T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEZOPOTAMYA YAYIN BALIĞI (*S. TRIOSTEGUS*, H. 1843) SPERMASININ DONDURULMASINDA SULANDIRICIYA KATILAN SÜKROZUN ÇÖZÜM SONRASI SPERMA KALİTESİNE ETKİLERİ

Ahmet İlker MERMER

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2022

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEZOPOTAMYA YAYIN BALIĞI (*S. TRIOSTEGUS*, H. 1843) SPERMASININ DONDURULMASINDA SULANDIRICIYA KATILAN SÜKROZUN ÇÖZÜM SONRASI SPERMA KALİTESİNE ETKİLERİ

Ahmet İlker MERMER

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
1.GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5
3. MATERYAL ve YÖNTEM 11
3.1. Materyal 11
3.1.1. Deneylerde kullanılan malzemeler 11
3.2.Yöntem 12
3.2.1. Çalışma yeri ve sperma eldesi 12
3.2.2. Spermatozoa motilite oranı ve yoğunluğunun belirlenmesi 12
3.2.3. Sulandırıcı kompozisyonu, sulandırıcı osmolitesi ve kriyoprotektanların hazırlanması 13
3.2.4. Spermaların dondurulması ve çözündürülmesi sonrası analizi 15
3.2.5. Biyokimyasal analizler için sperma örneklerinin hazırlanması 16
3.2.6. Balık spermasında 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHDG) ölçümü 17
3.2.7. Comet Assay yöntemi ile genotoksisite tayini 18
3.2.8. Balık spermasında ELISA ile apoptozis tayini 19
3.2.9. Kit içeriği 20
3.2.10. Ön işlemler 21
3.2.11. Deney basamakları 21
3.2.12. Hesaplama yöntemi 22
3.2.13. Fertilizasyon işlemi 23
3.2.14. İstatistiksel analiz 23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 25
4.1. Sperma Kalitesinin Değerlendirilmesi 25
4.1.1. Spermatozoa yoğunluğu 25
4.1.2. Seminal plazma ve sperma sulandırıcının pH'sı ve osmotik basıncı 25
4.1.3. Spermatozoa motilite oranı 25
4.1.4. Spermatozoa motilite süresi 26
4.1.5. Balık spermasında 8-hidroksideoksiguanozin (8-ohdg) incelenmesi 28
4.1.6. Comet Assay yöntemi (kuyruklu yıldız deneyi) ile genotoksisite tayini 29
4.1.7. Balık sperm hücresinde ELISA ile apoptozis tayini 30
4.1.8. Fertilizasyon oranı 32
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 40
5.1. Sonuçlar 40
5.2. Öneriler 40
KAYNAKLAR 41

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MEZOPOTAMYA YAYIN BALIĞI (*S. TRIOSTEGUS*, H. 1843) SPERMASININ DONDURULMASINDA SULANDIRICIYA KATILAN SÜKROZUN ÇÖZÜM SONRASI SPERMA KALİTESİNE ETKİLERİ

Ahmet İlker MERMER

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Zafer DOĞU
Yıl: 2022, Sayfa: 48

Bu çalışmada Mezopotamya yayın balığı (*S. triostegus*) spermaları farklı kriyoprotektanlara (DMSO, methanol, metilglikol) eklenen sükroz ile oluşturulan kriyoprezervasyon medyumu ile 1/3 oranında seyreltilerek dondurulmuş ve çözüm sonrası sperma kalitesi üzerine etkileri, DNA hasar düzeyleri incelenerek, fertilizasyon oranları test edilmiştir. Bu amaçla 4-5 yaşlarında 5 adet erkek, 3 dişi kullanılmıştır. Çözüm sonrası sperma kalitesi değerlendirilirken spermatozoamotilite oranı ve motilite süresi belirlenmiştir. DNA hasar düzeyleri 8-Hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) Ölçümü ve CometAssay yöntemi ile tespit edilmiştir. Bunlara ilaveten apoptotikspermatozoa incelenmiştir. Son olarak da çalışılan sperma örneklerinin çözüm sonrası fertilizasyon oranları belirlenmiştir. Sperma kalitesi değerlendirme sonuçlarına göre, yalnız DMSO içeren sperma sulandırıcısı %30,00±3,51 ile en yüksek spermatozoamotilite oranı göstermiştir (P<0,05). DMSO kontrol grubu (45,00±6,50 s) ve DMSO±Sükroz (50,00±10,51 s) katılan sulandırıcı grubunda motilite süreleri önemli (P<0,05) şekilde yüksek bulunmuştur. 8-Hidroksideoksiguanozin ölçümünde, Methanol+Sükroz grubu 123,86±4,08 ng/ml ile en yüksek DNA hasarı göstermiştir (P<0,05). Metilglikol kontrol grubu hariç, DMSO, Methanol ve Sükroz kontrol gruplarında en düşük DNA hasarı (59,13±0,77-60,80±1,11) belirlenmiştir (P<0,05). Yalnız DMSO (2,23±0,13) ve DMSO+Sükroz (2.02±0.12) içeren medyum en yüksek apoptotik DNA fragmantasyonuna sahip olmuş (P<0,05), en düşük apoptotik DNA fragmantasyonu ise methanol kontrol grubunda (1,17±0,11) ve methanol+Sükroz (1.15±0.10) deneme grubunda belirlenmiştir(P<0,05). En yüksek fertilizasyon oranı kontrol gruplarından DMSO (%24,66±3,51) ve metilglikol (%20,66±1,15); deneme gruplarından DMSO+Sükroz (%20,33±1,52) içeren medyumunda tespit edilmiştir (P<0,05). Bu sonuçlar DMSO ve sükroz karışımının sperma dondurma için sulandırıcılara birlikte katılmasının metilglikol ve methanol'e göre uygun olduğunu göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *S.triostegus*, Kriyoprezervasyon, Sükroz, DNA

ABSTRACT

MSc Thesis

EFFECTS OF SUCROSE ADDED TO DILUENT IN CRYOPRESERVATION OF MESOPOTAMIAN CATFISH (*S. TRIOSTEGUS*, H. 1843) SEMEN QUALITY AFTER THAWING

Ahmet İlker MERMER

Harran University
Graduate School of Natural andAppliedSciences
Department of AnimalScience

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zafer DOĞU
Year: 2022, Page: 48

Inthisstudy, Mesopotamian catfish (*S. triostegus*) semen was frozen by diluting 1/3 with a cryopreservation medium created with sucrose supplementation to different cryoprotectants (DMSO, Methanol, Methylglycol). Then, its effects on post-thaw semen quality, DNA damage levels, and fertilization rates were tested. For this purpose, 5 males and 3 females aged 4-5 years were used. While evaluating the semen quality after thawing, sperm motility rate and motility duration, DNA damage levels were determined by 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) measurement and Comet Assay method. Inaddition, apoptotic spermatozoa were examined. Finally, the post-solution fertilization rates of the studied semen samples were determined. According to the semen quality evaluation results, semen extender containing only DMSO showed the highest sperm motility rate with 30.00±3.51% ($P<0.05$). Motility durations were significantly higher ($P<0.05$) in the DMSO control group (45.00±6.50 h) and the extender group supplemented with DMSO±Sucrose (50.00±10.51 h). In the measurement of 8-Hydroxydeoxyguanosine, methanol+sucrose group showed th ehighest DNA damage with 123.86±4.08 ng/ml ($P<0.05$). Except the methylglycol control group, the lowest DNA damage (ranged between 59.13±0.77 and 60.80±1.11) was determined in the DMSO, methanol and sucrose control groups ($P<0.05$). The media containing only DMSO (2.23±0.13) and DMSO+sucrose (2.02±0.12) groups had the highest apoptotic DNA fragmentation ($P<0.05$), while the lowest apoptotic DNA fragmentation was found in the methanol (1.17±0.11) and methanol+sucrose (1.15±0.10) ($P<0.05$) groups. The highest fertilization rate was found in DMSO (24.66%±3.51%) and methylglycol (20.66±1.15%) groups. These results showed that the addition of DMSO and sucrose mixture to extenders for semen freezing is more suitable than methylglycol and methanol.

KEY WORDS: *S. triostegus*, Cryoprezervation, Sucrose, DNA

TEŞEKKÜR

Tezin konusunun seçimi, yürütülmesi ve yazım aşamasında yüksek lisans eğitim hayatımda yanımda olan her türlü desteği sağlayan saygı değer Danışmanım Doç. Dr. Zafer DOĞU'yasonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam sırasında bilimsel anlamda yardım ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Faruk ARAL'a ve Prof. Dr. Erdinç ŞAHİNÖZ'e, laboratuar aşamasında benden desteğini esirgemeyen Doç. Dr. İsmail KOYUNCU'ya ve laboratuvar ekibine, teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Fırat nehrinden yakalanan *S.triostegus* örnekleri....12
Şekil 3.2. Spermatozoamotilite oranının ve motilite süresinin mikroskopta tespiti 13
Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan kriyoskopik osmometre cihazı....15
Şekil 3.4. Kullanılan bazı cihazlar 17
Şekil 3.5. CDD ELISA yönteminin prensibinin şematik gösterimi....20
Şekil 4.1. Dondurulan *S. triostegus* spermalarından çözüm sonrası yüzde motilite oranı 26
Şekil 4.2. Dondurulan *S. triostegus* spermalarından çözüm sonrası motilite süreleri 27
Şekil 4.3. Dondurulan S. triostegus spermalarından çözüm sonrası hücre içi DNA Hasar seviyeleri 29
Şekil 4.4. Dondurulan *S.triostegus* spermalarından çözüm sonrası DNA hasar seviyeleri (Comet assay 30
Şekil 4.5. Dondurulan *S. triostegus* spermalarından çözüm sonrası apoptotik DNA fragmantasyon analizi değerleri 31
Şekil 4.6. Dondurulan *S.triostegus* spermalarından çözüm sonrası fertilizasyon oranları 33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal ve cihazlar 11
Çizelge 3.2. Gruplarda donmuş sperma çözüm sıcaklık ve süreleri 15
Çizelge 4.1. Dondurulan *S.triostegus* spermalarının çözüm sonrası motilite oranları 26
Çizelge 4.2. Dondurulan *S. triostegus* spermalarının çözüm sonrası motilite süresi değerleri 27
Çizelge 4.3. Dondurulan *S. triostegus* spermalarının çözüm sonrası hücreiçi DNA hasar seviyeleri 28
Çizelge 4.4. Dondurulan *S. triostegus* spermalarının çözüm sonrası DNA hasar seviyeleri (Comet Assay) 30
Çizelge 4.5. Dondurulan *S. triostegus* spermalarının çözüm sonrası apoptotik DNA hasar seviyeleri 31
Çizelge 4.6. Dondurulan *S. triostegus* spermalarının çözüm sonrası fertilizasyon değerleri 32

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

8-OHdG8	Hidroksideoksiguanozin
ABS	Absorbans
AR	Apoptotik Rate
AU	ArbitraryUnit
CDD	Cell DeathDetection
dk	Dakika
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleikasit
EDTA	Etilen DiaminTetra Asetik Asit
FAO	FoodandAgricultureOrganization- Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
g	Gram
kg	Kilogram
LMP	LowMelting Point
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mOsm	Miliosmol
NP-CPA	NonPermablCryoprotektan-Geçirgen Olmayan Kriyoprotektan
PBS	Fosfat bufferedsaline
P-CPA	PermablCryoprotektan-Geçirgen Kriyoprotektan
ProH	Propilen glikol
s	Saniye
TL	Total Boy
UV	Ultraviole
µl	Mikrolitre

1.GİRİŞ

Sürekli şekilde artan insan nüfusunun gıda ihtiyacını karşılamak amacıyla yapılan karasal tarım uygulamalarının son yıllarda doyum noktasına gelmiş olması, sucul ortamların gıda gereksinimini karşılamak üzere daha fazla kullanımını zorunlu hale getirmiştir. İnsan nüfusunun 2050 yıllarında 13 milyara yaklaşacağı ve hayvansal protein ihtiyacının neredeyse iki kat fazla olacağı tahmin edilmektedir. Artan hayvansal protein ihtiyacının karşılanabilmesi üzerine birçok alanda çalışma yapılmakla birlikte, su ürünleri üretimi üzerine yapılan hesaplamalarda Birleşmiş Milletlere göre hayvansal protein gereksinimlerinin yaklaşık yüzde 20'sini balıklardan karşılanabileceği ifade edilmektedir (FAO, 2014).

Bu noktada balık yetiştiriciliğinin önemi her geçen gün daha da iyi anlaşılmaktadır. Başta çipura, levrek ve alabalık üzerine yoğunlaşılmış olsa da son yıllarda alternatif balık türleri üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Birçok balık türünde yetiştiricilik çalışmaları belli bir aşamaya gelmiştir. Yayın balıkları da doğadan elde edilip tüketilebildiği gibi, yetiştiriciliği yapılan türler arasındadır.

Ülkemiz içsularında (akarsu ve göl) 2 farklı yayın balığı türü bulunmaktadır. Yaygın olarak bulunan tür Avrupa Yayın Balığı (*S. glanis* L., 1758)'dır. Ancak bilinçsiz ve yoğun avlanma sonucu yaşadığı alanlarda oldukça azalmış ya da bitme noktasına gelmiştir. Genel biyolojik özellikleri açısından 2 tür birbirine çok benzemekle birlikte, çalışmamızın konusunu oluşturan Mezopotamya Yayın Balığı (*S. triostegus* H., 1843) ise yalnızca Fırat-Dicle Havza'sında yaşamaktadır.

Mezopotamya Yayın Balığı (*S. triostegus*)'nın Irak Basra Körfezi'nden bildirilen kayıtlarında 7 yaşına, Türkiye'de Atatürk Baraj Gölü'nden elde edilen kayıtlarda ise 11 yaşına kadar ulaşabildiği rapor edilmiştir (Al-Abood, 1989; Al-Hassan ve Al-Sayab, 1994; Oymak ve ark., 2001). Irak'ta, Mart-Mayıs aylarında ve Türkiye'de ise Mayıs-Haziran aylarında gerçekleşen üreme döneminde yumurtalar bitki örtüsü üzerine bırakılmaktadır (van den Eelaart, 1954; Al-Daham ve Al-Seyab,

2001; Oymak ve ark., 2001). Üreme döneminde kıyı bölgelerde çoğunlukla 2 erkek ve 1 dişi olacak şekilde sürüler halinde dolanır ve çiftleşme sonrası tekrar derin sulara hareket ederler (Coad, 2014).

Öğleden sonra kısa süreler ile çoğunlukla geceleri diğer balık türleri, sucul böcekler, kurbağalar, karides ve yengeçlerle beslenen bu türün mide içeriğine bakıldığında detritus ve sucul bitkilere de rastlanmıştır (Al-Daham ve Al-Seyab, 2001; Ünlü ve Bozkurt, 1996; Dawood, 1997; Coad, 2014). Et kalitesi bakımından oldukça yüksek protein içeren bu tür yöre halkı tarafından sevilerek tüketilmektedir (Al-Habbib ve ark., 1993; Jasim ve ark., 2006; Cengiz ve ark., 2012).

Balık gen kaynaklarının korunması ve ekonomik değere haiz alternatif balık türlerinin yapay koşullarda kontrollü bir şekilde üretilmesi son yıllarda üzerinde sıklıkla durulan konular arasındadır. Bu bağlamda spermaların uzun ve kısa süreli muhafazası önem arz etmektedir. Uzun yıllar süren çalışmalar sonucunda ilk başarılı sperma dondurma çalışması Ringa balıkları üzerinde rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada dondurulmuş ve taze spermalarda fertilizasyon çalışması yapılmış ve dondurulmuş spermada döllenme sağlanmıştır (Holtz, 1993).

Alabalık ve Sazan türleri gibi birçok balık türü mevsimsel üreme özelliğine sahiptirler. Bu mevsimsel üreme özelliğinden dolayı erkek balıkların sperma kalitesi sıcaklık, ışık ve hormonal mekanizmadan etkilenmektedir. Dolayısıyla mevsimsel farklılık ve sarkmalarda oluşan değişiklikler kaliteli populasyonların elde edilmesi ve sürdürülebilirliği için risk oluşturmaktadır.

Genellikle erkek balıklar, dişi balıklardan daha erken eşeysel olgunluğa erişirler. Örneğin, alabalıklar 2 yaşında, sazanlar 3 yaşında eşeysel olgunluğa ulaşmaktadırlar. Doğal ortamlarında alabalıklar genellikle su sıcaklığının 10^0C'nin altında olduğu, sazanlar ise su sıcaklığının 20^0C'nin üzerinde olduğu zaman aralıklarında üreme yeteneğine sahip olurlar (Koldras ve ark.,1990; Billard,1992).

Balıkların üreme özellikleri incelendiğinde 2 farklı parametre karşımıza çıkmaktadır. Bunlardan birincisi genital kanallardan salgılanan seminal plazma ve genital organda yani gonadlarda olgunlaşan üreme hücresi yani spermatozoondur. Bu iki parametrenin birleşmesiyle oluşan yapıya sperma (semen, süt) denmektedir. Seminal plazmanın içeriği ise türlere göre az da olsa değişmekle birlikte genelde Na, K, Cl, şeker ve proteinden oluşmaktadır (Billard,1992).

Sperma hücresi (spermatozoon), ürogenital bölgede hareketsizdir. Bununla birlikte su ile temasa geçince aktif hale geçerek hareket etme yeteneğine kavuşurlar. Spermatozoon'un sucul ortama girdiğinde hareket etme süresi türlere göre değişmekle birlikte oldukça kısadır (50 s- 2 dk) (Billard,1992).

Sperma dondurmanın temel amacı, çözündürme sonrası yaşayan normal spermatozoa sayısının yüksek tutarak dondurularak saklamaktır. Dondurma önce mevcut bulunan spermatozoa motilitesi, yapısal bütünlük, canlılık, nükleer DNA ve dölleme potansiyelinin çözüm sonrası spermada da devam ettirilmesi temel olarak gereklidir. Önceki literatürlerde, sperma dondurma için dondurma öncesi sperma kalitesi, dondurma ve çözündürme yöntemleri, sperma sulandırıcıları gibi önemli faktörler çözüm sonrası sperma kalite özellikleri üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bunların üzerinde hassasiyetle durulması gerektiği anlaşılmaktadır. Nitekim dondurma-çözündürme teknikleri ve sperma sulandırıcılarını iyileştirmek adına yapılan birçok çalışma, balık sperma dondurma yönteminin ilerlemesini sağlamıştır. Önceki çalışmalarda, sperma sulandırıcısına katılan değişik antioksidanlar, spermatozoa motilitesini devam ettirdiği, spermatozoa bütünlüğünü koruduğu ve DNA hasarını en aza indirdiği gösterilmiş olmasına rağmen bu maddelerin yararı hala tartışmalıdır.

Atatürk Baraj Gölü'nde yapılan önceki çalışmalara bakıldığında, gölde yaşayan balıkların spermalarının dondurulması üzerine çalışmaların son derece sınırlı olduğugörülmektedir. Bu noktadan hareketle önerilen projenin başlıca hedefleri, alternatif protein ihtiyacının giderilmesi adına yetiştiricilik potansiyeline sahip, *S. triostegus*'ta kaliteli anaç stoklarının oluşturulabilmesi için sperma sulandırıcısına

Sükroz ilavesi ile farklı oranlarda sulandırma yapılacak olan sperma dondurulmasında amacımız;

- Spermatozoa motilitesi ve DNA bütünlüğüne etkisini belirlemek,
- Farklı kriyoprotektanların sperma dondurmadaki etkilerini belirlemek,
- Fertilizasyon oranına etkisini belirlemek,

Hem yetiştiricilik potansiyeli bulunan hem de gen kaynaklarının korunması adına *S. triostegus* spermasının dondurulabilmesi için farklı katkı maddelerinin sperma dondurmaya etkisi araştırılarak, söz konusu tür için en uygun sperma dondurma medyumu geliştirme çalışmalarına katkıda bulunmak,

Atatürk Baraj Gölü'nde bulunan ekonomik ve ekolojik değere sahip balık türlerinin yetiştiricilik çalışmalarına katkıda bulunmak ve gen kaynaklarının korunması sağlamak; olarak belirlenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Günümüzde dondurularak saklama yöntemi sperma ve embryo gibi farklı dokuların saklanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliği konusunda yapılan araştırmalarda, özellikle spermanın dondurulması noktasında yoğun çalışmalar yürütülmektedir. Bugüne kadar 200'den fazla tatlı su ve deniz balığı türünün sperması dondurulmuştur (Lakra, 1993; Linhart ve ark., 1993; Lahnsteiner ve ark., 2000).

Balık spermasının dondurularak saklanmasının iyi bilinmesi; ani hastalık salgını, doğal afet, aşırı tüketim vb. nedeniyle oluşabilecek kayıplara karşı stokların korunması gibi birçok alanda fayda sunar. Tür farklılıkları nedeniyle mevcut teknolojiye, kriyoprotektana ve donmaya karşı verilen tepki hücreye göre değiştiğinden, balık spermatozoa dondurulması için tek bir evrensel protokol önerilememektedir. Bu nedenle, her bir balık türü için bazı genel kurallar uygulanmasına rağmen, her bir tür için dondurma protokolünün optimizasyonu gerekmektedir (Agarwal, 2011).

Dondurma işlemi sırasındaki hücresel hasar; ozmotik şok, hücre içi buz oluşumu, artan hücre içi çözünen konsantrasyon ve çözelti etkilerinden kaynaklanmaktadır. Dondurma solüsyonlarına kriyoprotektanların eklenmesi, hücre menbranını daha esnek hale getirerek çözelti etkilerinden kaynaklanan hasarı azaltır (Mazur, 1970; Bailey ve ark., 2003; Bucak ve Tekin, 2007; Agarwal, 2011). Kriyoprotektanların sperma muhafazasındaki özellikleri, bulundukları ortamdaki iyon sayısının azaltılmaları ve donmamış molekülleri artırmaları olarak tanımlanabilir (Palasz ve Mapletopt, 1996).

Balık sperması gonadlarda hareketsizdir. Tatlısu balıklarındaki spermatozoa hareketini hiperozmotik ortam başlatmaktadır (Morisawa ve Suzuki, 1980). Ozmotik basınç, pH, sıcaklık ve iyon konsantrasyonu spermatozoa hareketini etkilemektedir (Alavi ve Cosson, 2006). Sulandırıcı, spermatozoonun aktivasyonunu inhibe eder ve

hücresel enerjiyi koruyarak canlılığın korunmasını sağlar. İdeal bir sulandırıcı izotoniktir ve iyi bir tamponlama kapasitesine sahiptir. Besin maddeleri, stabilize edici kolloidler ve antioksidanlar içerir. Aynı zamanda antibakteriyeldir ve genellikle iyi kalitede bir korumaya sahiptir.

Dondurma, soğutmanın bir sonucudur ve suyun sıvı halinden katı faza geçmesidir. Bu durumda tüm moleküllerin hareketi inhibe edildiğinden tüm biyolojik ve biyokimyasal olaylar durur (Bailey ve ark., 2003).

Yavaşça soğutulan sperma donmuş duruma girmeden önce yeterince dehidre edilebilirse, çözünme sırasında hücre içi donma hasarı önemsiz hale gelir. Çözünmenin ardından spermatozoon yeniden su alır ve ozmotik stres ile ilişkili spermatozoon plazma membranında hasar meydana gelebilir. Yeniden kristalleşme olaylarıyla ilişkili hücre içi stresin, donma hasarının ana nedeni olduğu düşünülmektedir. Bu hasar donmuş haldeki hızlı çözünme ile en aza indirilebilir.

Hızlı çözünmede donmuş sperma tamamen çözülmeden önce yeniden kristalleşmenin gerçekleşmesi için daha az zaman vardır (Pegg, 2002; Agarwal, 2011). Çözülme sıcaklığının donma sonrası spermatozoon canlılığı üzerinde derin etkileri vardır. Bazı tatlı su balık türlerinin donmuş spermalarının çözülmesi 30-80 °C'de su banyosunda yapılır. Ancak, her bir balık grubu için sperm fizyolojisindeki büyük değişkenlik nedeniyle standardize edilmesi gerekir (Rana, 1995). Uygulamada, sazan donmuş spermaları genellikle 30-35 °C su banyosunda çözündürülür. Bazı soğuk su balıkları için, doğal üreme ortamı sıcaklığında (20-25 °C) donmuş spermanın çözülmesi avantajlı bulunmaktadır (Agarwal, 2011).

Spermanın dondurulması sırasında hasar, spermatozoonun plazma zarı üzerindeki, dondurma işleminin zararlı etkileri nedeniyle, motil spermatozoa sayısındaki azalma ile karakterize edildiğinden, çözüm sonu spermatozoa canlılığının artırılması, oksidatif ve osmotikhasarın azaltılmasıen temel gaye olarak karşımıza çıkmaktadır (Curry, 2000). Donma ve çözülmenin spermatozoonun plazma zarı üzerindeki zarar verici etkileri, spermatozoonun fertilizasyon yeteneğini

düşürebilmektedir. Spermanın dondurma hasarı; spermatozoon motilitesindeki bozulma, spermatozoon morfolojisindeki değişiklikler ve akrozomun hasarı ile de ilişkilendirilmiştir (De Leeuw ve ark., 1990; Check ve ark., 1991; Varner ve Jhonson, 2007).

Hayvan türlerinde erkeklerde spermatozoon nükleer DNA'sının donma-çözülme işlemi ile önemli derecede hasar gördüğü bulunmuştur (Amann, 2005; Rodriguez-Martinez ve Wallgren, 2011). Bu veriler, balık spermatozoonundaki dondurma sonucunda kaçınılmaz şekilde ortaya çıkabilen hasarları azaltmak ve dolayısıyla sperma dondurulmasının sonuçlarını iyileştirmek için stratejilere ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

Diğer bir önemli faktör de, sulandırıcıda geçirgen (P-CPA) (Gliserol, DMSO (Dimetilsülfoksit), etilen glikol ve propilen glikol (ProH) ve methanol) ve geçirgen olmayan (NP-CPA) (monosakkaritler (glukoz, hekzoz), disakkaritler (sükroz) ve trisakkaritler (raffinoz)) kriyoprotektanlar kullanarak en iyi sulandırıcı solüsyonu elde edebilmektir. Bunun nedeni, hücre içi ve hücre dışı buz oluşumunun neden olduğu sperm hasarlarının azaltılması ve yumurta döllenme oranının iyileştirilmesidir (Fowler ve Toner, 2006; Kopeika ve ark., 2003). Bu amaçla yapılan çalışmalarda, çeşitli şekerlerin donma-çözülme kaynaklı hasara karşı kriyoprotektif özellikleri çeşitli hücre tiplerinde rapor edilmiştir (Yıldız ve ark. 2000; Storey ve ark., 1998).

Sulandırıcılara şeker eklenmesinin çözdürme sonrası semen kalitesi üzerindeki etkisi, *Pseudosciaena crocea*, (Cheng, 2016), gökkuşağı alabalığı *Oncorhynchus mykiss*,(Tekin ve ark, 2007), Caspian kahverengi alabalığı *Salmo trutta*'da bildirilmiştir. Caspius, (Moghanloo ve ark., 2007), Atlantik somonu Salmo salar, (Dziewulska veark., 2011) ve dere alabalığı *Salvelinus fontinalis*, (Lahnsteiner ve ark., 2011) çalışılmıştır.

Hovart ve ark. (2003) Sazan balığı (*C. carpio*) spermasının farklı sulandırıcılarla dondurulması üzerine yaptıkları çalışmalarında, beş sulandırıcıdan üçü şekerlerden (300 Mm sükroz, 350 mM glikoz, 350 mM fruktoz) ve ikisi hücre içi

kriyoprotektandan (dimetil-sülfoksit (DMSO) ve metanol) oluşmuştur. Bu sulandırıcıların sazan spermasının dondurulmasındaki etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda; DMSO-sükrozmotilite oranını %29; fertilizasyon oranını %21 belirlerken yumurta açılım oranını %9 olarak tespit etmişlerdir. Metanol ile kombinasyon halinde sakaroz, fruktoz ve glikoz sulandırıcılar ile dondurulmuş sperma ile döllenmiş yumurtaların kuluçka oranları, DMSO varlığında dondurulmuş eşdeğerlerinden anlamlı derecede farklı bulmuşlardır (tüm sulandırıcılar için P <0.001). Elde ettikleri sonuçlar ışığında; metanol ile birleştirilmiş şeker esaslı sulandırıcılarda yüksek hareketlilik, döllenme ve yumurta açılma oranları vermiştir.

Maisse (1994), Gökkuşağı alabalığı spermasını altı şeker (sükroz, maltoz, trehaloz, galaktoz, fruktoz ve glikoz) ve üç farklı konsantrasyonda (125, 250 ve 500 mM) test ettiğinde ve 125 mM'dekisükrozun en çok faydalı olduğunu rapor etmiştir. Benzer şekilde, Sükrozun trehaloz ile beraber sulandırıcı solüsyonunda kullanılmasının, adi sazan spermatozoasında daha yüksek çözülme sonrası motilite oranları verdiği (Warnecke ve Pluta, 2003), dolayısıyla sükrozun sulandırıcının bir bileşeni olarak kullanılmasının, sazan spermasında çözünme sonrası motilite oranlarını ve motilite sürelerini iyileştirdiği bildirilmiştir (Irawan ve ark. 2010).

Lahnsteiner ve ark. (1996), Gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoanın permeable ve non-permeable kriyoprotektanların etkisini motilite, eozin geçirgenliği (spermatozoa) ve laktatdehidrojenaz aktivitesi üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmalarında; %7 ve %20 oranında yumurta sarısı ve %0,5 oranında sükroz ilavesinin bu katkı maddeleri içermeyenlere kıyasla gökkuşağı alabalığı spermasının kalitesini önemli ölçüde artırdığını rapor etmişlerdir. Babiak ve ark. (1995), farklı bir balık türü olan Kuzey turna balığı (*Esox lucius* L.) spermasının dondurulması için yumurta sarısı ve sükrozun uygunluklarını belirlemek adına yedi sulandırıcı, üç çözündürme ortamı ve iki çözünme sıcaklığını test etmişlerdir. Çözdürülen spermanın motilite ile fertilizasyon oranı arasındaki ilişkiyi önemli tespit edilmiştir.

Benzer şekilde, Abinawanto ve ark. (2012) farklı bir tür olan *Osphronemus goramy*'de farklı oranlarda sükroz konsantrasyonlarını (%0, %0,1, %0,3, %0,5, %0,7 ve %0,9) ilave ettikleri sulandırıcıları kullanarak dondurdukları spermalarda çözüm sonrası etkileri incelemişlerdir. İnceleme sonucunda; spermatozoa motilite oranı, canlılığı ve anormal spermatozoa üzerinde kontrole (sükroz %0,0) kıyasla %0,5'lik sükroz konsantrasyonun önemli etkisi (P <0,05) belirlenirken, sırasıyla çözdürülmüş spermatozoa motilite, canlılığı ve anormal spermatozoa üzerinde önemli bir fark göstermiştir (P <0.01). Yüzde 0,5 oranında katılan sükrozun çözüm sonrası en yüksek spermatozoa motilite oranı (%81,62±4,19) ve çözüm sonrası spermatozoa canlılığını (%82,17 ± 2,56) ve en düşük çözüm sonrası anormal spermatozoa (%12,50±1,52) tespit edilerek, bu orandaki sükrozun, çalışmadaki optimum sükroz konsantrasyonunu olarak ortaya çıktığı rapor edilmiştir.

Bozkurt ve ark. (2016) da Adi Sazan balığında (*C. carpio*) spermasının dondurulmasında farklı şeker türlerini kullanmışlar ve spermatozoa motilite, canlılığı ve fertilizasyon kabiliyeti üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda farklı şeker türlerinin; spermatozoada hareketlilik, hareketlilik süresi ve canlılık oranlarını önemli ölçüde etkiledğini ifade etmişlerdir (P<0,05). Glikoz, maltoz, sakaroz ve trehaloz, dondurulan spermatozoalarda çözüm sonrası şekersiz kontrole oranla daha yüksek hareketlilik sağlamıştır. Trehaloz, en yüksek progresifmotilite süresini sağlarlen, ksiloz dışındaki tüm şeker türleri ile daha yüksek canlı sperm oranları elde edilmiştir. Farklı şeker türleri ile dondurularak saklanan sazan spermatozoalarının ortalama en yüksek döllenme (%78,20±1,40) ve gözlü yumurta oranları (%94,30±1,50) sulandırıcıda trehaloz kullanıldığında elde edilmiştir (P<0,05).8-OHdG ve COMET testi, oksidatif DNA hasarının güvenilir belirteci olarak kabul edilen yaygın yöntemlerdendir (Shigenaga ve ark., 1994; Subash, 2016). Levrek spermasıkuyruklu yıldız tahlili, taze spermle karşılaştırıldığında donmuş çözülmüş spermaörneklerinde önemli bir DNA parçalanmasının gerçekleştiğini açıkça göstermiştir (Zilli ve ark., 2003). Ayrıca, önceki çalışma sonuçları, akrilamid tedavisinin, sıçanlara melatonin ile tedavi edildiğinde yüksek bir plazma 8-OHdG düzeyi ile sonuçlandığını göstermiştir (Tozan-Beceren ve ark., 2012).

Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü, hücresel stresin yanı sıra normal gelişimin bir sonucu olarak ortaya çıkan genle aktive olan bir olaydır. Canlı spermalarında ise apoptozun normal spermatogenez sırasında meydana geldiği ve sperm popülasyonunun kontrolünde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Duru ve ark., 2001). Öte yandan, apoptoz; UV ışınlar, kimyasal maddeler ve sıcaklık değişiklikleri gibi çeşitli çevresel, kimyasal ve fiziksel faktörler tarafından indüklenebilir (Nagata, 1997).

Yapılan çalışmalara bakıldığında, kriyoprezervasyonun sperm hücrelerinde apoptotik belirtiler üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. Kriyoprezervasyonun insan (Duru ve ark., 2001;Glander ve Schaller, 1999) yaban domuzu (Pena ve ark., 2002), boğa (Anzar ve ark., 2002; Januskauskas ve ark., 2003; Martin ve ark., 2004) ve balık (Şahinöz ve ark., 2020) spermatozoa hücrelerinde membran indüklenmesi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deneylerde kullanılan malzemeler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler, kitler ve cihazlar gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal ve cihazlar

Kimyasal maddeler	**Üretici Firma**
RPMI 1640 (Stabil L-glutamin'li)	Biochrom
DMEM:F12	Biochrom
DMSO	Sigma
Fetal Bovine Serum	Biochrom
EDTA	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma
Penisilin	Sigma
Streptomisin	Sigma
Tripan Mavisi	Sigma
MTT	Sigma
Apoptosis Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} Kit	Roche
Apoptotik DNA Ladder kit	Roche
CytotoxicityDetection Kit (LDH)	Roche
Agarose	Sigma
Low melting agarose	Sigma
Histopaq-1077	Sigma
Acridin orange	Sigma
Ethidium bromide	Sigma
TAE buffer	vivantis
Laminar Hava Akımlı Steril Çalışma Kabini	Metisafe
CO2 'li İnkübatör	Thermo
Inverted Mikroskop	Zeiss
Floresan Mikroskop	Nikon
Hemositometre	Hausser Scientific
Vorteks	Labart
Hücre Kültür Kapları	Corning
Pipetörler (10, 20, 100, 1000 µl)	Eppendorf
Santrifüj	Hettich
Micropleyt okuyucu	Spektra Max M5
pH metre	WTV
Su banyosu	Nüve

3.2.Yöntem

3.2.1. Çalışma yeri ve sperma eldesi

Bu çalışma, Atatürk Baraj Gölü'nün Şanlıurfa ili Bozova İlçesi Çatak Mevkii'nde bulunan Harran Üniversitesi Bozova Meslek Yüksekokulu Su Ürünleri Bölümüne ait Su Ürünleri Bölümü laboratuarlarında yapılmıştır. Çalışmada, Atatürk Baraj Gölü'ndeki balıkçılardan temin edilen en az 4-5 yaşlarındaki yeni ölmüş, Mezopotamya Yayın Balıkları (*S. triostegus*) kullanılmıştır (5 Erkek 3 Dişi). Balıkların yaş tahminlerinde omurlar kullanılmıştır. (Tesch, 1968). Örneklerin boy ölçümleri üzerine mm aralıklı cetvel yerleştirilmiş özel ölçüm tahtası ile, ağırlık ölçümleri 0,1 g hassasiyetli elektronik baskül ile yapılmıştır. Boy ölçümlerinde Total Boy (TL) kullanılmıştır (Geldiay ve Balık, 2009).Avlanan balıkların, ürogenital papillası dikkatlice kurulandıktan ve üre veya dışkı teması engellendikten sonra abdominal masaj uygulanarak 5 ml'lik cam tüplere spermalar alınmıştır (Şekil 3.1). Spermalar alınır alınmaz buz içeren straforlara (4±2ºC) yerleştirilerek vakit geçirmeden laboratuvara nakledilmiştir.



Şekil 3.1. Fırat nehrinden yakalanan *S.triostegus* örnekleri

3.2.2. Spermatozoa motilite oranı ve yoğunluğunun belirlenmesi

Sperma alındığı anda her bir örnekten 5 µl sperma alınarak ışık mikroskobunda (400X büyütmede) incelenerek, hareketsiz olduğu tespit edilenler çalışma için seçilmiştir (Şekil 3.2). Herhangi bir spermatozoon hareketi tespit edildiğinde üre ya

da su kontaminasyonu olduğu varsayılarak değerlendirmeye alınmamıştır. Akabinde tüm örneklerin 25 µl %0,29 NaCl aktivasyon solüsyonu (Maria ve ark., 2006) ile ışık mikroskobunda motilite oranı ve motilite süresi belirlenmiştir. Sperma yoğunlukları hemositometrik yöntem ile Thoma lamında sayılarak hesaplanmıştır. Muayene sonrası %80 ve üzeri motilitede (Viveiros ve ark., 2011), Spermatozoa yoğunluğu 9,00-14,00 X 10^9/ml olanları seçilmiştir. Her bir örnekten yaklaşık 1,5 ml sperma alınarak 2000g hızda 30 dk süre ile santrifuj edilerek seminal plazma osmotik basıncı ve pH'ı ölçülmüştür. Akabinde, bireysel varyasyonu önlemek için uygun tüm sperma örnekleri karıştırılarak sperma havuzu oluşturulmuştur.



Şekil 3.2. Spermatozoamotilite oranının ve motilite süresinin mikroskopta tespiti

3.2.3. Sulandırıcı kompozisyonu, sulandırıcı osmolitesi ve kriyoprotektanların hazırlanması

Sperma örnekleri 4 ºC'de 1/3 oranında sperma sulandırıcısı ile sulandırılmıştır. Sulandırıcı olarak 0,3 M Glukoz sulandırıcısı kullanılmıştır. Her erkekten alınan spermanın ozmolalitesi (yaklaşık 500 µl) oda sıcaklığında kriyoskopik olarak ölçülmüştür (Osmometer 3250, Advanced Instruments INC, Massachusetts, ABD) (Şekil 3.3). Kontrol grubu olarak %10 oranında Dimethylsulfoxide (DMSO),

Methanol ve Metilglikol ve 100 mM sükroz kullanılmıştır. Deneme ve kontrol grubu sulandırıcıları:

Grup 1: % 5 DMSO+ 50 mM sükroz (234 µl glukoz+15µl DMSO+15µl sükroz+36 µl yumurta sarısı (y.sarısı)+100µl sperma

Grup 2: % 5 Methanol+ 50 mM sükroz (234 µl glukoz+15µl Methanol+15µl sükroz+36 µl y.sarısı)+100µl sperma

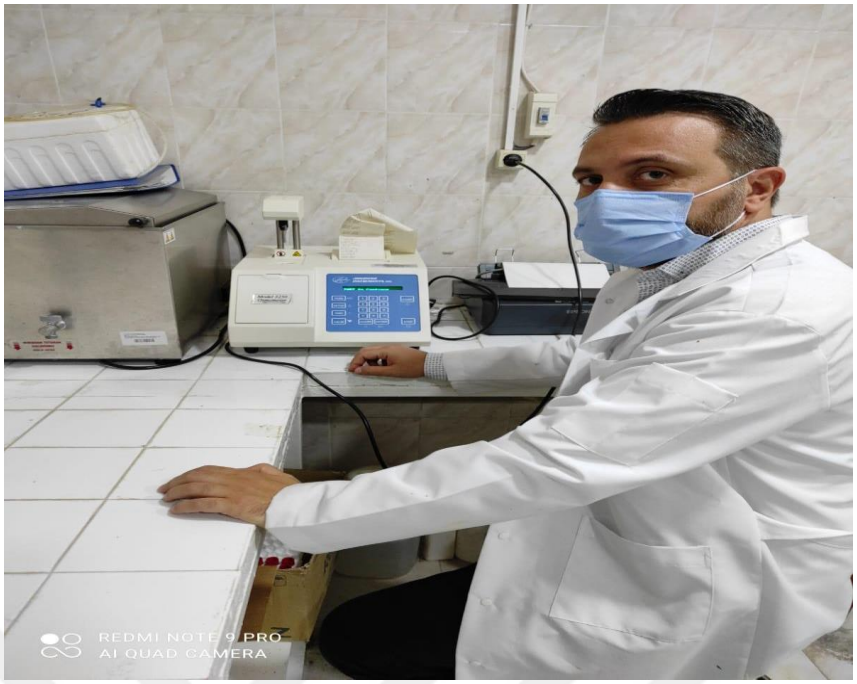
Grup 3: % 5 Metil glikol+ 50 mM sükroz (234 µl glukoz+15µl Metilglukol+15µl sükroz+36 µl y.sarısı)+100µl sperma

Kontrol Grup 4: % 10 DMSO (234 µl glukoz+30µl DMSO +36µl y.sarısı)+100µl sperma

Kontrol Grup 5: % 10 Metanol (234 µl glukoz+30 µl Metanol+36µl y.sarısı)+100µl sperma

Kontrol Grup 6: % 10 Metilglikol (234 µl glukoz+30µl Metilglikol+36µl y.sarısı)+100µl sperma

Kontrol Grup 7: 100 mM sükroz (234 µl glukoz+30µl sükroz+36µl y.sarısı)+100µl sperma, şeklinde hazırlanmıştır.



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan kriyoskopik osmometre cihazı

3.2.4. Spermaların dondurulması ve çözündürülmesi sonrası analizi

Sperma sulandırıldıktan sonra 4 °C 10 dakika ekilibrasyona tabi tutulmuştur. Spermayı dondurma işlemi; bir strafor içindeki sıvı azot yüzeyinden 5-7 cm üzerinde, sıvı azot buharında 12 dk tutularak dondurulması ve azot tankı içinde (-196 °C'de) muhafaza edilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2.Gruplarda donmuş sperma çözüm sıcaklık ve süreleri (Gruplar 1/3 sulandırma oranları ile test edilmiştir.)

Grup No ve Kriyoptotektan tipi	Sıcaklık (°C)	Süre (s)
Grup1 DMSO+ sükroz	40	8
Grup2Methanol+ sükroz	40	8
Grup3 Metil glikol+ sükroz	40	8
Kontrol Grup 4 DMSO	40	8
Kontrol Grup 5 Metanol	40	8
Kontrol Grup 6 Metilglikol	40	8
Kontrol Grup 7 Sükroz	40	8

Spermalar 2 hafta sıvı azotta saklandıktan sonra çözündürülerek analizleri yapılmıştır. Gruplarda dondurulan spermalar, 40 °C'de 8 sn tutularak çözündürülmüştür (Çizelge 3.2) (Kopeika ve ark., 2007). Çalışmamızda, 0,5 mL'lik payetlerde (IMV, France) dondurulan örneklerden, 3'er tanesi çözündürme sonrası analizde, 3'er tanesi fertilizasyon denemesinde olmak üzere toplam 6 payet kullanılmıştır (n=6 payet). Deneme ayrı günlerde iki tekrar ile yapılmıştır. Sperma muayeneleri ışık mikroskobunun 40'lık büyütmede altında 4 °C ortamda yapılmıştır.

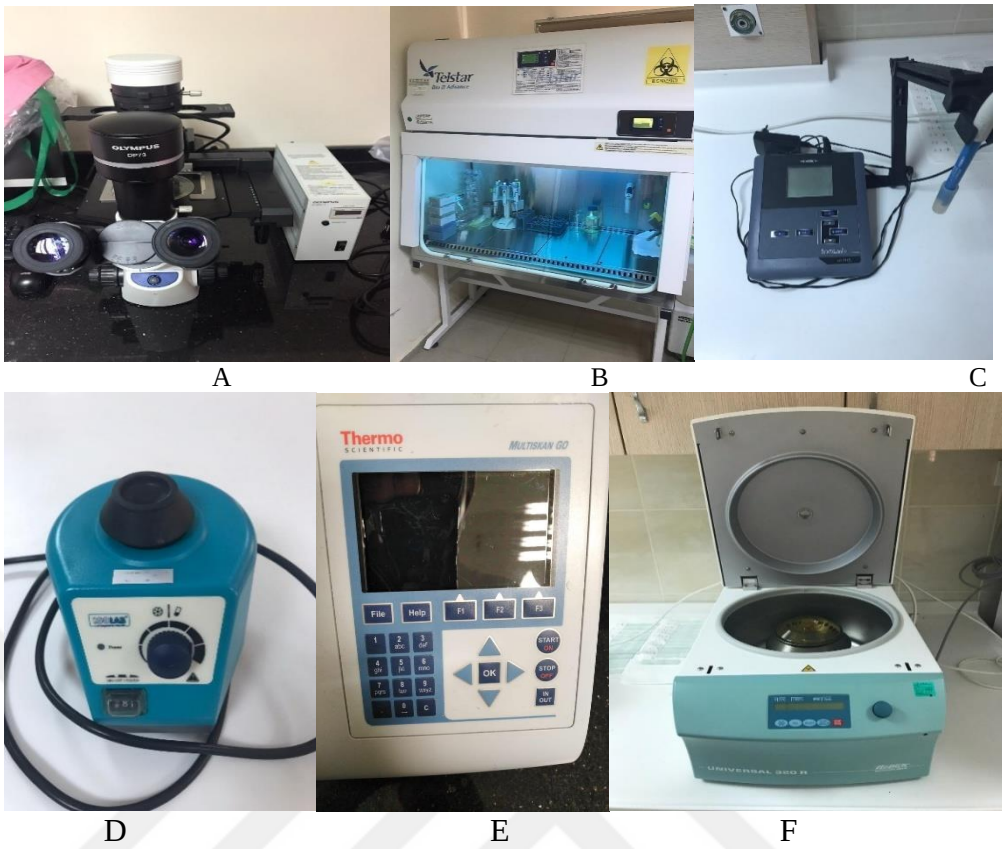
1-Çözündürme sonrası, 5µL donmuş-çözündürülmüş sperma 25µL aktivasyon solusyonu (%0.29 NaCl) olacak şekilde lam üzerinde karıştırılıp, lamel kapatıldıktan sonra spermaların motilite analizleri yapılmıştır (Tekin, 1994).

2- Sükroz içeren sulandırıcılarının spermatozoon DNA hasarı üzerindeki koruyucu etkileri

- Hücre içi 8-OHdOG ELISA yöntemiyle
- DNA hasar seviyesi comet assay yöntemi incelenmiştir.

3.2.5. Biyokimyasal analizler için sperma örneklerinin hazırlanması

Bu çalışmada tüm guruplardan eşit miktarda sperma örneği alındı. Alınan sperma örnekleri 1/10 oranında PBS ile dilüle edildikten sonra homojenizatörle (Qiagen, TissueLyserLT) homojenize edilerek santrifüj edilerek süpernatantlar elde edilmiştir. Spermaların laboratuar analizlerinde kullanılan bazı cihazlardan örnekler Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4. Kullanılan bazı cihazlar (A. İnverter mikroskop, B. Kabin, C. Ph metre, D. Vorteks, E. Eliza okuyucu F. Santrifuj)

3.2.6. Balık spermasında 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHDG) ölçümü

Sükroz uygulamaları sonucu sperma örnekleri 3500 rpm 10 dksantirfüj edildikten sonra elde edilen sperma örnekleri 1ml soğuk PBS eklendikten sonra homojenizatörle (qigen tissue lyser) homojenize edilmiştir. Homojenat 10.000 rpm 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant elde edilmiştir. Elde edilen süpernatant örnekleri 8-OHdG ELİSA kit (BT-LAB) yöntemine göre analiz edilmiştir.

Kısaca; bu yöntemde çalışılacak olan örnekler (Sperm süpernatant) en az 2 saat öncesinde oda sıcaklığına çıkarılmıştır. 96 kuyucuklu playte numuneler eklenmeden önce yıkanmış ve standart/sample (100 µl) eklenerek 37°C'de 90 dk inkübe edilmiştir. Örnekler uzaklaştırılarak biotinylated detection antibody (100 µl) eklenip 60dk inkübe edilmiştir. Yıkandıktan sonra tüm kuyucuklara 100 µl SABC working solution (HRP) eklenmiştir. 30dk inkübasyondan sonra 90 µl TMB substrate

eklenerek görünür bir renk değişimi gözlendiğinde stop solution (50 µl) eklenmiş ve sarı renk oluşumu gözlenmiştir. 450 nmmikropleytreaderda (thermoGo) (OD450 nm)'de optik yoğunluk (OD) değeri belirlendi ve veriler değerlendirilmiştir.

3.2.7. Comet Assay yöntemi ile genotoksisite tayini

Comet assay; hızlı, basit ve hücresel düzeyde uygulanması kolay, genotoksisite ve olası endojen DNA hasarını iyi tanımlayan bir tekniktir. Bu teknik, hasarlı DNA'nın elektroforez uygulanarak çekirdekten salınması ilkesine göre uygulanır. DNA hasarlı yapıya sahipse, uygulanan elektrik yükü sayesinde nukleus anoda doğru ilerlerken floresan bağlayıcı bir özellik gösteren etidyum bromid ile boyandığı için hücreler, kuyruklu yıldıza (comet) benzer şekilde uzayan bir yapı göstermektedir. Bu çalışmada; Singh ve ark. (1988) tarafından geliştirilen comet metodu modifiye edilerek uygulanmıştır.

1-%1,0 'lik NMP agaroz jel hazırlanarak 100 µl jel kenarları buzlanmış lam üzerine yaydırılarak, üzeri lamel ile kapatıldıktan sonra buzdolabında (2-4 ^{o}C) 5 dkinkübe edilmiş ve lamelleri kaldırılmıştır.

2-Hazırlanan lamlar nemli kutularda bekletilip PBS (Fosfat buffered saline) ile mm^3'te 10^4 hücre şeklinde karıştırılmış sperma hücrelerinden 10 µl alınıp, 80 µl %0,7'lik low melting point (LMP) agaroz jel (37 ^{o}C) ile karıştırılmıştır. Akabinde, ilk tabaka üzerine tabakalandırılıp, lamel ile kaplanmış ve buzdolabında donması için 5 dk bekletilmiştir.

3-Agaroz jel kuruduktan sonra slaytlar ortalama bir saat yüksek yoğunlukta tuz ve deterjan ihtiva eden soğuk lizis solüsyonunda (100 mM EDTA, 2,5 M Sodyum klorid, 10 mM Trizmabase) bekletilerek hücre ve çekirdek zarı lizise uğratılmıştır. Lizis buffer'a çalışmadan hemen önce %1 Triton X-100 ve %10 DMSO karıştırılıp soğutulduktan sonra kullanılmıştır.

4-Elektroforez uygulamasından önce DNA zincirlerinin tam olarak ayrışması için slaytlar alkali elektroforez tamponu kullanılmıştır (1mM EDTA, 300 mM sodyum hidroksit ve pH= 13). Akabinde, 30 dkinkübasyona bırakıldıktan sonra 300 mA, 17 volt'luk elekriksel alanda ve 5–25 °C'de 30 dakika yürütülmüştür.

5-Elektroforezde yürütme biter bitmez alkali tampon solüsyonunu içerikten ayırıp almak için slaytlar 3 dk süre ile 3 tekerrür olarak nötralizasyon tamponunda (0.4 M Tris-HCL, pH 7.5) yıkanmıştır.

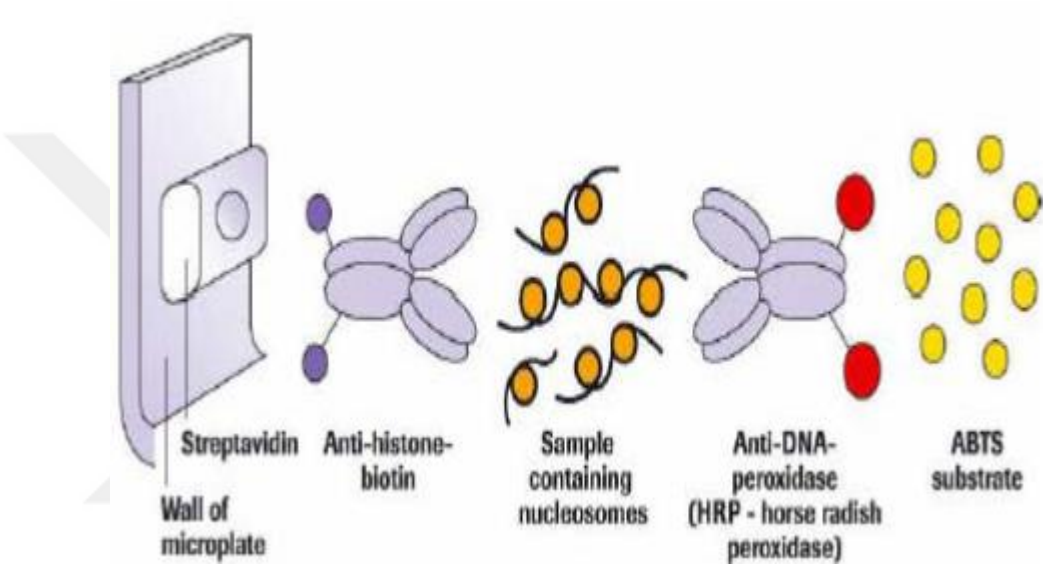
6-Nötralizasyon işlemi tamamlandıktan sonra boyama işlemine geçilmiştir. Boyama işlemi floresan özellik gösteren etidyum bromür boyası (5 µg/ml) ile yapılmış, tüm slaytlar için ayrı ayrı olacak şekilde 80µL boya slayt üzerine damlatılarak lamelle kapatılmıştır. Son olarak, 20 büyütmeli floresan mikroskop (Nikon, Tokyo, Japonya) ile (Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 580 nm) 50 adet DNA vizüel olarak incelenmiştir.

7-Bu yöntemde DNA göçü vizüel olarak değerlendirildi. Seviyesine göre hasarlı DNA'lar beş kategoriye ayrılmıştır. Hasarsız DNA'lar kategori 0, en fazla hasar olan DNA'lar ise kategori 4 olarak sınıflandırılmıştır. İncelenen 50 hücreye ait DNA'lardaki hasar seviyeleri kategorize edildikten sonra elde edilen değer 2 ile çarpılıp, değerlendirme 100 üzerinden yapılmıştır.

3.2.8. Balık spermasında ELISA ile apoptozis tayini

Sperma örneklerindeki apoptoz analizleri ticari olarak alınan kit (Hücre Ölümü Tespiti ELISAPLUS, Roche) kitinde uygulanmıştır. Uygulama metodu olarak Vermes ve ark. (1995) yöntemi kullanılmıştır. Yöntem şu şekildedir: "CDD (Cell Death Detection^{ELISA} Plus) kiti hücrelerin sitoplazmik lizatlarındaki mono- ve oligo-nükleozom içeriklerini karşılaştırarak örneklerarası oransal apoptoz değerlendirmesine olanak sağlar. Kitin içeriğindeki Anti-Histon-Biyotin antikoru histon proteinleri üzerinden, apoptoz sırasında oluşan, sitoplazmadaki fragmante DNA parçalarına ve streptavidin kaplı plağa bağlanır. Böylece mono- ve oligo-nükleozomlar plak

yüzeyine bağlanmış olur. Anti-DNA-Peroksidaz antikoru ise plağa bağlanan fragmante DNA'ya bağlanır. ABST (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]- diammonium salt) susbstratı aracılığıyla Anti-DNA-Peroksidaz aktivitesi kolorimetrik olarak tayin edilebilir böylece her bir örnekteki mono-, oligo-nükleozom miktarı belirlenmiş olur" (Vermes, 1995; Aktaran: Özkaya, 2009). Çalışmamızda kullanılan CDD ELISA yönteminin prensip şeması Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5. CDD ELISA yönteminin prensibinin şematik gösterimi (Vermes, 1995)

3.2.9. Kit içeriği

Kullanılan kitin içeriği Özkaya (2009) çalışmasında şu şekilde ifade etmiştir. "Anti-Histon-Biyotin (immünoreaktif bileşeni): liyofilizat 450µL bidistile su içerisinde 10 dakika boyunca karıştırılarak çözülür. Anti-DNA-POD (immünoreaktif bileşeni): liyofilizat 450µL bidistile su içerisinde 10 dakika boyunca karıştırılarak çözülür. Pozitif kontrol: liyofilizat 450µL bidistile su içerisinde 10 dakika boyunca karıştırılarak çözülür. ABTS tabletleri (substrat): Örnek sayısına göre 1, 2 ya da 3 tablet; 5, 10 ya da 15 mL substrat tamponu içerisinde çözülür. ABTS stop solüsyonu (kolorimetrik tepkimenin durdurulması): solüsyon berrak hale gelene kadar karıştırılarak 37°C'ye kadar ısıtılır. İnkübasyon tamponu (antikor bağlanmalarının gerçekleştiği ortam): kullanıma hazır hale gelir. Lizis tamponu (sitoplazmik hücre

lizatınıneldesi): kullanıma hazır Substrat tamponu (substrat çözgeni): kullanıma hazır hale gelir".

3.2.10. Ön işlemler

Uygulamadan önceki işlemler aşağıdaki şekildedir. "İmmünoreaktifin hazırlanması: İmmünoreaktif, 1:20 hacimde Anti-DNA-POD, 1:20 hacminde Anti-Histon-Biyotin ve 18:20 hacminde inkübasyon tamponunun karıştırılması ile elde edilen solüsyon stoklanmadığından, denemeden hemen önce hazırlanmış ve uygulanmıştır" (Özkaya, 2009).

3.2.11. Deney basamakları

Çalışma Özkaya (2009)'nin bildirdiği yöntemler modifiye edilerek uygulanmış ve deney basamakları aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

- Dondurulup çözündürülen spermatozoa Neubauer lamında sayılmıştır.
- 24'lü plakın her bir kuyucuğa $5x10^4$/500µL spermatozoa bırakılır. Her parametre için üç tekerrür yapılmıştır.
- Hücrelerin sabitlenmesi için plak 24 saat inkübe edilmiştir.
- Kuyucuklardaki hücre dışı sıvılar alınmış, 100 ve 200 µg/ml bitki ekstreleri ile 100 µg/ml kemoterapik maddeler içeren deney ortamları ilave edilmiştir.
- Plaklar 48 saat inkübatörde bekletilmiştir.
- Hücreler ependorf tüplere alınmıştır.
- 200gde 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Akabinde süpernatanlar özenle uzaklaştırılmıştır.
- Pelletler 200er µLlizis tamponunda süspanse edilmiştir.
- Lizisin için plak 26 derecede 30 dk bekletilmiştir.
- 200g de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Sitoplazma yapısındaki materyalleri ihtiva eden süpernatandan 20 µLözenle streptavidin kaplı plağa aktarılmıştır. Bu esnada plak özenle alınarak vakit geçirilmeden analiz edilmiştir.

- Akabinde, 20'şer µL pozitif kontrol, negatif kontrol madde içermeyen kuyucuklardan hücre lizatlarının süpernatanları ve kör (inkübasyon tamponu) streptavidin kaplı plağa aktarılarmış ve örnekler kuyucuğun tam ortasına gelecek şekilde pipetleme işlemi yapılmıştır.
- Her bir kuyucuğa 80'er µL immünoreaktif eklenmiştir.
- Plak yapışkan koruyucu ile kaplanmıştır.
- Daha sonra, oda sıcaklığında 300 rpm de karıştırılarak 2 sainkübasyona tabi tutulmuştur.
- Kuyucukların içerisindeki solüsyon özenle ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- Kuyucuklar 250-300µL inkübasyon tamponu ile triplike edilmiştir.
- Kuyucukların içerisindeki solüsyon dikkatlice çekilip atılmıştır.
- Bütün kuyucuklara 100'er µL ABST çözeltisinden ilave edilmiştir.
- Plak, yeterli renk oluşumu sağlanana kadar 250rpm'de inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu süre yaklaşık olarak 15-20 dk sürmüştür.
- Her bir kuyucuğa 100er µL ABSR stop çözeltisinden ilave edilmiştir.
- Plak kuyucuklarının absorbans değerleri plak okuyucuda 450 nm dalga boyuna karşı okunmuştur.
- Negatif kontrolün zenginleşme faktörü 1 olarak kabul edilmiş ancak, diğer örneklerin zenginleşme faktörü absorbans değerlerinden bağımsız olarak hesaplanmıştır.

3.2.12. Hesaplama yöntemi

Elde edilen sonuçların hesaplanmasında Özkaya (2009)'dan yararlanılmıştır. Bu hesaplama yöntemi aşağıda ifade edildiği gibi uygulanmıştır. "Tüm absorbans değerlerinden köre ait absorbans değerlerinin ortalaması çıkartılarak asıl absorbans değerleri elde edilir. Her bir örnek için elde edilen üçlü asıl absorbans değerlerinin ortalaması alınarak ortalama absorbans değerleri (ABS ortalama) elde edilir. Örneklerin ortalama absorbans değerleri, negatif kontrol hücrelerinden elde edilen ortalama absorbans değerine bölünür ve böylece negatif kontrol hücrelerine karşı oransal absorbans oranları elde edilir. Bu rölatif absorbans değeri zenginleştirme

faktörü olarak adlandırılır ve her bir örnekteki mono-, oligo-nükleozom miktarının kontroldekine oranını ifade eder".

"Zenginleşme Faktörü = $ABS_{ortalama}$ (her bir örnek) / $ABS_{ortalama}$ (kontrol)"

3.2.13. Fertilizasyon işlemi

Dondurulmuş-çözdürülmüş ve taze sperma örnekleri fertilizasyonda kullanılmıştır. Her tür için 4-5 yaşındaki 3 dişi balıktan sağım yoluyla elde edilen yumurta petri kutusuna yaklaşık 100 adet olacak şekilde aktarılmıştır. Petri kutusuna aktarılan 100 adet yumurta için 0.5ml'lik payetlerden bir adet olmak üzere toplam 6 adet dondurulmuş sperma 6 adet dölleme işleminde kullanılmıştır. Fertilizasyonda; deneme gruplarında kullanılan sperma miktarları ve yumurta sayısı, kontrol grubu içinde aynen kullanılmıştır. Sperma ve yumurtalar 10 saniye süreyle karıştırıldıktan sonra üzerine 1 ml göl suyu eklenerek, 30 saniye süre ile karıştırılmıştır.

Ardından 10mL göl suyu daha ilave edip 2 dakika boyunca tekrar karıştırılmıştır. 0.5 göz açıklığına sahip 10 cm çaplı PVC sepete yerleştirilecek olan yumurtalar 26°C'de hafif akıntılı akvaryum ortamında inkübe edilmiştir. Fertilizasyon oranı, şeffaf yumurtaların (canlı) toplam yumurtalara oranı olarak ifade edilmiştir (Lahnsteiner ve ark., 2000).

3.2.14. İstatistiksel analiz

Taze spermanın spermatolojik özelliklerinin (spermatozoa yoğunluğu, spermatozoa motilite oranı ve süresi) ortalama ve standart sapma (±Sd) değerleri belirlenmiştir. Grupların sonuçları iki tekrar ile elde edilmiştir. Tekrarlar iki farklı günde, aynı materyallerle aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Spermatozoa motilite yüzdeleri arcsinus karekök çevrimine tabi tutulmuştur. Normal dağılım testi uygulanmıştır. Tüm denemelerden elde edilen, motilite oran ve süreleri, apoptotik, anti-apoptotik etkiler, DNA hasar sonuçları ve fertilizasyon oranları, SPSS 14.0paket programında değerlendirilmiştir. Verilerin analizi varyans analizi Anova (One-

way Anova) yapılmış, istatistiki öneme sahip sonuçlar, Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanarak gruplar arası fark belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Sperma Kalitesinin Değerlendirilmesi

4.1.1. Spermatozoa yoğunluğu

Doğadan doğal yollarla elde edilen *S. triostegus* (n=5) spermalarında ortalama spermatazoa yoğunluğunun (20,80±3,20x10^9spermatazoa/mL) olduğu tespit edilmiştir.

4.1.2. Seminal plazma ve sperma sulandırıcının pH'sı ve osmotik basıncı

Doğadan doğal yollarla elde edilen *S. triostegus* spermasının pH'sı 8,20 ve santrifüjle ayrıştırılan seminal plazma pH'sı 8,00olarak tespit edilmiştir. Taze spermaların ozmotik basıncı 335,80±19,66 ve santrifüjle ayrıştırılan seminal plazma ozmotik basıncı 354,20±22,19 olarak tespit edilmiştir.

4.1.3. Spermatozoa motilite oranı

Taze spermaların ön muayenesinde ortalama spermamotilite oranı %97,96±2,51 s olarak tespit edilmiştir. Dondurulan spermalarda, her grup için tespit edilen çözüm sonrası ortalama spermatozoa motilite oranı Çizelge4.1.'de gösterildiği şekilde kontrol ve deneme gruplarında %10,00±4,50ile 25,00±4,04 arasında değişmiştir. Kontrol ve deneme grupları karşılaştırıldığında, yalnız DMSO içeren sperma sulandırıcısı %30,00±3,51 ile en yüksek spermatozoa motilite oranı göstermiştir ($P<0,05$). En düşük motilite oranı (%10,00±4,50) sükroz kontrol grubunda belirlenmiştir ($P<0,05$). Sükrozve DMSO içeren sulandırıcılar hariç Methanol ve Metilglikole Sükroz ilave edilerek oluşturulan sulandırıcılarda kontrol gruplarıyla benzer motilite oranları elde edilmiştir (Şekil 4.1.)

Çizelge 4.1. Dondurulan *S.triostegus* spermalarının çözüm sonrası motilite oranları

Sulandırma Oranı	Gruplar	Motilite Oranı (%) Ortalama± standart sapma (±Sd)
1/3	Taze sperma	97,96±2,51[a]
	Sükroz	10,00±4,50[d]
	DMSO	30,00±3,51[b]
	DMSO+Sükroz	25,00±4,04[c]
	Methanol	15,00±2,00[d]
	Methanol+Sükroz	15,00±3,51[d]
	Metilglikol	20,00±7,02[cd]
	Methilglikol+Sükroz	20,00±5,50 [cd]

a,b,c:Farklı harf taşıyan grupların ortalamaları (N=6) birbirlerinden istatistiki yönden önemli (P<0,05) farklılıklar göstermiştir.



Şekil 4.1. Dondurulan *S. triostegus* spermalarından çözüm sonrası yüzde motilite oranı
a,b,c:Farklı harf taşıyan grupların ortalamaları (N=6) birbirlerinden istatistiki yönden önemli (P<0,05) farklılıklar göstermiştir.

4.1.4. Spermatozoa motilite süresi

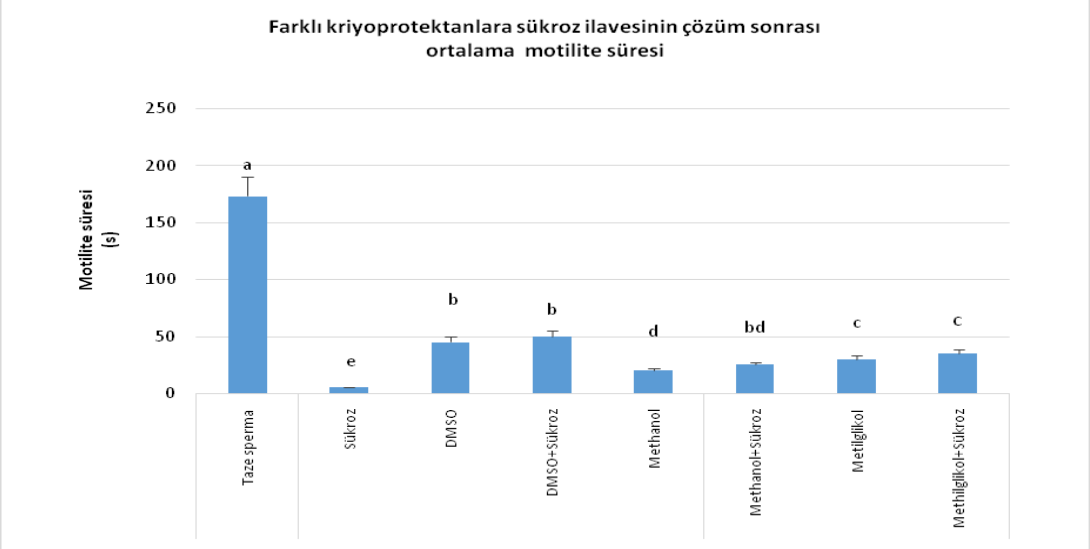
Taze spermaların ön muayenesinde ortalama spermatozoa motilite süresi ise 173,33±25,16 s olarak tespit edilmiştir. Farklı kriyoprotektan içeren glikoz sulandırıcısı ile dondurulan spermalarda, her grup için tespit edilen çözüm sonrası ortalama spermatozoa motilite süreleri Çizelge 4.2'te gösterilmiştir. Kontrol gruplarıyla deneme gruplarını karşılaştırıldığında, DMSO kontrol grubu (45,00±6,50 s) ve DMSO±Sükroz (50,00±10,51 s) katılan sulandırıcı grubunda motilite süreleri önemli (P<0,05) şekilde yüksek bulunmuştur. Sükroz kontrol grubu diğer gruplar

içinde en düşük motilite süresine (5,00±1,52 s) sahip olmuştur (P<0,05). Methanol ile Methanol+Sükroz ve Metilglikol ile Methilglikol+Sükroz şeklinde olan kontrol ve deneme grupları birbirleriyle benzerlik göstermiştir.

Çizelge 4.2. Dondurulan *S. triostegus* spermalarının çözüm sonrası motilite süresi değerleri

Sulandırma Oranı	Gruplar	Motilite Süresi (s) Ortalama± standart sapma (±Sd)
	Taze sperma	173,33±25,16 [a]
1/3	Sükroz	5,00+1,52[d]
	DMSO	45,00+6,50[a]
	DMSO+Sükroz	50,00+10,51[a]
	Methanol	20,00+5,48[c]
	Methanol+Sükroz	25,00+3,60[bc]
	Metilglikol	30,00+4,02[b]
	Methilglikol+Sükroz	35,00+4,56[b]

a,b,c:Farklı harf taşıyan grupların ortalamaları (N=6) birbirlerinden istatistiki yönden önemli (P<0,05) farklılıklar göstermiştir.



Şekil 4.2. Dondurulan *S. triostegus* spermalarından çözüm sonrası motilite süreleri. a,b,c: Farklı harf taşıyan grupların ortalamaları (N=6) birbirlerinden istatistiki yönden önemli (P<0,05) farklılıklar göstermiştir.

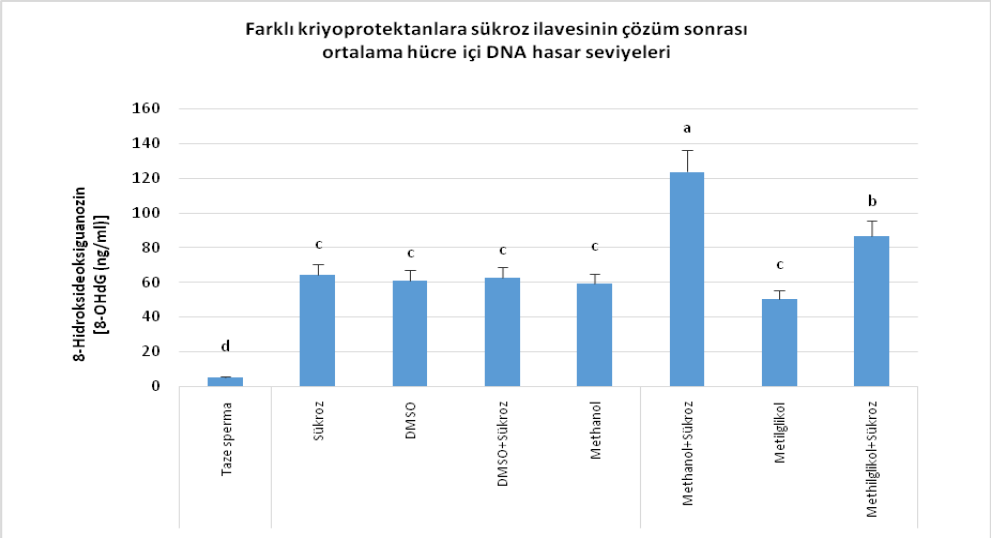
4.1.5. Balık spermasında 8-hidroksideoksiguanozin (8-ohdg) incelenmesi

Dondurulan spermalarda, her grup için tespit edilen çözüm sonrası ortalama hücre içi DNA hasar seviyeleri aşağıdaki Çizelge4.3.'te gösterilmiştir. Tüm gruplarda DNA hasarı seviyesi 50,08±0,82 ile 123,86±4,08ng/ml arasında değişmiştir. Taze spermada 5,27±1.42 ng/ml belirlenmiştir. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında Methanol+Sükroz grubu 123,86±4,08 ng/ml ile en yüksek DNA hasarı göstermiştir (P<0,05). Metilglikol kontrol grubu hariç, DMSO, Methanol ve Sükroz kontrol gruplarında en düşük DNA hasarı (59,13±0,77 ile 60,80±1,11 arasında değişmiştir) elde edilmiştir (P<0,05). DMSO+Sükrozgrubu bu kontrol gruplarıyla benzerlik göstermiştir.

Çizelge 4.3. Dondurulan *S. triostegus* spermalarının çözüm sonrası hücreiçi DNA hasar seviyeleri

Sulandırma Oranı	**Gruplar**	**8-OHdG (ng/ml) Ortalama± standart sapma (±Sd)**
1/3	Taze sperma	5,27±1,42^{d}
	Sükroz	64,24±1,57^{c}
	DMSO	60,80±1,11 ^{c}
	DMSO+Sükroz	62,55±1,45 ^{c}
	Methanol	59,13±0,77^{c}
	Methanol+Sükroz	123,86±4,08^{a}
	Metilglikol	50,08±0,82^{c}
	Methilglikol+Sükroz	86,86±2,45^{b}

a,b,c:Farklı harf taşıyan grupların ortalamaları (N=6) birbirlerinden istatistiki yönden önemli (P<0,05) farklılıklar göstermiştir.



Şekil 4.3. Dondurulan S. triostegus spermalarından çözüm sonrası hücre içi DNA hasar seviyeleri a,b,c:Farklı harf taşıyan grupların ortalamaları (N=6) birbirlerinden istatistiki yönden önemli (P<0,05) farklılıklar göstermiştir.

Şekil 4.3.'te görüldüğü gibi en yüksek hücre içi DNA hasar seviyesi methanol+sükroz medyumu kullanılan sperma örneklerinde bulunmuştur. Bu en yüksek hasar seviyesini methilglikol+sükroz medyumu uygulanan sperma örnekleri takip etmiştir. DMSO+sükroz, ethanol ve methilglikol kullanılan medyumlarda ise en düşük hasar seviyeleri belirlenmiştir.

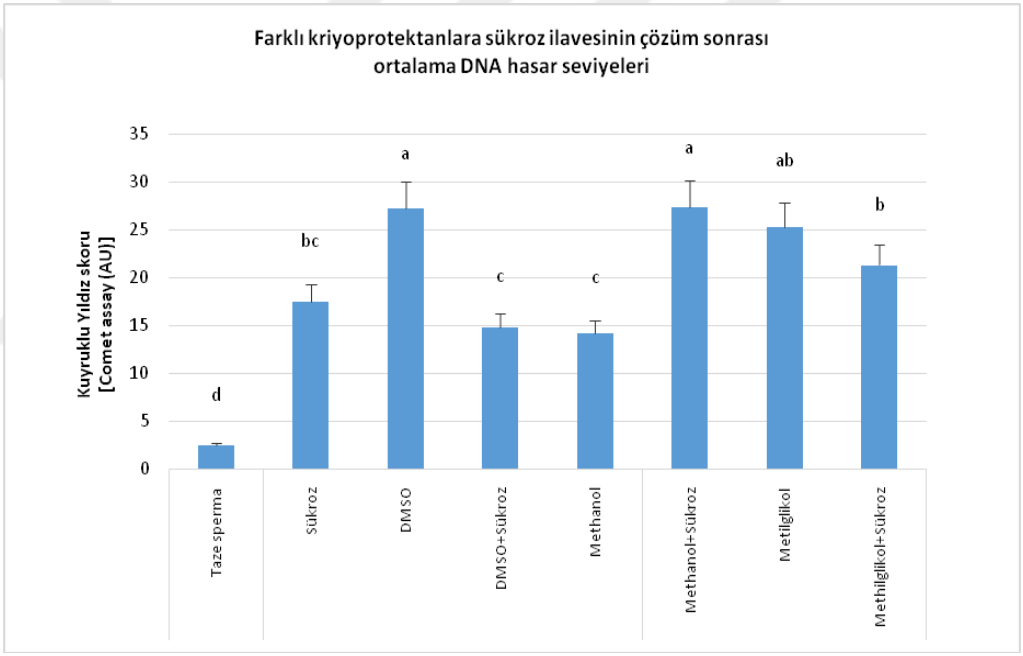
4.1.6. Comet Assay yöntemi (kuyruklu yıldız deneyi) ile genotoksisite tayini

Dondurulan spermalarda, her grup için kuyruklu yıldız deneyi ile tespit edilen çözüm sonrası ortalama DNA hasarı değerleri aşağıdaki Çizelge 4.3.'te gösterilmiştir. Kontrol ve deneme gruplarında Comet Assay Yöntemi ile DNA hasarı seviyeleri 14,15±0,85 ile 27,43±3,45 AU arasında değişmiştir. Taze spermada 02,47±1,60 AU olmuştur. Kontrol gruplarından DMSO ve metilglikol de en yüksek, sükroz ve methanol ise en düşük DNA hasarı seviyeleri tespit edilmiştir (P<0,05). DMSO+sükroz deneme grubu DMSO kontrol grubundan önemli düzeyde düşük DNA hasarına sahipken, aksine methanol+sükroz deneme grubu methanol kontrol grubundan yüksek olmuştur (P<0,05). methilglikol+sükroz ile metilglikol deneme grubu benzer DNA hasarı seviyelerine sahip olmuştur.

Çizelge 4.4. Dondurulan *S. triostegus* spermalarının çözüm sonrası DNA hasar seviyeleri (Comet Assay)

Sulandırma Oranları	Gruplar	Comet Assay (AU) Ortalama± standart sapma (±Sd)
	Taze sperma	02,47±1,60 ^{d}
1/3	Sükroz	17,53±0,75^{bc}
	DMSO	27,30±3,40^{a}
	DMSO+Sükroz	14,82±1,20^{c}
	Methanol	14,15±0,85^{c}
	Methanol+Sükroz	27,43±3,45^{a}
	Metilglikol	25,35±2,35^{ab}
	Methilglikol+Sükroz	21,33±1,15^{b}

a,b,c:Farklı harf taşıyan grupların ortalamaları (N=6) birbirlerinden istatistiki yönden önemli (P<0,05) farklılıklar göstermiştir.



Şekil 4.4. Dondurulan *S.triostegus* spermalarından çözüm sonrası DNA hasar seviyeleri (Comet assay). a,b,c:Farklı harf taşıyan grupların ortalamaları (N=6) birbirlerinden istatistiki yönden önemli (P<0,05) farklılıklar göstermiştir

4.1.7. Balık sperm hücresinde ELISA ile apoptozis tayini

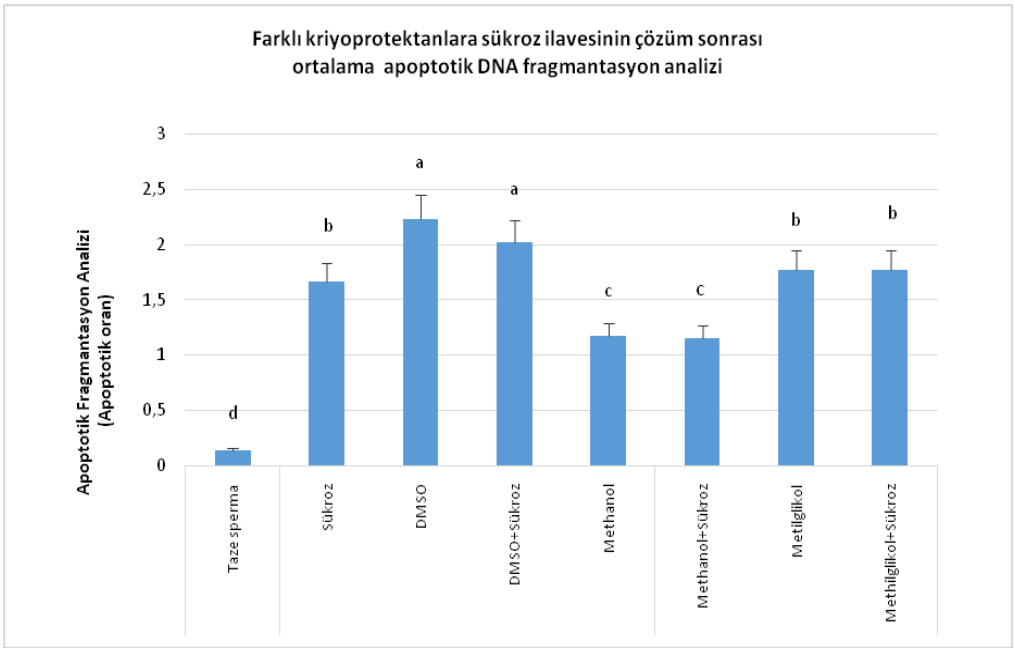
Dondurulan spermalarda, her grup için tespit edilen çözüm sonrası ortalama apoptotik DNA fragmantasyon analizi değerleri aşağıdaki Çizelge 4.4.'da gösterilmiştir. Gruplarda apoptotik DNA fragmantasyonu 1,15±0,10 ile 2,23±0,13 AR arasında değişmiştir. Kontrol gruplarıyla deneme grupları karşılaştırıldığında

kontrol gruplarından DMSO (2.23±0.13 AR) ve deneme gruplarından DMSO+sükroz (2.02±0.12 AR) grupları en yüksek apoptotik DNA fragmantasyonuna sahip olmuştur (P<0,05). En düşük apoptotik DNA fragmantasyonu ise methanol kontrol grubunda (1.17±0.11 AR) ve methanol+sükroz (1.15±0.10 AR) deneme grubunda belirlenmiştir (P<0,05)

Çizelge 4.5. Dondurulan *S. triostegus* spermalarının çözüm sonrası apoptotik DNA hasar seviyeleri

Sulandırma Oranları	**Gruplar**	**Apoptotik Fragmantasyon Analizi (Apoptotik oran-AR) Ortalama± standart sapma (±Sd)**
	Taze sperma	0,14±0,11 [d]
1/3	Sükroz	1,67±0,23[b]
	DMSO	2,23±0,13[a]
	DMSO+Sükroz	2,02±0,12[a]
	Methanol	1,17±0,11[c]
	Methanol+Sükroz	1,15±0,10[c]
	Metilglikol	1.77±0,22[b]
	Methilglikol+Sükroz	1,77±0,22[b]

a,b,c:Farklı harf taşıyan grupların ortalamaları (N=6) birbirlerinden istatistiki yönden önemli (P<0,05) farklılıklar göstermiştir.



Şekil 4.5. Dondurulan S. triostegus spermalarından çözüm sonrası apoptotik DNA fragmantasyon analizi değerleri. a,b,c:Farklı harf taşıyan grupların ortalamaları (N=6) birbirlerinden istatistiki yönden önemli (P<0,05) farklılıklar göstermiştir.

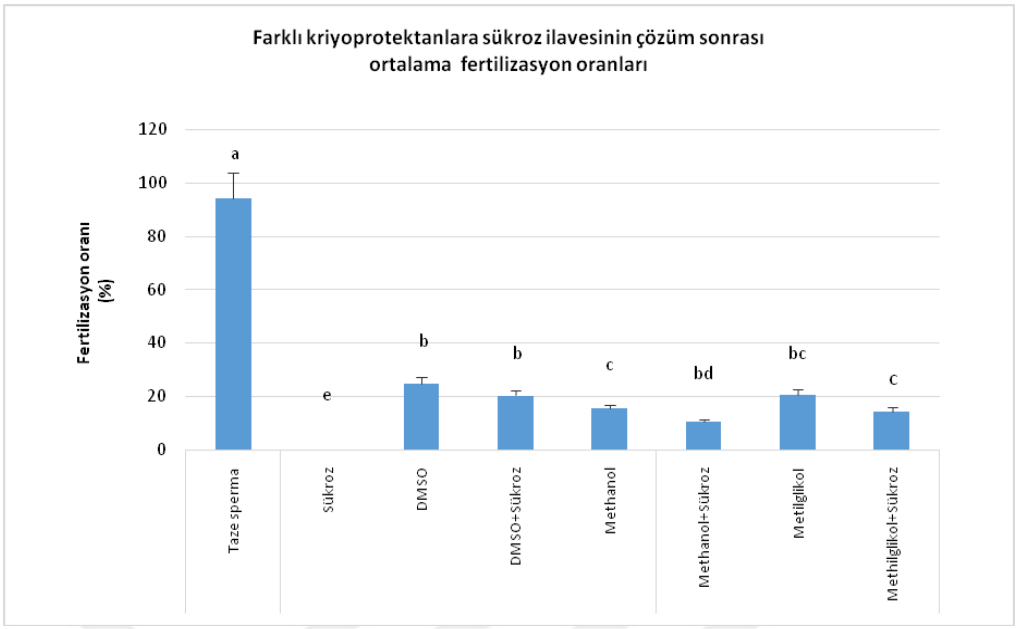
4.1.8. Fertilizasyon oranı

Dondurulan spermaların, her grup için tespit edilen çözüm sonrası ortalama fertilizasyon değerleri aşağıdaki Çizelge (4.6.)'de gösterilmiştir. Tüm gruplarda fertilizasyon oranı %0,0±0,00 ile 24,66±3,51 arasında değişti. Kontrolle deneme grupları karşılaştırıldığında en yüksek fertilizasyon oranı kontrol gruplarından DMSO (%24,66±3,51) ve metilglikol (%20,66±1,15); deneme gruplarından DMSO+sükroz (%20,33±1,52) de tespit edilmiştir (P<0,05). En düşük ise deneme gruplarından Methanol+sükroz (%10,33±0,57) da kaydedilmiştir (P<0,05). Sükroz kontrol grubunda ise fertil yumurta (%0,00±0,00) belirlenememiştir.

Çizelge 4.6. Dondurulan *S. triostegus* spermalarının çözüm sonrası fertilizasyon değerleri

Sulandırma Oranı	**Gruplar**	**Fertilizasyon Oranı (%) Ortalama± standart sapma (±Sd)**
1/3	Taze Sperma	94,29±1,12 [a]
	Sükroz	0,00±0,00[e]
	DMSO	24,66±3,51[b]
	DMSO+Sükroz	20,33±1,52[bc]
	Methanol	15,33±0,57[c]
	Methanol+Sükroz	10,33±0,57[d]
	Metilglikol	20,66±1,15[bc]
	Methilglikol+Sükroz	14,33±1,15[c]

a,b,c:Farklı harf taşıyan grupların ortalamaları (N=6) birbirlerinden istatistiki yönden önemli (P<0,05) farklılıklar göstermiştir.



Şekil 4.6. Dondurulan S.triostegus spermalarından çözüm sonrası fertilizasyon oranları. a,b,c: Farklı harf taşıyan grupların ortalamaları (N=6) birbirlerinden istatistiki yönden önemli (P<0,05) farklılıklar göstermiştir.

Spermanın dondurulması, spermanın çözüm sonrası motilitesini belirli bir oranda koruyan bir yöntemdir. Spermanın dondurulması başarısı, sperma parametrelerine ve sulandırıcının bileşimi, sulandırma, dondurma ve çözme işlemleri gibi çevresel faktörlere bağlıdır (Silva ve ark., 2011). Kriyoprezervasyon işlemlerinin sperma kalitesini bozduğu ve spermatozoa motilitesine bağlı fertilizasyonu azalttığı bilinmektedir (Li ve ark., 2006; Condorelli ve ark., 2011). Ayrıca kriyoprezervasyon çoğu durumda membran bütünlüğünün kaybına, mitokondriyal hasara, metabolik ve fonksiyonel durum değişikliklerine (Condorelli ve ark., 2011), lipid peroksidasyonuna ve sitoplazmik reaktif oksijen türlerinin artışına (ROS) vedolayısıyla DNA hasarının artmasına neden olur (Musset ve ark., 2012; Donnelly ve ark., 2000; Agarwal ve ark., 2018).

Çalışmamızda, farklı kriyoprotektanlarla birlikte sükroz ilavesiyle hazırlanan sulandırıcılarla yapılan dondurma sonrası elde edilen motilite oranları kontrolle karşılaştırıldığında, gruplar arasında önemli farklılıklar belirlenmiştir (Çizelge (4.1.), Şekil (4.1.); P<0,05). Kriyoprotektan olarak sperma sulandırıcısına sükroz katılması en düşük motilite oranına (%10,00±4,50) yol açmıştır. Hücre içerisine nüfuz edebilen kriyoprotektanlardan DMSO, Methanol ve Metilglikol'ün (Agca, 1994; Bağış ve

ark., 2002; Palasz ve Mapletoft, 1996; Sağırkaya 2001) kontrol gruplarında önerilen dozlarının, hücre içine nüfuz edemeyen (nonpermeating) kriyoprotektan olan sükroz'la (Agca, 1994; Palasz ve Mapletoft, 1996; Bağış ve ark., 2002) karşılaştırıldığında, sükrozla en düşük motilite oranı ve motilite süresi elde edilmiştir (Çizelge (4.2), Şekil (4.2)). DMSO'ya sükroz ilave edilmesi motilite oranında ve süresinde önemli düşmeye yol açarken ($P<0,05$), Methanol ve Metilglikol'e karıştırıldığında bu grupların kontrolleri ile bu iki spermatolojik özellik üzerinde benzer sonuçlar vermiştir.

Sükrozun kriyoprotektan etkisi hücre içerisine nüfuz edebilen kriyoprotektan türüne göre değişebilmektedir. Donma öncesi, ozmotik basınç farkından dolayı, spermatozoon içerisindeki sıvı kriyoprotektan maddeler ile yer değiştirmektedir. Hem spermatozoa hacmindeki farklılıklar düşürülerek hem de hücreleri içerisinde buz kristallerinin oluşumu en alt seviyeye düşürülerek dondurma işlemi sırasındaki hasarı azalttığı görülmektedir (Agca, 1994; Bağış ve ark., 2002; Palasz ve Mapletoft, 1996).

Hücre içine nüfuz edemeyen sükrozun donma boyunca şekillenen buz kristalleri oluşumunu azaltan etkilerini, hücrelerin dondurulması ve çözündürülmesi sırasında oluşan buz kristallerinin biçimlerini hücreye zararsız olacak değişikliğe uğratarak etkisini gösterirler (Palasz ve Mapletoft, 1996). DMSO için önerilenorandan düşük katılması ve bu oranın yerine farklı etkiye sahip sükroz katılması spermatozoa motilite ve motilite süresini düşürmektedir. Diğer yandan, kriyoprotektan olarak sükroz kullanılması halinde yarısı kadar DMSO katılması motilite oranı ve süresini yükseltebileceği söylenebilir. Aynı durum, Methanol ve Metilglikol içinde ileri sürülebilir.

Sükroz dışındaki kriyoprotektanlar yüksek orandasuda çözünebilme yeteneğine ve ısı etkisine sahiptir (Palasz ve Mapletoft, 1996). DMSO, Methanol ve Metilglikol bu özelliklerinden dolayı sükrozdan daha yüksek motilite oranı ve süresine sahip olmuş olabilir. Çalışmalar, spermatozoa motilite özelliklerindeki bu azalmaların, hücre içi ve hücre dışı buz kristallerinin oluşumuna, hücresel dehidrasyona ve

ozmotik şoka neden olan termal şok gibi elementlerin donma ve çözülme süreçleri sırasında zarar görmesinden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir (Stanic ve ark., 2000). Ayrıca, dondurma işleminin bir sonucu olarak, daha reaktif oksijen türleri üretildiği için lipid peroksidasyonuna (LPO) duyarlılık artar. Bu nedenle, LPO'ya duyarlı olan spermatozoon, zarlarındaki stresi tolere etmelidir (Amor ve ark. 2018).

Hücre içi veya hücre dışı buz kristallerinin oluşumu, zarlarda yarıklara neden olan ve organel fonksiyonunu etkilemektedir (Di Santo ve ark., 2012). Çalışmamızda tüm gruplarda motilite oranı % 10,00 ile 30,00 arasında değişmiştir (Çizelge (4.1), Şekil (4.1.); P<0,05). Methanol'e sükroz ilavesinin *Osphronemus goramy* balığı spermasının dondurulmasında test edildiği bir çalışmada spermanın çözüm sonrası 48. Saat'inde elde edilen sperma motilitesi (%81,62), DMSO ile dondurulduğu ve çözüm sonra 24. saatte elde edilen sperma motilitesinden (% 68,58) yüksek bulunmuştur (Abiwanto ve ark., 2012). Ayrıca *Brachydanio rerio* (%51,00) (Harvey ve ark., 1982), *Oreochromis mossambicus* (%70,00) (Harvey, 1983), tilapia balığı (%40,00-80,00) (Chao ve ark., 1987) *Cyprinus carpio* (%55,00) (Akçay ve ark., 2004) ve *Osteochiius hasseltii* (%63,33) (Sunarma ve ark., 2007) gibi farklı balık türlerinde belirlenen motilite oranları çalışma sonuçlarımızdan yüksek olmuştur. Bu söz konusu farklılık kullanılan kriyoprotektanlardan DMSO'nun sükroz ile kombinasyonunun uyumundan kaynaklanmış olabileceği gibi (Abinawanto ve ark., 2012), çalışmada kullanılan balık türü ve sperma sulandırıcısı tipinden kaynaklanmış olabilir.

Sperma kalitesini değerlendirmek için yeni testler, sperm kalitesini ve sperma dondurma protokollerinin optimizasyonununa katkılar sunar. Çok sayıda sperma dondurma yöntemi mevcuttur, ancak hepsi soğutma, dondurma ve çözmeyi içerir. Çözüldükten sonra, spermatozoa DNA bütünlüğünün çeşitli kriyoprezervasyon yöntemlerinden nasıl etkilendiğine dair tartışmalar devam etmektedir. Birçok çalışma, bu süreçlerin sperm fonksiyonuna zarar verebileceğini göstermiştir (Colás ve ark., 2009). Oksidatif stresin olumsuz sonuçları nükleer ve mitokondriyal DNA hasara yol açmasıdır. Bu nedenle reaktif oksijen türlerinin azaltılması DNA hasarını azaltabilir (Venkatesh ve ark., 2009). Daha önceki çalışma bulguları dondurma

çözündürme işlemi sırasında oluşan serbest radikaller ve Caspase 3 gibi enzimlerin aktivasyonu hücresel apoptoza ve DNA hasarına neden olmaktadır (Aitken ve ark., 1998; Grunewald ve ark., 2009; Zobeiri ve ark., 2012).

Çalışmamızda, spermatozoon DNA'sını analiz etmek için Comet analizi ve hücre içi 8-OHdG ELISA yöntemleri kullanılmıştır (Çizelge (4.3) -(4.4.), Şekil (4.3)-(4.4.); $P<0,05$). Oksidatif DNA hasarını saptamaya yönelik testlerden biri olan 8-OHdG analizi sonuçlarına bakıldığında, yalnızca Methanol ve Sükroz'un birlikte kullanıldığı sulandırıcıda ve Methilglikole Sükroz ilave edilen sulandırıcıda hasar yükselmiştir. Aynı şekilde, Comet analizinde de Methanol'e Sükroz, Methilglikol'e Sükroz ilavesinde DNA hasarında anlamlı derecede artış gözlemlenmiştir. Buna karşılık, Comet analizi sonucunda DMSO'ya Sükroz ve Methilglikol'e Sükroz ilavesinde önemli azalma tespit edilmiştir. 8-OHdG ve Comet analizi, oksidatif DNA hasarının güvenilir belirteci olarak kabul edilen yaygın yöntemlerden biridir (Shigenaga ve ark., 1994; Subash, 2016). Levrek sperm Comet analizi, taze sperm ile karşılaştırıldığında, dondurulmuş çözünmüş sperm örneklerinde önemli bir DNA parçalanması meydana geldiğini açıkça göstermiştir (Zilli ve ark., 2003).

Her iki test sonucunda DMSO+Sükroz sonuçlarının düşük DNA hasarına sebep olması bu iki kriyoprotektanın donma işlemi süresinde DNA hasarın düşük düzeyde tuttuğunu göstermektedir. Ayrıca sükrozun tek başına kullanıldığında her iki testte düşük DNA hasarına yol açtığı belirlendi. Hücre içine girebilen kriyoprotektanlar, bir maddenin donma noktasını düşürerek, sulandırıcıdaki tuzların ve çözünen maddelerin konsantrasyonunu azaltarak ve spermde buz oluşumunu azaltarak etki eder. Ayrıca, lipid çift tabakasının membran yapısını, geçirgenliğini ve stabilitesini, yüzey proteinlerinin ilişkisini ve hücresel metabolizmayı destekler (Di Santo ve ark., 2012). Hücre içine giremeyen sükrozun (Agca, 1994; Palasz ve Mapletoft, 1996; Bağış ve ark., 2002) DNA hasarını azalttığı söylenebilir. Buna karşılık, DMSO ve metilglikol'ün comet assay analizinde yüksek DNA hasarına yol açtığı belirlenirken, 8-OHdG testinde, alkol ve şekerlerin (Agca, 1994; Bağış ve ark., 2002; Palasz ve Mapletoft, 1996; Sağırkaya, 2001) düşük DNA hasarına yol açması, bunların

karışımının DNA hasarını yükseltmesi, her iki test ile daha çok çalışmalar yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

Dondurma işlemi süresince spermatozoa belirli bir noktaya kadar hücre içi kriyoprotektandan dolayı toksikayon durumunu yaşamakta ve sonrasında spermatozoa aynı ortam şartlarına çok fazla maruz kalması sebebi ile öncelikle spermatozoa motilitesinin düşüşü, sonrasında DNA hasarının ortaya çıkması ve en son aşamada ise apoptoz veya nekroz ile hücre ölümünün tetiklenmesi gerçekleşiyor olabilir. Tez çalışmamızda dondurulmuş spermalar iki DNA hasar belirleme yöntemi ile test edilmiş ve DNA yapısındaki bozulmaların oranı karşılaştırılmalı olarak gösterilmiştir.

Çalışmamızda, apoptotik spermatozoa yüzdesi, tüm deney grubunda anlamlı farklılık göstermedi (Çizelge (4.5), Şekil (4.5); $p>0,05$;). Çalışmalar, apoptoz belirteçlerinin, dondurarak saklama ve çözdürmeyi takiben spermatozoada artma eğiliminde olduğunu ortaya koymuştur. Hayvanlar üzerine yapılan çalışmalarda, kriyoprezervasyon, mitokondriyal membran potansiyeli, kaspaz aktivasyonu, membran geçirgenliği ve fosfatidilserin dışsallaştırması dahil olmak üzere apoptoz tezahürlerini arttırmıştır (Martin ve ark., 2004).

Bir başka çalışmada ise, kriyoprezervasyonun, kaspaz-3, 8 ve 9'un aktivasyonunun yanı sıra mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir (Paasch ve ark., 2004). Aktive edilmiş kaspazlar, nükleik asitler, proteinler ve lipidler olarak hedef moleküllere saldırırlar, lipid peroksidasyonu ve DNA parçalanmasına yol açarlar (Hetts, 1998). Çalışmamızda en yüksek apoptotik spermatozoa yüzdesi bakınca, etki mekanizmaları yönünde bir sonuç ortaya çıkmamıştır. Şöyleki; hücre içine girebilen bir kriyoprotektan olan DMSO ve DMSO+sükroz en yüksek apoptotik spermatozoa yüzdesine sahip olurken, yine hücre içi bir kriyoprotektan olan methanol ve methanol+sükroz ile en düşük sonuç elde edilmiştir. Sükrozla bu kriyoprotektanları eşit oranda karıştırmak önemli bir etkiye sahip olmamıştır. Tek başına sükroz ise yine yüksek apoptotik spermatozoa yüzdesinde yol açmıştır.

Bu sonuçlar kriyoprotektanların bireysel etkilerindeki farklılıklar olabileceğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda DMSO ve gliserol hücreiçi kriyoprotektan maddeler sınıfında yer almaktadır. DMSO, gliserole göre hücre içine daha hızlı diffüze olabildiğinden daha yüksek kriyoprezervatif özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Anchordoguy ve ark., 1991; Rinkes ve ark.,1992). Kriyoprotektanların hücre içine diffuzyon yeteneği yanında, suyu bağlama ve çevredeki elektrolit konsantrasyonu etkisi olabilir (Palasz ve Mapletopt, 1996; Duran ve ark., 2001). Bu etkiler hücre zarının yapısının ve kaspaz-3 gibi enzim aktivasyonunu etkilemiş olabilir (Paasch ve ark., 2004; Amor ve ark., 2018). Bu sebeple kriyoprotektanların yanında dondurma solüsyonlarına hücre hasarlarını azaltmak amacıyla sükroz, trehaloz, BSA gibi membran stabilizatörleri de katılmaktadır (Duran ve ark., 2001). Bu memran stabilizatörlerinin etkisi kriyoprotektanın çeşidine göre etkiside farklı olmaktadır.

Bu tez çalışmasında en yüksek fertilizayon DMSO, DMSO+sükroz ve Metilglikol gruplarında elde edilmiştir (Çizelge (4.6.), Şekil (4.6.); $P<0,05$). Sadece Sükroz katılan grupta ise fertil yumurta tespit edilememiştir. Spermada dondurma işlemi uzun süreli saklamalar için yapılmaktadır. Bununla birlikte, dondurma-çözme işlemleri esnasında spermatozoonlarda çeşitli hasarlar oluşabilmektedir.

Bu çalışmada olduğu gibi spermatozoa motilite oranı ve süresinde önemli düzeyde düşüş gözlenmektedir. Uygulanan bu işlemler nedeniyle donmuş spermayla fertilizasyonda olumsuzluklar yaşanmaktadır (Yang ve ark., 2010). Bu çalışmada belirlenen genel fertilizasyon oranlarının daha önceki çalışma sonuçlarından düşük olduğu görülmektedir. Aoki ve ark. (1997) medaka (*Oryzias latipes*) spermalarını dondurmada sulandırıcı olarak fetal sığır serumu ve kriyoprotektan olarak %10 dimetil sülfoksit (Me2SO) ve dimetilformamid (DMF) kullandıkları çalışmalarında, DMF ile %96-100 ve Me2SO %60 fertilizayon oranı belirlenmiş ve DMF ile yükse fertilite elde etmişlerdir. Krone ve Wittbrodt (1997) medaka balığı spermasını dondurmada sulandırıcı olarak 0,6 M sakaroz, %10 Me2SO kriyoprotektan ile %85 oranında fertilizasyon bildirmişlerdir. Yang ve ark., (2010) Medaka balığı spermalarında methanol ve 2-methoxyethanol (ME) (10%) dondurulan spermalarda

%82 fertilite elde etmişlerdir. Bu çalışma sonuçları tezçalışma bulgularından yüksek olmuştur. Buna karşılık, Hovart ve ark. (2003) Sazan balığı (*C. carpio*) spermasının DMSO (%10)-sükroz (350 mM) ile belirledikleri %21 fertilizasyon oranını, bizim sonuçlarımızla benzer bulunmuştur. Tez çalışma sonuçları ile diğer çalışma sonuçları arasındaki farklılık, muhtemelen her testteki sperm konsantrasyonundaki ve sperm sayılarındaki değişiklikten kaynaklanıyor olabilir. Yumurta ve spermatozoon oranı fertilizasyonu etkileyen önemli bir faktördür (Yang ve ark., 2010). Diğer yandan, çözündürülmüş sperma ile ilgili olarak, spermatozoa-yumurta oranı daha yüksek olmalıdır çünkü dondurma-çözülme spermatozoaların hücre yapılarına (DNA, hücre zarı, orta kısım ve flagellum) zarar vermenin yanı sıra büyük ölümlere neden olabilmekte ve böylece onları döllenme için devre dışı bırakabilmektedir (Martinez ve Ekwall., 1998).

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Literatürde farklı balık türlerinin kültüre alınarak kontrollü üretimi üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Günümüzde ise alternatif balık türlerinin spermalarının dondurma solüsyonlarının optimizasyonu çalışmaları halen yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Sunulan bu tez çalışması sayesinde;

- *S. triostegus* spermasının dondurulmasında sperma sulandırıcısına katılan Sükrozun bazı sperma parametreleri üzerine etkileri ilk defa test edilmiştir.
- Dondurulan spermalarda, çözündürme sonrasındaki etkiler aşağıda verilen parametreler ile test edilerek;
- Bazı spermatolojik özellikler,
- 2 farklı boyutta spermatozoa DNA hasarı,
- Sperm hücrelerindeki apoptotik etkileri,
- Fertilizasyon oranlarına etkisi incelenmiştir.
- Farklı kryoprotektanlarınspermatozoona etkileri, hücresel boyutta ve genetik materyale etkileri yönüyle belirlenmiştir.

5.2. Öneriler

- *S. triostegus* türü üzerinden yürütülen sperma dondurma çalışması sonrasında elde edilen verilerle, Atatürk Baraj Gölü'nde bulunan ekonomik ve ekolojik öneme sahip diğer balık türleri ve farklı su kaynaklarındaki tatlısu balıklarında sperma dondurma çalışmalarında kullanılabilir.
- Bu çalışmadan hareketle farklı kriyoprotektanlar, farklı sulandırma oranları ve farklı ilave maddeler farklı oranlarda sperma sulandırıcılarına katılarak çalışılacak türlerin spermatozoalarının dondurulabilmesi için optimum medyumlar geliştirilebilir.

KAYNAKLAR

ABINAWANTO, A., NURMAN, K. and LESTARI, R., 2012. The Effect of Sucrose on Sperm Quality of *Osphronemus goramy* Two Days Post-cryopreservation. Journal of Agricultural Science and Technology B, 2, 204-207.

AGARWAL, A., QIU, E. and SHARMA, R., 2018. Laboratory assessment of oxidative stress in semen. Arab J. Urol., 16, 77–86. https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1016/j.aju.2017.11.008

AGARWAL, N.K., 2011. Cryopreservation of Fish Semen, Himalayan Aquatic Biodiversity Conservation & New Tools in Biotechnology. Ed: Madhu Thapliyal, Ashish Thapliyal, J.P. Bhatt Transmedia Publication, 978-81-904778-3-6: 104-127.

AGCA, Y., 1994. Post-thaw survival and pregnancy rates of intact and biopsied and sexed in vitro produced bovine embryos after vitrification (Master Thesis). University of Wisconsin-Madison, Madison WI, USA.

AITKEN,R.J., GORDON, E., HARKISS, D., TWIGG, J.P., MİLNE, P., JENNİNGS, Z. and IRVINE, D.S., 1998. RELATIVE impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa Biol Reprod.1998 Nov; 59(5):1037-46. doi: 10.1095/biolreprod59.5.1037.

AL-ABOOD, A.Y., 1989. Studies on the blood haemoglobin and haematocrit of the silurid fish, *S. triostegus* in relation to weight. Riv. Idrobiol. 28: 255-259.

AL-DAHAM, N.K. and AL-SEYAB, A.A., 2001. Reproductive biology of the silurid catfish *S. triostegus* Heckel, 1843 in Lake Hammar, southern Iraq. Marina Mesopotamica 16: 47-58.

AL-HASSAN, L.A.J. and AL-SAYAB, A.A., 1994. Eye lens diameter as an age indicator in the catfish, *S. triostegus*. Pak. J. Zool. 26: 81-82.

ALAVI, S.M.H. and COSSON, J., 2006.Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality, Cell Biol. Int.30: 1–14.

AMANN, R.P., 2005. Weaknesses in reports of fertility for horses and other species, Theriogenology. 63(3): 698-715.

AMOR, H., ZEYAD, A., ALKHALED, Y., LAQQAN, M., SAAD, A., BEN ALI, H. ve HAMMADEH, M.E., 2018. Fertil ve subfertil erkeklerin spermatozoalarında donma-çözme işlemi öncesi ve sonrası nükleer DNA fragmantasyonu, mitokondriyal DNA hasarı ve standart sperm parametreleri arasındaki ilişki. Andrologia. 50(5):e12998.

ANCHORDOGUY, T.J., CECHINI, C.A., CROWEE, J.H. and CROWEE, L.M., 1991. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethylsulfoxide for phospholipid bilayer. Cryobiology, 28: 467-73.

ANZAR, M., HE, L., BUHR M. M., KROETSCH, T.G. and PAULS K.P., 2002. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flowcytometry and its relationship with fertility. Biol Reprod., 66: 354–360.17.

AOKI, K., OKAMOTO, M., TATSUMI, K. and ISHIKAWA, Y., 1997. Cryopreservation of medaka spermatozoa. *Zoo Sci.*, 14:641–644.

BABIAK, I., GLOGOWSKİ, J., LUEZYNSKI, M.J., KUCHAREZYK, D. and M., LUEZYNSKI. 1995. Cryopreservation of the milk of the northern pike. Fish Biology. 46 (5): 819-828.

BAĞIŞ, H., ODAMAN, H., SAĞIRKAYA, H. and DINNYES, A., 2002. Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos. Mol. Reprod. Dev., 61: 173-179.

BAILEY, J.L., MORRIE, A. and CORMIER, N., 2003. Semen cryopreservation success and persistent in farm species. Can. J. Anim. Sci. 83: 393- 401.

BILLARD, R., 1992. Reproduction in rainbow trout. Aquaculture, 100, 263 - 298

BOZKURT, Y., YAVAŞ, İ. and YILDIZ, C., 2016. Effect of extender supplemented with different sugar types on post-thaw motility, viability and fertilizing ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, 68, 1334.

BUCAK, M.N. ve TEKİN, N., 2007. Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki, Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 54: 67-72.

CENGİZ, E.I., ÜNLÜ, E., BASHAN, M., SATAR, A. and UYSAL, E., 2012. Effects of seasonal variations on the fatty acid composition of total lipid, phospholipid and triacylglicerol in the dorsal muscle of Mesopotamian catfish (*S. triostegus* Heckel, 1843) in Tigris River (Turkey). Turk. J. Fish. Aqua. Sci., 12, 33-39.

CHAO, N.H., CHAO, W.C., LIU, K.C. and LIAO, I.C., 1987. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation, J. Fish Biol. 30, 107-118.

CHECK, M.L., CHECK, J.H. and LONG, R., 1991. Detrimental effects of cryopreservation on the structural and functional integrity of the sperm membrane, Arch. Androl. 27(3): 155-60.

CHENG, S., SHENG, Z., ZHU, J-Q. and WU, X.F., 2016. Effects of trehalose, bovine serum albumin, and sucrose, on the integrity of the plasma membrane of *Pseudosciaena crocea* semen after cryopreservation. Isr. J. Aquacult.-Bamidgeh,68. 1219.12 pages.

COAD, B.W., 2014. Review of the Freshwater Catfishes of Iran (Order Siluriformes). Iran. J. Ichthyol. 1: 218-257.

COLÁS, C., JUNQUERA, C., PÉREZ-PÉ, R., CEBRİÁN-PÉREZ, J.A. and MUİÑO-BLANCO, T., 2009. Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. MicroscRes Tech.72(8): 566-572.

CONDORELLI, R.A., LA, VIGNERA, S., DI, BARI, F., UNFER, V. and CALOGERO, A.E., 2011. Effects of myoinositol on sperm mitochondrial function in-vitro. Eur Rev Med Pharmacol Sci., 15(2), 129-34. https://www.europeanreview.org/article/884

CURRY, M.R., 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. Rev. Reprod. 5: 46-52.

DAWOOD, A.H., 1997. Food habit of *S. triostegus* Heckel, 1843 (Pisces, Siluriformes) from Al-Hammar Marsh, southern Iraq – Marina Mesopotamica 12: 75-85.

DE LEEUW, F.E., CHEN, H.C., COLENBRANDER, B. and VERKLEIJ, A.J., 1990. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes, Cryobiology. 27(2): 171-83.

DI SANTO, M., TAROZZI, N., NADALINI, M. and BORINI, A., 2012. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. Adv Urol. 854837.

DONNELLY, E.T., MCCLURE, N. and LEWIS, S.E., 2000. Glutathione and hypotaurine in vitro: Effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. Mutagenesis, 15, 61–68. https://academic.oup.com/mutage/article/15/1/61/1320859

DURAN, N., YARKIN, F. ve ALLAHVERDIYEV, A.M., 2001. Çeşitli dondurma yöntemlerinin hep-2 ve tavşan böbrek hücrelerinin kriyoprezervasyonunda hücre canlılığına etkisi. Türk Hij Den Biyol Derg., 58 (2), 53 – 60.

DURU, N.K., MORSHEDİ, M., SCHUFFNER, A. and OEHNINGER, S., 2001. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. Fertil Steril., 75: 263-268.

DZIEWULSKA, K., RZEMIENIECKI A., CZERNIAWSKI, R. and DOMAGAŁA, J., 2011. Post-thawed motility and fertility from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) sperm frozen with four cryodiluents in straws or pellets. Theriogenology, 76: 300-311.

FAO, 2014. OECD-FAO Agricultural Outlook 2014-2023. http://www.fao.org/3/i3818e/i3818e.pdf.

FOWLER, A. and TONER, M., 2006. Cryo-injury and biopreservation. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1066: 119–135.

GELDİAY, R. ve BALIK, S., 2009. Türkiye Tatlısu Balıkları. E.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:46 Ders Kitabı Dizini No:16, VI. Baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova / İzmir, 644 s

GLANDER, H.J. and SCHALLER, J., 1999. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. Mol Hum Reprod., 5: 109–115.15.

GRUNEWALD,S., SHARMA, R., PAASCH, U., GLANDER, H.J., and AGARWAL, A. 2009. Impact of caspase activation in human spermatozoa. *MicroscRes Tech.*,72:878–888.

HARVEY, B., NORMAN, K.R. and ASHWOOD-SMITH, M.J., 1982. Cryopreservation of zebrafish spermatozoa using methanol. Can J Zool., 60, 1867–1870.

HARVEY, B., 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa, Aquacult. 32, 313-320.

HETTS S.W., 1998. To die or not to die. JAMA 279, 300–307.

HOLTZ, W., 1993. Cryopreservation of rainbow trout sperm pratical recommendations.Aquaculture, 110, 97-100

HORVATH, A., MISKOLCZI, E. and URBANYI, B., 2003. Cryopreservation of common carp sperm. Aquat. Living Resour. 16(5):457-460. doi:10.1016/S0990-7440(03)00084-6

IRAWAN, H., VUTHIPHANDCHAI, V. and NIMRAT, S., 2010. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. Anim. Reprod. Sci., 122: 236-243.

JANUSKAUSKAS, A., JOHANNISSON, A. and RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation

with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. Theriogenology, 60: 743–758.

JASIM, M.A., AL-SHATTY, S.M.H. and NUEAMA, A.K., 2006. Monitoring the quality of *S. triostegus* (Heckel, 1843) fresh and smoked stocked at room temperature Mesopotamian J. Mar. Sci. 21: 271-299 (in Arabic).

KOLDRAS, M., BIENIARZ, K. and KİME, D.E., 1990. Sperm production and steroidogenesis in testes of the common carp. Journal of Fish Biology, 37: 635 - 645

KOPEIKA, J., KOPEIKA, E., ZHANG, T. and RAWSON, D.M., 2003. Studies on theToxicity of Dimethyl Sulfoxide, Ethylene Glycol, Methanol and Glycerol to Loach (*Misgurnus fossilis*) Sperm and the Effect on Subsequent Embryo Development. CryoLetters, 24: 365–374.

KRONE, A. and WITTBRODT, J., 1997. A simple and reliable protocol for cryopreservation of medaka *Oryzias latipes* spermatozoa. Fish Biol J Medaka, 9: 47–48.

LAHNSTEINER F., MANSOUR N. and KUNZ, F.A., 2011. The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Theriogenology, 76 (5): 882- 890.

LAHNSTEINER, F., BERGER, B., HORVATH, A., URBANYI, B. and Weismann, T., 2000. Cryopreservation of spermatozoa in Cyprinid fishes, Theriogenology. 54: 1477-1498.

LAHNSTEINER F., BERGER, B., WEISMANN T. and PATZNER, R.A., 1996. Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation. Prog. Fish-Cult., 58: 149-159.

LAKRA, W.S., 1993. Cryogenic preservation of fish spermatozoa and its application to aquaculture, Indian Journal of Cryogenics. 18 (1-4): 171-176.

LI, J., LIU, Q. and ZHANG, S., 2006. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 24, 4: 370-377. https://link.springer.com/article/10.1007/BF02842852

LINHART, U., BILLARD, R. and PROTEAU, J.P., 1993. Cryopreservation of Europeancatfish (*S. glanis* L.) spermatozoa, Aquaculture. 115:347-359.

MAISSE, G. 1994. Comparison de l'effet cryoprotecteur de différents glucides sur le sperme de truitearc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Living Resour. 7: 217–219.

MARIA, R.F.S., MILAGROS, C.E., VIDAL, M., ANA, J.S. and JOSE, J.G., 2006. Influence of various spermeating cryoprotectants on freezability of iberan reddeer (*Cervuselaphus hispanicus*) epididiymal spermatozoa: effects of concentration and temperature of addition. The American Society of Andrology, Journal of Andrology.

MARTIN, G., SABIDO, O., DURAND, P. and LEVY, R., 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. Biol. Reprod. 71, 28–37. DOI 10.1095/biolreprod.103.024281.

MARTINEZ, H. R. and EKWALL, H., 1998. Electron microscopy in the assesment of cryopreserved spermatozoa viability. The Americas Microscopy and Analysis, 11-13.

MAZUR, P., 1970. Cryobiology: The freezing of biological systems, Science. 168: 939-949.

MOGHANLOO, K.S., NIKSIRAT, H., MOJAZI, AMİRİ, B. and MIRTORABI, S.M., 2007. The effects of extender type, freezing and thawing rates on fertility of the cryopreserved semen of the Caspian Brown trout (*Salmo trutta caspius*). Iran. J. Fish. Sci., 7 (1): 111-128.

MORISAWA, M. and SUZUKI, K., 1980. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. Science, 110, 1145-1147.

MUSSET, B., CLARK, R.A., DECOURSEY, T.E., PETHEO, G.L., GEISZT, M., CHEN, Y., CORNELL, J.E., EDDY, C.A., BRZYSKI, R.G. and EL JAMALI, A., 2012. NOX5 in human spermatozoa: expression, function, and regulation. J Biol Chem., 16, 287(12), 9376-9388. https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820609012

NAGATA, S., 1997. Apoptosis by death factor. Cell. 88: 355-365.

OYMAK, S.A., SOLAK, K. and ÜNLÜ, E., 2001. Some biological characteristics of *S. triostegus* Heckel, 1843 from Atatürk Dam lake (Turkey). Turk. J. Zool. 25: 139-148.

ÖZKAYA, A.B., 2009. HCT-116 kolon kanser hücre hattında yeşil çay etken maddesi olan(-)-epigallokatekin-3-gallat'inapoptoz üzerine etkisinin incelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). T.C. Dokuz Eylül ÜniversitesiSağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.s 40-43.

PAASCH, U., SHARMA, R.K., GUPTA, A.K., GRUNEWALD, S., MASCHA, E.J., THOMAS E.J., GLANDER, H.J. and AGARWAL, A., 2004. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. Biol. Reprod. 71, 1828–1837.

PALASZ, A.T. and MAPLETOFT, R.J., 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. Biotechnol. Adv., 14: 127-149.

PEGG, D.E., 2002. The history and principles of cryopreservation. Semi. Reprod. Med., 20: 5-13.

PENA F.J., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M. and RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., 2003. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an annexin-V as-say: a new method of evaluating sperm membrane integrity. Theriogenology, 60: 677–689.

RANA, K., 1995. Preservation of Gametes. In: Broodstock Management and Egg and Larval Quality, In: N.R. Bromage and R.J. Roberts (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 53-76.

RINKES, I.H., TONER, M., EZZEL, R.M., TOMPKINS, R.G. and YARMUSH, M.L., 1992. Effect of dimethylsulfoxide on cultured rat hepatocytes in sandwich configuration. Cryobiology, 29 (4): 443-53.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. and WALLGREN, M., 2011. Advances in boar semen cryopreservation review article, Vet. Med. Int. 1-5.

SAĞIRKAYA, H., 2001. Değişik gelişim dönemlerinde bulunan hibrit fare embriyolarının vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması (Doktora Tezi). U.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

SHIGENAGA, M.K., HAGEN, T.M. and AMES, B.N., 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. Proc Natl Acad Sci USA, 91, 10771-10778. https://www.pnas.org/content/91/23/10771.

SILVA, S.V., SOARES, A.T., BATISTA, A.M., ALMEIDA, F.C., NUNES, J.F., PEIXOTO, C.A. and GUERRA, M.M.P., 2011. In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. Reprod Dom Anim., 46, 874–881. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01758.x

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R. and SCHNEIDER, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res.; 175(1): 184-91. doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.

STANIC, P., TANDARA, M., SONICKI, Z., SIMUNIC, V., RADAKOVIC, B. and SUCHANEK, E., 2000. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 91(1): 65-70.

STOREY B.T., NOILES E.E. and THOMPSON, K.A., 1998. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. Cryobiology, 37: 46-58.

SUBASH, P., 2016. Assessment of Oxidative DNA Damage by Alkaline Comet Assay in Human Essential Hypertension. Indian J Clin Biochem., 31(2): 185–193. https://link.springer.com/article/10.1007/s12291-015-0521-1

SUNARMA, A., HASTUTI, D.W. and SISTINA, Y., 2007. Utilization of honey as an extender combined to different cryoprotectant on sperm cryopreservation of nilem (Indonesian Shark minnow, *Osteochiius hasseltii* Valenciennes, 1842), in: Indonesia Aquacult. Conf., pp. 1-9

ŞAHİNÖZ, E., ARAL, F., DOĞU, Z., KOYUNCU, İ. and YÜKSEKDAĞ, Ö., 2020. Cryopreservation of Mesopotamian catfish (*S. triostegus* H., 1843) spermatozoa: Effects of diluents and osmotic pressure on spermatozoa DNA damage, rate and duration of motility. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 19(5): 2293-2307. DOI: 10.22092/ijfs.2018.119818.

TEKİN, N., 1994. Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon. Suni Tohumlama. Doğum ve İnfertilite. Dizgievi, Konya. Ed., Alaçam, E., Bölüm 7, s: 69-79.

TEKİN, N., SECER, S., AKCAY, E., BOZKURT, Y. and KAYAM, S., 2007. Effects of glycerol additions on post-thaw fertility of frozen rainbow trout sperm, with an emphasis on interaction between extender and cryoprotectant. J. Appl. Ichthyol., 23 (1): 60-63.

TESCH, F.W., 1968. Age and Growth. In Methods for Assessment of Fish Production in Freshwaters, Edited by W.E. Ricker. IBP. Handbook No:3, Blackwell Scientific Publ. Oxford and Edinburg, 93-123.

TOZAN-BECEREN, A., ŞEHİRLİ, A.Ö., EKSİOGLU-DEMİRALP, E., ŞENER, G., and OMURTAG, G.Z. 2012. Melatonin protects against acrylamide induced oxidative tissue damage in rats, Marmara Pharmaceutical Journal, 16: 213-221. http://dspace.marmara.edu.tr/bitstream/handle/11424/1478/5000010736-5000016782-1-sm.pdf?sequence=1.

ÜNLÜ, E. and BOZKURT, R., 1996. Notes on thecatfish, *S. triostegus* (Siluridae) from the Euphrates river in Turkey. Cybium 20: 315-317.

VAN DEN EELAART, A., 1954. Report to the government of Iraq on the development of inland fisheries report of the expanded technical assistance Program, Food and Agriculture Organization, Rome 270, 42 p.

VARNER, D.D. and JOHNSON, L., 2007. From a sperm's eyeview revisiting our perception of this intriguing cell, AAEP Proceedings. 53: 104-177.

VENKATESH, S., RIAZ, A.M., KUMAR, M., SHAMSI, M.B., TANWAR, M. DEECARAMAN, M. and DADA, R., 2009. Oxidative stress: a marker of male in fertility, Obstet. Gynecol. Today, 14, 34–36.

VERMES,I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H. and REUTELINGSPERGER, C., 1995. A novel assay for apoptosis. Flowcytometric detection of phosphatid ylserine expression on early apoptotic cells using fluoresce inlabelled Annexin V. J Immunol Methods. 17;184(1), 39-51. doi: 10.1016/0022-1759(95)00072-i.

VIVEIROS, A.T.M., AMARAL, T.B., ORFÃO, L.H., ISAÚ, Z.A., CANEPPELE, D. and LEAL, M.C., 2011. Sperm cryopreservation of tietetetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features, Aqua. Res. 42 (6): 858-865.

WARNECKE D. and PLUTA, H.J., 2003. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. Aquaculture, 215: 167-185.

YANG, H., NORRIS, M., WINN, R. and TIERSCH, T.R., 2010. Evaluation of cryoprotectant and cooling rate for sperm cryopreservation in the euryhaline fish medaka *Oryzias latipes*. Cryobiology, 61(2): 211-219. doi:10.1016/j.cryobiol.2010.07.006

YILDIZ, C., KAYA, A., AKSOY, M. and TEKELİ, T., 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. Theriogenology, 54: 579-585.

ZILLI, L., SCHIAVONE, R., ZONNO, V., STORELLI, C. and VILELLA, S., 2003. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. Cryobioloy, 47, 227-235. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011224003001068?via%3Dihub.

ZOBEIRI, F., SADRKHANLOU, RA., SALAMI, S., KARIM MARDANI, K. and ABBAS AHMADI, A., 2012. The effect of ciprofloxacin on sperm DNA damage, fertility potential and early embryonic development in NMRI mice. Veterinary Research Forum., 3 (2):131-135.