köpeklerde ortalama spermatolojik değerler ortaya konulmuştur (Akçay ve Tekin 2002).

Çizelge1.1. Kangal Çoban köpeklerinde spermatolojik muayene bulguları (Akçay 2000).

Orta Sekret miktarı (ml)	Motilite (%)	Yoğunluk ($x10^6$ / ml)	Ölü Spermatozoa oranı (%)
2.21	74.54	290.30	10.56

Günümüzde evcil hayvnaların sperma muayene yöntemleri ile erkek hayvanların fertilite yönünden değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Köpeklerden sperma almak için kullanılan en yaygın teknik elle masaj yöntemi (digital maniplasyon)'dir (Akçay 2000).

1.1.1. Spermatozoonun Morfolojik Yapısı

Memeli spermatozoası baş, boyun ve kuyruk olarak üç bölümden oluşmaktadır. Uzunluğu ise türlere göre değişkenlik göstermektedir (Pesch ve Bergmann 2006). Schnorr (1996), Smollich ve Michel (1992) ve Dahlbom ve ark (1997)'nın yapmış oldukları çalışmalara göre farklı türlerin spermatozoon uzunlukları Çizelge1.2.'de verilmiştir.

Çizelge1.2. Türlere göre spermatozoon uzunlukları (µm).

Türler	Baş kısmı	Kuyruk kısmı	Total uzunluk
Aygır	5.0[a]	55.0[a]	60[c]
Boğa	9.15[a]	65.8-80.8[a]	75-90[c]
Domuz	8.5[a]	41.5-71.5[a]	50-60[c]
Koç	8.2[a]	61.8-71.8[a]	70-80[c]
Köpek	6.49-7.06[b]	53.5[b]	60-70[c]

[a] Smollich ve Michel (1992)

[b] Dahlbom ve ark (1997)

[c] Schnorr (1996)

1.1.2. Ejakulat Miktarı

Ejakulat miktarı, bir ejakulasyon sonunda dışarı verilen spermatozoa ve eklenti bezleri salgılarının toplamının hacmidir ve değerlendirmesi ml olarak yapılır (Garner ve Hafez 1993).

Köpeklerde ejekülasyon, diğer evcil hayvan türlerinden farklı olarak, ön sekret, ana sekret ve son sekret olmak üzere 3 fazdan oluşmaktadır. Birinci faz seminal sıvıdan, üçüncü fazın ise prostat sıvısından zengin olduğu bildirilmiştir. Sperma ise ejekulasyonun ikinci fazından elde edilmektedir (England ve ark 1990). Farklı köpek ırklarına ait ejakulat miktarı ve ejakulasyon sürelerine ilişkin araştırma sonuçları Çizelge1.3.'de verilmiştir.

Çizelge1.3. Köpek ejakulat miktarı ve ejakulasyon sürelerine ilişkin araştırma sonuçları.

		Fraksiyon Miktarı (ml)	Toplam Ejakulat Miktarı (ml)	Fraksiyon Süresi (sn)	Ejakulasyon Süresi (dk)
Harrop (1962)	Birinci Fraksiyon	0,25-2	3,75-31	30-50	4,5-33
	İkinci Fraksiyon	0,5-4		50-80	
	Üçüncü Fraksiyon	3-25		180-1800	
Tekin ve ark (1987)	Birinci Fraksiyon	-	25,4	-	10-12
	İkinci Fraksiyon	-		-	
	Üçüncü Fraksiyon	-		-	
England ve ark (1990)	Birinci Fraksiyon	-	25,4	60-120	70-75
	İkinci Fraksiyon	-		30-60	
	Üçüncü Fraksiyon	-		600-4500	
Linde-Forsberg (1991)	Birinci Fraksiyon	1-5	32-48	30-60	6,5-65
	İkinci Fraksiyon	1-3		60-180	
	Üçüncü Fraksiyon	30-40		300-3600	
Johnstone (1991)	Birinci Fraksiyon	-	1-30	-	-
	İkinci Fraksiyon	-		-	
	Üçüncü Fraksiyon	-		-	

Çizelge1.3(Devamı). Köpek ejakulat miktarı ve ejakulasyon sürelerine ilişkin araştırma sonuçları.

Schafer ve ark (1997)	Birinci Fraksiyon		-	-	-
	İkinci Fraksiyon	1,2		-	
	Üçüncü Fraksiyon			-	
Akçay ve Tekin (2002)	Birinci Fraksiyon	-	14,75	-	17,04
	İkinci Fraksiyon	-		-	
	Üçüncü Fraksiyon	-		-	
Akçay ve Tekin (2002)	Birinci Fraksiyon	-	16,81	-	15,13
	İkinci Fraksiyon	-		-	
	Üçüncü Fraksiyon	-		-	
Akçay ve Tekin (2002)	Birinci Fraksiyon	-	11,86	-	12,07
	İkinci Fraksiyon	-		-	
	Üçüncü Fraksiyon	-		-	
Freshman ve Dacvim (2002)	Birinci Fraksiyon	0,5-20	1-22	-	-
	İkinci Fraksiyon	0,5-2		-	
	Üçüncü Fraksiyon	-		-	
Çoyan ve ark (2009)	Birinci Fraksiyon	0,7	7,4	-	7
	İkinci Fraksiyon	0,7		-	
	Üçüncü Fraksiyon	6		-	
Peres ve ark (2014)	Birinci Fraksiyon		10	-	-
	İkinci Fraksiyon			-	
	Üçüncü Fraksiyon			-	

1.1.3. Spermatozoa Motilitesi

Spermatozoa motilitesi, başı yönünde ileriye doğru düzgün doğrusal hareket eden spermatozoonların tüm spermatozoonlara oranı olarak tanımlanır ve % olarak ifade edilir. Motilite muayenesinin, sperma alınmasından hemen sonra çevre şartlarından etkilenmeden yapılması gerekmektedir (Garner ve Hafez 1993).

İlk olarak 1979' da Dott ve Foster'ın bilgisayar destekli bir yazılımla motilite tayinini yapmasının ardından artık günümüzde kullanılan mevcut bilgisayar teknolojileri ve halen geliştirilmeye devam eden yazılımlar sayesinde spermatolojik

özelliklerin belirlenmesi hızlı ve hassas bir şekilde yapılabilmektedir. Bilgisayar destekli spermatozoa analiz sistemleri, periyodik olarak hareket eden spermatozoonun zaman ayarlı fotoğraflarının çekilerek bilgisayar yazılımı sayesinde analiz edilmesi prensibiyle çalışmaktadır. Hayvan türlerine göre farklılık gösteren spermatolojik özelliklerin değerlendirilmesi amacıyla bilgisayar destekli spermtazoa analiz cihazları (CASA), cihazın çalışma metodunun güvenilirliği ve objektifliği sayesinde günümüzde bilimsel araştırmalarda tercih edilen bir teknik olarak yerini almıştır (Foote 2003).

CASA sisteminde spermatazoon hareket özelliklerinin değerlendirilmesinde; total motilite herhangi bir şekilde hareket kabiliyetine sahip spermatozoonların toplamı olarak tanımlanabilir. Progresif motil olarak kabul edilen spermatozoon güçlü, ileri doğru ve özellikle düzgün doğrusal hareket eder, non-progresif motil spermatozoon ise hareket yeteneğine sahiptir, ancak güçsüz, doğrusal olmayan ya da anormal bir yörüngede hareket eden spermatozoonlar olarak tanımlanmaktadır. Spermatozoon hareket özellikleri arasında bulunan VCL (Velocity Curve Linear), spermatozoonun izlediği yol boyunca ortalama hızı (µm/s); VSL (Velocity Straight Line), düz bir hat boyunca izlediği yolun başlangıcından sonuna kadar ki ortalama hızı (µm/s), ALH (Lateral Head Displacement), spermatozoon dairesel hareketinin ortalama hızını (µm), VAP (Velocity Average Path), katettiği toplam yol süresince ortalama hızı (µm/s) vermektedir. Bunların yanında, spermatozoonların izlediği yol ve katettiği mesafeye ilişkin olarak, LIN (Linearity %); spermatozoonun doğrusal hareketini (VSL/VCL X 100) ifade etmektedir (Verstegen ve ark 2002, Foote 2003, Malo ve ark 2006).

İn vivo fertilite ile ilişkilendirilen ve hayvan türlerine göre farklılık gösteren, CASA sistemleri, spermatozoa hareket özelliklerini (total motilite, progresif motilite, non-progresif motilite, immotilite, VSL, VCL, VAP, LIN, ALH) ayrıntılı olarak değerlendirebilmektedir (Foote 2003).

Schubert ve Seager (1991), Dalmaçya ırkı köpekler üzerinde yaptıkları çalışmada köpekleri 6 yaş üzeri ve altı olacak şekilde iki gruba ayırmış ve motilite değerlerini sırasıyla % 84 ve % 77, iki yaş grubunun ortalamasını ise % 81 olarak belirlemelerine karşın Günzel (1986), 78 adet Beagle ırkı köpeğin ortalama spermatozoa motilitesini % 71 olarak tespit etmiştir.

Tekin ve ark (1987), Kangal Çoban köpekleri ile Alman Çoban köpeklerinin spermatolojik parametrelerini belirlemek üzere yaptıkları çalışmalarında ortalama spermatozoon motilitesini sırasıyla % 62,6 ve % 67,8 olarak elde ettiklerini ifade etmişlerdir.

Çoyan ve ark (2009), Kangal Çoban köpeklerinde yapmış oldukları çalışmada ortalama spermatozoa motilitesini % 76,3 olarak tespit etmişlerdir.

Iguer-Ouada ve Verstegen (2001), 42 baş Beagle köpekten digital maniplasyon yöntemi ile aldıkları ejakulatları incelemiş ve sonucunda ortalama köpek spermatozoa motilitesinin % 70-90 arasında olabileceğini ifade etmişlerdir.

Schafer-Somi ve ark (2006), Beagle köpek spermasının dondurulmasını araştırdıkları çalışmalarında; CASA analiz sistemi ile motilite değerlerini belirlemişler ve natif spermanın total motilitesini % 79,1 progresif motilitesini ise % 75,7 olarak bulmuşlardır. Ayrıca aynı çalışmada çözüm sonu spermatozoa motilitesini % 29,1 olarak belirlemişlerdir.

Rota ve ark (2006), köpek spermasının dondurulmasında çözüm sonu CASA motilitesini % 51,5 olarak tespit etmişlerdir.

Schafer-Somi ve Aurich (2007), Beagle ırkı köpeklerin sulandırma sonrası spermatozoon hareket değerlerini; VAP (µm/s) 89,5, VCL (µm/s) 148,4, VSL (µm/s) 77,7, LIN (%) 51,5 ve ALH (µm) 4,2 olarak bulduklarını belirtmişlerdir.

Iguer-Ouada ve Verstegen (2001), 8 baş Beagle köpeğinde yaptıkları çalışmada sulandırma sonu ortalama spermatozoon hareket değerlerini VAP (µm/s) 100, VCL (µm/s) 163, VSL (µm/s) 82, LIN (%) 52, ALH (µm) 9,5 olarak ortaya koymuşlardır.

Goericke-Pesch ve ark (2012), köpek spermasının kısa süreli saklanmasında 4 farklı sulandırıcıya ait sulandırma sonu sperma hareket değerlerini sırasıyla VAP (µm/s) 72,2;87,8;83,8;90,9, VCL (µm/s) 109,1;126,8;123,1;127, VSL (µm/s) 60,7;71,8;66,3;76,2, LIN (%) 53,8;56,2;59,3;55,0, ALH (µm) 4,4;5,4;5,5;5,2 şeklinde analiz ettiklerini belirtmektedirler.

Mogas ve ark (2011), 5 baş Beagle köpeğinin çözüm sonu ortalama VAP (µm/s) ve ALH (µm) parametrelini sırasıyla 34,1 ve 5,7 olarak belirlemişlerdir.

1.1.4. Spermatozoa Yoğunluğu

Spermatozoa yoğunluğu, birim hacimde bulunan spermatozoa sayısı olarak tanımlanmaktadır. Spermanın kalitesinin değerlendirilmesinde ve sulandırılmasında çok önemli bir spermatolojik özelliktir ve belirlenmesinde spektrofotometre, hemasitometre ve fotolemetrik gibi tekniklerden faydalanılmaktadır (Garner ve Hafez 1993).

Köpeklerde spermatozoa yoğunluğu, ırka, yaşa, beslenmeye ve çevre şartlarına bağlı olarak değişmekle birlikte genel olarak ortalama 300(100-1000)x10^6/ml olduğu ifade edilmektedir (Tekin 1990). Sperma alma işleminin yoğunluğu etkileyebileceğini ve sperma yoğunluğunun 300x10^6 ile 2x10^9 arasında olabileceği belirtilmektedir (Johnston 1991).

Tekin ve ark (1987), östrus gösteren dişi varlığında masaj yöntemi ile spermalarını aldıkları Kangal çoban köpeklerinde ortalama spermatozoa yoğunluğunu 524x10^6/ml olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada dişi kullanmadan aldıkları ejakulatlarda spermatozoa yoğunluğunu 305,8x10^6/ml olarak bildirmişlerdir.

Hendrikse ve Antonisse (1984), farklı ırk köpeklerde yaptıkları çalışmalarında motilite, anormal spermatazoa oranları ile spermatozoon sayısını sırasıyla % 71, % 14 ve 853x10^6/ml olarak saptamışlar, köpeklerin yaşının artması ile motilite oranının düştüğünü, anormal spermatozoa oranının arttığını ve yoğunluğun azaldığını ortaya koymuşlardır.

1.2. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, oksijen ve oksijenden türemiş çoğunlukla serbest oksijen radikalleri (SOR) olarak bilinen oksidant oranının ortamda artarak hücresel hasara yol açması durumudur. Kontrolsüz bir şekilde oluşan SOR, seminal plazma antioksidan kapasitesini aşıp oksidatif strese yol açarak, spermatozoa için hasar verici etki oluşturur (Sikka ve ark 1995).

1.2.1 Spermatozoonun Membran Yapısı

Spermatozoonda % 70 oranında fosfolipit, % 25 oranında doğal lipitler ve % 5 oranında glikolipit içeren bir membran yapısı bulunmaktadır. Fosfolipit katmanı ise % 70 oranında doymamış yağ asitlerinden oluşmaktadır (DYA). Spermatozoonun membranında bulunan çift katmanlı lipit kompozisyonu, epididimal olgunlaşmadan spermatozoonun dişi reprodüktif kanalda rekapasitasyonunu tamamlayıncaya kadar değişime uğramaktadır (Alvarez ve Storey 1995).

Spermatozoa epididimisten geçerken membran lipit kompozisyonunda değişiklikler gözlenir. Bu değişiklikler sonucunda spermatozoonun orta ve kuyruk kısmındaki plazmojenler membranda en yüksek fosfolipit yapıyı oluşturur. Oluşan plazmojenler spermatozoonun epididimis boyunca göçü esnasında kolesterol/fosfolipit molaritesini iki kat artırmaktadır. Bu değişim sonucunda spermatozoanın membran kolesterol oranı azalmakta ve bu etki spermatozoonun olgunlaşmasına katkı sağlamaktadır (Benoff 1993).

Spermatozoon membran yapısında dokosahekseonik asit (DHA), fosfatidilserin, desmosterol, kolesterol gibi lipitler de bulunmaktadır. DHA spermatozoon membran yapısının membran akışkanlığında, fosfatidilserin ve desmosterol spermatozoon kapasitasyonunda, kolesterol membran akışkanlığı ve geçirgenliğinde rol almaktadır. Ayrıca kolesterol Ca^{+2} transferinde etkin rol oynayarak akrozom reaksiyonu için gerekli olan Ca^{+2}'un hücre dışından hücre içine geçişini sağlamaktadır (Ollero ve ark 2000, Kotwicka ve ark 2002).

1.2.2. Lipit Peroksidasyonunun Spermatozoon Üzerine Etkisi

Soğutma, dondurma ve çözdürme sırasında oluşan ısı ve ozmotik değişiklikler spermatozoa plazma membranlarında lipit kompozisyonu ve organizasyonu, kalsiyum akışını, geçirgenlik ve bütünlüğünü etkileyerek mekanik stres oluşturmaktadır (Noiles ve ark 1995).

Hayvan türleri arasında spermatozoa lipit kompozisyonundaki farklılık spermatozoonun dondurma/çözdürme işlemlerine karşı duyarlılıklarının değişken olmasına neden olmaktadır. Doymamış yağ asitlerince zengin plazma membranına sahip boğa, domuz ve koç spermatozoonunun donmaya karşı; insan, köpek ve tavşan

spermatozoonuna göre daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (Noiles ve ark 1995). Spermanın, dondurma/çözdürme işlemleri sırasında oluşan ısı değişimlerine ve aerobik oksijene maruz kalması reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif olmayan oksijen türlerinin üretilmesine yol açmaktadır (Agarwal ve ark 2005, Sarıözkan 2008).

1.2.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir ya da daha fazla ortaklanmamış elektrona sahip kısa süreli reaktif etki gösteren kimyasal ajanlardır (Sanocka ve Kurpisz 2004, Kefer ve ark 2009). Serbest radikaller, ortaklanmamış elektronlarını hücre içi iyon transfer kanalları aracılığı ile hücre içine geçirerek hücrenin membran lipit ve protein yapısı üzerine etki etmektedir.

Spermatozoon membranı üzerinde epididimal taşınma esnasında doymamış yağ asitleri oluşumu başlamaktadır. Spermatozoonun kaput epididimisten kauda epidimise göçü esnasında serbest radikallerin etkisi ile spermatozoanın taşınmasına katkı sağlanmaktadır. Bunun yanında spermatozoonun proliferasyon ve farklılaşma aşamasında da serbest radikallerin olumlu etki gösterdiği belirtilmektedir (Agarwal ve ark 2005).

Reaktif oksijen türleri (ROS), içeriğindeki oksijen molekülleri ve yüksek aktivite kapasitesine sahip ortaklanmamış bir ya da daha çok elektrona sahip olmasından dolayı serbest radikallerin içerisinde sınıflandırılmaktadır. Ancak ROS'un hepsi serbest radikal olarak sınıflandırılmazlar (Tremellen 2008).

1.2.4. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri, fertilizasyon, kapasitasyon, motilite ve akrozom reaksiyonunda rol oynayan ve belirli oranda spermatozoonda bulunması gereken oksijen türevleri olarak bilinmektedir (Agarwal ve ark 2005). Spermatozoon membranında bulunan doymamış yağ asit kompozisyonunun fazlaca olması, spermatozoonu oksidatif strese karşı duyarlı hale getirmektedir. Bu durum spermatozoonun motilite, morfoloji, fertilizasyon yeteneği ve DNA yapısında hasarlara neden olmaktadır (Tremellen 2008). ROS genel olarak üç formda bulunmaktadır. Birinci formu, süperoksit anyondur; süperoksit anyondan doğrudan

ya da dolaylı olarak ikinci form oluşmaktadır. İkinci formunda; hidroksil radikali ve peroksil radikali ve reaktif olmayan hidrojen peroksit bulunmaktadır. Üçüncü ROS formu ise serbest radikal sınıfından olan nitrojen bileşikleri (peroksi nitrik asit, nitroksil anyon peroksi, peroksi nitril ve nitrik oksit) oluşturmaktadır (Tremellen 2008, Hwang ve Lamb 2012).

$O_2^{\bullet -}$ (Süperoksit anyon)

Süperoksit anyon ($O_2^{\bullet -}$) radikali, moleküler oksijenin (O_2) bir elektron transferi sonucu indirgenmesi sonucunu oluşan kararsız bir yapıdır. Süperoksit anyonun adrenalin, tiyol içeren bileşikler, glukoz, demir gibi geçiş metallerinin moleküler oksijenden bir elektron koparark meydana geldiği belirtilmektedir (Çaylak 2011).

Spermatozoon membranının $O_2^{\bullet -}$'a karşı geçirgenliği su molekülünün hücre içine girişi kadar kolay olmaktadır. Hücre içine geçişinin kolay olması nedeniyle de spermatozoa üzerine toksik etkinliği oldukça yüksek ve antioksidan sisteme de dirençli olduğu belirtilmektedir (Lenzi ve ark 1996)

Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$)

Moleküler oksijene üç elektron transferi sonucu oluştuğu belirtilmektedir. Hidroksil radikali ile serbest radikallerin zararlı etkilerinin gerçekleştiği ifade edilmektedir. H_2O_2 ve $O_2^{\bullet -}$ bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron taşıyan geçiş metalleri ile reaksiyona girerek sonucu $OH^{\bullet}$'ni oluşmatadır. Bu reaksiyona Fenton reaksiyonu adı verilmektedir (Lenzi ve ark 1996, Lloyd ve ark 1997).

Hidroksil radikalinin sitotoksik özelliğinin, $O_2^{\bullet -}$ ve H_2O_2'e göre daha fazla olduğu ve diğer radikallere göre oldukça kısa sürede reaktif etkinlik oluşturduğu belirtilmektedir. Bu nedenle ortamda bulunan herhangi bir madde ile kısa sürede reaksiyona girerek toksik etkiler göstermeye başlar (Lenzi ve ark 1996).

1.2.5. Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)

Reaktif nitrojen türlerinden nitrik oksit (NO)'in en önemlisi RNS olduğu belirtilmektedir (Çaylak 2011). Nitrik oksit radikali, bir atom azot ile bir atom oksijenin ortaklanmamış elektron vererek birleşmesiyle oluşmuş ve bu sebeple

radikal sınıfında yer aldığı belirtilmektedir. Nitrik oksit sentaz enzimi damar endotel hücrelerinde L-arjininden sentezlendiği belirtilmekte ve yarılanma ömrünün 10-20 saniye olduğu ifade edilmektedir. NO metaboliz olduğunda moleküler oksijen ile reaksiyona girip azot dioksit (NO_2) oluşturmaktadır (Çaylak 2011). Yapılan bir çalışmada NO'in spermatozoon motilitesini ve fertilizasyonu engelleyici etkileri ortaya konmuştur (Wu ve ark 2004).

1.2.6. Reaktif Olmayan Oksijen Türleri

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Serbest radikal olmayan hidrojen peroksit, O_2'ne bir elektron transferi (süperoksit dismutasyonu), O_2'ne iki elektronun eklenmesi (indirgenme) ile yada glikolat oksidaz ve D-amino asit oksidaz ile direkt olarak meydana gelmektedir (Flora 2007).

Singlet Oksijen (O_2^*)

Singlet oksijen ortaklanmamış elektron içermediğinden dolayı serbest radikal sınıfında yer almamaktadır. Biradikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşmaktadır. Singlet oksijende elektron dönme yönleri birbirine zıttır ve delta veya sigma formuna oluşumuna göre aynı ya da ayrı yörüngelerde bulunurlar. Aynı yörüngede ise delta singlet oksijen, ayrı yörüngelerde bulunuyor ise sigma singlet oksijen formu oulmaktadır. Sigma formunun yüksek enerji içermesinden dolayı kolayca delta formuna dönüştüğü belirtilmektedir (Karp 2005).

1.2.7. Spermatozoada Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu ve Etkileri

Ejakulat içerisinde çeşitli türlerde hücreler bulunmaktadır. Bunlar olgun ve olgunlaşmamış spermatozoonlar, lökosit ve epitel hücrelerdir. Lökositler (nötrofil ve makrofaj) ve olgunlaşmamış spermatozoonlar ROS türlerinin oluşumunda önemli iki etkenidir. Spermatogenezis sırasında oluşabilen sitoplazmik damlacıkların fazla miktarda ortamda bulunması düşük sperma kalitesine sebep olmaktadır. Spermanın bulunduğu ortamın aerobik yapısının da anaerobik olarak değişimi ROS oluşumuna neden olmaktadır. İnsanlarda yapılan araştırmalarda salgı bezlerinde oluşan enfeksiyonların lökosperma ve ROS seviyesini arttırdığı belirtilmektedir. Enfeksiyon

anında sperma antioksidan sistemi ile ROS oluşumu arasındaki dengenin bozulması spermada fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır (Agarwal ve ark 2008).

Lökositlerin neden olduğu ROS oluşumu, antoksidan dengenin bozulması ile gösterilebileceği gibi sperma-lökosit kontaminasyonu ya da lökosit ürünlerinin ortamda artmasıyla da gösterilmektedir (Agarwal ve ark 2008)

Spermatozoonun hiperaktivasyon, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunda rol oynayan enzimatik sistemin $O_2^{\bullet -}$ oluşumunda da etkili olduğu belirtilmektedir. Bunun yanında $O_2^{\bullet -}$ üretiminde etkili olduğu düşünülen birçok mekanizma bulunmakla birlikte tam olarak aydınlatılamamıştır. Protein kinaz ve fosfolipaz enzimlerinin uyarılması, kalsiyum akışının indüklenmesi, cAMP seviyesinin artışı, $O_2^{\bullet -}$'nun spermada üretilmesiyle benzerlik göstermektedir (Meier ve ark 1991, Aitken ve ark 1995).

Reaktif oksijen türlerinin düşük seviyeleri spermatogenezis esnasında doğal olarak ortaya çıkmaktadır. ROS ürünlerinden H_2O_2, akrozom reaksiyonu, hiperaktivasyon ve tirozin fosforilizasyonunu uyararak spermatozoa üzerinde olumlu etki göstermektedir (de Lamirande ve Gagnon 1993, Aitken ve ark 1995). Hwang ve Lamb (2012), H_2O_2'in aynı zamanda spermatozoanın zona pellusidaya bağlanmasında rol aldığını belirtmektedirler. Araştırmacılar $O_2^{\bullet -}$'un, embriyo gelişiminin son aşamasında etkin bir role sahip olduğunu da belirtmişlerdir (Kodama ve ark 1996). de Lamirande ve Gagnon (1993), ROS'un kontrollü bir şekilde oluşumunun spermatozoon kapasitasyonunda gerekli olduğunu ifade etmişlerdir.

Reaktif oksijen türleri genellikle oksidatif fosforilizasyon esnasında rol oynayan enzimatik reaksiyonlar sonucu ATP sentezlenmesinin önüne geçerek mitokondride bulunan oksijeni redüklemek suretiyle etki göstermektedir (Valko ve ark 2007, Tremellen 2008). Yapılan çalışmalarda mitokondriyal DNA'nın çekirdekteki DNA'ya göre ROS saldırılarına karşı daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (Liu ve ark 2004, Taylor ve Turnbull 2005). Yüksek oranda ROS oluşumu sonucunda hücre apoptozisinde rol oynayan sitokrom C proteini serbest kalarak spermatozoonda dejenerasyona sebep olmaktadır (Wang ve ark 2003). Henkel ve ark (2005), spermatazoonda oluşan DNA hasarı oranı ile ROS ürünlerinin ortamdaki yoğunluğu arasında pozitif bir korelasyonun olduğunu ifade etmektedirler.

Spermatozoon membran yapısının doymamış yağ asitlerce zengin olması, spermatozoonu LPO'a ve ROS oluşumuna karşı oldukça duyarlı hale getirmektedir (Sikka ve ark 1995, Hwang ve Lamb 2012). Lipit peroksidayonla yüksek oranda oluşan ROS sonucu spermatozoa DNA yapısında ve fizyolojik fonksiyonlarında olumsuz etkiler ortaya çıkarak; akrozom reaksiyonu ve kapasitasyon mekanizmaları olumsuz etkilenmekte, spermatozoon motilitesi ve fertilizasyon yeteneğinde geri dönüşümsüz hasarlar ortaya çıkmaktadır (Bansal ve Bilaspuri 2011, Agarwal ve ark 2014).

Enfeksiyon/yangı nedeniyle direkt olarak ya da yangı sonucu artan kemokin miktarı ROS oluşumunu artırmaktadır. Kemokinler oksidatif stresi uyararak LPO'a sebep olmaktadır. LPO spermatozoonun membran, protein ve lipit yapısına zarar vermektedir. Kemokinler spermatazoon üzerine direkt olarak etki ederek spermatozoada fonksiyon bozukluğuna yol açabilmektedir (Hwang ve Lamb 2012).

Enfeksiyon/yangı sonucu oluşan ROS, oksidatif stres ve LPO'a neden olmaktadır. Bunun sonucunda spermatozoon canlılığı, akrozom bütünlüğü, kapasitasyon yeteneğine hasar vererek fertilite olumsuz etkilenmektedir (Bansal ve Bilaspuri 2011).

Sperma antioksidan sistemi ile ROS üretimi arasında bir denge bulunmaktadır, bu denge sayesinde sperma ROS'a karşı bir savunma mekanizması oluşturmaktadır. Ancak yukarıda bahsedilen enfeksiyon/yangı, kemokinler, lökosit kontaminasyonu bu dengeyi ROS yönünde bozmakta ve bu durumda da spermatozoa kendini ROS sonucu oluşan etkilerden koruyamamakta ve sonucunda spermatozoon üzerinde kalıcı hasar oluşmaktadır (Agarwal 2014).

Spermatozoonu ROS, oksidatif stres, LPO'nun zararlı etkilerinden korumak amacıyla dışarıdan ilave edilen antioksidanlar spermatozoon antioksidan sistemine katkı sağlayarak, spermatozoa motilitesi, canlılığı, membran bütünlüğü, kapasitasyon ve füzyon yeteneğini koruyabileceği düşünülmektedir (Henkel ve ark 2005).

1.3. Antioksidanların Oksidatif Stres Üzerine Etkileri

Akkuş (1995) vücutta oluşan birçok savunma mekanizması sayesinde serbest oksijen türlerinin oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarın önlenebileceğini, bunların da antioksidan olarak isimlendirilebileceğini bildirmiştir.

Spermatozoa seminal plazmada bulunan antioksidanlar ile kendisini oksidatif strese karşı korumaya çalışmaktadır (Kim ve Parthasarathy 1998).

Antioksidanların ilk belirlenen etkileri, hücre membranı yapısında bulunan LPO'a karşı korunması olmuştur. Bunun sonucu olarak, başlangıçta antioksidanlar LPO'u engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise antioksidanların tanımı lipitlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir. Böylece antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmakta ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir (Rangan ve Bulkley 1993).

Başlıca antioksidan etki çeşitleri şunlardır:

1.ROS'nin enzim reaksiyonları aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi

Bu etkileşimde zincir kırıcı antioksidatif etkinlik ile membran fosfolipitlerinde bulunan DYA'ni serbest radikal hasarından koruyan ilk savunma hattını oluşturması yönüyle etkinlik gösterilmektedir.

E vitamini, yapısında fenolik hidroksil grubu taşımakta ve zincir kırıcı antioksidatif etkinlik göstermektedir (Aydilek ve Aksakal 2003).

2. ROS'nin oluşumunun baskılama yoluyla engellenmesi

Glutatyon gibi antioksidan moleküller ise direk olarak ROS konsantrasyonunu azaltırlar. Süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimler serbest radikal üretimini etkisiz hale getirirler (Baskin ve Salem 1997).

3.Metal iyonlarını bağlayarak radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi

Sitrik asit, amino asit, etilen diamin tetra asetikasit (EDTA) metal iyonlarını bağlayarak radikal oluşum reaksiyonlarını engelleyici etkinlik göstermektedir. Metalik iyonlar, örneğin bakır ve demir katalitik olaylarda lipit oksidasyonunu hızlandırırlar (Rossell 1983).

4.Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi

Bu gruba örnek olarak verilen askorbik asit (vitamin C), askorbil palmitat, izo askorbik asit ve sodyum tuzları yağ içeren gıdalarda stabiliteyi sağlamak amacıyla kullanılırlar (Cuvelier ve ark 1992).

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 LPO'nun 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).

Her antioksidan farklı serbest radikale etkilidir ve antioksidanlar kombine edildiklerinde birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler (Vishwanath ve Sahannon 1997, Upreti ve ark 1997). Antioksidanlar etkinliklerine göre enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılmaktadır (Bansal ve Bilaspuri 2011).

1.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

En önemli antioksidan enzimler; süperoksit anyonunu H_2O_2'e dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GPx) ve H_2O_2'i suya indirgeyen katalazdır (Guemouri ve ark 1991).

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit Dismutaz, endojen şekilde üretilen ve organizmada bulunan her hücre için esansiyel bir enzim olarak ifade edilmektedir. SOD vücutta farklı formlarda olabileceği gibi en yaygın formunun sistolik bakır çinko içeren CuZn-SOD olduğu belirtilmiştir. SOD, ROS'inden süperokside bir elektron vererek H_2O_2'e indirgerken; katalaz ve selenyum-bağımlı glutatyon peroksidaz (GPx) ise H_2O_2'i

suya indirger. SOD antioksidatif etkinliğini $O_2^{\bullet -}$ ile Fe^{3+}'ün Fe^{2+}'ye indirgenmesi ile $OH^{\cdot}$'nin oluşumunu engellenmesi şeklinde göstermektedir (Baskin ve Salem 1997).

Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Glutatyon peroksidaz, endojen hidroperoksitlerin indirgenmesinde önemli etkinlik göstermektedir. GPx bileşeninde dört atom selenyum bulunmasından dolayı seleno-sistein bileşiği sınıfına girmekte ve bu sayede katalitik aktivite göstermektedir. GPx, etkinlik göstermek için glutatyona gereksinim duymaktadır. Glutatyonu oksitleyerek H_2O_2'yi H_2O'ya indirgemektedir (Eşitlik A). Okside olan glutatyonu, glutatyon redüktaz (GR) aracılığı ile tekrar glutatyona (GSH) indirgeyebilmektedir (Eşitlik B). SOD en yüksek düzeyde etki gösterebilmek için bakır, çinko ve manganez; GPx, selenyum ve katalaz demir gibi geçiş metallerinin kofaktörlüğüne gereksinim duymaktadır (Garewal 1997).

$H_2O_2 + 2\ GSH \rightarrow GSSG + 2\ H_2O$ (Eşitlik A)
$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2\ GSH + NADP^+$ (Eşitlik B)

Katalaz (CAT)

Hayvansal organizmalarda karaciğer ve eritrositlerde yoğun olarak bulunan CAT beyin, kalp, iskelet kaslarında ise çok düşük seviyelerde olduğu belirtilmektedir. CAT ve GPx, H_2O_2'i su ve atomik oksijene indirgemektedir. Bunun yanında membran geçirgenliğine yüksek olan moleküllerin sulandırıcı veya ortamdan uzaklaştırılmasında görev almaktadır. CAT ve GPx enzimlerin etkinliklerinin artmadan SOD'ın aktivitesinin artması H_2O_2 seviyesinin artmasına ve böylece $OH^{\cdot}$ radikallerinin oluşmasına sebep olduğu ifade edilmektedir (Garewal 1997).

1.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar sentetik antioksidan ya da diyet olarak alınan maddeler olarak bilinmektedir (Bansal ve Bilaspuri 2011). Enzimatik olmayan antioksidanlar hidrofilik ve hidrofobik olarak iki sınıfa ayrılmaktadır.

Hidrofilik moleküller

Polar gruba sahip olan moleküller su ile hidrojen bağı oluşturarak suyun içerisinde çözünürler. Bu tür moleküllere hidrofilik (suyu seven) denmektedir (Lee ve Rossky 1994).

Glutatyon, hücrede mM düzeyinde bulunan ROS süpürücüsüdür. Glutatyonun bu özelliği serbest radikallere bir H atomu vermesi ile olabildiği gibi, GPx'in kofaktörü olarak H_2O_2 ve diğer hidroperoksitlerin toksik etkilerini önleyerek de gösterebilmektedir (Lenzi ve ark 1993).

Vitamin C, hidrofilik molekül özelliğinde olup, LPO'a karşı $O_2^{\bullet -}$, $OH^{\cdot}$ ve lipit hidroperoksitlerle reaksiyona girerek antioksidan etkinlik gösterdiği belirtilmektedir (Cuvelier ve ark 1992).

Ayrıca hidrofilik yapıda antioksidanlar sınıfında, ergotiyonin, askorbik asit, tiyoredoksinler bulunmaktadır (Antmen 2005).

Hidrofobik moleküller

Apolar moleküller su içerisinde çözünmezler ve hidrofobik (sudan kaçan) olarak isimlendirilirler. Bu tür moleküller su ile hidrojen bağı oluşturamayacakları için diğer hidrofobik moleküllerle interaksiyona (etkileşime) girerler (Lee ve Rossky 1994).

Hidrofobik moleküller, lipoprotein ve membran yapısında bulunarak oksidatif strese ve LPO oluşumuna karşı antioksidatif etkinliği bulunan maddelerdir. Bu etkilerini, peroksi radikallerini parçalayarak ya da hidroperoksitlerin O_2^* oluşturmasının önüne geçerek göstermektedir (Cemeli ve ark 2009).

Vitamin E, membran fosfolipit bağlarında peroksil radikallerin parçalanmasında en etkili maddedir. Vitamin C ve Vitamin E sinerjistik etki göstererek, α-tokoferol radikalinin tokoferole dönüştürülmesinde rol oynamaktadır.

Beta-karoten ve likopen gibi retinoidler, antioksidan sistemde hidrofobik moleküller olarak yerlerini almaktadır. Retinoidler plazmada lipoproteinler ve retinol bağlayıcı proteinler aracılığıyla taşınırlar. Beta-karotenler lipit peroksil radikallerini, düşük oksijen basıncı altında süpürerek antioksidatif etkinlik göstermektedir. Karotenoidler, hücreleri oksidatif strese karşı üç farklı şekilde korurlar: Flavinler ve porfirinler gibi triplet uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama, $O_2^{*'}$i baskılama ve peroksil radikallerini temizlemedir (McCord ve Edeas 2005). Türk ve ark (2006) yazmış oldukları derlemede, likopenin oksidatif strese karşı rat testis dejenerasyonunu önlediğini ve spermatozoon kalitesini artırdığını belirtmektelerdir.

Antioksidanların sperma sulandırıcılarına farklı oranlarda eklenerek spermanın kısa süreli ya da dondurularak saklanması üzerine etkinlikleri birçok araştırmacı tarafından araştırılmaktadır (Ball ve Vo 2001, Funahashi ve Sano 2005, Uysal ve Bucak 2007, Sarıözkan ve ark 2009, Camara ve ark 2011, Peruma ve ark 2013).

Amini ve ark (2015), sperma sulandırıcısına 50, 100, 200 ve 300 µg/mL oranında CAT ve 50, 100, 200 ve 300 U/mL oranında SOD ilave ederek dondurdukları horoz spermasının çözüm sonu incelemesinde 100 µg/mL CAT ve 50 U/mL SOD içeren sulandırıcı gruplarında yüksek motilite ve canlılık oranları elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Aygır spermasının kısa süreli saklanmasının araştırıldığı çalışmada sperma sulandırıcısına 100 ve 200 U/mL CAT; 0,5, 1 ve 2 mM BHT, 1, 2 ve 4 mM Vit E; 0,5, 1 ve 2 mM Tempo antioksidanları eklenmiş ve 72 saat süre ile saklanan spermaların motilite değerlendirilmesinde antioksidan eklenen gruplar arasında bir fark bulunmadığı sonucuna varılmıştır (Ball ve Vo 2001).

Roca ve ark (2005), domuz spermasının dondurulması amacıyla SOD (150 ve 300 U/mL) ve CAT (200 ve 400 U/mL) ekledikleri sulandırıcı gruplarının çözüm sonu değerlendirilmesinde, SOD ve CAT ilavesinin sperma parametrelerine katkı sağladığını bildirmişlerdir.

Peruma ve ark (2013), mithun boğa spermasının kısa süreli saklanmasında sulandırıcıya ilave ettikleri CAT'ın (50, 100 ve 150 U/mL) spermatazoon motilite ve canlılık oranınlarını koruduğunu belirtmişlerdir.

Sperma sulandırıcısına inositol ilavesinin glutatyonun antioksidan etkinliğini artırdığı ve bu sayede akrozom ve membran bütünlüğünü oksidatif strese karşı koruduğu ifade edilmektedir (Bucak ve ark 2010). Boğa spermasının dondurulmasında inositol ilavesinin çözüm sonu spermatozoon motilitesini koruduğu Bucak ve ark (2010) tarafından gösterilmiştir.

Sistein düşük molekül ağırlığına sahip tiyol grubu bir amino asittir. Hücre içi glutatyonun öncümaddesi olarak bilinmektedir. Hücre membranına kolayca penetre olması sayesinde, invitro/invivo ortamda GSH sentezini artırarak hücreyi oksidatif

strese karşı koruduğu belirtilmektedir (Hendin ve ark 1999). Uysal ve Bucak (2007), koç spermasının dondurulması amacıyla sulandırıcıya ekledikleri sistein ve glutatyonun çözüm sonu spermatozoon motilitesi üzerine koruyu etkinlik gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Sisteinin boğa, koç ve teke spermalarının dondurulması üzerine etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda çözüm sonu spermatozoon motilitesini artırdığı belirtilmektedir (Bilodeau ve ark 2001, Uysal ve Bucak 2007, Sarıözkan ve ark 2009). Ayrıca domuz spermasının kısa süreli saklanmasında da sistein içeren sulandırıcı grubuyla benzer sonuçlar alınmıştır (Funahashi ve Sano 2005).

Trehaloz ve taurin sulfonik amino asit grubundan olup enzimatik olmayan antioksidanlar olarak bilinmektedir (Shiva Shankar Reddy ve ark 2010). Disakkaritler spermanın dondurulması sürecinde ozmotik değişimlere karşı membranın fosfolipit bağlarına etki ederek hücre hasarının önüne geçmeye çalıştığı bildirilmektedir (Molinia ve ark 1994, Liu ve ark 1998). Trehalozun koç, boğa ve fare spermasının dondurulmasında başarılı bir kriyoprotektan etki gösterdiği belirtilmektedir (Storey ve ark 1998, Bilodeau ve ark 2001, El-Alamy ve Foote 2001)

Köpek spermasının kısa süreli saklanmasında ve dondurulmasına ilişkin çeşitli antioksidanlar ile yapılmış birçok araştırma mevcuttur (Uysal ve ark 2005, Michael ve ark 2009, Martin-Besa ve ark 2007, Bencharif ve ark 2012).

Michael ve ark (2009), köpek spermasının çeşitli antioksidanlar ile kısa süreli saklanabilirliğini araştırdıkları çalışmada sulandırıcıya Vit C, n-asetil-l-sistein, taurin, CAT, Vit E ve Vit B16 eklemişler; Vit E, taurin ve Vit B16 katılan gruplarında motilite oranlarının kontrol grubuna göre önemli ölçüde korunduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada spermatozoa canlılık oranları Vit B16 ve Vit E gruplarında kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca ROS seviyelerinin de taurin, CAT, Vit E ve Vit B16 içeren sulandırıcı gruplarında kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığı araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur.

Kmenta ve ark (2011), köpek spermasının kısa süreli saklanmasında CAT ve tirosin amino asitlerinin etkinliklerini araştırmışlar ve CAT içeren sulandırıcı grubunun diğer gruplara göre motilite ve canlılık oranlarını istatiksel olarak önemli oranda koruduğunu göstermişlerdir.

Bencharif ve ark (2012), köpek spermasının dondurulmasında glutaminin çözüm sonu motilte oranını kontrol grubuna göre önemli ölçüde iyileştirdiğini belirtmişlerdir.

Neagu ve ark (2010), köpek spermasının dondurulması amacıyla sulandırıcıya 1mM BHT ilavesinin çözüm sonu total motilite ve canlı spermatozoa oranı bakımından diğer gruplara göre anlamlı ölçüde katkı sağladığını ifade etmişlerdir.

Martins-Besa ve ark (2007), köpek spermasının dondurulması amacıyla Uppsala Equex II sulandırıcısına 25, 50 ve 75 mM dozlarında taurin ve hipotaurin amino asitlerini eklemişler ve çözüm sonu spermatolojik değerlendirmede amino asit gruplarının kontrol grubuna göre mitokondriyal aktivite, motilite ve canlılık parametreleri bakımından etkili olmadığı kanısına varmışlardır.

1.4. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması

1.4.1. Spermanın Sulandırılması

Başarılı bir kriyoprezervasyon işleminde osmolarite, pH ve iyonik yapının devamlılığının ve enerji kaynağının sağlanması, donma sırasında oluşacak soğuk şoku hasarların azaltılması temel noktalar olarak bildirilmektedir (Hammerstedt ve ark 1990, England 1993).

Spermatozoanın metabolik aktivitesi hidrojen iyonlarının açığa çıkmasına neden olur. Açığa çıkan bu iyonlar sulandırıcı pH'sının düşmesine ve dolayısıyla motilite ve fertilite gücünün azalmasına yol açmaktadır. Bu nedenle tampon özellikli sıvıların sperma sulandırıcılarında kullanılması zorunlu hale geldiği belirtilmektedir (England 1993). Köpek spermasının sulandırılması amacıyla ilk yapılan çalışmalarda krebs-ringer-fosfat tampon sulandırıcıları kullanılmış, daha sonra Seager ve ark (1975), %11 laktoz içeren sulandırıcı ile başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Günümüzde dipolar iyon (zwitterionic) tampon sulandırıcıları spermanın sulandırılmasında kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan en önemlisi tris-sitrik asit-fruktoz- yumurta sarısı sulandırıcısı olup, modifiye edilmiş farklı içerikleri ile birçok araştırmada kullanılmaktadır (Woods ve ark 2000, Tosun ve Uysal 2007, Stanescu ve Birtoiu 2010).

Memeli spermasında pH nötre yakındır. Buna göre sulandırıcıların pH'sı genellikle 6,9-7,1 arasında olmaktadır. Köpeklerde spermatozoon bulunan ana sekretin pH'sı 6,27±0,3 dür. Motilite oranı yüksek olan spermatozoonlarda ejakulat pH değerinin 7'nin üzerinde olduğu ifade edilmektedir (England 1993).

Sulandırıcılara katılan yumurta sarısının fosfolipit yapısında olup, spermatozoayı soğuk şokundan koruduğu ve sulandırıcılara katılması gerektiği bildirilmiştir (Medeiros ve ark 2002). Dondurma sürecinde yumurta sarısında bulunan düşük yoğunluklu lipitler (LDL) yumurta sarısının jelatinleşmesini sağlar. Yumurta sarısının koruyucu kısmları fosfolipitler (lesitin) ve LDL olduğunu bildirmektedir. LDL spermatozoon membranını sararak dondurma-çözdürme sırasında spermatozoonun zarar görmesini engellemeye çalışmaktadır (Medeiros ve ark 2002, Purdy 2006). Yumurta sarısı sulandırıcı içerisinde türlere göre farklı olmakla birlikte genellikle % 3-25 oranlarında kullanılmaktadır. Yumurta sarısının kriyoprotektan özelliği tam olarak bilinmemekle birlikte, spermatozoonun soğutulması esnasından spermatozoon membranına yapışarak membran bütünlüğünün bozulmasını engelleyi etki gösterdiği düşünülmektedir (Akçay 2000).

Sulandırıcılarda spermatozoonların enerji gereksinimlerini sağlamak adına eksojen olarak şekerlerden faydalanılmaktadır. Glikolizis etkinliğinden dolayı spermatozoa için glukoz, fruktoz ve mannoz enerji kaynağı olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Bu nedenle sulandırıcılara glukoz ve fruktoz eklanmaektedir (Silva ve ark 2001).

1.4.2. Spermanın Dondurulması

Spermanın dondurulmasına ait çalışmalar gliserolün kriyoprotektan olarak etkinliğinin ortaya konmasından sonra başlamıştır (Holt 2000).

Spermatozoon membran yapısında yüksek oranda bulunan DYA, spermatozoonun soğutulması esnasında irreversibl faz değişimine, (sıvı fazdan jel fazına geçmesine) neden olmaktadır (Holt 2000, Watson 2000). Faz değişimi sonucu olarak spermatozoonun çözüm sonu canlılığının azalması görülmektedir. Aynı zamanda membran yapısındaki doymamış fosfolipitler spermatozoayı ROS ataklarına ve sonucunda LPO'a karşı duyarlı hale getirerek ozmotik ve mekanik

strese sebep olmaktadır (Eilts 2005, Bucak ve Tekin 2007, Agarwal 2014). Bu süreç terminolojide soğutma zararı (cryoinjury) olarak adlandırılmaktadır (Holt 2000).

1.4.3. Kristalizasyon

Spermatozoanın soğutulması ile beraber hücre dışı ortamda -5^{o}C ile -10^{o}C arasında buz kristali oluşumu gözlenmekteyken, hücre içi hücre membranının etkisiyle tam olarak donmamıştır. Hücre dışında oluşan kristalleşme sonucu hücre dışı ozmotik basınç, ortamda bulunan yapılarının yoğunluklarının artması sonucu izotonik halden hipertonik ortama doğru hızlı bir şekilde geçiş yapar. Bunun sonucunda, hücre dışı ortamda oluşan buz kristalleri arasında yoğunluk-basınç farklarından kaynaklı hiperozmotik cepler oluşmaktadır. Bu esnada hücre içinde henüz donmamış yapılar ve iyonlar (Ca^{+}, Na^{+}) Na^{+}- Ca^{+} ve K^{+}-ATPaz kanallarından hücre dışına doğru geçmeye başlar (dehidrasyon) ve bunun sonucunda hücre içi madde kaybı ve hücrenin küçülmesi şekillenirken, aynı zamanda hücre içi yoğunluk artmasına bağlı olarak hücre içi kristalleşme oluşur. Hücrenin soğutulması sürecinde yaşanan bu durum spermatozoanın çözdürülmesi sürecinde de dekristalizasyon olarak tersine gerçekleşmektedir (Fraser ve Strzezek 2005, Bucak ve Tekin 2007).

İki-Faktör Hipotezi

Mazur ve ark (1972) tarafından ortaya konulan iki faktör hipotezi, hücrenin yavaş soğutulması sonucu hücre içi-dışı iyon ve su moleküllerinin düşük sıcaklıklara maruz kalma süresinin uzaması ile buz kristali oluşumunun artışı, yavaş çözdürme ile de tersine dekristalizasyon sonucu hücrenin geri dönüşümsüz olarak hasar görmesi olarak ifade edilmektedir. Buna göre hücrenin dondurma ve çözdürme hızlarının hücre tiplerine göre optimize edilmesinin ve kullanılacak olan kriyoprotektan seçimi ve optimum dozunun belirlenmesinin hücrenin dondurma-çözdürme sürecinde oldukça önemli olduğu vurgulanmaktadır.

Hücrelerdeki soğutma zararının oluşmasında, hiperozmotik stres, soğuk şoku stresi, ozmotik büzüşme-şişme etkili olduğu belirtilmektedir. Hiperozmotik ortamın oluşmasında; pH, hücresel dehidrasyonda artış, hücre membranındaki protein-lipit yapının zayıflaması etkili olmaktadır. Spermatozoonun dondurulması sırasında hiperozmotik ortam oluşmaktayken çözüm esnasında kristalizasyonun ortadan

kalkması ile hiperozmotik ortam azalmaktadır. Ozmotik stres intra/ekstrasellüler ortamda oluşan bu farklılıktan ileri gelmektedir (Holt 2000).

Kriyoprotektan ilavesi, hücre içinde hiperozmotik ortam oluşturmasına ve dehidrasyona neden olmaktadır. Kriyoprotektanların ortamdan uzaklaştırılmasında ise tersine etki oluşarak tekrar gelişen hiperozmosize bağlı membran yıkımları oluşmaktadır. Spermatozoonlardaki küçük porların varlığı potasyum ve sodyum iyonlarının giriş-çıkışını sağlarken aynı zamanda hipoozmotik stres ve kolloidal ozmotik hemolize karşı duyarlılığı artırmaktadır. Bunu önüne geçilebilmesi için ortama eklenecek olan kriyoprotektanların yavaş bir şekilde eklenmesi gerekmektedir (Bucak ve Tekin 2007).

1.4.4. Spermanın Dondurulmasında Kullanılan Kriyoprotektanlar

Kriyoprotektanlar spermatozoanın dondurulmasında meydana gelen soğuk şokuna, hücre içi kristal oluşumuna, spermatozoonun çözüm esnasında membran yapısının destablizasyonuna ve dekristalizasyonuna karşı koruyucu etkinlik göstermesi nedeniyle kullanılmaktadır. Kriyoprotektanlar hücre içerisinde donmamış fraksiyonu artırarak, denge sağlamakta ve bu sözelliği ile spermatozoonların dondurlması ve çözdürlmesinde koruyucu etkinlik göstermektedirler (Bucak ve Tekin 2007).

Hücrelerin kriyoprotektan maddelere maruz kalması hücrelerden su atılmasına neden olmaktadır. Bu dehidrasyon işleminin çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesi, hücrelerin ölümüne neden olabileceğinden kriyoprotektan içeren sıvıların artan konsantrasyonlarda ilave edilmesi gerekmektedir. Doza bağlı olarak çoğu kriyoprotektan madde hücreler için toksik özellik gösterebileceğinden bu toksik etkiyi minimize etmek için kriyoprotektanlar ortama yavaş bir şekilde ilave edilmeli, sulandırıcı ve kriyoprotektan karışımı spermaya ilave edilmeden önce düşük sıcaklıkta muhafaza edilmelidir (Holt 2000).

Kriyoprotektanlar permeabl ve permeabl olmayan kroyoprotektanlar olarak iki gruba ayrılmaktadırlar (Holt 2000, Silva ve ark 2003, Pena 2004).

Permeabl Kriyoprotektanlar

Bu grup içerisinde; Gliserol, Etilen Glikol, DMSO (dimetil sülfo oksit) örnek olarak sayılabilir. Permeabl özellikteki kriyoprotektanlar hücre içerisine etki ederek, donma esnasında elektrolit dengeyi koruma, dehidrasyon esnasında hücre içi protein yapısında oluşabilecek protein denatürasyonunu azaltma ve düşük sıcaklıklarda oluşabilecek mekanik stresin önüne geçme gibi özelliklere sahiptir (Holt 2000, Silva ve ark 2003, Pena 2004).

Gliserol

Gliserol yüksek oranda hidrofilik yapı gösteren bir poliol bileşiğidir. Gliserol hücre içi su ile hücre sitoplazması arasına girerek hücre içi kristalizasyonun önüne geçmektedir (Vidament ve ark 1997). Gliserolün karbon atomu ile hidroksil grubu oranının eşit olması, ayrıca liyofilik/hidrofilik özelliği taşıması, spermanın dondurulması esnasında kriyoprotektif etkinliğini artırmaktadır (Storey ve ark 1998). Gliserolün farklı konsantrasyonları spermanın dondurulmasında denenmiş ve düşük konsantrasyonlarda kullanımı kriyoprotektan etkinliğinin daha iyi ortaya çıkmasını sağlamıştır (Cochran ve ark 1984, Cristanelli ve ark 1985). Gliserolün hayvan türlerine göre sulandırıcılara ilave edilecek optimum dozlarının araştırıldığı çalışmalarda boğa sperması sulandırıcısında % 7 (De Jarnette ve ark 2000), aygırlarda % 4-5 (Morrell ve Hodge 1998), koç ve teke spermasında % 4-8 (Woods ve ark 2000), domuzlarda % 3, farede ise % 1,75 (Holt 2000) oranında kullanılabileceği belirlenmiştir. Hücrelerde gliserolün toksik etkisi, membran biyoenerji dengesinde değişikliğe ve ozmotik strese ve sonucunda da protein denatürasyonu ve membran hasarına yol açmaktadır (Hammerstedt ve Graham 1992, Alvarenga ve ark 2000, Woods ve ark 2000).

Gliserol köpek spermasının dondurulmasında en yaygın kullanılan kriyoprotektan olarak bildirilmektedir (Rota ve ark 2006). Köpeklerde dondurulmuş sperma ile yapılan ilk suni tohumlama uygulamalarında gliserol % 8 oranında kullanılmıştır. Sonraki çalışmalarda farklı gliserol oranı içeren sulandırıcılarla dondurulan köpek spermalarının çözüm sonu verilerine göre optimum gliserol oranının % 2-8 arasında olması kanısına varılmıştır (Günzel 1986, England 1993,

Pena ve ark 1998, Mayenco-Aguirre ve Perez-Cortes 1998, Cardoso ve ark 2003, Silva ve ark 2003, Pena 2004).

Etilen glikol

Etilen glikol gliserol gibi aynı karbon atomuna ve hidroksil grubuna sahip bir kriyoprotektandır. Etilen glikolün (62,07 g/mol) moleküler ağırlığı ise gliserole (92,10 g/mol) oranla daha düşüktür. Bu sebeple etilen glikolün gliserole oranla hücre içi permeabilitesinin yüksek olduğu ve toksik etkisinin daha az olduğu belirtilmiştir (Storey ve ark 1998).

Etilen glikolün aygır, domuz, fare ve insan spermasının dondurulmasında hücre içi geçirgenliğinin daha iyi olduğu düşüncesiyle kullanıldığı belirtilmektedir (Watson 1990, Molinia ve ark 1994, Phelps ve ark 1999). Etilen glikolün köpek spermasının dondurulmasında kullanılması ile ilgili veriler sınırlı sayıda olmakla birlikte etkileri tam olarak ortaya konulamamıştır (Soares ve ark 2002).

Rota ve ark (2006), köpek spermasının dondurulmasında etilen glikolün gliserole oranla daha iyi koruyuculuğu olduğunu vurgulamışlardır.

Cavalcanti ve ark (2002), etilen glikolün köpek spermasının çözüm sonu motilitesini düşürdüğünü belirtirken, Soares ve ark (2002), gliserol ile etilen glikolün köpek spermasının çözüm sonu motilite değerleri arasında bir fark oluşturmadığını belirtmişlerdir. Benzer sonucu Santos ve ark (2001), % 5 oranında gliserol ve etilen glikolü kullandıkları çalışmalarında da elde etmişlerdir.

Permeabl Olmayan Kriyoprotektanlar

Bu tür kriyoprotektanların hücre membranında sıvı veya katyonlara karşı permeabilite artışı yaparak oluşacak olan ozmotik strese karşı koruma ve bu sayede LPO'u azaltıcı etkileri bulunmaktadır. Permeabl olmayan kriyoprotektanlar makromoleküller (Polietilen glikol, ficoll 70, BSA, dekstran, mannitol) ve sakkaritler (glukoz, sükroz, trehaloz ve raffinoz) olarak iki gruba ayrılmaktadırlar (An ve ark 2000, Ball ve Vo 2001).

Hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar, donma işlemi süresince şekillenen kristal oluşumunu azaltıcı etkilerini hücreleri

dehidre ederek göstermektedir. Hücre içine nüfuz edemeyen yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar ise, hücrelerin dondurulması ve çözdürülmesi sırasında oluşan buz kristallerinin şekil ve büyüklüklerini zararsız olacak biçimde değiştirerek etkilerini göstermektedir (Mcgann ve ark 1988).

Eksternal kriyoprotektanlar, hücre membranının sıvı ve katyonlara karşı permeabilitesinde artış sağlayarak ozmotik strese karşı hücreyi esnek hale getirir. Bu sayede hücrenin donma/çözünmesi esnasında gelişen LPO'u azaltmaya çalışırlar (Cabrita ve ark 2001).

1.4.5. Köpek Spermasının Dondurulması İle İlgi Yapılan Çalışmalar

Pena (2004), tris bazlı sulandırıcı ile 0,25 ml'lik payetlerde spermayı dondurarak çözüm sonu motilite ve anormal akrozom oranlarını değerlendirmiştir. Buna göre çözüm sonu motilite oranı % 35,13±12,53 olurken, hasarlı akrozom oranını ise % 31,75±10,18 olarak saptanmıştır.

Olar ve ark (1989), en yüksek çözüm sonu motiliteyi tris sulandırıcısında % 3-4 gliserol oranı ile elde ettiğini bildirmiştir. Ayrıca 0,5 ml'lik payetlerde tris ve laktoz sulandırıcılarını farklı gliserol oranları kullanarak karşılaştırmış ve % 2-4 gliserol katılan tris sulandırıcısında çözüm sonu motilitenin daha yüksek olduğunu (% 40) saptamıştır.

Yurdaydın ve Kotzab (1987), yaptıkları bir araştırmada, 4 adet köpekten topladıkları 20 ejakulatı tris sulandırıcısı ile 1:3 oranında sulandırmışlar ve 4^{o}C'ta 2 saat ekilibre ettikten sonra sıvı azot buharında 7 dakikada dondurmuşlardır. Çalışma sonucunda çözüm sonu motiliteyi % 46,25, ölü spermatozoa oranını % 33,12, anormal spermatozoa oranını ise % 27,91 olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Yubi ve ark (1987) ise % 8 gliserol içeren tris-fruktoz ve % 4 gliserol içeren laktoz sulandırıcıları ile köpek spermasını 1:5 oranında sulandırmışlar ve 7^{o}C'ta 3 saat ekilibrasyon uygulayarak kuru buz-etil alkol yöntemi ile 0,5 ml lik payetlerde dondurmuşlardır. Çözüm sonu motiliteleri tris-fruktoz sulandırıcısı için % 29,17, laktoz sulandırıcısı için % 24,17 olarak saptanmıştır.

Dondurulmuş spermanın çözüm sonrası kabul edilebilir motilite oranı % 50 olarak belirlenmiştir. Elde edilen daha düşük motilite oranlarına ise, anormal

spermatozoanın neden olduğu düşünülmektedir. Özellikle dondurma öncesi protoplazmik damlacıkların oranı başarılı dondurma işlemini olumsuz etkilemektedir. Bunun nedeni ise, protoplazmik damlacıkların içinde bulunan hidrolitik enzimlerin donma ve çözme sırasında parçalanarak açığa çıkmasıyla spermatozoaya olumsuz etki etmesidir (Pena 2004). Ayrıca dondurma ve çözdürme işlemleri sırasında akrozomda zarar görmektedir. Ancak akrozom hasarları direkt olarak motiliteyi etkilememekle birlikte, büyük ölçüde fertilite düşüklüğüne neden olmaktadır (Froman ve ark 1984, Pena 2004).

Köpek spermasının dondurulmasında spermanın uygun bir sulandırıcı ile sulandırılması, çözüm sonu spermatolojik parametrelere olumlu katkı sağlaması açısından kriyoprotektan ve antioksidan seçimi önemli olmaktadır.

1.5. Kuersetin, Ergotiyonin ve Esansiyel Amino Asit Solüsyonunun (BME) Antioksidatif Etkinliği

Antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, antiallerjik ve antitrombotik özellikleri bulunan flavonoidler çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Stavric 1994, Yetük 2013). Flavonoidler fenolik madde yapısında olup, aromatik halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu bileşiği içermektedir (Shahidi ve Naczk 1995).

Flavonoidler kateşin-kuersetinler, antosiyanidinler, flavonoller, flavanonlar ve proantosiyanidinler olmak üzere beş alt gruba ayrılır. Flavonoidlerin antitoksidan özelliklerini gösterebilmek için serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirdiği belirtilmektedir (Yetük 2013).

Flavonoidlerin hücre yapısı üzerinde; süperoksit radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijeni temizleme, peroksil radikalini tutma, lipit peroksil zincir yapısını kırma, hücre içine girme ya da çıkma özelliğinde olan demir, bakır gibi metallerin geçişini düzenleme gibi özellikleri ile etki etmektedir (Stavric 1994, Skaper ve ark 1997, Formica ve Regelson1995).

Kuersetin özellikle soğan, elma, maydanoz ve narenciyede bulunan önemli bir flavonoid maddedir. Kuvvetli bir antioksidan olma özelliği yanında antiviral, antikarsinojen, antimikrobiyal, antiparaziter, yangı giderici, kolesterolü düşürücü ve

immun sistemi destekleyici etkisi olduğu belirtilmektedir (Abdallah ve ark 2011, Zribi ve ark 2012).

Kuersetin spermanın kısa süreli saklanmasında ya da dondurulmasında ROS oluşumunun önüne geçerek antioksidatif aktivite göstermekte ve serbest radikallere karşı divalent katyonlar ile şelasyon oluşturarak lipoksi radikal oluşumunu baskılamaktadır (da Silva ve ark 1998, Johinke ve ark 2014). Flavonoidler LPO'u azaltmak amacıyla peroksil radikallerden H atomu vererek ROS oluşumunu azaltmakta ve bu sayede koroner kalp hastalığı ve kanser gibi patolojik hastalıklar dahil LPO'a karşı dokuları koruyucu rol üstlenmektedir (Aherne ve O'Brien 2000). Kuersetinin ayrıca spermatozoonda oksidatif strese bağlı oluşan DNA hasarına karşı koruyucu etkinliği bildirilmiştir (Zribi ve ark 2012).

Ergotiyonin tiyol ve tiyon formunda bulunan flavonoid kökenli antioksidan özellikte olan bir maddedir. Ergotiyonin ilk olarak Tanret (1909) tarafından çavdar tohumu üzerindeki Clavipes purpurea mantarından elde edilmiştir. Bunun yanı sıra siyah ve kırmızı fasulyede, kırmızı ette, karaciğer, böbrek ve tahıllarda da bulunduğu belirlenmiştir. İnsanlarda eritrositlerde, kemik iliğinde, karaciğer, böbrek, seminal sıvı ve gözün kornea tabakasında 100μM-2mM arasında değişen oranlarda bulunmaktadır (Cheah ve Halliwell 2012).

Ergotiyoninin yapılan çalışmalarda, katyon şelasyonunda, gen ekspresyonunda ve immun sistem düzenleyicisi rolünde olduğu ortaya konmuştur (Rahman ve ark 2003, Laurenza ve ark 2008). Bunların yanı sıra antioksidan ve kriyoprotektan özelliğinin de bulunduğu araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Akanmu ve ark 1991, Aruoma ve ark 1999, Mitsuyama ve May 1999). Vücudun büyük bölümünde değişen oranlarda bulunması sebebiyle ergotiyoninin fizyolojik bir antioksidan olduğu kanısına varılmıştır. Karaciğer, böbrek, eritrositler, seminal sıvı ve göz gibi oksitatif strese duyarlı olan dokularda yüksek oranda bulunması bu hipotezi desteklemektedir. Oksidatif strese bağlı olarak bağırsaklarda oluşan iskemi ve reperfüzyon hastalıklarının ergotiyonin eksikliği bulunan farelerde ortaya çıktığını bildirmişlerdir (Kato ve ark 2010).

Ergotiyoninin güçlü bir $OH^{\cdot}$, HOCl ve $ONOO^{-}$ koruyucu özelliği bulunmakta ve diğer tiyol grubu içeren GSH bileşenlerine göre tekli oksijen molekülünü daha

yüksek oranda deaktive ettiği bildirilmektedir (Akanmu ve ark 1991). Ergotiyonin, $ONOO^-$ ve karbonat radikallerinin yol açtığı LPO'a, protein ve DNA hasarına karşı GSH'a göre daha yüksek düzeyde koruma sağladığı ifade edilmektedir (Aruoma ve ark 1997, Franzoni ve ark 2006). Ayrıca hücre dondurma sürecinde H_2O_2 oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Aruoma ve ark 1999).

Amino asitler belirli organizmalarda düşük sıcaklıklara karşı koruyucu rol üstlenmektedir. Balık kas proteinlerinin şoklanmasına karşın bozulmaması da amino asitlerin bu özelliğine örnek gösterilmektedir. Bunun yanında birçok amino asitin spermanın dondurulmasında spermatozoonun hücre duvarını sararak soğuk şokuna karşı koruduğu araştırmacılar tarafından ifade edilmektedir (Pena ve ark 1998, Martins-Besa ve ark 2007, Uysal ve Bucak 2007, Bucak ve ark 2007, 2008,2009, Ali Al Ahmad ve ark 2008, Ateşşahin ve ark 2008). BME'nin sperma dondurulması üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada Farshad ve Hosseini (2013), teke spermasına katılan % 10 oranında BME'nin çözüm sonu motilite, progresif motilite, canlılık, akrozom ve membran bütünlüğü oranları bakımından kontrol grubuna göre önemli ölçüde katkı sağladığını belirtmişlerdir. Buna karşın Bucak ve ark (2009), % 13 oranında koç sperma sulandırıcısına ilave ettikleri BME'nin, çözüm sonu motiliteyi ve anormal spermatozoon oranına katkı sağlamadığını vurgulamışlardır.

Köpek spermasının dondurma işlemine karşı son derece duyarlı olması ve çözüm sonu sperma parametrelerinin katkı maddeleri ile iyileştirilmeye çalışılması süre gelen çalışmalarla ifade edilmiştir. Sunulan tez çalışmasında, Kangal Çoban köpeği ırkına ait spermaların başarılı şekilde dondurulabilmesi için çeşitli antioksidan özellikli katkı maddelerinin (kuersetin, ergotiyonin ve BME) ve kriyoprotektan olarak gliserol ve etilen glikol'ün etkinliklerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı dozlarda kuersetin, ergotiyonin ve BME antioksidanlarının çözüm sonu etkinlikleri subjektif ve CASA motiliteleri, spermatozoa hareketleri (VCL μm/s, VSL μm/s, VAP μm/s, ALH μm ve LIN %), floresan boyama teknikleri (canlılık, akrozom bütünlüğü, mitokondriyal aktivite) ve DNA bütünlüğü (COMET) yönüyle değerlendirilmiştir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

Araştırma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği ile Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yürütüldü.

Sunulan çalışma için Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'ndan gerekli onay (2013/016) alınmış olup, 1-3 yaşlı 5 baş ergin Kangal köpeğinden alınan spermalar kullanıldı. Köpeklerin bakım ve beslemesi Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde standart yetiştirme koşullarında yapıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Spermanın Alınması

Köpeklerden sperma, elle masaj yöntemiyle (Digital Maniplasyon) alındı. Erkek köpeğe sağ tarafından yaklaşılarak prepusyum üzerinden penise özellikle bulbus glandise masaj yapıldı. Bulbus glandis şişmeye başladığında prepusyum geri çekilerek penis prepusyumdan çıkarıldı ve bulbus glandis köküne masaja devam edildi. Daha sonra penis arka bacaklar arasından geriye çevrilerek sperması alındı. (Akçay 2000).

Ejakulatlar, haftada iki kez, 12 hafta süresince alındı. Alınan ejakulatlardan uygun özellik (sperma yoğunluğu $\geq 400 \times 10^6$ spermatozoa/ml; motilite $\geq$% 80) gösterenler miks yapılarak spermanın sulandırılması ve dondurulması işleminde kullanıldı.

2.2.2. Sperma Sulandırıcısının Hazırlanması

Spermaların sulandırılmasında kullanılan tris bazlı sulandırıcı aşağıda belirtilen formüle göre hazırlandı.

Tris (Hidroksimetilaminometan)	297,58 mM
Sitrik asit	96,32 mM
Fruktoz	82,66 mM
Gentamisin	0,1cc/100ml

Yukarıdaki formüle göre tartılan sulandırıcı bileşenleri çalışmanın tümünde yetecek miktarda deiyonize (18,2Ω) suda çözdürülerek hazırlanan temel sulandırıcı +4 ^{o}C'ta saklandı (Tris stok sıvısı). Sperma alınacağı gün Tris stok sıvısına % 20 oranında taze yumurta sarısı eklendi ve yumurta sarısının tortularını uzaklaştırmak için 15 ml'lik falkon tüpler içerisine konularak 15 dakika 6000 devirde santrifüj edilerek supernatant kısmı filtre işlemi sonrasında atıldı ve geriye kalan kısım sperma işlemi için hazır hale getirildi (Temel sulandırıcı).

Hazırlanan temel sulandırıcıya kriyoprotektan olarak % 5 oranında gliserol ve EG, antioksidan olarak Kuersetin (Sigma 337951) 50 µM ve 200 µM, Ergotiyonin (Sigma A3555) 0,5 mM ve 2 mM ve BME (Sigma B6766) % 2,5 ve % 10 dozlarında aşağıda belirtildiği gibi eklenerek deney grupları oluşturuldu.

1. <u>Deney</u>

- Temel sulandırıcı + % 5 Gliserol (G) + Kuersetin 50 µM (TGK50)
- Temel sulandırıcı + % 5 Gliserol + Kuersetin 200 µM (TGK200)
- Temel sulandırıcı + % 5 Etilen Glikol (E) + Kuersetin 50 µM (TEK50)
- Temel sulandırıcı + % 5 Etilen Glikol + Kuersetin 200 µM (TEK200)
- Temel sulandırıcı + % 5 Gliserol (TG)
- Temel sulandırıcı + % 5 Etilen glikol (TE)

2. <u>Deney</u>

- Temel sulandırıcı + % 5 Gliserol + Ergotiyonin 0,5 mM (TGE0.5)
- Temel sulandırıcı +% 5 Gliserol + Ergotiyonin 2 mM (TGE2)
- Temel sulandırıcı + % 5 Etilen Glikol + Ergotiyonin 0,5 mM (TEE0.5)
- Temel sulandırıcı + % 5 Etilen Glikol + Ergotiyonin 2 mM (TEE2)
- Temel sulandırıcı + % 5 Gliserol (TG)
- Temel sulandırıcı + % 5 Etilen glikol (TE)

3. <u>Deney</u>

- Temel sulandırıcı + % 5 Gliserol + BME % 2,5 (TGB2.5)
- Temel sulandırıcı +% 5 Gliserol + BME % 10 (TGB10)
- Temel sulandırıcı + % 5 Etilen Glikol + BME % 2,5 (TEB2.5)
- Temel sulandırıcı + % 5 Etilen Glikol + BME % 10 (TEB10)
- Temel sulandırıcı + % 5 Gliserol (TG)
- Temel sulandırıcı + % 5 Etilen glikol (TE)

2.2.3. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması

Sulandırma işlemi ml'de yaklaşık 400×10^6 spermatozoa olacak şekilde yapıldı. Sulandırma işlemini takiben sperma numuneleri 10 dakika oda ısısında tutulup ardından 0,25 ml'lik payetlere çekilerek yaklaşık 1,5 saat +4°C'ta ekilibrasyona bırakıldı ve ekilibrasyonu izleyen süreçte sıvı azot buharında (~-100°C) 12 dakika tutularak donduruldu ve (~-196°C) sıvı azotta saklandı. Çalışma her deney grubu için 6 replikasyondan oluştu.

2.3. Spermanın Değerlendirilmesi

Çalışmada antioksidan içeren ve içermeyen sperma numuneleri dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik muayenelerden spermatozoa subjektif motilitesi, CASA total ve progresif motilite, ayrıca speramatozoa hareketlerinden VCL, VSL, VAP, LIN ve ALH yönünden değerlendirildi. Floresan mikroskopta spermatozoalar canlılık (SYBR-14/PI), akrozom bütünlüğü (FITC/PI) ve mitokondriyal aktivite (JC-1/PI) yönünden değerlendirildi. Gümüş boyama tekniği ile DNA bütünlüğü (COMET test) analizi yapıldı.

Bu işlemler en az 24 saat sıvı azotta bekletilen payetlerin, 37°C'taki su banyosunda 30 saniyede çözdürülmesiyle gerçekleştirildi.

2.3.1. Spermatozoa Motilitesi

2.3.2. Subjektif Motilite

Isıtma tablalı faz kontrast mikroskobun 37°C'ta, 400x büyütmesinde lam-lamel arasına alınan bir damla sperma numunesinde en az 3 mikroskop sahasına bakılıp, sahalardaki motilite değerlerinin ortalaması % motilite oranı olarak kaydedildi (Çoyan ve ark 2002).

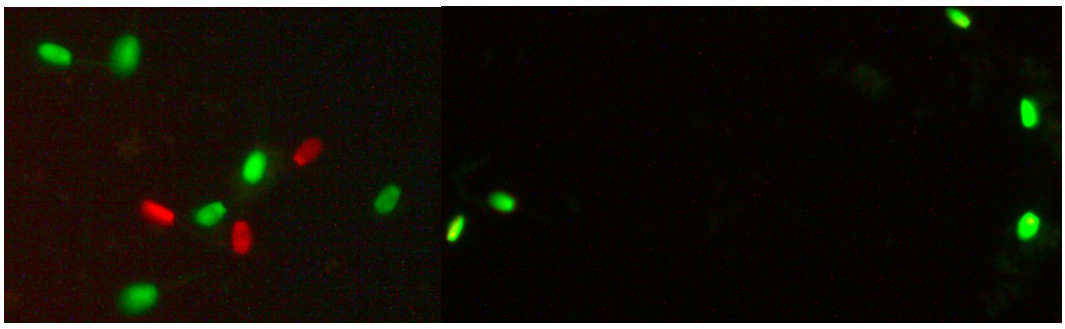
2.3.3.Bilgisayarlı Sperma Analiz Cihazı (CASA) ile Motilite

Çözüm sonu motilitelerinin ve hareket özelliklerinin değerlendirilmesinde Bilgisayarlı Sperma Analiz Cihazı (CASA), Sperm Class Analyzer (SCA® v.4.2, Barcelona, Spain) kullanıldı. Spermatozoon hareket özellikleri değerleri hesaplanırken hız ayarları statik, yavaş > 20 μm/s, orta > 50 μm/s, hızlı > 80 μm/s

olarak ayarlandı. Her bir örnekten 5 µl alınarak lama damlatıldı ve üzerine 22x22'lik lamel kapatıldı. Sisteme bağlı faz-kontrast mikroskobunda x100'lük büyütmede 60 framelik kamera (Basler®) eşliğinde her bir örnek için 7 farklı alanda en az 200 en fazla 350 adet spermatozoon analiz edildi. Yapılan analizde spermatozoa total motilitesi %, progresif motilite %, VCL µm/s, VSL µm/s, VAP µm/s, ALH µm ve LIN % parametreleri değerlendirildi.

2.3.4. Spermatozoa Canlılığı

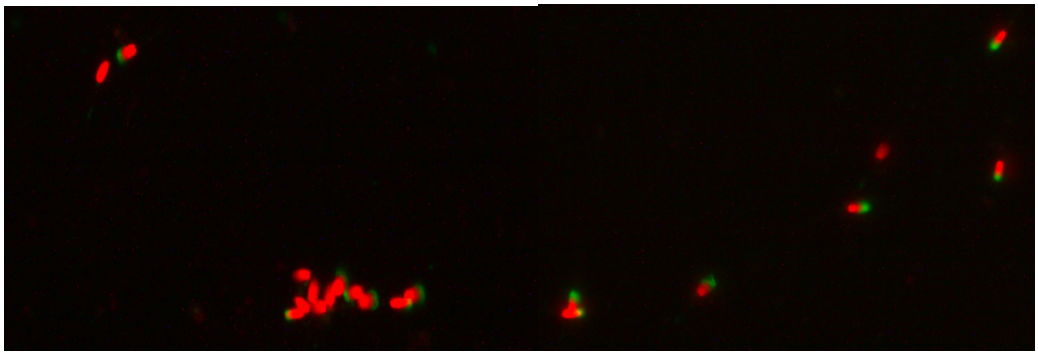
Spermatozoa canlılığının tespiti için SYBR-14/PI (SYBR-14/PI Molecular Probe: L 7011 Invitrogen, Carlsbad, CA) floresan boyaması uygulandı. SYBR-14 stok sıvısı için SYBR-14 1/10 oranında dimetil sülfo oksit (DMSO) içerisinde çözülerek, 10'ar µl'lik hacimler halinde ependorflara aktarıldı ve -20^{o}C'ta saklandı. PI stok sıvısı ise şu şekilde hazırlandı: 1 mg propidyum iyot, 1 ml fosfat bufer solüsyonu (PBS) içerisinde çözdürülerek 10'ar µl'lik hacimler halinde ependorflara aktarıldı ve -20^{o}C'ta saklandı. Analiz için +37^{o}C'ta çözdürülen 0,25 ml payet içerisindeki sulandırılmış spermatozoa ependorf içerisine alındı ve üzerine 300 µl PBS (SIGMA P4417) eklendi. Sulandırılmış numunenin 30 µl'si üzerine 6 µl'lik SYBR-14 stok sıvısı ve 2,5 µl PI stok sıvısı eklenerek +37^{o}C'taki su banyosunda 15 dakika inkube edildi. İnkubasyonun ardından üzerine 10 µl Hancock sıvısı eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Ardından boyanmış spermatozoa numunesinden 5 µl lam üzerine alınarak üzeri lamel ile kapatılarak değerlendirildi. Değerlendirme floresan mikroskopta (Leica DM 3000 Microsystems GmbH, Ernst-Leitz-Straße, Wetzlar, Germany) x400 büyütmeli objektif ile yapıldı. Baş kısımları açık yeşille boyalı olanlar membranı sağlam (canlı) spermatozoayı, kırmızı boya alanlar ise ise membranı hasarlı (ölü) spermatozooayı gösterdi.



Şekil 2.1. Spermatozoonlarda SYBR-14/PI boyama tekniği ile ölü-canlı spermatozoa oranının değerlendirilmesi. Baş kısmı yeşil floresan veren hücreler, canlı spermatozoa; baş kısmı kırmızı floresan veren hücreler, ölü spermatozoa olarak değerlendirildi.

2.3.5. Spermatozoa Akrozom Bütünlüğü

Akrozom değerlendirmesi için, Floresin isosiyanat (FITC-PNA)/Propidyum İyot (PI) floresan boyaması uygulandı. Bunun için, FITC-PNA stok sıvısı hazırlandı: 120 µg FITC-PNA (Invitrogen S7580) boyası 1 ml PBS içerisinde çözdürüldü ve sonrasında 100 µl'lik hacimlerde ependorflara kullanılmak üzere aktarıldı ve -20^{o}C'ta saklandı. Analiz için +37^{o}C'ta çözdürülen 0,25 ml payet içerisindeki sulandırılmış spermatozoa ependorf içerisine alındı ve üzerine 300 µl PBS eklendi Sulandırılmış numunenin 60 µl'si üzerine 10 µl'lik FITC-PNA stok sıvısı ve 2,5 µl PI stok sıvısı eklenerek +37^{o}C'taki su banyosunda 15 dakika inkube edildi. İnkubasyonun ardından 10 µl Hancock sıvısı eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Ardından boyanmış spermatozoa numunesinden 5 µl lam üzerine alınarak üzeri lamel ile kapatılarak değerlendirildi. Spermatozoa akrozomal yapıları floresan mikroskopta 450-490 nm dalga boyunda en az 200 spermatozoon sayılarak değerlendirildi. Akrozomu yeşil boya alanlar hasarlı akrozoma sahip spermatozoayı, akrozomu boya almayanlar ise sağlam akrozoma sahip spermatozoayı gösterdi.



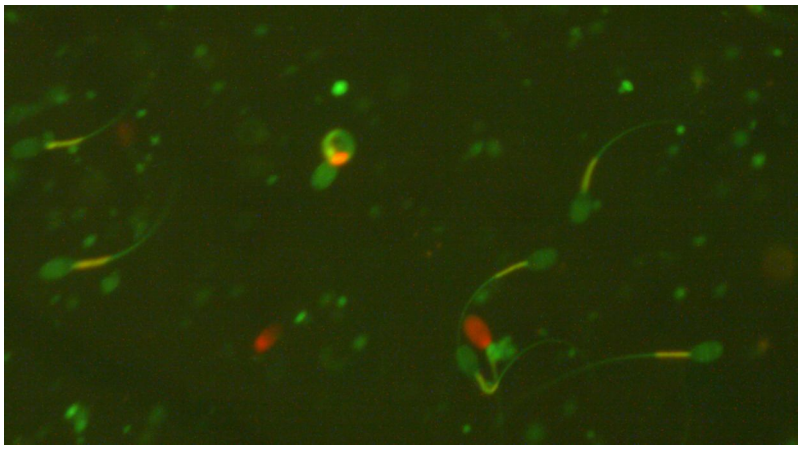
Şekil 2.2. Spermatozoonlarda FITCH-PNA/PI boyama tekniği ile akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi. Akrozom kısımları yeşil floresan veren hücreler, hasarlı akrozomu olan spermatozoa; akrozom kısımları yeşil floresan vermeyen ya da kırmızı veren floresan hücreler, sağlam akrozomu olan spermatozoa olarak değerlendirildi.

2.3.6. Spermatozoa Mitokondriyal Aktivitesi

Mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla, JC-1/PI floresan boyaması uygulandı. Boya çözeltisinin hazırlanması amacıyla 0,01 mg JC-1 [Mitochondrial Membrane Potential Probe (Invitrogen T3168)] 10 ml DMSO içerisinde çözdürülerek 50 µl'lik hacimler halinde ependorflara kullanılmak üzere aktarıldı ve -20^{o}C'ta saklandı. Analiz için +37^{o}C'ta çözdürülen 0,25 ml payet içerisindeki sulandırılmış spermatozoa ependorf içerisine alındı ve üzerine 300 µl PBS eklendi Sulandırılmış numunenin 300 µl'si üzerine 2,5 µl'lik JC-1/PI stok sıvısı ve 2,5 µl PI

stok sıvısı eklenerek +37°C'taki su banyosunda 15 dakika inkube edildi. İnkubasyonun ardından süspansiyon üzerine 10 µl Hancock sıvısı eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Ardından boyanmış spermatozoa numunesinden 5 µl lam üzerine damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatılarak değerlendirildi. Bu amaçla yapılan sınıflandırma şöyle oldu:

1- Gövde turuncu: mitokondriyal aktivite var
2- Gövde yeşil: mitokondriyal aktivite var
3- Gövde mat: mitokondriyal aktivite yok



Şekil 2.3. Spermatozoonlarda JC-1/PI boyama tekniği ile mitokondriyal aktivitenin değerlendirilmesi. Gövde kısmı turuncu floresan veren hücreler ile gövde kısmı yeşil floresan veren hücreler, mitokondriyal aktivite gösteren spermatoza; gövde kısmı floresan vermeyen hücreler ise mitokondriyal aktivite göstermeyen spermatoza olarak değerlendirildi.

2.3.7. Spermatozoa DNA Bütünlüğü

Spermatozoa DNA bütünlüğü değerlendirilmesi amacıyla tek hücre jel elektroforez testi (COMET) uygulandı.

Etüv ısısı 50°C'a ayarlanarak lamlar ısıtıldı. 3 ml Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen fosfat tamponu (PBS) ile 30 mg NMA (normal kaynama dereceli agaroz, Sigma A5093) ile kaynatıldıktan sonra, % 1'lik agaroz hazırlandı. Agaroz iyice şeffaflaşıncaya kadar eritildi. Polimerleşmesini engellemek için sıcak suya alındı. 200 µl NMA, tamamen buzlu lamlar üzerine bir lamel ya da pipet ucu yardımıyla yayıldı.

Sıvı azot içindeki payet 37°C'taki su banyosunda 30 sn tutularak çözüldükten sonra PBS ile uygun oranda sulandırıldı. Sulandırılan spermatozoa 30 mg (0,03 gr)

LMA (düşük kaynama dereceli agaroz Sigma A2790) + 4 ml PBS'de eritildi (% 0,75'lik) ve 37^{o}C'taki su banyosuna alındı. 18 µl sulandırılmış spermatozoa (yaklaşık 100.000 spermatozoon), 50 µl LMA ile karıştırıldı. Bu karışım NMA kaplı lamlara dökülerek üzeri lamelle kapatıldı ve 20 dk +4 ^{o}C'ta bekletildikten sonra lamel çıkartıldı.

Ardından lamlar, içerisinde lizis sıvısı [Lizis stok sıvısı (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trisma Base; pH 10) içerisine % 1 Triton X, % 1 Na Lauril sarkosinat ve % 0,77 DL-Dihtiyoeritrol (DTT) eklenerek hazırlandı] bulunan alüminyum folyo ile sarılmış şalelere (her şaleye 65 ml lizis sıvısı) alındıktan sonra +4°C'ta buzdolabında 1 saat lizis için beklendi.

Lizis Stok Sıvısı: 1000 ml için:

146,1 gr NaCl (Sigma 13423)
37,2 gr EDTA (Merck 1.08421.1000)
1,2 gr Trisma-Base (Sigma T6066)

Distile su içerisinde 146,1 gr NaCl ile 37,2 gr EDTA çözdürülerek solüsyon pH'sı 10'a ayarlandı. Sonrasında üzerine 1,2 gr Trisma-Base eklendi ve stok solüsyon hazırlama işlemi tamamlandı.

Lizis Çalışma Sıvısı: 100 ml için:

99 ml lizis stok
1 ml Triton X100 (Biomatik, A4025)
1 gr Na Lauril sarkosinat (Sigma, L9150)
76,92 µl DTT (Sigma, 43816)

Lizis çalışma sıvısını hazırlamak için aynı gün hazırlanan stok sıvıdan 99 ml alınarak üzerine 1ml Triton X100, 1gr Na lauril sarkosinat ve 76,92 µl DTT eklendi.

Daha sonra lizis çalışma sıvısı (65 ml) ve lamların bulunduğu şalelere, 15 µl Proteinaz K (Vivantis PC0712) eklenerek hafifçe pipetlendikten sonra örnekler 37°C'ta 3 saat inkübe edildi.

Slaytlar daha sonra lizis sıvısından alınarak elektroforeze yerleştirildi. Buz soğukluğundaki elektroforez sıvısına [100 ml 10X TBE (Tris Borat-EDTA) + 900 ml distile su] örnekler alıştırılarak DNA'nın gevşemesi için 4 ^{o}C'ta 30 dk bekletildi.

10X TBE: 81 gr Tris base (Sigma, T6066)
41 gr Borik asit (Vivantis, PR0607)

30 ml 0,5 M EDTA (Merck, 1.08421.1000)

0,5 M EDTA: 18,61 gr EDTA (Merck, 1.08421.1000)
2 gr NaOH (Merck, 1.06462.1000)
80 ml distile su

Elektroforez süresi 20-25 dk, gerilim 25V ve akım -250 mA olarak uygulandı.

Elektroforezden sonra lamlar çıkarılarak, kağıt havlu üzerine alındı ve hücreleri içeren agaroz jeller yıkanmadan 50°C'ta 20 dakika (ya da oda ısısında 1 saat) kurutuldu.

Slaytlar daha sonra % 15 trichloroacetic acid [15 gr trichloroacetic acid (Sigma 27242) + 100 ml distile su], % 5 çinko sülfat [5 gr çinko sülfat (Merck 1.08883.1000) + 100 ml distile su] ve % 5 gliserol [5 ml gliserol (Sigma 15524) + hacmi 100 ml'ye tamamlanır] içeren sıvıda 10 dakika fikse edildi. Daha sonra slaytlar deiyonize su ile 3 kez yıkandı ve oda ısısında 3 saat ya da 50°C'ta 60 dakika kurutuldu.

Gümüş boyamadan önce slaytlar deiyonize su ile 5 dakika rehidre edildi. Gümüş boyamada Nadin ve ark (2001)'nın yöntemi (66 ml solüsyon A + 34 ml solüsyon B) takip edildi. Slaytlar yaklaşık 20 dakika hazırlanan sıvıda hafifce çalkalanarak boyandı (hafif bir gri renk oluşana kadar).

Solüsyon A:

% 5 sodyum karbonat; 5 gr sodyum karbonat (Sigma 13418)+100 ml distile su

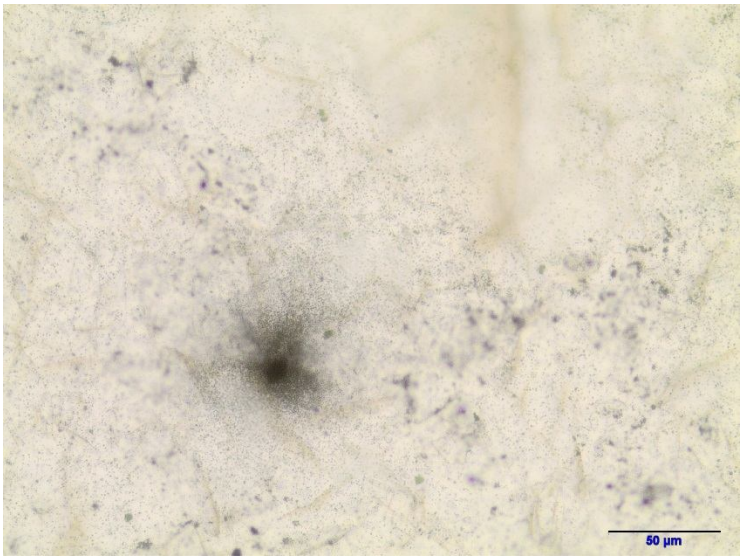
Solüsyon B:

% 0,2 amonyum nitrat; 0,2 gr amonyum nitrat (Merck 1.01188.1000) + 100 ml distile su
% 0,2 gümüş nitrat; 0,2 gr gümüş nitrat (Sigma 85228) + 100 ml distile su
% 0,5 tungstosilisik asit; 0,5 gr tungstosilisik asit (Sigma 383341) + 100 ml distile su
% 0,15 formaldehit; 0,15 ml (150 µl) formaldehit (Sigma 15512) + hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
% 5 sodyum karbonat; 0,5 gr sodyum karbonat (Sigma 13418) + 100 ml distile su

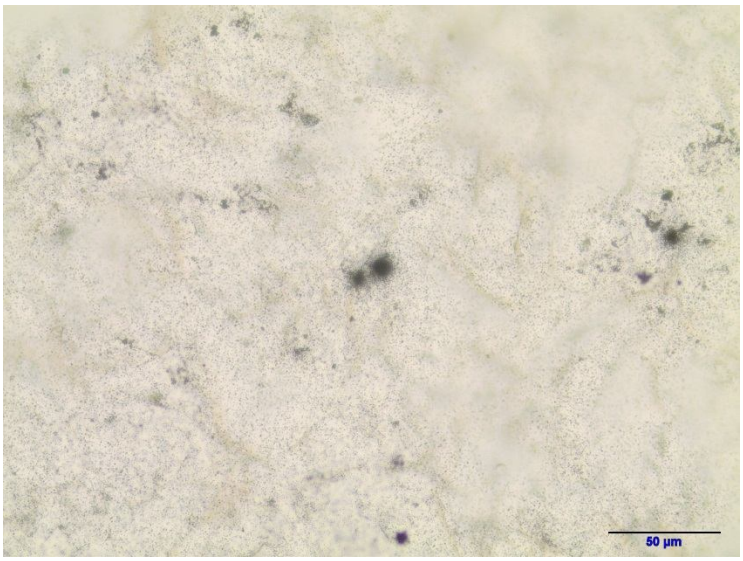
Daha sonra slaytlar deiyonize su ile 3-4 kez yıkandı. Boyanma reaksiyonu, slaytların % 1'lik asetik asit [1 ml glasiyal asetik asit (Sigma 27225) + hacmi distile ile 100 ml'ye tamamlanır] sıvısına daldırılması ile durdurularak 2 kez daha deiyonize

su ile yıkandı. Slaytlar açık havada kurutularak incelenineye kadar toz korumalı kutularda saklandı.

Hücre sayımı öncesi her slayt deiyonize su ile 5 dakika rehidre edildi. Değerlendirmede kuyruklu yıldız oluşumu gözlenen spermatozoa hasarlı kabul edildi. Kuyruklu yıldız oluşumu gözlenmeyen spermatozoa hasarsız olarak skorlandı. Her slayttan 200 spermatozoon sayılarak hasarsız hücre oranı belirlendi ve istatistiksel değerlendirmeye tabi tutuldu.



Şekil 2.4. Spermatozoonlarda COMET tekniği ile DNA bütünlüğü değerlendirilmesi, hasarlı DNA'ya sahip spermatozoon.



Şekil 2.5. Spermatozoonlarda COMET tekniği ile DNA bütünlüğü değerlendirilmesi, hasarlı DNA'ya sahip spermatozoon.

2.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizde en az 6 farklı uygulamadan elde edilen verilerin ortalamaları kullanıldı. Farklı antioksidan içeren ve içermeyen sulandırıcı grupların karşılaştırılmasında SPSS 15.0 programında Varyans analizi, aralarında önemli farklılık bulunan ikiden fazla grubu karşılaştırmak için de çoklu karşılaştırma testlerinden Duncan Testi kullanıldı. Farklılığın $P<0.05$ düzeyde olması önemli kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Birinci Deney Grubuna Ait Verilerin Değerlendirilmesi

Farklı dozlarda kuersetin içeren köpek spermalarında sulandırma ve çözüm sonu motilite parametreleri Çizelge 3.1.'de verildi. Çözüm sonu subjektif motilite bulguları açısından TGK50, TGK200 ve TEK200 grupları TG ve TE kontrol gruplarına göre, TEK50 grubu da TG kontrol grubuna göre belirgin bir üstünlük sağladı ($P<0.05$). Çözüm sonu progresif motilite oranı bakımından TGK200 sulandırma grubu TE grubuna göre üstünlük sağladı ($P<0.05$). Sulandırma sonu ve çözüm sonu CASA motilite oranları açısından gruplar arasında önemli bir fark görülmedi ($P>0.05$).

Çizelge 3.1. Farklı dozlarda kuersetin içeren köpek spermalarında sulandırma ve çözüm sonu motilite parametreleri.

GRUPLAR	Sulandırma Sonu Motilite (%)	Çözüm Sonu Motilite %		
		Subjektif	CASA	Progresif
TGK50	82.14±1.48	55.70±0.71^{c}	53.00±5.09	25.59±2.38^{ab}
TGK200	82.14±1.48	60.00±1.09^{d}	53.30±3.37	27.14±1.08^{b}
TEK50	80.75±2.29	55.00±1.54^{bc}	54.91±6.75	22.72±2.39^{ab}
TEK200	82.86±2.14	56.40±1.42^{cd}	55.20±6.23	24.14±1.94^{ab}
TG	83.56±0.92	50.70±1.70^{a}	47.72±3.31	23.72±1.49^{ab}
TE	82.14±1.48	51.40±0.92^{ab}	47.23±1.61	20.56±1.07^{a}
p	-	*	-	*

a-b-c-d: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir.
(*: $P<0.05$).
-: Gruplar arası farklılık önemli değildir ($P>0.05$).

Farklı dozlarda kuersetin içeren köpek spermalarında çözüm sonu spermatozoon hareket (VAP, VSL, VCL, ALH, LIN) parametreleri Çizelge 3.2.'de verildi. Buna göre gruplar arası spermatozoon hareketleri bakımından önemli bir fark bulunmadı.

Çizelge 3.2. Farklı dozlarda kuersetin içeren köpek spermalarında çözüm sonu spermatozoon hareket (VAP, VSL, VCL, ALH, LIN) parametreleri.

GRUPLAR	VAP (μm/s)	VSL (μm/s)	VCL (μm/s)	ALH (μm)	LIN (%)
TGK50	38.16±4.36	27.52±4.54	61.38±5.08	4.07±0.17	43.12±3.73
TGK200	44.19±4.39	32.80±4.39	66.20±4.13	4.14±0.23	48.38±3.78
TEK50	39.64±2.52	28.27±2.67	64.72±3.44	4.57±0.07	43.31±2.26
TEK200	38.80±2.57	26.58±2.43	64.24±3.84	4.50±0.22	40.92±1.79
TG	39.21±1.80	27.80±2.27	62.65±2.35	4.37±0.08	44.10±2.50
TE	36.50±2.31	25.24±2.22	57.98±2.42	4.05±0.57	37.70±6.05
p	-	-	-	-	-

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

Farklı dozlarda kuersetin içeren köpek spermalarında çözüm sonu floresan mikroskop (SYBR-PI, FITC-PI, JC1-PI) ve COMET değerleri Çizelge 3.3.'de verildi. SYBR14-PI boyama sonucu TGK50 ve TGK200 sulandırıcı grupları ile TEK200 grubu, TE grubuna göre belirgin bir üstünlük sağladı (P<0.05). Akrozom bütünlüğü bakımından TGK50 ve TGK200 sulandırıcı grupları TE grubuna göre koruyuculuğu önemli bulundu (P<0.05). Çözüm sonu mitoondriyal aktivite oranı en yüksek TEK50 ve TEK200 gruplarından elde edildi (P<0.05). DNA bütünlüğünün belirlendiği COMET analizinde TGK200 grubu TE grubuna göre üstünlük sağladı (P<0.05).

Çizelge 3.3. Farklı dozlarda kuersetin içeren köpek spermalarında çözüm sonu floresan mikroskop (SYBR-PI, FITC-PI, JC1-PI) ve COMET değerleri.

GRUPLAR	SYBR-14/PI %	FITC/PI %	JC-1/PI %	COMET %
TGK50	59.69±1.84^{b}	56.68±3.17^{b}	58.34±6.17^{b}	94.66±0.96^{ab}
TGK200	60.49±2.54^{b}	52.67±3.57^{b}	57.53±6.08^{b}	95.75±0.52^{b}
TEK50	54.86±2.73^{ab}	44.73±2.69^{ab}	50.56±2.37^{ab}	95.00±0.63^{ab}
TEK200	56.64±1.10^{b}	45.24±1.27^{ab}	50.18±2.49^{ab}	94.58±0.76^{ab}
TG	54.11±1.82^{ab}	43.31±3.99^{ab}	52.48±4.99^{ab}	95.00±0.36^{ab}
TE	48.68±2.41^{a}	37.95±1.76^{a}	43.25±2.10^{a}	93.41±0.74^{a}
p	*	*	*	*

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

3.2. İkinci Deney Grubuna Ait Verilerin Değerlendirilmesi

Farklı dozlarda ergotiyonin içeren köpek spermalarında sulandırma ve çözüm sonu motilite parametreleri Çizelge 3.4.'de verildi. Çözüm sonu progresif motilite oranları bakımından en iyi sonuç TGE2 grubunda elde edildi (P<0.05). Sulandırma, çözüm sonu sübjektif motilite, CASA motilite değerlendirilmesinde gruplar arası fark önemsiz bulundu (P>0.05).

Çizelge 3.4. Farklı dozlarda ergotiyonin içeren köpek spermalarında sulandırma ve çözüm sonu motilite parametreleri.

GRUPLAR	Sulandırma Sonu Motilite (%)	Çözüm Sonu Motilite (%)		
		Subjektif	CASA	Progresif
TGE0.5	84.2±1.7	53.5±0.71	49.9±5.75	20.29±3.63^{a}
TGE2	84.2±1.7	53.5±1.09	50.4±3.15	28.71±1.52^{b}
TEE0.5	84.2±1.7	47.8±1.54	45.7±2.21	16.22±2.18^{a}
TEE2	84.2±1.7	47.8±1.42	42.7±9.32	16.97±1.82^{a}
TG	84.2±1.7	47.8±1.70	41.6±3.83	15.81±0.49^{a}
TE	83.5±1.79	51.4±0.92	38.5±5.35	15.23±2.39^{a}
p	-	-	-	*

a-b: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir.
-: Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05).

(*: P<0.05).

Farklı dozlarda ergotiyonin içeren köpek spermalarında çözüm sonu spermatozoon hareket (VAP, VSL, VCL, ALH, LIN) parametreleri Çizelge 3.5.'de verildi. Buna göre antioksidan içeren gruplar antioksidan içermeyen gruplara karşı üstünlük sağlayamadı (P<0.05).

Çizelge 3.5. Farklı dozlarda ergotiyonin içeren köpek spermalarında çözüm sonu spermatozoon hareket (VAP, VSL, VCL, ALH, LIN) parametreleri.

GRUPLAR	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	LIN (%)
TGE0.5	36.71±2.76	26.17±2.46^{ab}	59.70±2.36^{ab}	4.17±0.07	43.40±3.01
TGE2	34.47±2.15	24.05±2.03^{ab}	54.18±2.75^{ab}	4.05±0.10	41.14±2.22
TEE0.5	37.47±2.53	27.30±2.76^{b}	61.00±3.38^{b}	4.32±0.08	44.18±2.57
TEE2	29.71±3.03	19.85±2.22^{a}	50.58±3.54^{a}	3.94±0.30	38.52±2.33
TG	34.25±2.02	24.90±1.73^{ab}	56.21±3.63^{ab}	4.00±0.27	44.38±1.55
TE	30.72±2.09	20.98±1.90^{ab}	52.78±3.31^{ab}	4.00±0.19	39.48±1.78
p	-	*	*	-	-

a-b: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir.
-: Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05).

(*: P<0.05).

Farklı dozlarda ergotiyonin içeren köpek spermalarında çözüm sonu floresan mikroskop (SYBR-PI, FITC-PI, JC1-PI) ve COMET değerleri Çizelge 3.6'da verildi. Buna göre SYBR14-PI boyama sonucu en yüksek canlılık oranı ile akrozom hasarının tespit edildiği FITC-PI floresan boyama sonrası en iyi koruma TGE2 grubunda elde edildi (P<0.05). Akrozom bütünlüğü açısından TGE0.5 grubu TG ve TE kontrol gruplarına istatiksel olarak üstünlük sağladı (P<0.05).

Çizelge 3.6. Farklı dozlarda ergotiyonin içeren köpek spermalarında çözüm sonu floresan mikroskop (SYBR-PI, FITC-PI, JC1-PI) ve COMET değerleri.

GRUPLAR	SYBR-14/PI %	FITC/PI %	JC-1/PI %	COMET %
TGE0.5	58.66±1.46^{a}	57.79±1.67^{cd}	69.56±3.88	93.58±1.51
TGE2	66.37±3.24^{b}	59.87±1.27^{d}	71.72±4.53	92.16±1.65
TEE0.5	54.14±0.76^{a}	51.02±1.28^{ab}	77.28±4.82	92.16±1.01
TEE2	57.97±1.03^{a}	54.67±1.03^{bc}	71.57±4.60	93.00±0.57
TG	58.42±2.44^{a}	49.99±2.52^{ab}	64.65±3.03	95.25±0.65
TE	54.69±0.85^{a}	47.06±1.48^{a}	69.44±5.55	93.08±0.62
p	*	*	-	-

a-b-c-d: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir.
-: Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05).
(*: P<0.05).

3.3. Üçüncü Deney Grubuna Ait Verilerin Değerlendirilmesi

Farklı dozlarda BME içeren köpek spermalarında sulandırma ve çözüm sonu motilite parametreleri Çizelge 3.7.'de gösterildi. Sulandırma sonu, çözüm sonu subjektif ve CASA motiliteleri açısından gruplar arası fark önemsiz bulundu (P>0.05). Çözüm sonu progresif motilite bakımından TGB10 sulandırıcı grubu TE grubuna göre istatiksel olarak önemli bulundu (P<0.05).

Çizelge 3.7. Farklı dozlarda BME içeren köpek spermalarında sulandırma ve çözüm sonu motilite parametreleri.

GRUPLAR	Sulandırma Sonu Motilite (%)	Çözüm Sonu Motilite (%)		
		Subjektif	CASA	Progresif
TGB2.5	83.5±0.92	57.1±2.40	53.6±7.28	19.31±1.52^{ab}
TGB10	83.5±0.92	53.5±2.60	52.2±7.35	23.19±1.61^{b}
TEB2.5	83.5±0.92	50.7±2.54	46.3±5.24	16.38±1.49^{a}
TEB10	83.5±0.92	52.8±2.85	53.5±3.53	15.09±1.35^{a}
TG	83.5±0.92	47.8±4.06	47.8±4.85	17.65±1.51^{ab}
TE	83.5±0.92	50.0±2.67	44.7±3.88	14.08±3.07^{a}
p	-	-	-	*

a-b: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir.
-: Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05).

(*: P<0.05).

Farklı dozlarda BME içeren köpek spermalarında çözüm sonu spermatozoon hareket (VAP, VSL, VCL, ALH, LIN) parametreleri Çizelge 3.8.'de verilmiştir. Buna göre gruplar arasında fark önemsiz bulundu (P>0.05).

Çizelge 3.8. Farklı dozlarda BME içeren köpek spermalarında çözüm sonu spermatozoon hareket (VAP, VSL, VCL, ALH, LIN) parametreleri.

GRUPLAR	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	LIN (%)
TGB2.5	40.35±3.59	30.07±3.39	63.45±5.01	4.18±0.18	47.01±2.74
TGB10	37.35±3.76	26.60±3.30	61.61±4.73	4.41±0.27	42.58±2.84
TEB2.5	33.32±2.53	22.50±1.82	57.72±3.87	4.68±0.23	39.10±1.96
TEB10	36.30±3.09	25.58±2.44	59.72±5.40	4.25±0.46	42.74±0.98
TG	39.71±3.96	28.91±4.22	64.18±4.27	4.45±0.10	43.75±4.49
TE	37.70±2.94	27.57±2.50	62.00±4.37	4.82±0.14	44.28±2.03
p	-	-	-	-	-

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

BME antioksidanı içeren ve içermeyen grupların çözüm sonu floresan mikroskobik değerlendirilmesi ve COMET analizi Çizelge 3.9.'da verildi. Akrozom bütünlüğü bakımından TGB2.5 sulandırıcı grubu TG grubuna göre istatiksel olarak yüksek koruma sağladı (P<0.05). Mitokondriyal aktivite oranı incelendiğinde TGB2.5, TGB10 ile TEB10 sulandırıcı gruplarının TE grubuna göre daha yüksek aktivite oranına sahip olduğu görüldü (P<0.05). DNA bütünlüğü analizinde BME katkı maddesinin kontrol grubuna göre istatiksel bir fark sağlamadığı görüldü (P>0.05).

Çizelge 3.9. Farklı dozlarda BME içeren köpek spermalarında çözüm sonu floresan mikroskop (SYBR-PI, FITC-PI, JC1-PI) ve COMET değerleri.

GRUPLAR	SYBR-14/PI %	FITC/PI %	JC-1/PI %	COMET %
TGB2.5	59.46±2.55	44.99±4.97^{b}	62.74±2.50^{b}	93.83±0.35
TGB10	58.98±2.15	42.46±4.02^{ab}	63.31±2.15^{b}	94.00±0.59
TEB2.5	60.10±7.90	38.63±2.38^{ab}	57.96±2.53^{ab}	94.83±0.91
TEB10	53.82±2.32	39.94±1.83^{ab}	59.69±2.71^{b}	93.66±1.30
TG	54.60±2.46	33.63±4.05^{a}	57.10±0.56^{ab}	94.75±0.54
TE	55.02±1.95	35.46±2.41^{ab}	52.50±2.45^{a}	94.08±0.66
p	-	*	*	-

a-b: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir.
-: Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05).

(*: P<0.05).

4. TARTIŞMA

Spermanın dondurulma işlemi sırasında soğuk şokuna karşı hücrelerde gözlenen aşırı duyarlılık, hasarı artırarak çözüm sonrası in vitro ve in vivo spermatolojik özellikleri olumsuz yönde etkilemektedir. Spermatozoonların membranlarında yüksek oranda doymamış yağ asiti bulunması, spermatozoonu LPO'a karşı duyarlı hale getirmektedir. Spermatozoonun soğutulması ve dondurulması/ çözdürülmesi irreversibl faz değişimine (sıvı fazdan jel fazına geçmesine) bağlı hasarlara ve oksidatif strese neden olmakta ve gelişen oksidatif stres ve oluşan sitotoksik aldehitler spermatozoonlarda fonksiyon kayıplarına neden olmaktadır (Holt 2000, Watson 2000). Bu nedenle sperma sulandırıcılarına katılan kriyoprotektif ve antioksidatif özellikli katkı maddeleri sayesinde oksidatif stres ve soğuk şoku hasarı minimize edilebilmektedir. Antioksidan bileşiklerin aynı zamanda kriyoprotektan özelliklerinin de olması, bu maddelerle dondurulan spermalardan daha iyi sonuçlar alınmasını sağlamaktadır (Aitken 1994, Alvarez ve Storey 1995, Bucak ve Tekin 2007, Bucak ve ark 2010, Agarwal 2014).

Köpek spermasının dondurulması Polge ve ark (1949)'nın gliserolün kriyoprotektan özelliğini ortaya çıkarmasıyla başlayan ve sonrasında birçok dondurma protokolünün geliştirildiği uzun bir dönemi içine almaktadır. Spermanın dondurulması işleminde oluşan ve geriye dönüşümsüz olarak hücrenin ölümüne neden olan fiziksel ve biyokimyasal değişimler, araştırmacıları optimum koşulları oluşturmaya yöneltmiştir. Irkın ıslahı ve genetik özelliklerin aktarılmasında önemli bir yeri olan spermanın dondurularak saklanmasında; sulandırıcının tipi, kriyoprotektan ilavesi ve oranı, ekilibrasyon ısısı ve süresi, dondurma hızı ve çözdürme işleminin önemli olduğu ifade edilmektedir (Stanescu ve Birtoiu 2012).

Sunulan tez çalışmasında ülkemizde en yaygın bulunan köpek ırkı olarak bilinen Kangal köpeği spermasında; kuersetinin 50-200 µM, ergotiyoninin 0,5-2 mM ve BME'nin % 2,5-10 oranlarında, % 5 oranında gliserol ve etilen glikol ilaveli tris temel sulandırıcıya eklenmesi sonrası sulandırma sonu motilite oranı, çözüm sonu spermatozoon motiliteleri, hareket özellikleri, floresan proplarla spermatozoon canlılığı, akrozom bütünlüğü, mitokondriyal aktivitesi ve COMET analiz yöntemi ile DNA bütünlüğü araştırıldı.

Köpek spermasının dondurulmasında sulandırıcıya katılan yumurta sarısı oranının % 10 ile % 20 oranında değiştiği belirtilmektedir (Silva ve ark 2002). Sunulan tez çalışmamızda da % 20 oranında yumurta sarısı içeren Tris temel sulandırıcısı kullanıldı.

Araştırmacılar köpek spermasının dondurulmasında sıklıkla kriyoprotektan olarak gliserolün farklı dozlarını denemişler ve optimum oranların % 4-11 arasında değiştiğini ifade etmişlerdir (Rota ve ark 1998, Pena ve Linde-Forsberg 2000).

Bunun yanında Stanescu ve Birtoiu (2012), köpek sperması sulandırıcısına eklenmesi gereken gliserol oranının % 5-8 arasında olduğunu belirtmişlerdir. Gliserolün yanı sıra köpek spermasının dondurulmasında sulandırıcıya kriyoprotektan olarak etilen glikolün % 5-20 arasında değişen oranlarda eklendiği belirtilmektedir (Kim ve ark 2012, Rota ve ark 2006, Rota ve ark 2010).

Sunulan tez çalışmamızda da temel sulandırıcıya % 5 oranında gliserol ve etilen glikol eklendi. Çalışmamızda % 5 oranında gliserol eklenerek oluşturulan 1. 2. ve 3. TG gruplarının çözüm sonu subjektif motilite değerleri sırasıyla % 50,7±1,7; 47,8±1,7; 47,8±4,06 olarak bulundu. Çalışmamızda ayrıca kriyoprotektan olarak % 5 oranında etilen glikol kullanıldı. Buna göre 1. 2. ve 3. TE gruplarının çözüm sonu subjektif motilite değerleri sırasıyla % 51,4±0.92; 51,4±0.92; 50,0±2.67 olarak tespit edildi.

Rota ve ark (2006), köpek spermasının dondurulmasında sulandırıcıya % 5 oranında gliserol ilave etmişler ve çözüm sonu motilite değerini % 31±5,6 olarak bulmuşlardır. Ayrıca Rota ve ark (2010), köpek spermasının dondurulmasını araştırdıkları diğer bir çalışmada da % 5 oranında gliserol eklenen grupta çözüm sonu motilite oranını % 51,6 olarak belirlemişlerdir. Sunulan çalışmamızda elde edilen sonuçlar Rota ve ark'nın ilk çalışmasından yüksek bulunmuş, diğer çalışması ile ise benzerlik göstermektedir.

Tosun ve Uysal (2007), Alman Çoban köpeği spermasında yapmış oldukları çalışmada sulandırıcıya % 6 oranında gliserol ekleyip dondurmuşlar ve çözüm sonu spermatozoon motilitesini % 55,8±10,8 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızdan yüksek elde edilen bu sonuç kullanılan gliserol oranından kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Daşkın ve ark (2003), yapmış oldukları çalışmada Kangal köpeği sperma sulandırıcısına % 8 oranında gliserol ilave etmişler ve çözüm sonu spermatozoon motilitesini % 59,16 olarak elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bu durum sperma sulandırıcısına ilave edilen kriyoprotektan oranından ve dondurma protokolünden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kim ve ark (2012), Beagle ırkı köpek spermasının dondurulabilirliğini araştırdıkları çalışmada % 5 gliserol, % 5 ve % 10 oranında etilen glikol ve kriyoprotektan eklemeden oluşturdukları grupların çözüm sonu motilite oranlarını sırasıyla % 62,5; % 49,38; % 5,13; % 12,5 olarak elde ettiklerini belirtmektedirler. Çalışmamız kıyasla sulandırıcıya ilave edilen %5 G ile elde edilen sonuçtan yüksek bulunurken, %5 E ilave edilen gruptan düşük olduğu değerlendirilmiştir. Oluşan farklılığın sulandırıcıya eklenen kriyoprotektanların etkinliklerinin hayvan ırklarına ve dondurma protokollerinden kaynaklanabileceği kanısına varılabilir.

Rota ve ark (1998), sulandırıcıya % 5 oranında gliserol ekleyerek dondurdukları köpek spermasının çözüm sonu motilitesini % 58 oranında olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızdan yüksek elde edilen bu sonucun ekilbrasyon ve dondurma/çözdürme farklılıklarında olabileceği düşünülebilir.

Filho ve ark (2011), köpek spermasının dondurulmasında kroyoprotektan olarak % 6 gliserol ve % 2, 4 ve 6 oranında dimetilformamid (DMF) ekleyerek çözüm sonu total ve progresif motilite değerlerini karşılaştırmışlar ve % 6 gliserol eklenen grupta değerleri % 58 ve % 14,3 olarak belirlenmiş ve diğer gruplara göre anlamlı ölçüde üstünlük sağladığı belirtilmiştir. Çalışmamızda kullanılan gliserolün dozunun Filho ve ark (2011)'nın kullandıkları dozdan düşük olmasından bu farklılığın kaynaklanabileceği sonucuna varılabilir.

Kuersetin polifenolik yapıda olup, spermanın kısa süreli saklanmasında ya da dondurulmasında ROS oluşumunun önüne geçerek antioksidatif aktivite göstermektedir (Johinke ve ark 2014). Kuersetin serbest radikallere karşı divalent katyonlar ile şelasyon oluşturarak lipoksi radikal oluşumunu baskılamaktadır (da Silva ve ark 1998).

Birinci deneyimizde kuersetin 50 ve 200 µM oranlarında temel sulandırıcıya eklenerek sulandırma sonu subjektif motilite ile çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine olan etkileri araştırıldı. Temel sulandırıcıya eklenen kuersetinin 50 ve 200 µM dozları, çözüm sonu subjektif motilite oranları bakımından istatiksel olarak önemli sonuçlar verdi. Elde edilen sonuçlar Zribi ve ark (2012)'nın insan spermasının dondurulmasında sulandırıcıya ekledikleri 50 µM kuersetinin çözüm sonu motilite sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Gibb ve ark (2013), cinsiyet tayini yapılmış aygır spermasını dondurmak amacıyla 0,15 mM oranında kuersetin ekledikleri sulandırıcı grubunda sunulan tez çalışması ile benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

Abdallah ve ark (2011), ratlarda kuersetinin spermatolojik parametrelerine olan etkinliğinin araştırıldığı çalışmada, sperma numunelerini 10, 100 ve 200 µM dozlarında oluşturulan kuersetin gruplarında 3 saat süre ile 32^{o}C'ta inkube etmişler ve en yüksek motilite oranını 200 µM kuersetin içeren gruptan elde ettiklerini belirtmişlerdir. Benzer bir sonuç da çalışmamızdaki TGK200 grubunda elde edilmiştir.

Johinkee ve ark (2014), tavşan spermasının kısa süreli saklanmasında kuersetin antioksidanının etkisini araştırdıkları çalışmalarında; 25, 50, 100 ve 200 µM oranlarında sulandırıcıya eklenen kuersetinin spermatozoa total motilitesi üzerine katkısı olmadığı kanısına varmışlardır. Bu sonuç, çalışmamızda kullanılan 50 ve 200 µM kuersetinin çözüm sonu motilite üzerine yapmış olduğu olumlu etki ile benzerlik göstermemesi, çalışmalarda kullanılan türlerin, saklama şartlarının farklılığına bağlanabilmektedir.

Khanduja ve ark (2001), insan sperma medyumuna 5, 10, 50, 100 ve 200 µM dozlarında ekledikleri kuersetin ile spermatozoonu 6 saat süre ile inkube ederek, yarım saatlik aralıklarla motilite oranlarını incelemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre kuersetin içeren sperma sulandırıcılarının kontrol grubunun gerisinde kalarak motiliteyi koruyamadığı belirlenmiştir. Bu çalışmada, sunulan tez çalışmamızdan oldukça farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu farklı sonuçlar, spermaların aerobik/anaerobik ortamda bulunmalarından ve farklı sulandırıcı tiplerinde saklanmasından kaynaklanabilir.

Moretti ve ark (2012), insan sperma yıkama medyumuna ekledikleri 20, 30, 50, 100, 200 ve 400 µM oranlarındaki kuersetinin motilite oranı bakımından kontrol grubuna göre üstünlük sağlayamadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar artan dozlarda kuersetinin ortamda gelişen LPO düzeyini de engellemediğini vurgulamışlardır. Bu sonuç çalışmamızda kullanılan 50 ve 200 µM oranında kuersetinin çözüm sonu sperma motilitesi üzerinde oluşturduğu etki ile benzerlik göstermemektedir. Bunun sebebinin köpek spermasının insan spermasına oranla daha dayanıklı bir yapıda olması veya Moretti ve ark (2012)'nın aldıkları sonuçların spermanın dondurmadan kısa süreli saklanması ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Zribi ve ark (2012) insan spermasının kuersetin içeren sulandırıcı ile dondurulması üzerine yaptıkları çalışma da elde ettikleri sonuçlar ile sunulan tez çalışması benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda kuersetin antioksidanı ile yapılan birinci deney grubunda çözüm sonu progresif motilite oranı TGK200 grubunda TE grubuna göre istatiksel olarak yüksek elde edildi. Silva ve ark (2012) ise en yüksek motilite değerini 20 µg/ml oranından elde etmişlerdir.

Johinkee ve ark (2014), tavşan spermasının kısa süreli saklandığı çalışmada sulandırıcıya ilave edilen 25, 50, 100 ve 200 µM dozlarındaki kuersetin gruplarında progresif motilite değerlendirmesinde, kuersetinin artan dozlarının kontrol grubuna göre üstünlük sağladığını belirtmektedir.

Sunulan tez çalışmasında kuersetinin çözüm sonu spermatozoa hareketlerinde kontrol grubuna göre rakamsal artış sağladığı fakat istatistiksel olarak üstünlük sağlamadığı görüldü. Bu sonuç Johinkee ve ark (2014)'nın tavşan spermasının kısa süreli saklandığı ve sulandırıcıya 25, 50, 100 ve 200 µM dozlarında ilave ettikleri kuersetin gruplarından elde ettikleri sonuçlar ile benzerlik gösterdi.

Kuersetin antioksidanının köpek spermasının dondurulması üzerine etkisinin araştırıldığı birinci deney grubunda çözüm sonu floresan mikroskop ile canlılık, akrozom bütünlüğü ve mitokondriyal aktivite oranları değerlendirilmiştir. İncelenen üç parametrede de TGK50, TGK200 grupları TE grubuna göre istatistiksel olarak üstünlük sağlamıştır. Johinkee ve ark (2014), tavşan spermasının kısa süreli saklanması ile ilgili yapmış oldukları araştırmada 100 µM dozundaki kuersetin grubunda en yüksek canlılık oranının elde edildiği belirtmektedirler. Bu sonuç,

çalışmamızda kullanılan TGK50, TGK200, TEK200 gruplarından elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

Zribi ve ark (2012), insan spermasının dondurulmasında sulandırıcıya ilave edilen 50 µM dozundaki kuersetinin canlılık oranının kontrol grubuna göre istatiksel olarak yüksek bulunduğunu ifade etmektedirler. Bu sonuç çalışmamızda kullanılan TGK50 grubunda elde edilen sonuç ile benzerlik göstermektedir.

Abdallah ve ark (2011), ratlarda kuersetinin sperm parametrelerine olan etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, 10, 100 ve 200 µM dozlarında oluşturulan gruplar ile spermayı 3 saat süre ile 32 ^{o}C'ta inkube etmişler ve en yüksek canlılık oranını 200 µM doz ilave edilen gruptan elde etmişlerdir. Bu sonuç çalışmamızda oluşturulan TGK200 grubu ile benzerlik göstermektedir.

Gibb ve ark (2013), aygır spermasının dondurulmasında sulandırıcıya 0,15 mM dozunda eklenen kuersetinin etkisini araştırdıkları çalışmalarında, kuersetin içeren sulandırıcı grubunun kontrol grubuna göre üstünlük sağlamadığını belirtmişlerdir. Bulgularımıza kıyasla, farklı sonuçların çıkması kullanılan antioksidanın dozuna, farklı hayvan türlerine, sulandırıcılara ve sulandırıcılar arasındaki pH değişikliğine bağlanabilir.

Moretti ve ark (2012), insan sperma yıkama medyumuna 20, 30, 50, 100 ve 200 µM dozlarında ekledikleri kuersetinin canlılık oranları bakımından kontrol grubuna göre etkinliklerinin olmadığı sonucuna varmışlardır.

Khanduja ve ark (2001), insan sperma sulandırıcısına eklenen 5, 10, 50, 100 ve 200 µM dozlarındaki kuersetinin spermanın kısa süreli saklanmasında canlılık üzerine etkilerini araştırmışlar ve kuersetinin herhangi bir etkinliğinin oluşmadığı sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda köpek spermasının çözüm sonu canlılık oranlarının TGK50, TGK200 ve TEK200 gruplarında TE grubuna göre istatistiksel olarak üstünlük sağladığı görüldü. Çalışmalar arasında farklı sonuçların çıkması farklı çalışma dizaynına, sulandırıcılardaki farklı içeriklere ve türlere bağlanabilir.

Sunulan tez çalışmasında kuersetin deney grubunda akrozom bütünlüğü bakımından TE grubuna göre en yüksek koruma istatistiksel olarak TGK200 ve TGK50 gruplarında elde edildi. Johinkee ve ark (2014), tavşan spermasının kısa

süreli saklanması ile ilgili yapmış oldukları araştırmada 100 µM dozundaki kuersetin grubunda kontrol grubuna göre en yüksek düzeyde akrozom bütünlüğü oranını elde etmişlerdir.

Gibb ve ark (2013), aygır spermasının dondurulmasında sulandırıcıya ilave ettikleri 0,15 mM dozundaki kuersetinin, sistin (0,2 mg/ml) ve katalaza (200 U/ml) göre çözüm sonu daha yüksek oranda akrozom bütünlüğü oranı verdiğini ifade etmektedirler. Çalışmamızda ise en yüksek akrozom bütünlüğü koruması TGK200 ve TGK50 gruplarından elde edildi.

Birinci deney grubunda Kangal köpek spermasının dondurulmasında sulandırıcıya 50 ve 200 µM dozlarında eklenen kuersetinin çözüm sonu en yüksek spermatozoa mitokondriyal aktivite üzerine olan etkinliği, TGK50 ve TGK200 gruplarından elde edildi.

Silva ve ark (2012), koç spermasının çözüm sonu mitokondriyal aktivitesini araştırdıkları çalışmada % 5 gliserollü temel sulandırıcıya 5, 10, 15 ve 20 µg/ml oranlarda kuersetin ekledikleri gruplarda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oranda mitokondriyal aktivite tespit etmişlerdir. Bu sonuçlardan farklı olarak, çalışmamızda ise gliserol ve yüksek dozda kuersetin içeren gruplarda en yüksek mitokondriyal aktivite bulundu. Farklı sonuçların elde edilmesine neden olarak kullanılan hayvan türü, dondurma protokolleri ve antioksidan maddelerin dozları gösterilebilir. Fenolik bir antioksidan olan kuersetinin etkinliği, kullanılan doz ve yarılanma ömrü ile doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle araştırmalarda optimum sonuçların alınabilmesi için antioksidan doz ayarlarının yapılması ve kullanımlarının hemen öncesinde sulandırıcıya katılması gerekmektedir (Sies 1993).

COMET analizinin hücre içi oksidatif stresi belirlemede oldukça etkin bir yöntem olduğu ve hücrelerde oluşan DNA kırılmalarının tespitinde kullanıldığı öngörülmektedir (Anderson ve ark 1994). Bu sayede hücre içinde katkı maddelerinin oksidan/antioksidan özelliklerinin ortaya konabildiği gibi, eklenen maddelerin hücre içi genetik materyale olan koruyucu etkinliği de saptanabilmektedir (Anderson ve Phillips 1999, Heaton ve ark 2002, Novotna ve ark 2007, Tuncer ve ark 2010).

Sunulan tez çalışmasında kuersetinin sperma dondurma esnasında DNA bütünlüğüne olan etkisi incelenmiş ve çözüm sonu DNA bütünlüğü değerlendirmesinde, TGK200 grubunun TE kontrol grubuna göre koruyucu etkinliği olduğu ortaya konulmuştur.

Johinkee ve ark (2014), tavşan spermasının kısa süreli saklandığı çalışmada sulandırıcıya ilave edilen 25, 50, 100 ve 200 µM dozlarındaki kuersetinin DNA bütünlüğü değerlendirmesinde, kuersetinin herhangi bir etkinlik sağlamadığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlara benzer şekilde çalışmamızın TGK50, TEK50 ve TEK200 gruplarından DNA bütünlüğü üzerinde herhangi bir koruyuculuk elde edilmemesine karşın, TGK200 grubu istatistiksel olarak üstünlük sağladı. Benzer sonuç Zribi ve ark (2012)'nın insan spermasının dondurulmasında yaptıkları çalışmadan da elde edilmiştir.

Gibb ve ark (2013), aygır spermasının dondurulmasını araştırdıkları çalışmalarında sulandırıcıya ilave ettikleri 0,15 mM dozundaki kuersetinin, sistin (0,2 mg/ml) ve katalaza (200 U/ml) göre daha yüksek oranda çözüm sonu DNA bütünlüğü sağladığını ifade etmektedirler. Çalışmamızda ise istatistiksel olarak sadece TGK200 grubu çözüm sonu DNA bütünlüğüne karşı koruyucu etkinlik gösterdi.

Ergotiyonin tiyol ve tiyon formunda bulunan flavonoid kökenli antioksidan özellikte olan bir maddedir (Cheah ve Halliwell 2012). Ergotiyoninin, katyon şelasyonunda, gen ekspresyonunda ve immun sistemin düzenlenmesinde rolü olduğu ortaya konulmuştur (Rahman ve ark 2003, Laurenza ve ark 2008). Bu etkilerin yanı sıra antioksidan ve kriyoprotektan özelliğinin de bulunduğu araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Akanmu ve ark 1991, Aruoma ve ark 1999, Mitsuyama ve ark 1999).

Sunulan tez çalışmasının ikinci deney grubunda ergotiyoninin 0,5 ve 2 mM dozları sulandırıcıya ilave edilip, Kangal köpeği spermasının dondurulabilirliğine olan etkisi araştırıldı.

Çalışmamız sonucunda çözüm sonu subjektif spermatozoon motilitesi üzerinde ergotiyoninin önemli bir katkı sağlamadığı görüldü. Çoyan ve ark (2011)

ise çözüm sonu koç spermatozoon subjektif motilitesinde 2 ve 4 mM ergotiyoninin önemli oranda koruma yaptığını saptamışlardır. Çalışmalar arasındaki farklı sonuçların çıkmasına kullanılan hayvan türlerinin, sulandırıcı tiplerinin ve türler arası dondurma-çözdürme işlemlerine olan duyarlılıklarının farklılığı neden olabilir.

Yıldız ve ark (2015), yağsız süt tozu sulandırıcısına 5 ve 10 mM ergotiyonini ilave ettikleri çalışmalarında çözüm sonu koç spermatozoon motilitesi üzerinde ergotiyoninin bir etkisinin olmadığı sonucuna varmışlardır. Bu sonuç ise çalışmamız ile benzerlik göstermektedir.

Sunulan tez çalışmasında çözüm sonu CASA motilite oranlarında ergotiyonin ilave edilen gruplar ile kontrol grupları arasında istatistiksel fark bulunmadı.

Najafi ve ark (2014), koç spermasının dondurulması üzerinde ergotiyoninin artan dozlarını denemişler ve en yüksek çözüm sonu CASA motilitesini 6 mM ergotiyonin içeren gruptan elde etmişlerdir. Çalışmamızda CASA motilitesi bakımından ergotiyonin içeren sulandırıcı grupları ile antioksidan içermeyen gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır. Bu durum kullanılan hayvan türü ve antioksidan konsantrasyonu gibi nedenlere bağlanabilir.

Sulandırıcıya eklenen ergotiyoninin Kangal köpeği spermasının çözüm sonu progresif motilitesi üzerine etkisinin araştırıldığı ikinci deney grubumuzda TGE2 grubu istatistiksel olarak TG ve TE gruplarına göre üstünlük sağladı. Benzer sonuç Çoyan ve ark (2011)'nın ergotiyonin ilave ederek dondurdukları koç spermasının çözüm sonu değerlendirilmelerinden de elde edilmiştir.

Najafi ve ark (2014), koç spermasının dondurulması üzerinde ergotiyoninin artan dozlarını denemişler ve ergotiyonin ilavesinin çözüm sonu koç spermatozoonu progresif motilitesi üzerine bir etkinliğinin olmadığı sonucuna varmışlardır.

Coutinho da Silva ve ark (2008), aygır spermasının dondurulmasında sulandırıcıya 0,7, 2, 6 ve 18 mM oranlarında ergotiyonin ilave ederek çözüm sonu CASA motilite oranlarını değerlendirmişler ve gruplar arası istatistiksel bir fark oluşmadığını belirtmişlerdir.

Ergotiyoninin 0,5 ve 2 mM dozlarının çözüm sonu spermatozoon hareketleri üzerine olan etkilerinin değerlendirildiğinde, ergotiyonin içeren sulandırıcı gruplarının, TG ve TE gruplarına göre istatiksel olarak üstünlük sağlamadığı sonucuna ulaşıldı.

Çoyan ve ark (2011), ergotiyoninin çözüm sonu koç spermatozoon hareketlerinden VAP (µm/s), VSL (µm/s), VCL (µm/s) ve ALH (µm) seviyelerinde kontrol grubuna göre üstünlük sağladığını ifade etmişlerdir. Çalışmalar arasında farklı sonuçların elde edilmesi sulandırıcı tipindeki, hayvan türündeki ve dondurma tekniklerindeki farklılıklara bağlanabilmektedir.

Najafi ve ark (2014), koç spermasının dondurulması üzerinde ergotiyoninin artan dozlarını denemişler ve ergotiyonin ilavesinin çözüm sonu koç spermatozoon hareketleri üzerine bir etkinliğinin olmadığı sonucuna varmışlardır. Elde edilen sonuç çalışmamız ile benzerlik göstermektedir.

Spermanın dondurulması amacıyla yapılan sulandırma, ekilibrasyon ve dondurma işlemleri sürecinde spermatozoon yapısal ve fonksiyonel değişimlere uğrayarak, canlılık oranında azalmalar gözlenmektedir. Bu süreçte ortama ilave edilen antioksidanlar ile kriyoprotektif bir etki oluşturularak canlılık oranının korunması hedeflenmektedir.

İkinci deney grubumuzda % 5 gliserol ve 2 mM ergotiyonin içeren sulandırıcı grubu çözüm sonu spermatozoa canlılık oranı bakımından diğer gruplara göre daha yüksek sonuç verdi. Buna karşın koçlarda yapılan bir çalışmada sulandırıcıya ergotiyonin ilavesinin çözüm sonu canlılık oranlarını koruyamadığı bildirilmiştir (Çoyan ve ark 2011).

Yıldız ve ark (2015), koç sperması üzerine ergotiyoninin etkinliğini araştırdıkları çalışmasında çözüm sonu canlılık oranları üzerinde etkinliğinin olmadığını ortaya koymuşlardır. Bu durum kullanılan hayvan türlerinin ve dondurma işleminin farklı olması gibi nedenlere bağlanabilir.

Çalışmamız sonucunda köpek spermatozoonunun akrozom bütünlüğü üzerine ergotiyonin içeren TGE2 ve TGE0.5 gruplarının, TG ve TE gruplarına göre; TEE2

grubunun ise TE grubuna göre üstünlük sağladığı görüldü. Mitokondriyal aktivite bakımından ise ergotiyoninin etkinliği önemsiz bulundu.

Çoyan ve ark (2011), koç spermasının dondurulmasında sulandırıcıya ilave ettikleri 1, 2 ve 4 mM dozlarındaki ergotiyoninin akrozom bütünlüğü ve mitokondriyal aktivite oranı bakımından kontrol grubuna göre üstünlük sağlamadığını ifade etmektedirler. Çalışmalar arasında görülen farklılığın hayvan türü, antioksidan dozu, ekilibrasyon süresi ve dondurma protokollerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çoyan ve ark (2011), koç spermasının dondurulmasında sulandırıcıya ilave edilen 1, 2 ve 4 mM dozlarında ergotiyoninin DNA bütünlüğünü koruduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın çalışmamız sonuçlarına göre ergotiyoninin DNA bütünlüğünü koruyamadığı saptandı.

Amino asitlerin spermanın dondurulması sırasında spermatozoon hücre duvarını sararak soğuk şokuna karşı koruyucu etki gösterdiği araştırmacılar tarafından ifade edilmektedir (Pena ve ark 1998, Martins-Besa ve ark 2007, Uysal ve Bucak 2007, Bucak ve ark 2007, 2008,2009, Ali Al Ahmed ve ark 2008, Ateşşahin ve ark 2008).

Çalışmamız sonuçlarına göre sulandırıcıya ilave edilen % 2,5 ve % 10 oranlarındaki BME amino asit maddesinin sulandırma sonrası spermatozoon subjektif motilitesi, çözüm sonu subjektif ve CASA motilitesi bakımından kontrol gruplarına göre üstünlük sağlayamadığı belirlendi. Çözüm sonu progresif motilite oranlarında ise TGB10 grubu TE'e göre istatistiksel olarak üstünlük sağladı.

Bucak ve ark (2009), koç spermasının dondurulmasında % 13 ve % 26 oranlarında ekledikleri BME'nin çözüm sonu spermatozoon motilitesini korumadığını belirtmişlerdir. Bu durum çalışmamız sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Farshad ve Hosseini (2013), teke spermasının dondurulmasında BME esansiyel amino asitinin etkinliğini araştırmışlar, %10 oranında sulandırıcıya katılan BME'nin çözüm sonu spermatozoon subjektif, CASA ve progresif motilitelerini iyileştirdiğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlara benzer şekilde, çalışmamızdan elde edilen

sonuçlara göre %10 oranındaki BME çözüm sonu progresif motilite bakımından TE grubuna göre önemli oranda koruma sağladı.

Taşdemir ve ark (2014), boğa spermasının dondurulmasında sulandırıcıya % 13 oranında ekledikleri BME'nin çözüm sonu subjektif, CASA ve progresif motilite oranlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak üstünlük sağlamadığını belirtmektedirler. Bu sonuç çalışmamızdan elde edilen subjektif ve CASA motilite değerleri ile benzerlik gösterirken, progresif motiliteden ise düşük bulunmuştur. Sonuçlar arasındaki farklılığın nedeni olarak hayvan türü, katkı maddesinin dozu ve sulandırıcı tipi gösterilebilir.

Sunulan tez çalışmasında, BME içeren sulandırıcı grupları spermatozoon hareket özellikleri üzerinde önemli iyileştirmeler oluşturmadı. Benzer sonuçlar Taşdemir ve ark (2014)'nın boğalarda yaptıkları çalışmadan da elde edilmiştir.

Çözüm sonu canlılık oranının araştırıldığı üçüncü deney grubunda gruplar arası istatistiksel bir farklılık gözlenmedi. Spermatozoa akrozom bütünlüğü ve mitokondriyal aktivite oranı bakımından ise TGB2.5 grubu, TG kontrol grubuna göre önemli oranda üstünlük gösterdi. Ayrıca TGB2.5, TGB10 ve TEB10 gruplarında çözüm sonu mitokondriyal aktivite oranları TE grubuna göre daha yüksek koruma sağladı.

Farshad ve Hosseini (2013), teke spermasının dondurulmasında BME esansiyel amino asitinin etkinliğini araştırmışlar, çözüm sonu canlılık oranı bakımından % 10 BME grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek sonuçlara ulaşmışlardır. Akrozom bütünlüğü değerlendirmesinde de % 10 BME'nin kontrol grubuna göre daha yüksek oranda koruma sağladığı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir.

Çalışmamızda BME gruplarından elde edilen çözüm sonu spermatozoa canlılığı Farshad ve Hosseini (2013)'nin elde ettikleri sonuçlardan düşük bulunurken akrozom bütünlüğü oranı TGB2.5 grubu ile benzerlik göstermektedir.

BME amino asitinin spermanın dondurma-çözdürme sonrası DNA bütünlüğü üzerine etkisinin incelendiği COMET analizi sonrası gruplar arası istatistiksel farklılıklar gözlenmedi.

Literatür taramalarında BME amino asitinin spermatozoon DNA bütünlüğü üzerine etkisinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle ilave başka çalışmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır.

İleriye doğru başı doğrultusunda düzgün doğrusal hareket eden spermatozoonların, hareket eden ve hareket etmeyen spermatozoonlara oranı motilite yüzdesi olarak tanımlanmaktadır. Spermatozoonun motil hareket yeteneği, kuyruklarının yaptığı kamçı hareketlerine ve frekansına bağlıdır (Çoyan ve ark 2002). Motiliteyi sağlayan önemli bir faktör de cAMP konsantrasyonunun seviyesidir. cAMP'nin ortamda yüksek oranda bulunması, protein kinaz aktivasyonunu artırmakta ve aksonem proteininin fosforolizasyonuna bağlı olarak spermatozoon motilitesinde artışa ve hiperaktivasyona neden olmaktadır. Spermatozoonda mitokondriyal kılıf tarafından sarılan aksonem ve fibrilar yapılar spermatozoon motilitesi için gerekli ATP üretiminden sorumludur (Garner ve Hafez 1993). Kullanılan katkı maddelerinin spermanın dondurulması sırasında spermatozoonun fonksiyonel yapılarına karşı koruyucu etki yaptığı düşünülmektedir. Sunulan tez çalışmasında elde edilen veriler ışığında birinci deney grubumuzda bulunan TGK200, ikinci deney grubumuzda TGE2 ve üçüncü deney grubumuzda da TGB10 grubunda çözüm sonu motilite oranları TG ve TE gruplarına göre yüksek bulundu.

Spermanın sulandırılması ve dondurulması sürecinde ortamın ısısı, iyonik yapısı ve kompozisyon değişimleri motilite parametrelerinde değişikliklere neden olmaktadır (Rijsselaere ve ark 2003). Sunulan tez çalışmamızda da CASA analiz sistemi ile spermatozoonun izlediği yol boyunca ortalama hızı, düz bir hat boyunca izlediği yolun başlangıcından sonuna kadar olan ortalama hızı, spermatozoonun dairesel hareketinin ortalama hızı ve kat ettiği toplam yol süresince ortalama hızı bakımından 3 deney grubunda kullanılan katkı maddelerinin etkisi araştırıldı. Buna göre 3 farklı deney grubunda kullanılan katkı maddelerinin spermatozoon hareketleri bakımından antioksidan içermeyen gruplara göre üstünlük sağlamadığı tespit edildi.

Dondurma ve çözdürme işlemlerinde spermatozoonun lipit ve termodinamik yapısında gözlenen değişimler spermatozoonun canlılığında rol oynayan ATPaz enziminin etkinliğini ortadan kaldırarak spermatozoa canlılığına direk olarak etkileyebilmektedir (Wartson 2000). Sulandırıcıya eklenen katkı maddelerinin bu

etkiyi minimize ettiği bildirilmektedir (Donnelly ve ark 2000). Çalışmamızda 3 farklı deney grubunda kullanılan kuersetin ve ergotiyoninin köpek spermasının dondurulmasında çözüm sonu canlılık oranını kontrol gruplarına göre iyileştirirken, BME ilave edilen grupların kontrol gruplarına göre üstünlük sağlamadığı sonucuna varıldı.

Akrozom yapısında bulunan enzimlerin spermatozoonun zona pellusidaya penetrasyonunda görevli olduğu ve akrozom bütünlüğü oranının fertilite oranı ile korelasyonunun olduğu belirtilmektedir (Garner ve Hafez 1993). Bu açıdan çalışmamızdaki deney gruplarında bulunan katkı maddelerinin Kangal köpeği spermasının çözüm sonu akrozom bütünlüğü üzerine etkisi incelendiğinde; TGK50, TGK200, TGE0.5, TGE2, TEE2 ve TGB2.5 gruplarının TE ve TG kontrol gruplarına göre üstünlük sağladığı belirlendi.

Spermatozoon gövde kısmında bulunan mitokondri, kuyruk kısmının hareketini yaptıran filamanlara enerji sağlayarak spermatozoonun dişi genital kanalda ilerlemesini ve zona pellusidaya penetrasyonuna yardımcı olmaktadır (O'Connell ve ark 2002). Spermanın dondurulma/çözdürülme işlemleri sonucunda mitokondriyal aktivitenin değişimi, fonksiyonel yapıda oluşan hasar hakkında bilgi verebilmektedir (Garner ve ark 1997). Yapılan çalışmalar spermatozoondaki mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasının, motilite ve fertilitede düşüşlere yol açtığını bildirmektedir (O'Connell ve ark 2002, Huang ve ark 2004). Çalışmamızda TGK50, TGK200, TGB2.5, TGB10 ve TEB10 gruplarında spermanın dondurma-çözdürme sonrası mitokondriyal aktivitesi, TE kontrol grubuna göre yüksek bulundu.

Spermatozoon DNA bütünlüğünün fonksiyonel spermatozoon parametreleriyle korelasyonunun olduğu belirtilmektedir (Twigg ve ark 1998, Rajesh ve ark 2002). Bu amaçla sunulan tez çalışmamızda sulandırıcıya eklenen katkı maddelerinin çözüm sonu DNA bütünlüğü üzerine, birinci deney grubunda bulunan TGK200'ün TE grubuna göre önemli oranda koruyucu etki sağladığı görüldü.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Köpek spermasının dondurulmasında spermanın çözüm sonu parametrelerini iyileştirmek için sulandırıcılarda değişik antioksidan maddeler kullanılmaktadır. Genel olarak olumlu etkileri olmakla birlikte, farklı hayvan türlerinde kullanılmış olan antioksidanların etkinliği uygulanan hayvan türüne, sulandırıcı tipine, spermatozoanın saklanma biçim/süresine, katkı madde dozuna ve dondurma protokollerine göre farklılık göstermektedir.

Ayrıca köpek spermasının dondurulmasında kullanılan kriyoprotektan madde farklılığının çözüm sonu spermatolojik parametrelere önemli ölçüde katkı sağladığı görülmektedir. Sunulan çalışmada sulandırıcıya eklenen gliserolün etilen glikole oranla daha başarılı bir kriyoprotektif etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Spermatozoonda mitokondriyal 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 kuersetinin, ergotiyonin ve BME'ye göre spermatozoa membran yapılarını koruyarak dondurma-çözdürme sonrası motiliteyi daha yüksek oranda iyileştirdiği sonucuna ulaşılabilir.

Sunulan tez çalışmasından elde edilen verilere göre, ülkemiz açısından önemli bir köpek ırkı olan Kangal köpeğinin uzun yıllar boyu genetik özelliklerinden sapmadan korunabilmesi için üstün özellikleri bulunan köpek spermalarının optimum tohumlama dozlarında dondurularak saklanabileceği ve böylelikle Kangal köpeği ırkının korunabileceği düşünülmektedir.

Söz konusu antioksidanların köpek spermasının spermatolojik parametreleri üzerine etkilerine dair yeterli çalışma bulunmadığı için ilave çalışmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca yapılacak araştırmalarda spermatolojik parametrelerin in vitro/vivo fertiliteyle de desteklenmesi gerekmektedir.

6.KAYNAKLAR

Abdallah BF, Zribi N, Ammar-Keskes L, 2011. Antioxidative potential of quercetin against hydrogen peroxide induced oxidative stress in spermatozoa in vitro. Andrologia, 43, 261-65.

Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, Peng J, Vazquez-Levin M, 2014. Proteomics, oxidative stress and male infertility. Reproductive BioMedicine Online, 29, 32– 58.

Agarwal A, Makker K, Sharma R, 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor ınfertility: An update. American Journal of Reproductive Immunology, 59, 2-11

Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM, 2005. Prevention of oxidative stress injury to sperm. J Androl, 26, 654-60.

Aherne SA, O'Brien NM, 2000. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadioneinduced DNA single strand breaks in CACO-2 cells. Free Radical Biology & Medicine, 29(6), 507–14.

Aitken RJ, 1994. Pathophysiology of human spermatozoa. Curr Opin Obstet Gynecol, 6, 128-35.

Aitken RJ, Buckingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HW, Irvine DS, 1995. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. Hum Reprod, 10, 2061–71.

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

Akanmu D, Cecchini R, Aruoma OI, Halliwell B, 1991. The antioxidant action of ergothioneine. Arch Biochem Biophys, 288, 10–16.

Akçay E, 2000. Kangal Çoban köpeklerinde androlojik muayeneler ve spermanın dondurulması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Akçay E, Tekin N, 2002. Köpek spermasının dondurulması üzerine bireysel özelliklerin ve farklı sulandırıcıların etkisi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 49, 207-12.

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

Ali Al Ahmad Al, Chatagnon G, Amirat-Briand L, Moussa M, Tain-turier D, Anton M, Fieni M, 2008. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. Reproduction in Domestic Animals, 43, 429–36.

Alvarez JG, Storey BT, 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. Mol Reprod Dev, 42, 334–346.

Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM, 2000. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. Equine Vet J, 32(6), 541-5.

Amini MR, Kohram H, Zare-Shahaneh A, Zhandi M, Sharideh H, Nabi MM, 2015. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. Cryobiology, 0011-2240.

An TZ, Iwakiri M, Edashige K, Takashi M, 2000. Factors affecting the survival of frozen mouse spermatozoa. Cryobiology, 40, 237-249.

Anderson D, Phillips BJ, 1999. Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. Food Chem Toxicol, 37, 1015–25.

Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P, 1994. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. Mutat Res, 307, 261–71.

Antmen ŞE, 2005. Beta talasemide oksidatif stres. Yüksek Lisans Tezi T.C. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı.

Aruoma OI, Spencer JP, Mahmood N, 1999. Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine. Food Chem Toxicol, 37, 1043–53.

Aruoma OI, Whiteman M, England TG, Halliwell B, 1997. Antioxidant action of ergothioneine: assessment of its ability to scavenge peroxynitrite. Biochem Biophys Res Commun, 231, 389–91.

Ateşşahin A, Bucak MN, Tuncer PB, Kizil M, 2008. Effect of antioxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze–thawing process. Small Ruminant Resarch, 77, 38–44.

Aydilek N, Aksakal M. 2003. Testosteronun tavşanlarda karaciğer antioksidan sistemi üzerine etkisi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Derg, 14 (2), 22-25.

Ball BA, Vo A, 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. J Androl, 22, 1061-69.

Bansal AK, Bilaspuri GS, 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Veterinary Medicine International, 1, 1-7.

Baskin SI, Salem H, 1997. Oxidants, antioxidants and free radicals. Washington DC: Taylor and Francis, 1-16.

Beconi MT, Affranchino MA, Schang LM, Beorlegui NB, 1991. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. Biochemistry International, 23(3), 545-53.

Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois M, Barriere P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D, 2012. The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with tris egg yolk and Equex STAMP extenders in the cryopreservation of canine sperm. Res Vet Sci, 93, 440-47.

Benoff S, 1993. Preliminaries to fertilization. The role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. Hum Reprod, 8(12), 2001-6.

Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA, 2001. Thiols prevent H_2O_2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology, 56, 275-86.

Bucak MN, Ateşşahin A, Varışlı O, Yüce A, Tekin N, Akcay A, 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyailuronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. Theriogenology, 67, 1060–67.

Bucak MN, Ateşşahin A, Yüce A, 2008. Effect of anti-oxidants andoxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. Small Ruminant Research, 75, 128–34.

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

Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Ulutaş PA, 2009. Comparison of the effects of glutamine and amino acid solution on post-thawed ram sperm parameter, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. Small Ruminant Research, 81, 13–17.

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

Cabrita E, Anel L, Herraez MP, 2001. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. Theriogenology, 56, 623–35.

Camara DR, Mello-Pinto MMC, Pinto LC, Brasil OO, Nunes JF, Guerra MMP, 2011. Effects of reduced glutathione and catalase on the kinematics and membrane functionality of sperm during liquid storage of ram semen. Small Ruminant Research, 100, 44–9.

Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa DC, Silva LDM, 2003. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. Theriogenology, 59, 743-51.

Cavalcanti MCO, Moura CS, Guerra MMP, Silva SV, 2002. Acção crioprotectora do glicerol e etileno glicol no congelamento do semen de cão (Cryoprotector action of the glycerol and ethylene glycol in the freezing of the dog semen) Revista Brasilaira de Reproduo Animal, 26, 174–76.

Cemeli E, Baumgartner A and Anderson D, 2009. Antioxidants and the Comet assay. Mutat Res 681, 51–67.

Cheah IK, Halliwell B, 2012. Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. Biochimica et Biophysica Acta, 1822, 784–93.

Cochran JD, Amann RP, Froman DP, Pickett BW, 1984. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. Theriogenology, 22(1), 25-38.

Coutinho da Silva MA, Ferreira HN, Johnson AEM, 2008. Effects of tempol and L-ergothioneine on motility parameters of cryopreserved stallion sperm. Anim Reprod Sci, 107(3), 317-18.

Cristanelli MJ, Amann RP, Squires EL, Pickett BW, 1985. Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. Theriogenology, 24(6), 681-6.

Cupps PT, 1991. Reproduction in the dog and cat. Reproduction in Domestic Animal, 544-46.

Cuvelier ME, Richard H, Berset C, 1992. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols structure-activity relationship. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 56(2), 324-25.

Çaylak E, 2011. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. Tıp Araştırmaları Dergisi, 9(1), 73-83.

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

Çoyan K, Atman MB, Özkalp B, Tepeli C, 2009. Effect of sildenafil (Viagra®) on penile erection and semen volume and characteristics in Kangal Dogs. Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 15(6), 855-58.

Çoyan K, Başpınar N, Bucak MN, Akalın PP, 2011. Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. Cryobiology, 63, 1–6.

Dahlbom M, Andersson M, Vierula M, Alanko M, 1997. Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: work in progress. Theriogenology, 48, 687-98.

da Silva EL, Piskula MK, Yamamoto N, Moon JH, Terao J, 1998. Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidationin rat plasma. FEBS Lett, 430, 405–08.

Daşkın A, Tekin N, Akçay E, 2003. Köpeklerde transservikal-intrauterin ve intravaginal tohumlama yöntemlerinin dölverimine etkisi. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 27, 235-39.

de Lamirande E, Gagnon C, 1993. Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. Fertil and Streril, 59, 1291-95.

De Jarnette JM, Barnes DA, Marshall CE, 2000. Effects of pre- and post-thaw thermal insults on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. Theriogenology, 53, 1225-38.

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

Dott HM, Foster GC,1979. The estimation of sperm motility in semen on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. J Reprod Fertil, 55, 161–66.

El-Alamy MA, Foote RH, 2001. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. Anim Reprod Sci, 65, 245–54.

England GCW, Allen WE, Middleton DC, 1990. An investigation into the origin of the first fracion of canine ejaculate. Res Vet Sci, 49(1), 66-70.

England GCW, 1993. Cryopreservation of dog semen. J Reprod Fert Suppl, 47, 243-55.

Eilts BE, 2005. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. Theriogenology, 65, 685-91.

Farshad A, Hosseini Y, 2013. The cryoprotective effects of amino acids supplementation on cooled and post-thaw Markhoz bucks semen quality. Small Ruminant Research,114, 258–63.

Filho ACM, Teles CHA, Juca RP, Cardoso JFS, Uchoa DC, Campello CC, Silva AR, Silva LDM, 2011. Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. Theriogenology, 76, 1367–72.

Flora SJ, 2007. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. Cell Mol Biol, 53, 1-2.

Foote RH, 2003. Fertility estimation: A review of past experience and future prospects. Anim Reprod Sci, 75, 119-39.

Formica JV, Regelson W, 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food Chem Toxicol, 33(12), 1061-80.

Franzoni F, Colognato R, Galetta F, Laurenza I, Barsotti M, Di Stefano R, Bocchetti R, Regoli F, Carpi A, Balbarini A, Migliore L, Santoro G, 2006. An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. Biomed Pharmacother, 60, 453–57.

Fraser L, Strzezek J, 2005. Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. Reproduction in Domestic Animals, 40, 530-36.

Freshman JL DVM, Dacvim MS, 2002. Semen collection and evaluation. Clin Tech Small Anim Pract, 17, (3), 104-07.

Froman DP, Amann RP, Riek PM, Olar TT, 1984. Acrosine activity of canine spermatozoa as an index of cellular damage. J Reprod Fertil, 70, 301-08.

Funahashi H, Sano T, 2005. Select antioxidants improve the function of extender boar semen at 10°C. Theriogenology, 63, 1605-16.

Garewal HS, 1997. Antioxidants and disease prevention. Florida: CRC Press LLC, 3-19.

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

Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, De Jarnette JM, Marshall CE, 1997. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. Biol Reprod, 57, 1401–06.

Gibb Z, Butler TJ, Morris LHA, Maxwell WMC, Grupen CG, 2013. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. Theriogenology, 1–9.

Goericke-Pesch S, Klaus D, Failing K, Wehrend A, 2012. Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. Anim Reprod Sci, 135, 97-105.

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

Günzel AR, 1986. Semen collection, evaluation and artificial insemination in the dog. Tierarztliche Praxis, 14(2), 275-82.

Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP, 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive? J Androl, 11, 73–88.

Hammerstedt RH, Graham JK, 1992. Cryopreservation of poutry sperm: The enigma of glycerol. Cryobiology, 29, 26-38.

Harrop AE, 1962. Artificial insemination in the dog. Ed.:Maule, J.P., The Semen of Animals and Artificial İnsemination, 17, 304-15, Common-wealth Agricultural Bureaux, England.

Heaton PR, Reed CF, Mann SJ, Ransley R, Stevenson J, Charlton CJ, Smith BH, Harper EJ, Rawlings JM, 2002. Role of dietary antioxidants to protect against DNA damage in adult dogs. J Nutr, 132, 1720–24.

Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal A, 1999. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. J Urol, 161, 1831-4.

Hendrikse J, Antonisse HW, 1984. Evaluation of canine semen. Tijdschr Diergeneeskd, 109(5), 171-74.

Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg HR, Schill WB, Kruger TF, 2005. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. Fertil Steril, 83, 635–42.

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

Huang HF, Li MT, Wang S, Barton B, Anesetti R, Jetko JA, 2004. Effects of exogenous testosterone on testicular function during the chronic phase of spinal cord injury, dose effects on spermatogenesis, sertoli cell and sperm function. J Spinal Cord Med, 27, 55–62.

Hwang K, Lamb DJ, 2012. Molecular mechanisms of male infertility. In: Parekattil, SJ, Agarwal A, (Eds.), Male Infertility. Springer, New York.

Iguer-Ouada M, Verstegen JP, 2001. Evaluation of the Hamilton Thorn computer-based automated system for dog semen analysis. Theriogenology, 55, 733–49.

Johinkee D, de Graaf SP, Bathgate R, 2014. Quercetin reduces the in vitro production of H_2O_2 during chilled storage of rabbit spermatozoa. Anim Reprod Sci, 151, 208–19.

Johnstone SD, 1991. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. Small Animal Practice, 21(3), 545-51.

Karp G, 2005. Cell and molecular cell biology: concepts and experiments fourth edition, 223.

Kato Y, Kubo Y, Iwata D, Kato S, Sudo T, Sugiura T, Kagaya T, Wakayama T, Hirayama A, Sugimoto M, Sugihara K, Kaneko S, Soga T, Asano M, Tomita M, Matsui T, Wada M, Tsuji A, 2010. Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1. Pharm Res, 27, 832–40.

Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E, 2009. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. International Journal of Urology, 16, 449–57.

Khanduja KL, Verma A, Bhardwaj A, 2001. Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. Andrologia, 33, 277–81.

Kim S, Lee Y, Yang H, Kim Y, 2012. Rapid freezing without cooling equilibration in canine sperm. Anim Reprod Sci, 130, 111-18.

Kim JG, Parthasarathy S, 1998. Oxidation and the spermatozoa. Semin Reprod Endocrinol, 16 (4), 235-9.

Kmenta I, Strohmayer C, Müller-Schlöser F, Schafer-Somi S, 2011. Effects of lechitin and catalase contaning semen extender and a second dilution with different buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa. Theriogenology, 75, 1095-03.

Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C, 1996. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. J Androl, 17, 151-57.

Kotwicka M, Jendraszak M, Warchol JB, 2002. Plasma membrane translocation of phosphatidylserine in human spermatozoa. Folia Histochem Cytobiol, 40, 111–12.

Laurenza I, Colognato R, Migliore L, Del Prato S, Benzi L, 2008. Modulation of palmitic acid-induced cell death by ergothioneine: evidence of an anti-inflammatory action. Biofactors, 33, 237–47.

Lee SH, Rossky PJ, (1994). A comparison of the structure and dynamics of liquid water at hydrophobic and hydrophilic surfaces-a molecular dynamics simulation study. The Journal of Chemical Physics, 4, 3334.

Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Dondero F, 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. Hum Reprod Update, 2(3), 246-56.

Linde-Forsberg C, 1991. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. Small Animal Practice, 21(3), 467-85.

Liu CY, Lee CF, Hong CH, Wei YH, 2004. Mitochondrial DNA mutation and depletion increase the susceptibility of human cells to apoptosis. Ann NY Acad Sci 1011, 133–45.

Liu Z, Foote RH, Brockett CC, 1998. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. Cryobiology, 37, 219–30.

Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP, 1997. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. Free Radic Biol Med, 22, 885-88.

Malo AF, Gomendıo M, Garde J, Lang-Lenton B, Soler AJ, Roldan ERS, 2006. Sperm design and sperm function. Biology Letters, 2, 246-49.

Martins-Besa A, Rocha A, Maenco-Aguirre A, 2007. Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. Theriogenology, 68, 1088-96.

Mayenco-Aguirre AM, Pérez-Cortés AB, 1998. Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. Theriogenology 50, 195–204.

Mazur P, Leibo SP, Chu EHY, 1972. Two-Factor hypothesis of freezing injury evidence from chinese hamster tissue-culture cells. Experimantal Cell Resarch, 71, 345-55.

McCord JM, Edeas MA, 2005. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. Biomed Pharmacother, 59(4), 139-42.

Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL, 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology, 57, 327–44.

Meier B, Cross AR, Hanckock JT, Kaup FJ, Jones OTG, 1991. Identification of superoxide-generating system in human fibroblasts. Biochem J, 275, 241-45.

Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratis P, Ververidis HN, Boscos CM, 2009. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Anim Rep Sci, 112, 119-35.

Mitsuyama H, May JM, 1999. Uptake and antioxidant effects of ergothioneine in human erythrocytes. Clin Sci, 97, 407–11.

Mogas MT, Rivera del Álamo M, Rodríguez-Gil JE, 2011. Roles of Na^+/K^+-dependent ATPase, Na^+/H^+ antiporter and glut hexose transporters in the cryosurvival of dog spermatozoa: Effects on viability, acrosome state and motile sperm subpopulation structure. Theriogenology, 75, 1669–81.

Molinia FC, Evans G, Casares PI, Maxwell WMC, 1994. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. Anim Reprod Sci, 36, 113–22.

Moretti E, Mazzi L, Terzuoli G, Bonechi C, Iacoponi F, Martini S, Rossi C, Collodel G, 2012. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. Reprod Toxicol, 34, 651– 57.

Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR, 2001. A silver staining method for single-cell gel assay. J Histochem Cytochem, 49(9), 1183-86.

Najafi A, Daghigh Kia H, Mohammadi H, Najafi MH, Zanganeh Z, Sharafi M, Martinez-Pastor F, Adeldust H, 2014. Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. Cryobiology, 69, 68–73.

Neagu VR, Garcia Macias B, Sandoval Salazar C, Rodriguez Morillo A, Ferrusola Ortega C, Fernandez Gonzalez L, Tapia JA, Pena FJ, 2010. Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytolune improves posthaw sperm membrane integrity. Theriogenology, 73, 645-50.

Noiles EE, Bailey J, Storey BT, 1995. Temperature dependence of the water permeability, Lp, of murine sperm shows a discontinuity between 4^o and 0^o C. Cryobiology, 32, 220-38.

Novotna B, Topinka J, Solansky I, Chvatalova I, Lnenickova Z, Sram RJ, 2007. Impact of air pollution and genotype variability on DNA damage in Prague policemen. Toxicol Lett, 172, 37–47.

O'Connell M, McClure N, Lewis SE, 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Hum Reprod, 17, 704–9.

Olar TT, Bowen RA, Pickett BW, 1989. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. Theriogenology, 31, 451–61.

Ollero M, Powers RD, Alvarez JG, 2000. Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications for sperm lipoperoxidative damage. Mol Reprod Dev, 55, (3), 326–34.

Özbeyaz C, 1994. Kangal köpeklerinde bazı morfolojik özellikler. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 34(1-2), 38-46.

Özgüneş AF, Çiftçi N, 1993. Kangal köpeği hakkında genel bilgiler. Tigem Dergisi, 1-8.

Pena MAI, 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. Anim Reprod Sci, 82(83), 209–24.

Pena AI, Barrio F, Quintela LA, Herradon PG, 1998. Proline, glycine and betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. Reproduction in Domestic Animals, 33, 5–9.

Pena AI, Lınde-Forsberg C, 2000. Effects of Equex, one or two steps dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. Theriogenology, 53, 859-75.

Peres MA, da Rocha AM, Vannucchi CI, Mendes CM, Cavalcanti PV, Nichi M, Ambrosio CE, M. Miglino A, Visintin JA, Avila Assumpçao MEOD, 2014. Semen analysis of Golden Retriever healthy dogs and those affected by muscular dystrophy. Andrologia, 46, 277–82.

Peruma P, Chamuah JK, Rajkhowa C, 2013. Effect of catalase on the liquid storage of mithun (Bos frontalis) semen. Asian Pacific Journal of Reproduction, 2, 209–14.

Pesch S, Bergmann M, 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. Micron, 37, 597-612.

Phelps MJ, Liu J, Benson JD, Willoughby CE, Gilmore JA, Critser JK, 1999. Effects of Percoll separation, cryoprotective agents, and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance to cryopreservation. Biol Reprod, 61, 1031–41.

Polge C, Smith AU, Parkes AS, 1949. Revival of spermatozoa after vitrification at low temperatures. Nature, 164, 666–67.

Purdy PH, 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Resarch, 6, 215–25.

Rahman I, Gilmour PS, Jimenez LA, Biswas SK, Antonicelli F, Aruoma OI, 2003. Ergothioneine inhibits oxidative stress and TNF-alpha-induced NF-kappa B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun, 302, 860–64.

Rajesh KT, Doreswamy K, Shrilatha B, Muralidhara M, 2002. Oxidative stress associated DNA damage in testis of mice induction of abnormal sperms and effects on fertility. Mutat Res, 513, 103–11.

Rangan U, Bulkley GB, 1993. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. Br Med Bull, 49(3), 700-18.

Rijsselaere T,Van Soom A, Maes D, de Kruif A, 2003. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. Theriogenology 60, 1553–68.

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

Rossell JB, 1983. Measurement of rancidity. In J. C. Hllin & R. J. Hamilton (Eds.), Rancidity in Foods, 26–28.

Rota A, Linde-Forsberg C, Vanozzı I, Romagnolı S, Rodrıguez-Martınez H, 1998. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing-thawing rates. Reproduction in Domestic Animals, 33, 355-61.

Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M, 2006. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. Theriogenology, 65, 1848-58.

Rota A, Milani C, Romagloni S, Zucchini P, Mollo A, 2010. Pregnancy and conception rate after two intravaginal inseminations with dog semen frozen either with 5 % glycerol or 5 % ethylene glycol. Anim Reprod Sci, 118, 94-97.

Sanocka D, Kurpisz M, 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. Reproductive Biology and Endocrinology, 2, 12.

Santos SEC, Vannucchi CI, Satzinger S, Visintin JA, 2001. Comparação de dois crioprotectores na congelação de semen de cães (Comparison of two cryoprotectants for freezing dog semen). Revista Brasileira Reproduo Animal, 25, 472–73.

Sarıözkan S, 2008. Spermada lipid peroksidasyon ve antioksidanların rolü. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi, 79(4), 19-22.

Sarıözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutas¸ PA, Bilgen A, 2009. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. Cryobiology, 58, 134–38.

Schafer S, Holzman A, Arbeiter K, 1997. Effect of quality marker of ejaculates of beagle dogs after frequent semen collection. DTW Dtsch. Tierarztl Wochenschr, 104(1), 26-29.

Schafer-Somi S, Aurich C, 2007. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. Anim Reprod Sci, 102, 1–13.

Schafer-Somi S, Kluger S, Knapp E, Klein D, Aurich C, 2006. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. Theriogenology, 66(2), 173-82.

Schnorr B, 1996. Embryology of domestic animals. Enke, Stuttgart, 10-13.

Schubert CL, Seager SWJ, 1991. Semen collection and evaluation for the assessment of fertility parameters in the male Dalmacian. Canine Practice, 16(5), 17-21.

Seager SWJ, Platz C, Fletcher WS, 1975. Conception rates and related data using frozen dog semen. J Reprod Fertil, 45, 189-92.

Shahidi F, Naczk M, 1995. Food phenolics, chemistry effects applications. Technomic, USA. Willson KC, Clifford MN, Tea Cultivation To Consumption. Chapman & Hall, London, 258.

Shiva Shankar Reddy N, Jagan Mohanarao G, Atreja SK, 2010. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (Bubalus bubalis) sperm quality following cryopreservation. Anim Reprod Sci, 119, 183–90.

Sies H, 1993. Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem, 215, 213–19.

Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ, 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. J Androl, 16, 464–68.

Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM, 2001. Efeito das etapas do processo de criopreservação sobre a qualidade do sêmen canino diluído em tampão tris. Revista Brasileira Reproduo Animal, 25, 474-5.

Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM, 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. Theriogenology, 59, 821-29.

Silva AR, De Cassia Soares Cardoso R, Uchoa DC, Machado DA, Silva LD, 2002. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. Vet J, 164(3), 244-46.

Silva ECB, Cajueiro JFP, Silva SV, Soares PC, Guerra MMP, 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. Theriogenology, 77, 1722–26.

Skaper SD, Fabris M, Ferrari V, Carbonare MD, Leon A, 1997. Quercetin protects cuteneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. Free Rad Biol Med, 22(4), 669-78.

Smollich A, Michel G, 1992. Microscopical anatomy of domestic animals. Gustav Fischer, Jena, Stuttgart, 245.

Soares MP, Rossi CAR, Mezzalira A, Cecim M, 2002. Etileno glicol na criopreservac¸a˜o de semen canino (Ethylene glycol on canine semen cryopreservation). Ciencia Rural, 32, 649–55.

Stanescu MP, Birtoiu AI, 2010. Freezing of dog's sperm: a review. Romanian Biotechnological Letters, 67(2), 209-15.

Stanescu MP, Birtoiu AI, 2012. Comparative studies canine sperm freezing protocols. Romanian Biotechnological Letters, 17, 7709-16.

Stavric B, 1994. Quercetin İn Our Diet: From Potent Mutagen To Probable Anticarcinogen. Clin Biochem, 27(4), 245-48.

Storey BT, Noiles EE, Thompson KA, 1998. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. Cryobiology, 37, 46–58.

Tanret C, 1909. Sur une base nouvelle retiree du seigle ergote, l'ergothioneine. Comptes Rendus Chimie, 149, 222–24.

Taşdemir U, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Özgürtaş T, Durmaz E, Büyükleblebici O, 2014. Effects of various antioxidants on cryopreserved bull sperm quality. Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 20, 253-58.

Taylor RW, Turnbull DM, 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. Nature Reviews Genetics 6, 389–402.

Tekin N, 1990. Erkek üreme organlarının muayenesi (Androlojik muayeneler) Theriogenoloji Ed.: Alaçam, E., Nurol Matbaacılık. Ankara. 7, 53-67.

Tekin N, 1994. Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. Evcil Hayvanlarda Reproduksiyon, Sun'i Tohumlama, Doğum ve İnfertilite. Ed.: Alaçam, E., Dizgievi, Konya. 7, 69-79.

Tekin N, İzgür H, Özyurt M, 1987. Köpeklerde penis masajı yöntemiyle sperma alma ve başlıca spermatolojik özellikler üzerine araştırmalar. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 3(1), 83-95.

Tosun H, Uysal O. 2007. Köpek spermasının dondurulmasında farklı sulandırıcıların ve bireylerin etkisi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 54, 23-28.

Tremellen K, 2008. Oxidative stress and male infertility a clinical perspective. Hum Reprod Update, 14, 243–258.

Tuncer PB, Bucak MN, Büyükleblebici S, Sarıözkan S, Yeni D, Eken A, Akalın PP, Kinet H, Avdatek F, Gündoğan M, 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. Cryobiology, 61, 303–07.

Türk G, Aksu EH, Bozkurt T, 2006. Spermatozoon DNA'sı hasarı. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 20, 85-95.

Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ, 1998. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. Hum Reprod, 13, 1429–36.

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

Uysal O, Bucak MN, 2007. Effects of oxidized glutathione, bovine serumalbumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. Acta Veterinaria Brno, 76, 383–90.

Uysal O, Bucak MN, Yavas I, Varışlı O, Gürcan IS, 2005. Evaluation of ram sperm frozen with various taurine concentrations. Indian Vet J, 82, 1059–61.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol, 39, 44–84.

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology, 57: 149-79.

Vidament MDA, Julienne P, Evain A, Noue P, Palmer E, 1997. Equine frozen semen: Freezability and fertility field results. Theriogenology, 48, 905-17.

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

Wang X, Sharma RK, Gupta A, George V, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A, 2003. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. Fertil Steril, 80, 844–850.

Watson PF, 1990. Artificial insemination and the production of semen. In: Marshalls Physiology of Reproduction, Vol. 2, 4th edition, Ed: G.E. Lamming, London. 747-869.

Watson PF, 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci, 60, 481-92.

Woods EJ, Gilmore JA, Liu J, 2000. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. Hum Reprod, 15, 335-43.

Wu TP, Huang BM, Tsai HC, Lui MC, Liu MY, 2004. Effects of nitric oxide on human spermatozoa activity, fertilization and Mouse embryonic development. Arch Androl, 50, 173-9.

Yetük G, 2013. Gıda katkı maddesi sodyum benzoatın insan eritrositleri üzerine in vitro toksik etkisi ve kateşin ve kuersetinin koruyucu rolü. Yüksek Lisans Tezi, Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yozgat.

Yıldız S, Öztürkler Y, Arı UÇ, Lehimcioğlu NC, Atakişi E, Kulaksız R, 2015. The effects of l-ergothioneine, n-acetylcystein and cystein on freezing of ram semen. Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 21, 81-6.

Yılmaz O, 2005. Kangal köpeği tarihçesi, tanıtımı, yetiştirilmesi, ıslahı. Öztepe Matbaası, 240.

Yubi CA, Ferguson JM, Renton JP, Harker S, Harvey MJ, Bagyenji B, Douglas TA, 1987. Some observations on the dilution, cooling and freezing of canine semen. J Small Anim Pract, 28, 753-61.

Yurdaydın N, Kotzab E, 1987. Studies on the deep freezing of dog semen. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 34(3), 534-40.

Zribi N, Chakroun FN, Abdallah BF, Elleuch H, Sellami A, Gargouri J, Rebai T, Fakhfakh F, Keskes AL, 2012. Effect of freze-thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. Criobiology, 65, 326-31.

8. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Denizli'de doğdu. İlköğrenimini Cumhuriyet İlkokulunda, orta öğrenimini Dalaman Anadolu Lisesinde, Lise öğrenimini Denizli Anadolu Lisesinde tamamladı. 2003 yılında kazandığı Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesini 2008 yılında tamamladı. Aynı yıl Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında araştırma görevlisi kadrosunda göreve başladı. 2009 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında Doktora eğitimini yapmak üzere göreve başladı. Halen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.