

**KOÇ SPERMASININ DONDURULMASINDA KATKI
MADDELERİNİN ETKİSİ**

Proje kodu: 1001

Proje No: 1140642

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Nazan KESKİN

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Mustafa Numan BUCAK

Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR

Dr. Öğr. Üyesi Şükrü DURSUN

Dr. Öğr. Üyesi Pınar İLİ

ARALIK 2018

DENİZLİ

ÖNSÖZ

Hayvancılıkta ve üreme biyoteknolojisinde en verimli ırkı belirlemek amacıyla, sperma kriyoprezervasyonu yapılarak suni tohumlama yoluyla gebelik çalışmalarının araştırılması yoğun bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Sperma kriyoprezervasyonu, sperma hücrelerini içeren semen sıvısının, daha sonra kullanılmak üzere kriyoprotektanlar yardımıyla dondurulması işlemidir. Ancak, kriyoprezervasyonda, düşük sperm canlılığı önemli bir problem olarak ortaya çıkmaktadır. Kriyoprezervasyon sırasında sperma'da, buz kristallerinin oluşması (Watson 1995) ile morfolojide, hareketlilikte, mitokondriyal aktivitelerde, canlılıkta değişimler şeklinde (O'Connell vd 2002) sperm fonksiyonunu etkileyen birçok hücresel hasar meydana gelmektedir (Sieme vd 2015). Hücrelerin dondurma işlemleri sırasında, plazma zarı kaybı, akrozom reaksiyonu benzeri değişiklikler, akrozomal bileşenlerin düzensiz dağılımı veya kaybı (Prinosilova vd 2012), DNA instabilitesi (Peris vd 2007), lipit içeriğinde değişiklikler (Cerolini vd 2001), sperm fragmentasyonu, DNA kondensasyon artışı ve apoptozis (Anzar vd 2002) meydana gelir. Kriyoprezervasyon sonrası ortaya çıkan bu kriyohasarlara sperm fertilizasyonunu olumsuz yönde etkiler. Kriyoprezervasyon sonucu oluşan kriyohasarlara en aza indirmek amacıyla farklı kriyoprotektanlar kullanılmaktadır.

Bu projede, koç spermasının dondurulmasında, sulandırıcıya katılan farklı kriyoprotektanların ve katkı maddelerinin, spermatolojik ve oksidatif stres parametreleri ile fertilité ve ince yapı üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu projede, önce kriyoprotektan toksisitesini azaltabilmek için trehalozun artan dozları kullanılmıştır. Ortaya konan düşük kriyoprotektanlı ve yüksek şeker oranlı sulandırıcıya antioksidan özellikli farklı katkı maddeleri ilave edilerek, çözüm sonrası in vitro parametreler iyileştirilmeye çalışılmıştır.

Birçok çalışmada çözüm sonu spermatozoon motilitesi yüksek elde edilmesine karşın, yüksek oranda akrozomal hasarlar oluşmakta ve döl veriminde önemli oranda kayıplar olmaktadır. Akrozomal hasarların azaltılabilmesi için kriyoprotektan toksisitesinin azaltılıp, antioksidan ilavesiyle fertilizasyonda optimum oranın elde edilmesi gerekmektedir. Ancak bu sayede spermaları dondurulmuş yüksek genetik kapasiteli koçlardan maksimum düzeyde verim alınarak yetiştiricilik ideal hale gelecektir. Bu amaçla, fertil ve normospermik özellik gösteren 6 baş Merinos ırkı koçtan alınan spermalar, farklı kriyoprotektan ile trehalozun farklı dozlarını içeren sulandırıcı gruplarıyla miks yapılarak sulandırılmış ve dondurulmuştur. Bu işlem sonucunda en iyi sonuç veren iki sulandırıcıya farklı antioksidan özelliğinde olan katkı maddeleri (Boron; 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM, Taxifolin hidrat; 10 µM, 100 µM, 500 µM, Fetuin; 2.5 mg/ml, 5 mg/ml, 15 mg/ml) ilave edilmiş ve sperma dondurulmuştur. Dondurma çözündürme sonrası antioksidan etkinlik, sperma parametreleri, DNA bütünlüğü, apoptozis, lipit

peroksidasyonu, total antioksidan aktiviteleri, ince yapı değişiklikleri ve antioksidan cevap sinyal yolakları araştırılmıştır.

'Koç Spermalarının Dondurulmasında Katkı Maddelerinin Etkisi' adlı projenin (proje no: 114O642) gerçekleştirilmesinde bütçe desteği sağlayan TÜBİTAK TOVAG'a teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

KAPAK	1
ÖNSÖZ	2
İÇİNDEKİLER	4
TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ	6
ÖZET	11
ABSTRACT	13
1. GİRİŞ	15
2. LİTERATÜR ÖZETİ	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1 Farklı Kriyoprotektan ve Trehalozun Farklı Dozlarını İçeren Sulandırıcı Gruplarıyla Miks Spermaların Dondurulması ve Çözüm Sonrası Değerlendirilmesi (1. Aşama)	23
3.2 Spermanın Farklı Katkı Maddeleriyle Dondurulması ve Çözüm Sonrası Değerlendirilmesi (2. Aşama)	24
3.2.1 İn vitro Spermatolojik Parametreler	26
3.2.1.1 Spermatozoa Motilitesi	
3.2.1.2 Spermatozoon Akrozom Hasarların Tespiti	26
3.2.1.3 Mitokondrial Aktivitenin Belirlenmesi	27
3.2.1.4. Oksidatif Stres Parametreleri	27
3.2.1.5 Antioksidan Cevap Sinyal Yolakları/Genetik Analizler	28
3.2.1.5.1 Spermada Gen Ekspresyon Analizleri	29
3.2.1.6. DNA Bütünlüğü ve Apoptozisin İncelenmesi	31
3.2.1.7 Kriyohasarlardan İnce Yapı Düzeyinde Gösterilmesi (Elektron Mikroskobu Çalışması)	33
3.3 Spermada Tohumlamaların Yapılması (3. Aşama)	33
3.4 İstatistiksel Analizlerin Yapılması (4. Aşama)	34

4. BULGULAR	35
4.1 Motilite, Akrozom Hasarları, Mitokondrial Aktivite Bulguları	35
4.2 Oksidatif Stres Parametreleri Bulguları	42
4.3 Antioksidan Cevap Sinyal Yolakları/Genetik Analiz Bulguları	45
4.4 TUNEL Testi	47
4.5 COMET Testi	50
4.6 İnce yapı bulguları	60
4.6.1. Geçirimli Elektron Mikroskobu Bulguları	60
4.6.2 Taramalı Elektron Mikroskobu Bulguları	73
4.7 Elektron Mikroskobundan Trehaloz Grubu İçin İstatistiksel Analiz Bulguları	81
4.8 Fertilite Bulguları	82
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	83
6. KAYNAKLAR	97

Tablo 1. Farklı kriyoprotektan ve trehaloz oranları ile dondurulan koç spermasının çözüm sonu motilite, ölü-canlı, mitokondriyel aktivite ve akrozom anomalisi değerleri ortalaması (Mean±SEM)

Tablo 2. Koç spermasının farklı fetuin dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu motilite, ölü-canlı, mitokondriyel aktivite ve akrozom anomalisi değerleri ortalaması (Mean±SEM)

Tablo 3. Koç spermasının farklı taksifolin dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu motilite, ölü-canlı, mitokondriyel aktivite ve akrozom anomalisi değerleri ortalaması (Mean±SEM)

Tablo 4. Koç spermasının farklı boron dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu motilite, ölü-canlı, mitokondriyel aktivite ve akrozom anomalisi değerleri ortalaması (Mean±SEM)

Tablo 5. Koç spermasının farklı taksifolin hidrat dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu LPO, GSH ve AOC düzeyleri (Ort±SE)

Tablo 6. Koç spermasının farklı fetuin dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu LPO, GSH ve AOC düzeyleri (Ort±SE)

Tablo 7. Koç spermasının farklı boron dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu LPO, GSH ve AOC düzeyleri (Ort±SE)

Tablo 8. Koç spermasının farklı fetuin dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu hedef genlerin grublardaki ekspresyon değerleri (Ort±SH)

Tablo 9. Koç spermasının farklı taksifolin dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu hedef genlerin grublardaki ekspresyon değerleri (Ort±SH)

Tablo 10. Koç spermasının farklı boron dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu hedef genlerin grublardaki ekspresyon değerleri (Ort±SH)

Tablo 11. Temel sulandırıcılar ile dondurulan koç spermasının çözüm sonu DNA fragmentasyonu oranları (ortalama±standart sapma).

Tablo 12. Fetuin grubu koç spermasının çözüm sonu DNA fragmentasyonu oranları (ortalama±standart sapma) ve p değerleri.

Tablo 13. Taksifolin grubu koç spermasının çözüm sonu DNA fragmentasyonu oranları (ortalama±standart sapma) ve p değerleri.

Tablo 14. Boron grubu koç spermasının çözüm sonu DNA fragmentasyonu oranları (ortalama±standart sapma) ve p değerleri.

Tablo 15. Temel sulandırıcılar ile dondurulan koç spermasının çözüm sonu DNA hasarı oranları (COMET değerleri) (ortalama±standart sapma).

Tablo 16. Fetuin grubu koç spermasının çözüm sonu DNA hasarı oranları (COMET değerleri) (ortalama±standart sapma) ve p değerleri.

Tablo 17. Taksifolin grubu koç spermasının çözüm sonu DNA hasarı oranları (COMET değerleri) (ortalama±standart sapma) ve p değerleri.

Tablo 18. Boron grubu koç spermasının çözüm sonu DNA hasarı oranları (COMET değerleri) (ortalama±standart sapma) ve p değerleri.

Tablo 190. COMET-TUNEL bulguları özet tablo

Tablo 20. EM'de tespit edilen hasarlı sperm yüzdesi

Tablo 21. Koçlarda kontrol grupları ve en iyi çıkan antioksidan grupları ile dondurulmuş sperma numuneleri ile yapılan tohumlama sonuçları

Şekil 1. Spermalarda ölü-canlı spermatozoa oranının SYBR/PI boyama tekniğiyle değerlendirilmesi. Baş kısmı yeşil floresan veren hücreler, canlı spermatozoayı; Baş kısmı kırmızı ve kırmızı-yeşil floresan veren hücreler, ölü spermatozoayı göstermektedir.

Şekil 2. Spermalarda mitokondriyel aktivite ve membran bütünlüğünün JC-1/PI boyama tekniği ile değerlendirilmesi. Gövde kısmı turuncu floresan veren hücreler, mitokondriyel aktivite gösteren spermatozayı; gövde kısmı yeşil floresan veren ve floresan vermeyen hücreler, iyi mitokondriyel aktivite göstermeyen spermatozayı göstermektedir.

Şekil 3. Spermalarda akrozom ve membran bütünlüğünün Lectin/PI boyama tekniğiyle değerlendirilmesi. Akrozom kısımları yeşil floresan veren hücreler, hasarlı akrozomu olan spermatozoayı; Akrozom kısımları yeşil floresan vermeyen yada kırmızı veren floresan hücreler, sağlam akrozomu olan spermatozoayı göstermektedir.

Şekil 4. TUNEL testi. TUNEL-pozitif (kırmızı ok) ve TUNEL-negatif (siyah ok) hücreler. Orijinal büyütme 40X.

Şekil 5. TUNEL testi, negatif kontrol. Sperm başları (ok). Orijinal büyütme 40X.

Şekil 6. Gliserol (%3 ve 5), trehaloz (60 mM) ve farklı oranlarda fetuin (2,5; 5 ve 15 mg/ml), taksifolin (10, 100 ve 500 µM) ve boron (0,25; 0,5 ve 1 mM) içeren kriyoprotektanlar ile

dondurulan koç spermasının çözüm sonu DNA hasarlarını gösteren COMET görüntüleri. A: Hasarsız sperm; B, C ve D: Farklı oranlarda DNA hasarlarına sahip sperm hücreleri. Orijinal büyütme 40X.

Şekil 7. Temel sulandırıcı gruplarının çözüm sonu DNA hasarı oranları (COMET ve TUNEL değerleri) yüzdeleri. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (Gruplar: T1: Gliserol %5; T2: Gliserol %3 + 60 mM Trehaloz; T3: Gliserol %1,5 + 100 mM Trehaloz; T4: Etilen Glikol %5; T5: Etilen Glikol %3 + 60 mM Trehaloz; T6: Etilen Glikol %1,5 + 100 mM Trehaloz).

Şekil 8. Fetuin gruplarının çözüm sonu DNA hasarı oranları (COMET ve TUNEL değerleri) yüzdeleri. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (Gruplar: GC: Gliserol %5; G5F2,5: Gliserol %5+Fetuin 2,5 mg/ml; G5F5: Gliserol %5+Fetuin 5 mg/ml; G5F15: Gliserol %5+Fetuin 15 mg/ml; G3TRE: Gliserol %3+60 mM Trehaloz; G3TREF2,5: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 2,5 mg/ml; G3TREF5: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 5 mg/ml; G3TREF15: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 15 mg/ml).

Şekil 9. Taksifolin gruplarının çözüm sonu DNA hasarı oranları (COMET ve TUNEL değerleri) yüzdeleri. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (Gruplar: GC: Gliserol %5; G5T10: Gliserol %5+Taksifolin 10 µM; G5T100: Gliserol %5+Taksifolin 100 µM; G5T500: Gliserol %5+Taksifolin 500 µM; G3TRE: Gliserol %3+60 mM Trehaloz; G3TRET10: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Taksifolin 10 µM; G3TRET100: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Taksifolin 100 µM; G3TRET500: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Taksifolin 500 µM).

Şekil 10. Boron gruplarının çözüm sonu DNA hasarı oranları (COMET ve TUNEL değerleri) yüzdeleri. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (Gruplar: GC: Gliserol %5; G5B0,25: Gliserol %5+Boron 0,25 mM; G5B0,5: Gliserol %5+Boron 0,5 mM; G5B1: Gliserol %5+Boron 1 mM; G3TRE: Gliserol %3+60 mM Trehaloz; G3TREB0,25: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Boron 0,25 mM; G3TREB0,5: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Boron 0,5 mM; G3TREB1: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Boron 1 mM).

Şekil 11. Spermilerin baş (siyah oklar) ve kuyruk (kırmızı oklar) bölgelerinden geçen boyuna ve enine kesitleri. TB boyama, 1000X.

Şekil 12. Baş, orta ve kuyruk bölgelerinde zar deformasyonları (ok) ve vakuoller (v). Orijinal büyütme a: 30000X b: 22000X.

Şekil 13. Baş, orta ve kuyruk bölgelerinde zar deformasyonları (ok), genişlemeler (*), çift kuyruk (ok başı) ve vakuolleşme (v). Orijinal büyütme a: 30000X b: 40000X.

Şekil 14. Baş bölgesinde zar deformasyonları (ok), dış akrozomal zarda vezikülasyon (çift yönlü ok). Orijinal büyütme 66000X.

Şekil 15. Hasarsız (ok) ve hasarlı aksonemlerin (kırmızı ok) enine kesitleri ve membran parçaları (mavi ok). Orijinal büyütme 100000X.

Şekil 16. Baş bölgesinde ve orta bölgede zar deformasyonları (ok), buz kristali (kırmızı ok), vakuolleşmeler (v) ve akrozomal içerik kaybı (*). (Aks: Aksonem, Mk: Mitokondriyal kılıf). Orijinal büyütme 22000X.

Şekil 17. a: Orta bölgede; dış yoğun fibriller (DYF), Aksonem (A), Mitokondri (M), Mitokondriyal krista hasarlanması (), zar deformasyonu (ok). b: Çatallanmış yapısıyla çift kuyruk. Orijinal büyütme a: 154000X b:50000X.

Şekil 18. Çift kuyruk. Orijinal büyütme a, b: 90000X.

Şekil 19. Hasarsız orta bölge (mavi ok). Orijinal büyütme 75000X.

Şekil 20. Baş bölgesinde zar deformasyonu (ok). Orijinal büyütme 128000X.

Şekil 21. Orta bölgede genişlemiş ve deforme olmuş zar altında vakuolleşmeler (V) ve inkluzyonlar (İ), (A: Aksonem, M: Mitokondri). Orijinal büyütme 130000X.

Şekil 22. a: Baş bölgesinde oldukça genişlemiş (*) ve deforme olmuş dış zar (ok), b: dış (ok) ve akrozom zarında (kesikli ok) deformasyon, plazma membran deformasyonu (mavi ok). (Ak: Akrozom, Aks: Aksonem). Orijinal büyütme a: 52000X, b: 50000X.

Şekil 23. Kuyruk boyuna kesitinde deforme olmuş zar (ok). Orijinal büyütme 80000X.

Şekil 24. 1: Çift kuyruk, 2: Baş bölgesinin nuklear bölümünde genetik materyal kaybından kaynaklanan deformasyon (beyaz yıldız), 3: Hasarsız orta bölge. (Mk: Mitokondriyal kılıf, DYF: Dış yoğun fibriller, Aks: Aksonem). Orijinal büyütme 48000X.

Şekil 25. a: Plazma membran deformasyonları (siyah ok), akrozomda şişme (kırmızı ok). b: kabarcıklar şeklinde membran deformasyonu (mor ok). Orijinal büyütme; (a): 37000X, b: 23000X. Ak: Akrozom; N: Nukleus.

Şekil 26. a: Hasarlı plazma membranı (siyah ok), dev membransal vakuol (). Orijinal büyütme 52000X. b: Enine geçmiş hasarsız kuyruk (yeşil ok), hasarlı baş kısım-nuklear vakuol (kırmızı ok), akrozom (turuncu ok) ve membran deformasyonları (siyah ok). Orijinal büyütme 27000X. c: Buz kristalleri (kesikli ok), membran deformasyonu (siyah ok), hasarsız akrozom (mavi ok). Orijinal büyütme 55000X. d: membran deformasyonu (siyah ok), buz

kristali (siyah çizgi) olmakla birlikte membran deformasyonu gibi ince yapı değişikliği göstermeyen hasarsız baş (kırmızı ok). Orijinal büyütme 28000X. e: Plazma membran deformasyonu (siyah ok). f: Akrozom membranında kabarcıklar (mor ok), plazma membranı deformasyonu (siyah ok). Orijinal büyütme 128000X, f: 66000X. N: Nukleus.

Şekil 27. Hasarsız (turuncu ok), başta vakuol benzeri kabarmalar (yeşil ok), akrozomda şişme/deformasyon (kırmızı ok), kuyrukta kıvrılma/sarmal (mor ok), baş kenarlarında deformasyon/hasar (mavi ok), boyun bölgesinde deformasyon/hasar (siyah ok), kopmuş baş (mavi yıldız). Orijinal büyütme; a: 5190X; b: 6000X; c: 7500, d, e, f, g, l, o, p: 10000X; h: 3500X, i: 15000X, j: 5000X, k: 4000X, m: 4000X, n: 3000X, r: 20000X.

ÖZET

Bu projede, koç sperması kriyoprezervasyonunda, sulandırıcıya katılan farklı katkı maddelerinin, dondurma çözündürme sonrası çeşitli *in vitro* spermatolojik parametreler üzerine etkileri araştırılmıştır. İlk aşamada, farklı kriyoprotektan ve trehalozun farklı dozlarını içeren sulandırıcı grupları ile iki sulandırıcı grubu, gliserol %5 (T1) ve gliserol %3 + 60 mM trehaloz (T2) grupları belirlenmiştir. İkinci aşamada ise, üç farklı dozda fetuin, taksifolin hidrat ve boron T1 ve T2 sulandırıcılarına eklenmiş ve sekizer grup oluşturulduktan sonra hepsi kriyoprezerve edilmiştir. T2+fetuin 5 mg grubu en yüksek motilite, mitokondriyel aktivite ve canlı spermatozoa oranlarını vermiştir. Akrozom bütünlüğü bakımından ise, gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark belirlenmemiştir. Spermatozoa motilitesi, akrozom bütünlüğü, mitokondriyel aktivite ve canlı spermatozoa bakımından T2+Taksifolin 10 µM ve T2+Boron 0,25 mM grupları en iyi sonuçları vermiştir. DNA'da çift zincir kırıklarının engellenmesinde, T2+fetuin 5 mg/ml ile T1+taksifolin 10 µM gruplarının, DNA fragmantasyonunun engellenmesinde T2+fetuin 5 mg/ml; T1+taksifolin 10 µM ve T1+taksifolin 500 µM ile T2+boron 0,5 Mm gruplarının etkili olduğu belirlenmiştir. İnce yapı düzeyinde, kriyohasarlara başlıca membran, akrozom, mitokondri, aksonem ile kuyruk yapısında gözlenmiştir. Oksidatif Stres Parametrelerinde, LPO düzeyleri Gliserol %5 grubu düzeyinin Gliserol %5 + Taksifolin 500 µM ve Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 100 µM gruplarına göre önemli düzeyde yüksektir. GSH ve AOC yönünden bir farklılık yoktur. LPO düzeyleri, Gliserol %5 grubu düzeyinin, Gliserol %5 + Fetuin 5 mg grubu düzeyinden önemli düzeyde yüksektir. GSH düzeyleri ise, Gliserol %5 ve Gliserol %5 + Fetuin 2,5 mg gruplarda, Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetuin 2,5 mg gruplarına göre önemli düzeyde düşüktür. AOC düzeyleri yönünden bir farklılık yoktur. Boron uygulamaları değerlendirildiğinde, GSH düzeylerinde, Gliserol %3 grubu düzeyinin, Gliserol %5, Gliserol %5 + 0,25 mM Boron, Gliserol %5 + 0,5 mM Boron, Gliserol %3 + 0,25 mM Boron ve Gliserol %3 + 0,5 mM Boron gruplarına göre önemli düzeyde yüksektir. Gliserol %5 + 1 mM Boron ve Gliserol %3 + 0,5 mM Boron gruplarında farklılık yoktur. Diğer parametreler bakımından bir farklılık yoktur. İstatistik sonuçları, $ORT \pm SH$ olarak verilmiştir. Değerler SPSS 15.0 programında ANOVA ile, gruplararası farklılıklar Duncan testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ önem düzeyinde önemli kabul edildi. Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 100 µM grubu, yüksek NQO1 gen ekspresyonu düzeyi göstermiştir. %3 Gliserol + 60 mM Trehaloz + 0,5 mM Boron grubunda da, NQO1 gen ekspresyonu az düzeyde yüksek bulunmuştur. Fetuin gruplarında belirgin bir fark bulunmamıştır.

Gliserol %5, Gliserol %3 + Trehaloz 60 mM, Gliserol %3 + Trehaloz 60 mM + Fetuin 5 mg, Gliserol %3 + Trehaloz 60 mM + Taksifolin 10 µM ve Gliserol %3 + Trehaloz 60 mM + Boron

0,5 mM ile dondurulan koç sperma grublarının tohumlama sonrası sonuçlarında gruplar arası istatistiksel bir fark yoktur.

Anahtar Kelimeler: Koç sperması, kriyoprezervasyon, kriyoprotektan, katkı maddesi, dondurma, in vitro parametreler, tohumlama

ABSTRACT

In this project, the effects of different antioxidants added into ram semen extender on various *in vitro* spermatologic parameters following freezing-thawing process of the ram cryopreservation was investigated. In the first step, two extender groups, glycerol 5% (T1) and glycerol 3% + 60 mM trehalose (T2), were determined using different cryoprotectants and different dose of trehalose containing extender. In the second step, three different dose of fetuin, taxifolin hydrate and boron were added T1 and T2 extenders and eight groups were created for each and then all cryopreserved. T2 + fetuin 5 mg group resulted in higher motility, mitochondrial activity and viability ratios. Statistically significant difference was not determined in groups according to acrosome integrity. T2+taxifolin 10 µM and T2+ Boron 0,25 mM groups given the best results for motility, acrosome integrity, mitochondrial activity and viability. The most effective groups have been determined to be T2+fetuin 5 mg/ml and T1+taxifolin 10 µM groups for preventing double-strand breaks in DNA, and T2+fetuin 5 mg/ml, T1+taxifolin 10 µM, T1+taxifolin 500 µM, and T2+boron 0,5 Mm groups for preventing DNA fragmentation. At the ultrastructural level, cryodamages were observed mainly on the membranes, axoneme, mitochondria, and tail structure. The oxidative stress parameters assessed were LPO, GSH and AOC. LPO levels were significantly higher in group Glycerol %5 as compared to group Glycerol %5 + Taxifolin 500 µM and group Glycerol %3 + Trehalose 60 µM +Taxifolin 100 µM. There was no significant difference between the three groups with respect to GSH and AOC levels. LPO levels were significantly higher in group Glycerol %5 as compared to group Glycerol %5 + Fetuin 5 mg. The GSH level was significantly lower in group Glycerol %5 and group Glycerol %5 + Fetuin 2,5 mg than in group Glycerol %3 + Trehalose 60 µM + Fetuin 2,5 mg. No significant differences in AOC levels were found between the groups. It was found that boron supplementation resulted in a significant change in GSH levels in some groups. GSH levels were significantly higher in group Glycerol %3 as compared to group Glycerol %5, group Glycerol %5 + 0,25 µM Boron, group Glycerol %5 + 0,5 µM Boron, group Glycerol %3 + 0,25 µM Boron and group Glycerol %3 + 0,5 µM Boron, in group Glycerol %5 + 1 µM Boron and group Glycerol %3 + 0,5 µM Boron, no significant change was observed in GSH levels. No significant differences were found between the groups in any other parameters. The results of statistical tests were reported as $ORT \pm SH$. An ANOVA was performed to confirm that the groups differ from one another in terms of the parameters of interest. To determine amongst which groups these differences existed, Duncan's post hoc test was performed. An alpha level (level of significance) of 0.05 was used throughout data analysis, unless otherwise noted. Glycerol %3 + Trehalose 60 mM + Taxifolin 100 µM group resulted in higher expression levels of NQO1 gene. Also, NQO1 gene expression was found to be slightly higher in 3% Glycerol + 60 mM Trehalose + 0,5 mM Boron group. No significant differences were found in the groups of Fetuin.

There was no statistical difference between the groups of sperma cryopreserved with Glycerol 5%, Glycerol 3% + Trehalose 60 mM, Glycerol 3% + Trehalose 60 mM + Fetuin 5 mg, Glycerol 3%+ Trehalose 60 mM + Taxifolin 10 µM and Glycerol 3%+ Trehalose 60 mM + Boron 0,5 mM in the post-insemination results.

Key Words: Ram semen, cryopreservation, cryoprotectant, additives, freezing, in vitro parameters, insemination

GİRİŞ

Hayvancılıkta önemli bir yeri olan üreme biyoteknolojisi, spermanın dondurulması ve suni tohumlama, in-vitro fertilizasyon, çekirdek transferi ve klonlama gibi araştırmaları içermektedir. Bu araştırmaların temelinde spermanın dondurulması ve dişi hayvanların suni tohumlama yoluyla gebe bırakılması yer almaktadır. Böylelikle, uygulanan çeşitli tekniklerle en verimli ırkın belirlenmesi hedeflenmektedir.

Kriyoprezervasyon, spermlerin saklanması için kullanılan bir yöntem (Sasikumar ve Dakshayani, 2013) olmakla birlikte, DNA fragmentasyonunu ve oksidasyonunu uyararak sperm DNA'sına zarar vermektedir (Zribi ve diğ., 2010). Spermlerin kriyoprezervasyonu ve çözölme süreçleri boyunca reaktif oksijen türevleri (ROS) üretiminde artış ile antioksidan seviyelerinde azalmanın olduğu bilinmektedir (Said ve Agarwal, 2012). ROS ile antioksidanlar arasındaki dengesizlikten kaynaklanan oksidatif stres, sperm DNA'sında tek ve çift zincir kırıklarına neden olmaktadır (Said ve Agarwal, 2012; Shamsi vd., 2008). Spermin yapısal bütünlüğünün kaybı ve sperm DNA hasarı, oosit fertilizasyonu, embriyo gelişim oranı ile canlı doğum oranı üzerinde önemli derecede olumsuz etkiler göstermektedir (Katepogu vd., 2012). Dolayısıyla, kriyoprezervasyonun başarılı bir şekilde uygulanması yardımcı üreme tekniklerinin sonucunu etkilemesi bakımından önemlidir (Di Santo ve diğ., 2012). Bununla birlikte, önemli miktarda DNA hasarı gösteren spermlerin oosit fertilizasyon yeteneğini kaybetmediği de bildirilmiştir (Aitken ve diğ., 1998). Yumurtanın, %8'in altındaki DNA hasarlarını onarabilme yeteneğine sahip olduğu ve bunun üzerindeki hasarların düşük embriyonik gelişim oranına ve yüksek erken gebelik kaybına neden olduğu da rapor edilmiştir (Ahmedi ve Ng, 1999).

Kriyoprezervasyonda spermler üzerinde oksidatif stres ile indüklenen kriyohasarlardan önlenmesinde, antioksidanların önemli rol oynayabileceği bildirilmiştir (Said ve Agarwal, 2012). Kriyoprezervasyon ortamına antioksidan ilavesinin memeli sperm kalitesinde kriyoprotektif etki sağladığı rapor edilmiştir (Bansal ve Bilaspuri, 2011). Mahabadi keçi semeninin dondurulması sırasında bir antioksidan olan bütillenmiş hidroksitoluenin 1 mM konsantrasyonda eklenmesinin motiliteyi, progresif motiliteyi ve canlılığı istatistiksel olarak arttırdığı ve malondialdehit seviyesini anlamlı şekilde düşürdüğü gösterilmiştir (Naijian ve diğ., 2013). Ayrıca, insan spermi DNA fragmentasyonunun kaspazların ve apoptozisin aktivasyonundan daha çok, kriyoprezervasyon süresince artan oksidatif stres ile ilgili olduğu ve içine 50 veya 100 µM genistein (östrojenik bileşen, potansiyel antioksidan) ilavesinin sperm DNA'sı üzerinde önemli bir koruma sağladığı bildirilmiştir (Thomson ve diğ., 2009).

[Kriyoprotektanlar, spermleri buz kristalleştirme ile indüklenen dondurma hasarından korumak için yararlanılan düşük moleköl ağırlıklı ve yüksek ölçüde geçirgen kimyasallardır. Maddenin donma noktasını düşürerek, örneğin likit fazındaki tuz ve

Çözölmüş madde miktarını ve sperm içinde buz oluşumunu azaltarak iş görürler (Said ve Agarwal, 2012)]

Önemli bir antioksidan olan resveratrolün kriyoprotektanlara ilavesinin, insan semen kriyoprezervasyonu ile indüklenen oksidatif hasarı önlediği rapor edilmiştir (Garcez ve diğ., 2010). Benzer şekilde, önemli bir antioksidan olan kurkuminin donma sırasında ortama ilavesinin yetişkin sıçanlarda, çözüldükten sonraki sperm parametreleri (sperm sayısı, motilite, canlılık, total antioksidan kapasitesi ve DNA bütünlüğü) üzerinde olumlu etkilere yol açtığı da gösterilmiştir (Soleimanzadeh ve Saberivand, 2013). Antioksidan özelliği olan likopenin, insan spermi ile preinkübasyonunun in vitro oksidatif DNA hasarına karşı koruma sağladığı, likopenin sperm hareketliliği ve sperm DNA bütünlüğü üzerine koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Zini ve diğ., 2010). Ayrıca, oksitlenmiş glutatyonun 50 mM, bovine serum albuminin 20 mg/ml, sisteinin 10 mM ve likopenin 800 µg konsantrasyonda dondurma ortamlarına eklenmesinin, dondurma-çözme prosedürü sonrası Akkaraman koç sperm karakteristiklerinin korunmasında, kullanılan diğer konsantrasyonlara ve kontrole göre daha olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (Uysal ve Bucak, 2007).

Sonuç olarak, spermanın dondurulması-çözdürülmesi esnasında oluşan membran lipit faz değişimi, ozmotik-mekanik stres ve ortamdaki oksijen radikallerine bağlı olarak gelişen lipit peroksidasyonu ve ekstraselüler kristal oluşumuyla gelişen serbest membran proteinlerinin denaturasyonu, hücre organellerindeki yapısal deformasyon, DNA'da kırılmalar ve hücresel lizis gibi kriyohasarlara, sperma sulandırıcılarına antioksidanların ilavesiyle azaltılabilmekte, çözüm sonu spermatozoon fonksiyonları iyileştirilmektedir.

Bu proje kapsamında, koç spermasının dondurulması öncesi ilave edilen bazı antioksidanların, spermanın ekilibrasyon ve dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik ve oksidatif stres parametrelerine etkileri araştırılarak elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Hayvan yetiştiriciliğinde, spermanın kriyoprezervasyonu sonrasında suni tohumlama amacıyla kullanılması üstün verimli damızlık hayvanlara ait genetik özelliklerin korunmasında büyük önem taşımaktadır (Evans, 1988; Holt, 1997). Bununla birlikte, spermanın dondurulması sırasında meydana gelen soğuk şoku ve oksidatif stres nedeniyle spermatozoa yapısında kriyohasarlara meydana gelmektedir. Bunların temel nedeni ise, seminal plazma ve spermatozoa'da önemli antioksidanların seviyelerinde azalmaların olmasıdır. Bu süreçte, soğuk şoku ve stresinden etkilenen başlıca yapılar, spermatozoon plazma membranı ve akrozomdur (Hammerstedt vd., 1990; Noiles vd., 1995).

Spermatozoa membran yapıları, akıcı mozaik modelde düzenlenmiş protein, glikoprotein ve glikolipitleri içeren çift tabakalı fosfolipit katmandan oluşmaktadır. Bu yapıların termodinamik özellikte ve % 65-70 oranında doymamış fosfolipitlerden (yağ asidi) oluşması, membranların soğutulmalarının sonucu olarak geri dönüşümsüz faz değişimine, sıvı fazdan jel fazına geçmesine neden olmaktadır. Gelişen faz değişimi, enzimlerin kinetiğinde değişime yol açarak, çözündürme sonu hücre canlılığı azaltmaktadır. Bu değişimler sonrası ortaya çıkan olumsuz değişimler, hücrelerde soğuk şoku ve oksidatif stresten kaynaklanan hasarların ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Watson 1995, 2000). Bu olumsuz değişimler genel olarak **kriyohasarlara** olarak değerlendirilmektedir (Holt, 2000a; Holt, 2000b).

Soğutma/dondurma/çözündürme sırasındaki ısı ve ozmotik değişiklikler, plazma membranlarının lipit içeriğini, kalsiyum akışını, membran geçirgenliğini ve bütünlüğünü olumsuz etkileyerek mekanik strese neden olmaktadır (Hammerstedt vd., 1990; Noiles vd., 1995). Membranların doymamış fosfolipitlerce zengin olması lipit peroksidasyonuna karşı duyarlılığını artırmaktadır. Dondurulmuş/çözündürülmüş spermatozoa taze olana göre daha kolay lipit peroksidasyonuna uğramaktadır. Plazma membranlarında meydana gelen kriyohasarlara, spermatozoonda katyon ve antioksidan enzim kaybına yol açar (Harrison ve White, 1972). Bu hasar, hücre membranlarının kalsiyum geçirgenliğini bozar, spermatozoonun metabolik aktivitesi ve fonksiyonlarını (motilite, canlılık, membran bütünlüğü vb.) azaltır (Robertson vd., 1990; White, 1993). Bu olumsuz değişimler, düşük motiliteye sahip spermatozoanın dışı genital kanalında kolay ilerlemesini ve in vivo kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon gibi olayları olumsuz yönde etkiler (Watson, 1995; Zhao ve Buhr 1995). Spermanın dondurulması-çözündürülmesi sırasında oluşan ROS, endojen antioksidan savunma sistemini azaltarak fertilizasyonu etkiler. ROS'un düşük dozları, hiperaktivasyon, kapasitasyon, akrozom ve zona reaksiyonu gibi olaylarda önemli fizyolojik etkiler gösterir. Ancak, yüksek miktarlarda üretilmesinin spermatolojik parametreleri olumsuz yönde etkilediği de belirtilmiştir (Aitken ve Baker, 2004). Spermanın dondurulması sonrası ortamda ROS ürünlerinin oluşumu ve detoksifikasyonu arasındaki denge, spermatozoon yaşamı ve fonksiyonunda önem gösterir. Spermanın ROS ürünleri detoksifikasyonunda görevli doğal antioksidan sistemleri (glutatyon peroksidaz, glutatyon, süperoksit dismutaz, vitamin C, taurin vb.), spermatozoon korunmasında yeterli olmamakta, spermanın dondurulması/çözündürülmesi sırasında azalmakta, sonuç olarak spermatolojik parametreler ile fertilitate olumsuz olarak etkilenmektedir. Bu olumsuz etkilerin temel nedeni, spermanın soğutulması, dondurulması ve çözündürülmesi sırasında gelişen ısı şoku, ozmotik değişim ve gelişen lipit peroksidasyonudur (Bilodeau vd. 2000; Griveau vd. 1995; Holmes vd. 1992; Meister ve Anderson 1983).

Söz konusu olumsuz etkilere (hücre organellerinde yapısal deformasyonlar, DNA'da kırılmalar, spermatolojik paramerlerde düşme, antioksidatif kapasitede azalma) karşı bazı koruyucu maddelerin (antioksidanlar, kriyoprotektanlar v.s.) etkisi son zamanlarda anlaşılmış olup, sperma sulandırıcılarında kullanılmalarına başlanmıştır. (Maxwell ve Watson 1996; Gadea vd., 2004; Bucak vd., 2007; Bucak ve Uysal 2008). Ayrıca, membranların büyük oranda lipit içermesi nedeniyle gelişen peroksidatif hasarlara ve sperm fonksiyonlarındaki bozulmalara karşı etkili antioksidan sistemlerin gerekliliği rapor edilmiştir (Alvarez vd., 1983; Bilodeau vd., 2000, 2001). Dolayısıyla, kriyoprezervasyon sırasında oluşan tüm olumsuz etkiler, ortama antioksidanların ilavesiyle azaltılabilmekte, çözüm sonu spermatozoon fonksiyonları iyileştirilmektedir (Aitken, 1995; Maxwell ve Watson, 1996; Oehninger vd., 2000; Bilodeau vd., 2002). Antioksidanlar olumlu etkilerini, ortamdaki oksijen yoğunluğunu azaltarak, oluşacak olan zincir reaksiyonunu önleyerek veya oluşmuş peroksitleri parçalayarak göstermektedirler (Cheeseman ve Slater, 1993; Marxwell, 1995; Sardesai 1995; Thomas, 1995).

Kriyoprotektanlar, hücrenin dondurulmasında oluşan soğuk şoku zararına, hücreiçi kristal oluşumuna, çözündürme sırasında dekrizalizasyona ve gelişen membran destabilizasyonuna karşı koruyucu amaçlı olarak kullanılır. Genel olarak koruyucu etkilerini ortamdaki donmamış fraksiyonu artırarak ve ortamdaki iyon miktarını azaltarak gösterirler. Hücre, dondurulmadan önce kriyoprotektanlarla inkubasyona tabi tutularak, hücreiçinde dengeye gelmesi sağlanmaktadır. Kriyoprotektanların en önemli özellikleri, düşük moleküler ağırlığa sahip olmaları ve toksik etkilerinin ancak belirli oranlarda katıldıklarında oluşmasıdır (Palasz ve Mapletopt 1996). Hücre dondurma ortamındaki kriyoprotektanların toksisitesini azaltmak için, hücrelerin kriyoprotektanlara maruz kalma süresinin kısaltılması ve permeabl özelliği olmayan kriyoprotektanların kullanımı gibi uygulamalar yapılmaktadır (Massip 2001).

Kriyoprotektanlar işlevsel olarak iki gruba ayrılmaktadır.

- 1- Permeabl kriyoprotektanlar
- 2- Permeabl olmayan kriyoprotektanlar.

Permeabl özelliğe sahip kriyoprotektan olarak gliserol, etilen glikol, formamide, dimetilsülfoksit (DMSO) örnek olarak verilebilir. Bu tür kriyoprotektanlar etkilerini, hücre zarından içeriye girerek ve bağlaşık (koligatif) olarak göstermektedir. Koruyucu etkileri donma sırasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltmaları, dehidrasyonu düzenleyip protein yapılarını korumaları ve düşük sıcaklıkların yarattığı ozmotik büzüşmeyi azaltmaları ile oluşmaktadır (McGann 1978; Leeuw vd., 1993; Leibo ve Brandley 1999; Holt 2000a).

Gliserol: Gliserol yüksek oranda hidrofilik yapı gösteren bir polioll bileşiktir. Kimyasal yapısındaki C/OH oranının eşit olması onun spermatozoon üzerine olan etkisini artırmaktadır. Gliserolün toksisitesi, metabolik dönüşümünde oluşan methilglycosal tarafından oluşturulur. Toksik etki, türe bağımlılık göstermektedir (aygır, tavşan, kanatlı ve balık spermaları için fertilizasyonda kontraseptif özellik gösterir). Hücrelerde gliserolün toksik etkisi, membran biyoenerji dengesinde değişikliğe ve ozmotik strese yol açmasıyla kendini göstermektedir (Katkov vd., 1998; Woods vd., 2000; Alveranga vd., 2005). Ruminant ve primat spermasının dondurulmasında gliserolün katım oranı % 4-8, aygırlarda ise % 4-5'dir. Domuzda gliserol oranı % 3'ü, farede ise % 1,75'i geçtiğinde şiddetli akrozomal yıkımın olduğu bildirilmiştir (Katkov vd., 1998; Morrell ve Hodge 1998; Holt 2000b).

Etilen glikol: Birçok türün spermasında donma-çözüm sırasında oluşan hasara karşı etilen glikol, gliserolle eşit oranda etki sağlamaktadır. Etilen glikol, at embriyosunun dondurulmasında % 6, spermasının dondurulmasında 2 M oranında kullanıldığında gliserole göre daha az toksik etki göstermektedir (Alvarenga vd. 2000, 2005; Ball ve Vo 2001).

Eksternal kriyoprotektanlar ise, membranların sıvı ve katyonlara karşı permeabilitesinde artış sağlayarak, ozmotik strese karşı hücre membranlarını esnek hale getirir. Ayrıca, hücrede donma/çözünme sırasında gelişen lipit peroksidasyonunu azaltırlar. Sulandırıcıya ilavelerinde düşük oranda permeabl kriyoprotektan (gliserol, etilen glikol vb.) kullanılmakta, bu işlem internal kriyoprotektanların olası toksik etkilerini azaltmaktadır (Arav vd. 1993; Cabria vd. 2001).

Trehaloz: Eksternal kriyoprotektan olarak görev yapan sakkaritlerden olan trehaloz, iki D-glikoz molekülünün bağlanmasıyla oluşmuş bir disakkarit bileşiktir (Richards vd. 2002). Tam olarak etki mekanizması bilinmemekle birlikte, spermatozoa plazma membranına penetre olduğu, donma ve çözüm sırasında membran fosfolipitlerinin polar baş gruplarıyla hidrojen bağları kurarak yüzey artışı sağladığı, ozmotik tamponlayıcı göreviyle ozmotik şoka karşı koruyucu etkinlik gösterdiği ve serbest oksijen radikallerinin salınımını azalttığı ileri sürülmektedir (McWilliams vd., 1995; Gao ve Crister 2000; Aisen vd., 2005; Purdy 2006). Son yıllarda, trehaloz memeli spermasının dondurulmasında sulandırıcıya katılmaya başlanmış, çözüm/çözdürme sonrası spermatolojik parametreler (motilite, akrozom ve membran bütünlüğü) ve antioksidan kapasitenin artırılması ile lipit peroksidasyonunun azaltılması üzerinde önemli etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Aisen vd., 2000, 2002; Aboagla ve Terada 2003; Bucak vd., 2007).

Kriyoprotektif ajanların, dondurulmuş spermanın fertilizasyon gücünü etkilediği bilinmektedir. Çözüm sonu motilite değerleri tatmin edici oranlarda olsa da, bu ajanların (gliserol vb) kontraseptif özelliklerinden dolayı fertilitite oranlarında düşüslere neden olması, sperma

sulandırıcılarına daha düşük oranda kriyoprotektan madde katımını gerektirmektedir. Bu da ortama ancak antioksidan özellik gösteren katkı maddelerin katımıyla mümkün olmaktadır (Hammerstedt 1993; Purdy 2006; Bucak vd., 2007). Bu sayede ortamda reaktif oksijen türlerinin etkisiyle gelişen hasarlar giderilmeye çalışılmaktadır (Sies 1993). Spermanın dondurulması/çözdürülmesi sırasında gelişen oksidatif stres ve reaktif oksijen radikalleri, spermatozoa fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemekte ve yetersiz antioksidan içeren Tris-yumurta sarısı gibi klasik sulandırıcıların spermatozoonları bu hasarlara karşı koruyamadıkları bildirilmektedir (Parrish vd. 1986).

Taxifolin: Flavonoidler, bitkilerin büyük fenolik bileşenlerinde ve ikincil metabolitlerinde bulunmaktadır (Lin vd., 2007; Mateus ve Costa 2007). Bu maddeler, çeşitli polifenolik yapılarda çok sayıda besin maddesinde örneğin meyve, sebze, fındık ve içeceklerde (çay, kahve, kırmızı şarap) bulunmaktadır (Shikov vd. 2009). Flavonoidlerin serbest radikal oluşumunu önleyici, antimikrobiyal, antimitojenik, ve antikanserojenik özelliğe sahip olduğu belirtilmektedir. Flavonoid bileşiklerden olan taxifolinin, çam ya da karaçam köklerinde bulunduğu ve diken tohumundan köken aldığı bildirilmiştir (Vega-Villa vd. 2009). Taxifolinin kan damarlarında vazodilatasyona, kılcal kan dolaşımı destekleyicisi ve koroner kalp hastalıklarında da tedavi edici özellikleri vardır. Bunların yanısıra, taxifolinler gıda endüstrisinde antioksidan olarak da kullanılmaktadır (Dapkevicius vd., 2002). Sun vd. (2014) yapmış oldukları çalışmada diyabetik hale getirdikleri farelere 4 hafta boyunca 100 mg/kg/gün, 50 mg/kg/gün ve 25 mg/kg/gün olacak şekilde, 3 gruba gastrointestinal yolla taxifolin uygulaması yaparak diyabetik kardiyomyopati hastalığının önüne geçilmesini amaçlamışlardır. Luo vd. (2008) ovaryum hücre kültüründe kanser hücrelerinin gelişiminin baskılanması amacıyla yaptıkları çalışmada, 0-160 µM doz aralığında taxifolini kullanmış ve yüksek konsantrasyonlara ulaşıldığında kanserli hücrelerin gelişimini baskıladığını ortaya koymuşlardır.

Boron: Doğada mineral yapısında bulunan boron, geleneksel olarak sağlık alanında kullanılmasının yanında, endüstri, tarım ve kozmetik alanında da kullanılmaktadır. Boronun bitki ve bazı hayvan türlerinde esansiyel olarak alınması ve eksikliğinde ise 0,3 mg/kg-150 mg/kg doz aralığında alınması gerektiği araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Nielsen vd. 1987). Boronun kalsiyum, potasyum, vitamin D, aldehid dehidrogenaz, insülin, östrojen, testosteron, T3, T4, trigliserid, glukoz ve serbest oksijen radikallerinin oluşum mekanizmalarında etki gösterdiği belirtilmektedir (Devirian ve Volpe 2003). Ince vd. (2014) yapmış oldukları çalışmada, ratlarda intraperitoneal uygulanan siklofosfamidin (75 mg/kg) oluşturduğu lipid peroksidasyon artışının önüne geçmek için, 5, 10 ve 20 mg/kg dozunda intraperitoneal boron uygulaması sonucunda, boronun lipid peroksidasyonunu azaltıcı etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Fetuin: Fetuin, fetuin-A ve fetuin B olarak iki homolog proteinden oluşmaktadır (Olivier vd. 2000). Fetuin isminin, fetal hayatta bu proteinlere başta kan ve beyinin yapısında olmak üzere büyük gereksinim duyulmasından dolayı verildiği bildirilmektedir (Brown vd. 1992). Fetuin-A, yağ asit transferi (Cayatte vd., 1990), kemik oluşumu, insülin ve protein kinaz odaklı iletkenlik görevi ve sistemik yangı olaylarında rol almaktadır (Ombrellino vd., 2001). Fetuin-A ve fetuin-B birlikte dokularda kalsiyum fosfat çökmesinin önüne geçmektedir (Denecke vd., 2003; Liu vd., 2008). Fetuinler glikoprotein yapısında olup fetal sıgır serumunun (FCS) bir bileşeni olmasının yanında, ayrıca bir proteinaz inhibitörüdür (Schroeder vd., 1990). Bovin Serum Albumin (BSA) yapısına benzer bir etki göstererek sperm motilitesini artırdığı belirtilmektedir. Sperm sulandırıcısına katılan 3 mg/ml dozunda fetuinin, sperm motilitesine olumlu katkı yapmadığı ancak 80 mg/ml dozunda olumlu etki gösterdiği bildirilmektedir (Jaiswal vd., 2010). Sarıözkan vd. (2014) yapmış oldukları çalışmalarında boğa sperma sulandırıcısına sistemine (2,5; 7,5 mM), hiyaluronan (0,25; 1 mg/ml) ve fetuin'in (5-10 mg/ml) farklı dozlarını katarak boğa spermasını dondurmuşlardır. Çözüm sonu CASA motilite sonuçlarına, sperm normal morfolojik oranına ve HOST test sonuçlarına göre, 10 mg/ml fetuin dozu ile 2,5 mM sisteaminin en iyi sonuç verdiğini ortaya koymuşlardır.

Sperma'da gelişen ROS ürünlerinin bazal düzeyde salınımı fertilizasyon işleminde spermatozoon füsogenetiği ve fertilizasyon esnasında gerekli membran kayganlığı için önemli olduğundan, ROS ürünlerinin eliminasyonun tamamen giderilmesi ve antioksidan kapasitenin aşırı düzeyde ortamda artırılması istenen bir durum değildir. Bu açıdan antioksidanların optimum etkili katım dozları önem taşımaktadır (Alvarez ve Storey 1984; Aitken ve Baker 2004; Uysal vd., 2005; Bucak vd., 2007).

Yukarıda verilen bilgiler doğrultusunda, antioksidan özellikli katkı maddelerinden, boron, taksifolin, trehaloz ve fetuinin koç spermasının dondurulmasında olumlu etki göstereceği, çözüm sonrası koç spermasında spermatolojik parametreleri iyileştirebileceği, akrozomal hasarları azaltacağı, DNA bütünlüğünü koruyacağı, apoptozisi baskılayacağı, antioksidan cevap sinyal yollarını harekete geçirebileceği, dondurma çözülme sırasında gelişen lipid peroksidasyonunu azaltacağı ve spermadaki antioksidan kapasitelerini yükselteceği düşünülmüştür. Literatür taramalarında, trehaloz ortamında iki farklı kriyoprotektanın denendiği, parametrelerin moleküler ve gen düzeyinde araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Projenin ikinci aşamasında ilave edilen antioksidan özellikli katkı maddelerinin etkinlikleri, ilk defa bu çalışmada denenmiş ve değerlendirme kriterleri oldukça kapsamlı olarak ortaya konmuştur.

Ek olarak, bu çalışmada, canlı dokular üzerinde çok fazla ekzojen katkı maddesi olan antioksidan türlerinin olumlu etki göstermesine rağmen, antioksidanların seçimi, geniş literatür taraması ve antioksidanların kimyasal yapı uygunlukları göz önüne alınarak rastgele olmayan bir biçimde yapılmıştır. Bu nedenlerle söz konusu araştırmada kullanılması uygun görülen antioksidanlardan maksimum düzeyde verim alınması için, farklı dozlarının etkinlikleri araştırılarak optimum katım dozları saptanmış ve başarılı sulandırıcı tipi ortaya çıkarılmıştır.

Spermatozoonların değerlendirilmesinde kullanılan konvansiyonel parametrelerden motilite ve morfolojik muayene yöntemleri spermatozoonların fertilité gücü bakımından yeterli ve aydınlatıcı bilgi vermemektedir. Bu nedenle;

1. Akrozomal bütünlüğünün değerlendirilmesi amacıyla FITC-PNA,
2. Mitokondrial aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla JC-1 floresans boyama teknikleri,
3. DNA bütünlüğü için COMET testi,
4. Apoptozisin belirlenmesi için TUNEL testi,
5. Sperm kriyohasarlının ince yapı düzeyinde gösterilmesi amacıyla elektron mikroskopik inceleme,
6. Oksidatif stres parametrelerinin ve antioksidan cevap sinyal yollarının araştırılması için genetik ve biyokimyasal analizler,

kriyoprezervasyon işleminde spermatozoonlar üzerinde daha detaylı bilgilerle değerlendirmeler yapma imkanı sağlamıştır.

Dolayısıyla, bu çalışma, dondurma/çözdürme işlemlerinde, sperma üzerindeki antioksidan etkinliğinin, DNA hasarı ve apoptozis, sperma ince yapı hasarlarının elektron mikroskop düzeyde gösterilmesi ve antioksidan cevap sinyal yollarının araştırılması ile sonuçlarının ortaya konması bakımından oldukça özgün olmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Farklı Kriyoprotektan ve Trehalozun Farklı Dozlarını İçeren Sulandırıcı Gruplarıyla Miks Spermaların Dondurulması ve Çözüm Sonrası Değerlendirilmesi (1. Aşama)

Araştırmada sağlıklı ve fertil özelliği bilinen ergin 6 baş Konya-Merinos ırkı koçlara ait ejakülatlar kullanılmıştır. Koçların bakımı ve beslemesi Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırmalar Enstitüsünde yapılmıştır. Ejakülatlar, yetiştirme mevsiminde haftada 3 kez olmak üzere suni vajen yardımıyla alınmıştır. Koçlardan alınan ejakülatlardan % 80'in üzerinde motiliteye, 2×10^9 spermatozoa/ml'nin üzerinde yoğunluğa sahip olanları spermanın işlenmesinde kullanılmak üzere miks yapılarak 37°C'lik su banyosuna aktarılmıştır. Spermaların sulandırılmasında temel sulandırıcı olarak Tris sulandırıcısı kullanılmış ve aşağıda belirtilen formüle göre hazırlanmıştır:

Tris sulandırıcısı (temel sulandırıcı)

Tris (Hidroksimetilaminometan) 27,1 gr/L

Sitrik asit 14,0 gr/L

Fruktoz 10,0 gr/L

Bunun üzerine % 20 oranında yumurta sarısı ilave edilmiştir. Temel sulandırıcının osmotik basıncı 280-300 mOsm ve pH'sı 6,8-7,0 olarak ayarlanmıştır.

Bu aşamadan sonra farklı kriyoprotektan ve trehalozun farklı dozlarını içeren sulandırıcı gruplarıyla miks spermalar sulandırılmış ve dondurulmuştur. Çalışmada yer alan farklı sulandırıcı grupları şöyledir:

Temel sulandırıcı + % 5 gliserol

Temel sulandırıcı + % 5 etilen glikol

Temel sulandırıcı + % 3 gliserol + 60 mM trehaloz

Temel sulandırıcı + % 3 etilen glikol + 60 mM trehaloz

Temel sulandırıcı + % 1,5 gliserol + 100 mM trehaloz

Temel sulandırıcı + % 1,5 etilen glikol + 100 mM trehaloz

Miks yapılan ejakülatlar 6 eşit hacme bölünerek yukarıdaki sulandırıcı gruplarıyla ml'de yaklaşık 400 x 10⁶ spermatozoa olacak şekilde 37°C'ta sulandırılmıştır. Sulandırma işlemi tek aşamalı yöntemle göre 37°C'taki su banyosunda yapılmıştır. Bu işlemin ardından, sulandırılmış spermalar oda ısısında (22±2°C) payetlere çekilmiş ve +5°C'deki digital göstergeli soğuk kabine yerleştirilmiştir. Isının 45 dk-1 saat içerisinde 5°C'ye düşürülmesinden sonra numuneler 2 saat 5°C'ta ekilibasyon işlemine tabii tutulmuştur. Bunu

izleyen süreçte numuneler sıvı azot buharında (~ 100 °C) dondurularak sıvı azot (-196 °C) içerisinde saklanmıştır. Çalışma en az 6 replikasyondan oluşmuştur. Çalışmada, dondurma (1 hafta sonra)/çözdürme sonrası in vitro spermatolojik testlerden; **1.** motilite ve akrozom hasarlarının tespiti için FITC/PNA-PI, **2.** mitokondrial aktivitenin belirlenmesi için JC-1 floresan boyama yöntemleri, **3.** DNA hasarının tespiti için COMET testi, **4.** apoptozisin saptanması için TUNEL testi, **5.** ince yapı düzeyinde (akrozom hasarları gibi) kriyohasarlardan gösterilmesi için elektron mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

Birinci aşamadaki çalışma sonucunda in vitro spermatolojik parametrelere göre en başarılı sonuçları veren iki sulandırıcı grubu, ikinci aşama çalışmasında katkı maddelerinin etkinliklerinin belirlenmesinde temel sulandırıcı olarak kullanılmıştır ve T1 ve T2 sulandırıcıları olarak isimlendirilmiştir.

3.2 Spermanın Farklı Katkı Maddeleriyle Dondurulması ve Çözüm Sonrası Değerlendirilmesi (2. Aşama)

3.1.'da belirtilen çalışma sonucunda, in vitro spermatolojik parametrelere göre en başarılı sonuçları veren iki sulandırıcı grubuna (T1 ve T2), üç farklı katkı maddesi üç farklı dozda ilave edilmiş ve etkinlikleri araştırılmıştır. Bu katkı maddeleri; Boron (0,25 mM, 0,5 mM ve 1 mM), Taksifolin hidrat (10 µM, 100 µM ve 500 µM) ve Fetuin (2,5 mg/ml, 5 mg/ml ve 15 mg/ml)'dir.

Bu ikinci aşama çalışmasında, üç alt deney oluşturulmuş ve her bir deneyde bir katkı maddesinin farklı dozlarının etkinlikleri iki farklı sulandırıcı içerisinde denenmiştir.

1. Deney: Boron ve iki farklı sulandırıcıyı içeren 8 farklı sulandırıcı grubuyla yapılmıştır.

1. T1 + Boron 0,25 mM (Gliserol %5 + Boron 0,25 mM)
2. T1 + Boron 0,5 mM (Gliserol %5 + Boron 0,5 mM)
3. T1 + Boron 1 mM (Gliserol %5 + Boron 1 mM)
4. T2 + Boron 0,25 mM (Gliserol %3 + Trehaloz60 mM ++ Boron 0,25 mM)
5. T2 + Boron 0,5 mM (Gliserol %3 + Trehaloz60 mM ++ Boron 0,5 mM)
6. T2 + Boron 1 mM (Gliserol %3 + Trehaloz60 mM ++ Boron 1 mM)
7. T1 (Gliserol %5)
8. T2 (Gliserol %3 + Trehaloz60 mM)

Miks yapılan ejakülatlar 8 eşit hacme bölünerek yukarıdaki sulandırıcı gruplarıyla ml'de yaklaşık 400 x 106 spermatozoa olacak şekilde 37°C'de sulandırılmıştır. Sulandırma işlemi tek aşamalı yöntemle göre 37°C'teki su banyosunda yapılmıştır. Sulandırma işleminin ardından sulandırılmış spermalar oda ısısında (22±2°C) payetlere çekilmiş ve +5°C'teki digital göstergeli soğuk kabine yerleştirilmiştir. Isının 45 dk-1 saat içerisinde 5°C'ye düşürülmesinden sonra numuneler 2 saat 5°C'ta ekilibrasyon işlemine tabii tutulmuştur. Bunu izleyen süreçte numuneler sıvı azot buharında dondurularak sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Çalışma en az 8 replikasyondan oluşmuştur.

2. Deney: Taksifolin hidrat ve iki farklı sulandırıcıyı içeren 8 farklı sulandırıcı grubuyla yapılmıştır.

1. T1 + Taksifolin hidrat 10 µM (Gliserol %5 + Taksifolin hidrat 10 µM)
2. T1 + Taksifolin hidrat 100 µM (Gliserol %5 + Taksifolin hidrat 100 µM)
3. T1 + Taksifolin hidrat 500 µM (Gliserol %5 + Taksifolin hidrat 500 µM)
4. T2 + Taksifolin hidrat 10 µM (Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin hidrat 10 µM)
5. T2 + Taksifolin hidrat 100 µM (Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin hidrat 100 µM)
6. T2 + Taksifolin hidrat 500 µM (Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin hidrat 500 µM)
7. T1 (Gliserol %5)
8. T2 (Gliserol %3 + Trehaloz60 mM)

3. Deney: Fetuin ve iki farklı sulandırıcıyı içeren 8 farklı sulandırıcı grubuyla yapılmıştır.

1. T1 + Fetuin 2.5 mg/ml (Gliserol %5+ Fetuin 2.5 mg/ml)
2. T1 + Fetuin 5 mg/ml (Gliserol %5+ Fetuin 5 mg/ml)
3. T1 + Fetuin 15 mg/ml (Gliserol %5+ Fetuin 15 mg/ml)
4. T2 + Fetuin 2,5 mg/ml (Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetuin 2.5 mg/ml)
5. T2 + Fetuin 5 mg/ml (Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetuin 5 mg/ml)
6. T2 + Fetuin 15 mg/ml (Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetuin 15 mg/ml)
7. T1 (Gliserol %5)
8. T2 (Gliserol %3 + Trehaloz60 mM)

Miks yapılan ejakülatlar 8 eşit hacme bölünerek yukarıdaki sulandırıcı gruplarıyla ml'de yaklaşık 400x10⁶ spermatozoa olacak şekilde 37°C'ta sulandırılmıştır. Sulandırma işlemi tek aşamalı yöntemle göre 37°C'taki su banyosunda yapılmıştır. Sulandırma işleminin ardından sulandırılmış spermalar oda ısısında (22±2°C) payetlere çekilmiş ve +5°C'taki digital göstergeli soğuk kabine yerleştirilmiştir. Isının 45 dk-1 saat içerisinde 5°C'ye düşürülmesinden sonra numuneler, 2 saat 5°C'ta ekilibrasyon işlemine tabii tutulmuşlardır. Bunu izleyen süreçte numuneler, sıvı azot buharında dondurularak sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Çalışma en az 8 replikasyondan oluşmuştur.

Çalışmada, dondurma (1hafta sonra)/çözdürme sonrası olmak üzere in vitro spermatolojik testlerden; motilite, akrozom hasarlarının tespiti için FITC/PNA-PI, mitokondrial aktivitenin belirlenmesi için JC-1 floresans boyama yöntemleri, DNA hasarının tespiti için COMET testi, apoptozisin saptanması için TUNEL testi, kriyohasarlara (akrozomal bölge hasarları gibi) ince yapı düzeyinde gösterilmesi için elektron mikroskopik incelemeler, oksidatif stres parametrelerinden (lipit peroksidasyon, total antioksidan kapasite) ve antioksidan cevap sinyal yollarının araştırılması için biyokimya ve genetik analizler yapılmıştır.

İkinci aşama çalışma sonrasında, her deney grubundan in vitro parametrelere göre elde edilen en başarılı sonuç veren sulandırıcı gruplarıyla dondurulan spermalar üçüncü aşama çalışmasına alınmıştır.

3.2.1 İn vitro Spermatolojik Parametreler

3.2.1.1 Spermatozoa Motilitesi

Spermatozoa motilitesi 37 °C 'lık ısıya sahip ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskopta lam-lamel arasına alınan sperma numunesinde en az 3 farklı mikroskop sahasına bakılarak yapılmıştır. Sahalardaki motilite değerlerinin ortalaması % motilite oranı olarak kaydedilmiştir.

3.2.1.2 Spermatozoon Akrozom Hasarların Tespiti

Spermatozoon akrozom hasarların değerlendirilmesi için FITC-PNA/PI (Fluorescein isothiocyanate conjugated to Arachis hypogaea/Propidium iodide) floresan boyaması uygulanmıştır. Bunun için 37 °C'deki 60 µL sperma numunesi (25x10⁶ /mL) üzerine FITC-PNA (100 µg FITC-PNA/1 mL PBS) temel çözeltisinden 10 µL ve PI (2 mg PI/1 mL distile su) çözeltisinden 2 µL ilave edilip, karanlık ortamda 37 °C'de 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası numune 10 µL Hancock sıvısıyla tespit edilmiştir. Numuneden alınan 2 µL hacim, lam-lamel arasında akrozom bütünlüğü yönünden floresan ataçmanlı faz-kontrast mikroskopta değerlendirilmiştir (Leica DM3000, Germany). Akrozomu yeşil floresan alanlar

hasarlı akrozoma sahip spermatozoayı, akrozomu yeşil floresan boya almayanlar ise sağlam akrozoma sahip spermatozoayı göstermiştir.

3.2.1.3 Mitokondrial Aktivitenin Belirlenmesi

Bu değerlendirme için JC-1/PI floresans boyama esasına dayanarak, Çoyan vd. (2011)'nin uyguladığı yöntemine göre yapılmıştır. 300 µl sperma, 2,5 µl JC-1 ve 2,5 µl PI ile 37 °C'de 20 dk inkube edilmiştir. Ardından üzerine 10 µl Hankok solusyonu eklenmiştir. Bu karışımdan alınan 2,5 µl'lik numune, lam-lamel arasında floresan ataçmanlı mikroskopta 450-490 nm dalga boyunda incelenmiştir. Gövde kısmı sarı-turuncu floresan gösterenler yüksek mitokondriyal aktiviteye sahip spermatozoayı, yeşil floresan gösterenler düşük mitokondriyal aktiviteye sahip spermatozoayı göstermiştir. Boyamalar sonrası hücrelerin mikroskop görüntüleri kamera vasıtasıyla çekilip, bilgisayarda hücre sayımı işlemleri için depolanmıştır.

3.2.1.4 Oksidatif Stres Parametreleri

Sperma numunelerinin hazırlanması:

Sulandırılmış spermatozoon hücreleri +40C' ta 800 x g, 15 dk süre santrifüj edilerek ayrıldı, dipteki hücelere PBS ilave edildi ve süpernatant kısmı uzaklaştırılarak 3 kez yıkandı, işlem bitiminde PBS ile 0,5 ml'ye tamamlandı. Homojenizasyon için sperm süspansiyonu buzlu su içerisindeki 2 ml'lik hazne içerisine konuldu ve soğuk ortamda 10 sn süreli sonikasyon (Bandelin Sonopuls, Bandelin Electronic HeinrichstraBe, D-12207, GerateTyp:UW 2070, Pro-Nr. 51900037369.004, Berlin) uygulandı. Her uygulamanın sonunda örnekler 30 sn buz içerisinde bekletilmek suretiyle 5 kez işlem tekrarlandı. Lipit peroksidasyon (LPO) analizi için 120 µl homojenat alınıp üzerine 10 µl 0,5 mM BHT (bütil hidroksi toluen) ilave edildi, tGSH analizi için ise homojenattan 50 µL kullanıldı geriye kalan homojenat 12000 x g +40C' ta 15 dakika santrifüj edilip süpernatantlar ayrımlandı. Analizler yapılıncaya kadar örnekler -860C' ta saklandı.

Lipit peroksidasyonu (LPO) Düzeyi Analizi:

Lipit peroksidasyon ürünleri düzeyleri ticari LPO-586TM Oxis Research (OxisResearchTM, Bioxytech, USA) kiti ile spektrofotometrik olarak (UV 2100 UV-VIS Recording Spectrophotometer Shimadzu, Japonya) belirlendi. Analiz, 450C'de N-methyl-2phenylindole adlı kromojen maddenin MDA ve 4-hydroxyalkenals (LPO) ile reaksiyonuna dayanılarak gerçekleştirildi. Bir mol MDA veya 4-hydroxyalkenal, 2 molekül N-methyl-2phenylindole ile asetonitril içinde reaksiyona girmekte ve 586 nm'de dayanıklı bir kromofor meydana getirmektedir. Sonuçlar µmol (109 hücre/ml) olarak belirlendi.

Glutasyon (GSH) Düzeyi Analizi:

Redükte Glutasyon düzeyleri GSH-420R Oxis Research kiti (OxisResearchR, Bioxytech, USA) kullanılarak ölçüldü. Metot, kromoforik thion oluşumu temeline dayanmaktadır. Homojenat tamponlandı ve okside glutasyonu (GSSG) redükte duruma (GSH) getirmek için tris (2-karboksietil) fosfin eklendi. Baz ilavesiyle pH'nın 13'ü geçmesine dayanılarak; GSH-tioetere spesifik β -eliminasyon, kromoforik tion bileşiği ortaya çıkartıldı. Toplam GSH düzeyi, spektrofotometri ile 420 nm' de ölçüldü ve bulgular 109 spermatozoa/ml için μ mol olarak tespit edildi.

Total antioksidan kapasite (AOP) analizi:

Ölçüm için SIGMA Antioxidant Assay Kit kullanıldı. Metot, numunede bulunan tüm antioksidanların kombine etkisiyle Cu^{+2} 'nin Cu^{+} 'ya redüksiyonu temeline dayanmaktadır. Kromojenik reagent olan Bathocuproine (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolin) 490 nm'de maksimum absorbanza sahip olan Cu^{+} ile 2:1 oranında selektif kompleks oluşturmaktadır. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için ürik asit konsantrasyonunun standardı kullanıldı. Total antioksidan potansiyeli, spektrofotometri ile 490 nm'de ölçüldü ve bulgular 109 spermatozoa/ml için mmol olarak elde edildi.

Numuneler ölçüm öncesi Bucak vd. (2010)'nin modifiye ettikleri sonikasyon işlemiyle hazır hale getirilmiş ve ölçüm yapıncaya kadar $-80^{\circ}C$ ' de saklanmıştır. Örneklerde lipit peroksidasyonu ve total antioksidan aktiviteleri ticari kitler kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.1.5 Antioksidan Cevap Sinyal Yolakları/Genetik Analizler

Hücrelerde bulunan Nuklear faktor (NFE2L2) bir transkripsiyon faktörüdür ve hücrelerin oksidatif stresin sitotoksik etkilerinden kurtulmasında primer rol alan antioksidan cevap sinyal iletim sisteminde, yolaklarında görevi vardır. NFE2L2, antioksidan enzimlerin ekspresyon seviyelerinin artmasına yol açar ve oksidatif stress altındaki hücrelerin canlı kalmasını sağlar. Bu sinyal yolağının aktive olması sonucunda birçok hücre koruyucu proteinin gen düzeyinde ekspresyonu uyarılır. Bu yolağın hedef genleri arasında bulunan NAD(P)H quinone oksireduktaz (Nqo1), Glutamate-cysteine ligase (Gclc), Glutathione S-transferaz (GST)'in aktive edilmesi durumunda oksidatif stresin azaltılabileceği düşünülmektedir. Spermada dondurma işlemine ve sulandırıcıya ilave edilen antioksidan özellikli katkı maddelerine bağlı olarak yukarıdaki genler bakımından ekspresyon düzeyinde araştırmalar yapılarak, bu işlemler sonucunda sperma hücresinin oksidatif strese ve koruyuculara karşı verdiği cevabın moleküler mekanizmalarının bir kısmı araştırılmıştır.

3.2.1.5.1 Spermada Gen Ekspresyon Analizleri

Sperma örnekleri için BoviPure sperm seperasyon sıvısıyla somatik gücrelerden sperma hücrelerinin ayrılması işlemi: Sperma payetleri 25 sn boyunca 37 °C sıcaklıkta su banyosunda çözdürüldü. Çözdürülen her bir payet, bovipure ile muamele edildi: Bovipure çözeltisinden, izotonik bir solüsyon olan BoviDilute ile sulandırılarak %40 ve %80 fraksiyonları hazırlandı. (Underwood, S. L 2009). 15 ml santrifuj tüplerine 0,5 ml eşit hacimlerde %80 ve %40 konsantrasyonlarda Bovipure çözeltisi eklendi. Bu çözelti üzerine 0,25 ml kadar çözdürülmüş semen örneği aktarıldı. 20 dk boyunca +4 oC sıcaklıkta 600 G hızda santrifuj yapıldı. Üst faz uzaklaştırılarak, alt kısımda oluşan sperm pelleti üzerine 0,5 ml PBS solüsyonu eklendi. Sperm hücrelerinin PBS solüsyonu üzerinde çözülmesi için kısa bir vorteks işlemi yapılarak, numuneler 10 dk boyunca +4 oC sıcaklıkta 600 G hızda santrifuj yapıldı. Üst faz yıkanarak, 0,1 ml PBS ile sperm numuneleri sulandırıldı.

RNA ekstraksiyon işlemi

Mikrosantrifuj tüplere 100 µl PBS-sperm karışımı eklendi. Liziz ve faz ayrımı işlemlerini gerçekleştirmek üzerine süspansiyon içerisine 1 ml TRizol reagent solüsyonu ve 0,25 mg zirkonyum bilye (0,5 mmø) ilave edildi. Homojenizatörde 20 sn olacak şekilde hücreler parçalandı. Süspansiyon oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Karışıma 200 µl kloroform eklenerek dikkatlice karıştırıldı, oda sıcaklığında 2 dk bekletildikten sonra 12000 G hızda 10 dk 4 °C sıcaklıkta santrifuj işlemi uygulandı. Farklı bir mikrosantrifuj tüpe aktarılan Renksiz üst sıvı faz içerisine 0,5ml isopropanol eklenerek dikkatlice karıştırıldı. Karışım 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12,000 G hızda 10 dk 4°C sıcaklıkta santrifuj işlemi uygulandı. Süpernatant kısmı atılarak oluşan pellet 1 ml %70 etanol ile 7500 G hızda 5 dk 4°C sıcaklıkta tekrar santrifuj yapılarak yıkandı. Üst faz mikrosantrifuj tüpünden uzaklaştırılarak, RNA pelleti kuruyana kadar (15-30 dk) oda sıcaklığında bekletildi. 30 µl Nükleaz free elution buffer eklenerek pellet süspanse edildi.

DNase işlemi

Colibri Titertek Berthold cihazı kullanılarak spermelerin RNA ölçümleri gerçekleştirildi. Cihaz çalıştırıldıktan sonra nükleik asit sekmesine tıklandı. Sekme açıldıktan sonra örnek tipi RNA-40, ışık yolu uzunluğu otomatik olacak şekilde parametreler ayarlandı. Cihazın kapağı açıldıktan sonra körleme için elüsyon bufferdan 2 µl konulup kapak kapatıldıktan sonra blank seçeneğine tıklandı. Körleme işlemi bittikten sonra kapak açılarak, elüsyon buffer temizlendi. Numunelerden sırasıyla 2 µl alınıp ölçüm seçeneği kullanılarak RNA ölçme işlemi tamamlandı. Sperm numunelerine ait nükleik asit çözeltilerinin RNA konsantrasyonları 1 µg/10 µl olacak şekilde ayarlandı. DNase I enzim (Arcticzymes, Norveç) protokolüne göre; 0,5

$\mu\text{g}/ 5 \mu\text{l}$ total RNA üzerine $1 \mu\text{l}$ DNase I buffer eklenerek $5 \mu\text{l}$ tamamlayak şekilde nükleaz free su eklendi. Karışım $37 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklıkta 30 dk inkube edildi. İnkübasyon işlemi sonucunda $1 \mu\text{l}$ EDTA ilave edilerek $65 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklıkta 10 dk süre ile DNase I enzimi inaktive edilerek cDNA işlemine hazır hale getirildi.

Reverse Transkripsiyon işlemi

Sperm numunelerinden elde edilen $0,5 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ total RNA örneklerinden Reverse transkriptaz işlemi ile cDNA oluşturmak için Viva cDNA Synthesis Kit (Vivantis, Malezya) kullanıldı. $1 \mu\text{l}$ 10 Mm dNTP miks, $1 \mu\text{l}$ Random Hexamer ve $1 \mu\text{l}$ Oligod d(T) total RNA üzerine ilave edilerek $10 \mu\text{l}$ olacak şekilde nükleaz içermeyen su eklendi. Primerlerin bağlanabilmesi için $65 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklıkta 10 dk inkübasyon gerçekleştirildi. İşlem sonrasında buz üzerinde 2 dk bekletilen karışım üzerine, nükleaz free su ile $10 \mu\text{l}$ hacim olacak şekilde $2 \mu\text{l}$ 10X buffer m-MuLV ve $1 \mu\text{l}$ M-MuLV Reverse Transkriptaz enzimi ilave edilerek dikkatlice karıştırıldı. Reverse Transkriptaz karışımı için, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 dk , $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 dk ve reaksiyonu durdurmak için $85 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 dk inkübasyon gerçekleştirildi. Oluşturulan cDNA örnekleri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ de saklandı.

Sybrgreen Real Time PCR (qPCR) Gen Ekspresyonu

Proje için seçilen NAD(P)H quinone oksidoreduktaz (Nqo1), Glutamate-cysteine ligase (Gclc), Glutathione S-transferaz (GSTP) (Şen, 2015) ve liyofilize haldeki primerleri 100 Mm olacak şekilde nükleaz free su ile çözdürüldü. Real Time PCR işlemi için Sybrgreen boya içeren 2X master miks (Diagen, Türkiye) kullanıldı. 2X master miks 10 ul , $0,5 \text{ mM}$ forward ve reverse primerler, $2 \mu\text{l}$ cDNA $0,2 \mu\text{l}$ Taq DNA polymerase (Vivantis, Malezya) nükleaz free su ile hacim $20 \mu\text{l}$ 'ye tamamlandı. Reaksiyon, realtime PCR cihazında (ABI 7500 fast, ABD) 8 'li strip tüpler kullanılarak, ilk denatürasyon $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 dk , 40 tekrar $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 sn , $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 sn (okuma), $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 sn fragment çoğaltma işlemi takiben $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 sn , $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 dk ve $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 sn olarak sn de $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklık artışıyla melting curve (HRM) işlemi yapıldı. Real time PCR işlemi sonucunda elde edilen Ct değerleri kayıt edilerek hesaplamalar yapıldı.

NAD(P)H quinone oksidoreduktaz (Nqo1), Glutamate-cysteine ligase (Gclc), Glutathione S-transferaz (GSTP)'i determine eden genlerin ekspresyonları, farklı katkı maddeleriyle dondurulan sperma numunelerinde değerlendirildi.

(Underwood vd., 2009; Şen, 2015; Hamilton vd., 2018).

Spermadan total RNA analizi Trizol yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'ların miktarı ve kalitesi Nanodrop'ta belirlenmiştir. İzolasyon sırasında oluşabilecek fenol, protein ve genomik (g) DNA kontaminasyonlarını belirlemek için $A260/A280$ ve $A260/A230$ oranları değerlendirilmiştir. UV ölçümleri $A260/A280$ için $2\pm 0,1$ ve $A260/A230$ için $2,0-2,4$ arasında

olan RNA örnekleri qPZR analizlerinde kullanılmıştır. RNA örneklerinin kalitesinin belirlenmesi amacıyla 1µg/10µl konsantrasyonundaki RNA üzerine 6X yükleme boyasından 2 µl konularak % 1'lik agaroz jel elektroforez sonrası Ethidium Bromür (EtBr) ile boyanan RNA bantlarının kalitesi UV-translüminatör üzerinde gözle ve görüntüleme sisteminden alınan resim ile değerlendirilmiştir. Total RNA örnekleri -70 °C'de muhafaza edilmiştir. Olası gDNA kontaminasyonlarının ortadan kaldırılması amacıyla DNase-I (Fermentas, ABD) enzim reaksiyonu üretici firmanın protokolüne göre uygulanmıştır. Bu protokole göre 2 µg/20µl total RNA üzerine 2 µl DNase I reaksiyon karışımı ve 2 µl DNase I enzimi konularak su banyosunda 37°C 30 dakika bekletilmiştir. Reaksiyon durdurulması için 2 µl EDTA ilavesi ile 65°C su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. Nükleaz ari DEPC ddH2O kullanılarak 1 µg total RNA kullanılarak Reverse Transkriptaz (RT) reaksiyon kiti (Fermentas, USA) ile cDNA (complementary DNA) üretilmiştir. Sentezlenen cDNA örnekleri -80 °C'de qPZR analizleri yapıncaya kadar muhafaza edilmiştir. Aday genlerin ekspresyon seviyelerinin mRNA düzeyinde tespiti amacıyla real time PZR (RT-PZR) teknolojisi kullanılmıştır. RT-PZR protokolünde 10 µl SYBR Green Master Mix (2x), her bir primerden 5 pMol, 1 µl cDNA ve toplam 20 µl hacimde hazırlanmış ve qPZR protokolü uygulanmıştır. Termal siklus profili olarak: 95°C'de 10 dakika denatürasyon sonrası 40 siklus 95°C'de 30 s, 60°C'de 1 dk ve 72°C'de 30 sn kullanılmıştır. Melting curve analizlerinde 95°C (1 dakika), daha sonra 55°C ve 95°C arasında, her bir derecede floresan ölçümü yapılmıştır.

3.2.1.6. DNA Bütünlüğü ve Apoptozisin İncelenmesi

DNA çift zincir kırıkları ve fragmantasyonu incelemesi için, sıvı azotta saklanan spermalar, 35°C'deki su banyosunda tutularak çözülmüş ve payetlerdeki spermalar epondorflara aktararak, 2500 rpm'de 5 dakika döndürülerek sulandırıcıları uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 1X PBS ile 3 kez yıkanan spermalardan, DNA çift zincir kırıklarının belirlenmesi için COMET testi ve DNA fragmantasyonunun belirlenmesi için TUNEL testinde kullanılmak üzere 20 µl alınarak 80 µl 1X fosfat tamponlu tuz (PBS) içine aktarılmıştır. Bu karışımın hazırlanmasını takiben:

1. TUNEL testinde kullanılmak üzere, PBS-sperma karışımından 10 µl alınarak, poli-L-lizin kaplı lamlara smear şeklinde yayılmıştır.
2. COMET testinde kullanılmak üzere, PBS-sperma karışımından yaklaşık 100.000 hücre olacak şekilde alınarak, düşük erime noktalı agaroz (LMA) ile karıştırılmıştır.

TUNEL Testi (Roche, In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Roche- 11 684 817 910, kit prosedürü):

Çözdürüldükten sonra PBS ile dilüe edilen örnekler, poli-L-lizin kaplı lamlara smear şeklinde yayılmıştır. Slaytlar açık havada kurutulduktan sonra taze hazırlanmış %4'lük

paraformaldehitte oda ısısında 1 saat fikse edilerek, PBS ile 3X2 dk yıkanmıştır. Daha sonra 10 mM Tris-HCl içinde 20 µg/ml proteinaz K ile oda ısısında 10 dk inkübe edilen slaytlar, taze hazırlanmış bloklama solüsyonu (%3 H₂O₂, metanolde) ile oda ısısında 10 dk inkübe edilmiştir. PBS ile yıkamanın ardından, taze hazırlanmış şeffaflaştırma solüsyonu (%0,1 Triton X 100 ve %0,1 Sodyum sitrat) ile buz üstünde inkübe edilen slaytlar tekrar PBS ile yıkanmıştır. İşaretleme işlemi için kit içerisindeki 2 numaralı tüpte yer alan label solüsyonunun 450 µl'si ile 1. tüpteki 50 µl enzim karıştırılmış ve her bir örneğe bu karışımdan 50 µl eklenerek lamel kapatılmıştır. Nem odası içinde 37°C'de 1 saat inkübe edilen örnekler, PBS ile yıkanmıştır (3X5 dk). Daha sonra sinyal dönüşümü için, kit içinde bulunan converter-POD'dan her slayta 50 µl eklenerek, lamel kapatılmış ve nem odası içinde, 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Slaytlar PBS ile 3X2 dk yıkanarak, renk oluşumu için, örnek başına 100 µl DAB Substrat eklenerek, oda sıcaklığında yaklaşık 15 dk (renk oluşumu gözlenene kadar) beklenmiştir. Örnekler 3X2 dk PBS ile yıkanarak, Harris Hematoksilin ile zıt boyama [Harris Hematoksilinde 30 sn boyama; akarsuda yıkama; %70, %96 ve absöü alkolden (3'er dk) geçirilerek dehidrasyon; 2X3 dk ksilinde şeffaflaştırma] yapılmıştır. Zıt boyamanın ardından lamellar entellan kullanılarak cam bir lamel ile kapatılmıştır.

Işık mikroskopunda 40X büyütmede, her slaytta 100 hücre sayılarak, TUNEL-pozitif hücre %'si ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Negatif kontrol: Örnekler sadece label solüsyonu ile inkübe edilmiştir.

COMET Testi (DNA hasarının tespiti):

Tamamen buzlu lamellere %1'lik normal erime noktalı agaroz (NMA) yayılarak kurutulmuştur. Çözdürüldükten sonra PBS ile dilüe edilen örnekler yaklaşık 100.000 hücre olacak şekilde %0,75'lik 50 µl LMA ile karıştırılmıştır. Bu süspansiyondan NMA olan lamellere 70 µl dökülerek üzeri lamelle kapatılmış ve +4°C'de dondurulmuştur. Lameller alındıktan sonra, lamellar 20 dakika oda ısısında, daha sonra da 2 saat 37°C'de lizis solüsyonunda [Lizis stok solüsyonu (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Trizma Base; pH 10) içerisine %1 Triton X; %1,5 SDS; 10 mM DL-Dithioerithol eklenerek hazırlanır] inkübe edilmiştir. Daha sonra lizis solüsyonuna 20 µg/ml Proteinaz K (DNAse free) eklenerek 37°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Lizis tamponundan alınan slaytlar soğuk elektroforez tamponuna [100 ml 10X TBE ((81 gr Tris base; 41 gr Borik asit; 30 ml 0,5 M EDTA (18,61 gr EDTA; 2 gr NaOH; 80 ml dsu)) 900 ml distile su] yerleştirilerek, DNA'nın gevşemesi için 4 °C'de bekletilmiştir. Elektroforez işlemi takiben slaytlar oda ısısında 1 saat kurutulularak fikse (%15 trikloroasetik asit, %5 çinko sülfat ve %5 gliserol) edilmiştir. Daha sonra deiyonize su ile yıkanarak 50°C'de 1 saat kurutulan slaytlar, deiyonize su ile 5 dk rehidre edilerek, gümüş boyama yöntemi ile boyanmıştır. Bu işlem için Solüsyon A (%5 sodyum karbonat) ile Solüsyon B (%0,2 amonyum nitrat, %0,2 gümüş nitrat, %0,5 tungstosilik asit, %0,15 formaldehit, %5 sodyum karbonat) 2:1 oranında

kariştirilerek, çalkalayıcı 20 dk inkübe edilmiş, daha sonra taze boya solüsyonu hazırlanarak, örnekler 20 dk daha inkübe edilmiştir. Hafif bir gri ya da kahverengi renk oluşunca, slaytlar reaksiyonun durdurulması için %1'lik asetik asit içine alınmış, daha sonra slaytlar 3 kez deiyonize su ile yıkanarak, toz almayan kutularda, oda ısısında kurumaya bırakılmışlardır. Işık mikroskopik incelemelerden önce 5 dk deiyonize suda rehidre edilen her slaytta ortalama 200 hücre incelenerek, DNA hasarı hücre %'si ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

İstatistiksel Değerlendirme

TUNEL ve COMET testlerinden elde edilen veriler IBM SPSS Statistics 21 programı ile analiz edilmiş ve $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.2.1.7 Kriyohasarlara İnce Yapı Düzeyinde Gösterilmesi (Elektron Mikroskopu Çalışması)

Örneklerin, Geçirimli Elektron Mikroskopu çalışması için gluteraldehitli solüsyonda tespit edilmesinden sonra, OsO_4 ile ikinci tespit işlemi yapılmıştır (Millonig 1961). İkinci tespit işleminden sonra yıkanan örnekler yükselen etil alkol serileri, toluol ve epon serilerinden geçirilmiştir. Örnekler epoksi reçine bloklara gömüldükten sonra elde edilen bloklardan yarı ince kesitler alınmış ve Toluidin mavisiyle boyanarak ışık mikroskopunda fotoğraflanmıştır. Işık mikroskopunda belirlenen yerlerden alınan ince kesitler gridlere aktarılmış, uranil asetat ve kurşun sitratla boyandıktan sonra (Reynolds 1963) ZEISS SUPRA 40 VP elektron mikroskopunun STEM (Scanning Transmission Electron Microscope) dedektörü ile incelenerek mikrografları alınmıştır. Örneklerin, Taramalı Elektron Mikroskopu çalışması için gluteraldehitli solüsyonda tespit edilmesinden sonra yıkama işlemleri yapılmış ve ardından alkol serilerinden geçirilmiştir. Lisinli lamlara alınan örnekler, kurutma işleminden sonra altınla kaplanarak ZEISS EVO LS 10 elektron mikroskopunda incelenmiş ve mikrografları alınmıştır.

(Wael vd. 2018, Hafez ve Kanagawa, 1973, Mekkawy ve Osman, 2006)

3.3. Spermalarla Tohumlamaların Yapılması (3. Aşama)

Döl verimi değerlendirilmesi çalışmada kullanılan katkı maddelerinin farklı dozları spermatolojik ve oksidatif stres parametreleri bakımından değerlendirildikten sonra en iyi sonuç veren katkı maddeleri (fetuin, taksifolin hidrat ve bor) dozları belirlendi. Bu katkı maddelerini içermeyen iki grup (%5 gliserol ve %5 etilen glikol içeren gruplar) ile toplamda beş sulandırıcı grubu oluşturuldu. Bireysel olarak koçlardan alınan sperma, oluşturulan bu beş farklı sulandırıcı gruplarıyla

dondurularak tohumlama işlemlerinde kullanılmak üzere saklandı. Tohumlamalar öncesi koyunlar senkronizasyona tabi tutuldu. Bu amaçla, 9 gün arayla iki kez prostaglandin F2 α (cloprestenol), 125 mikrogram dozunda uygulandı. Uygulamayı takiben 42-44. saatlerde servikal yolla tohumlamalar yapıldı. Tohumlamalarda kullanılan sperma numunelerinde tohumlama dozu ve hacmi, 400 x 10⁶ spermatozoa ve 0.5 ml oldu. Tohumlamalar sonrası 30. günde ultrasonografi yardımıyla gebeliklerin tesbiti yapıldı ve doğum oranları kaydedildi. Tohumlamalarda kullanılan spermanın dondurulduğu sulandırıcı grupları şunlardır:

1-Gliserol % 5

2- Gliserol %3 + Trehaloz60 mM

3- Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetüin 5 mg

4- Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 10 μ M

5- Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Boron 0,5 mM

3.4 İstatistiksel Analizlerin Yapılması (4. Aşama)

İstatistiksel analizde farklı uygulamadan elde edilen verilerin ortalamaları kullanılmıştır. Farklı sulandırıcı gruplarının in vitro parametrelerinin karşılaştırılmasında varyans analizi, aralarında önemli farklılık bulunan ikiden fazla grubu karşılaştırmak için de Tukey çoklu karşılaştırma metodu kullanılmıştır. Tohumlama sonuçlarından elde edilen verilerin karşılaştırılmasında ise kikare testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Motilite, Akrozom Hasarları, Mitokondriyal Aktivite Bulguları

Tablo 1. Farklı kriyoprotektan ve **trehaloz** oranları ile dondurulan koç spermasının çözüm sonu motilite, ölü-canlı, mitokondriyal aktivite ve akrozom anomalisi değerleri ortalaması (Mean±SEM)

Gruplar	Motilite	SYBR-14/PI	JC-1/PI	FITCH/PI
	%	%	%	%
Gliserol %5	45.62±3.46 ^c	52.99±3.34 ^c	45.63±3.51 ^d	42.12±6.85
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM	34.37±4.05 ^{bc}	41.86±4.09 ^{bc}	34.99±4.21 ^{cd}	37.02±2.96
Gliserol %1.5 + Trehaloz100 mM	25.62±5.21 ^{ab}	34.14±4.54 ^{ab}	26.30±4.90 ^{abc}	43.88±3.00
Etilen Glikol %5	30.00±5.26 ^{ab}	37.64±4.84 ^{ab}	30.70±4.93 ^{bc}	36.47±4.92
Etilen Glikol %3 + Trehaloz60 mM	20.25±4.16 ^a	27.95±3.99 ^a	20.37±4.14 ^{ab}	28.01±6.05
Etilen Glikol %1.5 Trehaloz100 mM	16.25±4.50 ^a	26.58±4.35 ^a	16.95±4.62 ^a	34.41±5.11
p	*	*	*	-

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

SYBR-14/PI %: Canlı spermatozoa oranı

JC-1/PI %: Mitokondriyal bütünlük oranı

FITCH/PI %: Akrozomal bütünlük oranı

Çözüm sonrası koç sperması motilitesi, canlı spermatozoa, mitokondriyal aktivite oranları bakımından, gliserol %5 (45.62±3.46, 52.99±3.34 ve 45.63±3.51) diğer gruplara göre daha yüksek sonuç vermiştir (P<0.05). Akrozom bütünlüğü bakımından ise, gruplar arasında önemli bir farklılık ortaya çıkmamıştır (P>0.05). Gliserol %3 + trehaloz 60 mM sulandırıcı grubu ise, ikinci derecede çözüm sonu spermatolojik parametrelerde en yüksek korumayı sağlamıştır.

Bu tablo değerlerine göre, projenin ilk aşamasında en yüksek değerleri veren iki sulandırıcı grubu ortaya çıkmıştır. **Bu sulandırıcı grupları: Gliserol %5 (T1) ve Gliserol %3 + 60 mM Trehaloz (T2) gruplarıdır.** Buna göre, projenin ikinci aşamasında kullanılmış olan fetuin, taksifolin hidrat ve boron üç farklı dozda T1 ve T2 sulandırıcılarına eklenerek, fetuin (sekiz grup), taksifolin (sekiz grup) ve boron (sekiz grup) sulandırıcı grupları oluşturulmuş ve spermalar dondurulmuştur.

Tablo 2. Koç spermasının farklı **fetuin** dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu motilite, ölü-canlı, mitokondriyal aktivite ve akrozom anomalisi değerleri ortalaması (Mean±SEM)

Gruplar	Motilite %	JC1/PI %	SYBR-14/PI %	FITCH- PNA/PI %
Gliserol %5	31±1,87 ^d	31,00±1,56 ^d	41,35±1,26 ^d	52,99±2,83
Gliserol %5 + Fetuin 2,5 mg	38±2,54 ^c	38,70±2,43 ^c	48,94±1,42 ^c	53,55±0,82
Gliserol %5 + Fetuin 5 mg	45±1,58 ^b	45,44±1,20 ^b	54,47±1,66 ^b	52,34±1,52
Gliserol %5 + Fetuin 15 mg	46±1,87 ^b	46,46±1,47 ^b	56,15±1,28 ^b	52,95±2,09
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM	48±2,00 ^b	48,59±1,39 ^b	57,04±1,85 ^b	52,47±2,91
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetuin 2,5 mg	48±1,22 ^b	49,21±1,19 ^b	58,36±1,09 ^b	55,62±2,51
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetuin 5 mg	54±1,00 ^a	54,67±1,01 ^a	63,51±1,24 ^a	56,44±1,56
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetuin 15 mg	48±1,22 ^b	47,71±1,13 ^b	57,17±1,38 ^b	57,41±2,66
p	*	*	*	-

a, b, c, d: Aynı sütündeki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir (*P<0.05).

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

Gliserol %5 (T1) ve gliserol %3 + 60 mM trehaloz sulandırıcılarına, fetuinin farklı dozlarının ilave edildiği projenin ikinci aşamasında; gliserol %3 + trehaloz 60 mM + fetuin 5 mg sulandırıcı grubu, koç spermasında dondurma çözme sonrası diğer gruplara göre daha yüksek motilite, mitokondriyel aktivite ve canlı spermatozoa (% 54±1,00, 54,67±1,01 ve 63,51±1,24) oranlarını vermiştir (P<0.05). Akrozom bütünlüğü bakımından ise, gruplararası istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir (P>0.05).

Tablo 3. Koç spermasının farklı taksifolin dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu motilite, ölü-canlı, mitokondriyel aktivite ve akrozom anomali değerleri ortalaması (Mean±SEM)

Gruplar	Motilite %	JC1/PI %	SYBR-14/PI %	FITCH- PNA/PI %
Gliserol %5	38,33±3,80 ^{ab}	38,13±3,00 ^b	43,96±5,03 ^{bc}	48,38±2,05 ^{ab}

Gliserol %5 + Taksifolin 10 µM	32,50±4,78 ^{bc}	33,05±4,01 ^{bc}	42,53±4,22 ^{bc}	51,73±1,48 ^{ab}
Gliserol %5 + Taksifolin 100 µM	33,33±4,59 ^{bc}	33,68±3,75 ^{bc}	42,78±4,05 ^{bc}	52,14±3,90 ^{ab}
Gliserol %5 + Taksifolin 500 µM	22,50±2,81 ^d	23,44±2,74 ^d	32,55±2,47 ^d	45,54±2,02 ^{ab}
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM	39,16±2,38 ^{ab}	39,24±2,08 ^{ab}	47,93±2,26 ^{ab}	50,41±2,54 ^{ab}
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 10 µM	46,66±1,05 ^a	46,88±1,17 ^a	55,96±1,01 ^a	53,47±2,57 ^a
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 100 µM	37,50±2,14 ^{ab}	38,08±2,44 ^b	45,94±2,58 ^{bc}	43,46±3,53 ^b
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 500 µM	27,50±2,14 ^{cd}	27,94±2,01 ^{cd}	37,05±2,33 ^{cd}	48,99±3,25 ^{ab}
p	*	*	*	*

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

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

Gliserol %5 (T1) ve gliserol %3 + 60 mM trehaloz sulandırıcılarına, taksifolinin farklı dozlarının ilave edildiği projenin ikinci aşamasında, çözüm sonu spermatoza motilitesi ve akrozom bütünlüğü bakımından gliserol %3 + trehaloz 60 mM + taksifolin 10 µM sulandırıcı grubu, en yüksek oranları (%46,66±1,05 ve 53,47±2,57) vermiştir. Gliserol %3 + trehaloz 60 mM + taksifolin 10 µM sulandırıcı grubu, mitokondriyel aktivite ve canlı spermatozoa oranları bakımından (% 46,88±1,17 ve 55,96±1,01) diğer gruplara göre önemli iyileştirme yapmıştır (P<0.05).

Tablo 4. Koç spermasının farklı boron dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu motilite, ölü-canlı, mitokondriyel aktivite ve akrozom anomalisi değerleri ortalaması (Mean±SEM)

	MOTİLİTE %	JC1/PI %	SYBR-14/PI %	FITCH-PNA/PI %
Gliserol %5	43±1,22 ^{bc}	42,17±1,17 ^{bc}	51,15±1,37 ^{bc}	51,04±2,89 ^{bc}
Gliserol %5 + Boron 0,25 mM	40±2,23 ^{bc}	39,83±2,26 ^{bc}	48,22±2,16 ^c	58,75±3,03 ^a
Gliserol %5 + Boron 0,5 mM	42±6,04 ^{bc}	42,78±5,85 ^{bc}	50,87±5,36 ^{bc}	56,86±2,31 ^{ab}
Gliserol %5 + Boron 1 mM	36±4,30 ^c	32,31±4,44 ^c	43,60±4,48 ^c	50,46±1,56 ^c
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM	50±1,58 ^{ab}	49,70±1,68 ^{ab}	58,54±1,50 ^{ab}	57,20±2,09 ^{ab}
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM +	57±2,00 ^a	55,94±2,09 ^a	64,47±2,30 ^a	57,75±1,03 ^a

Boron 0,25 mM				
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM +	39±2,91 ^c	38,24±2,69 ^c	47,33±3,04 ^c	50,27±1,39 ^c
Boron 0,5 mM				
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM +	34±2,91 ^c	33,54±3,11 ^c	42,60±2,72 ^c	50,15±1,57 ^c
Boron 1 mM				
p	*	*	*	*

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

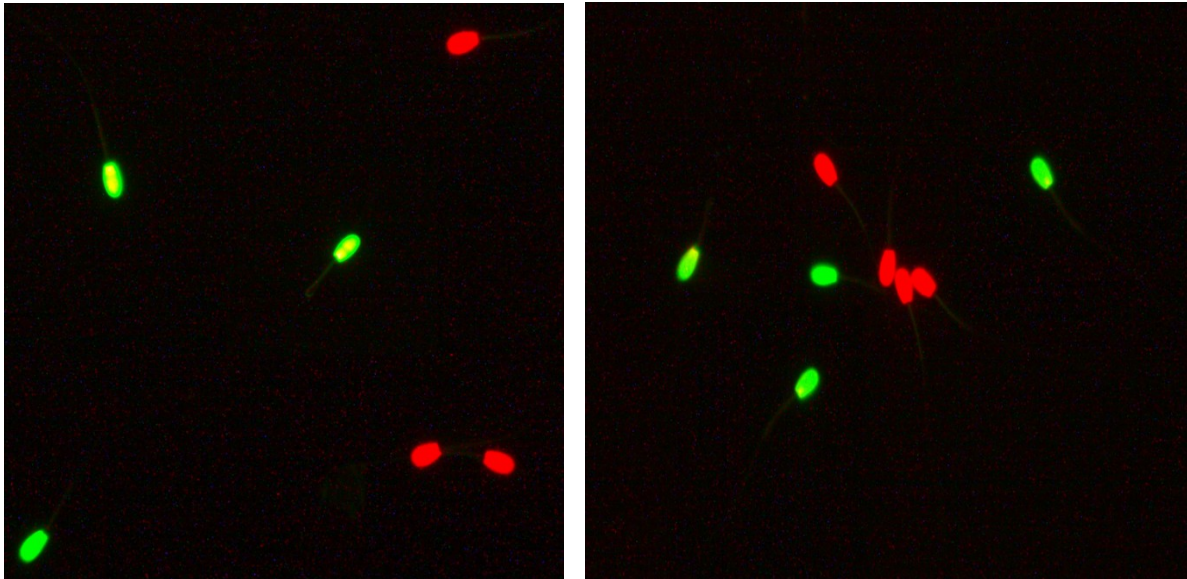
-: Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05).

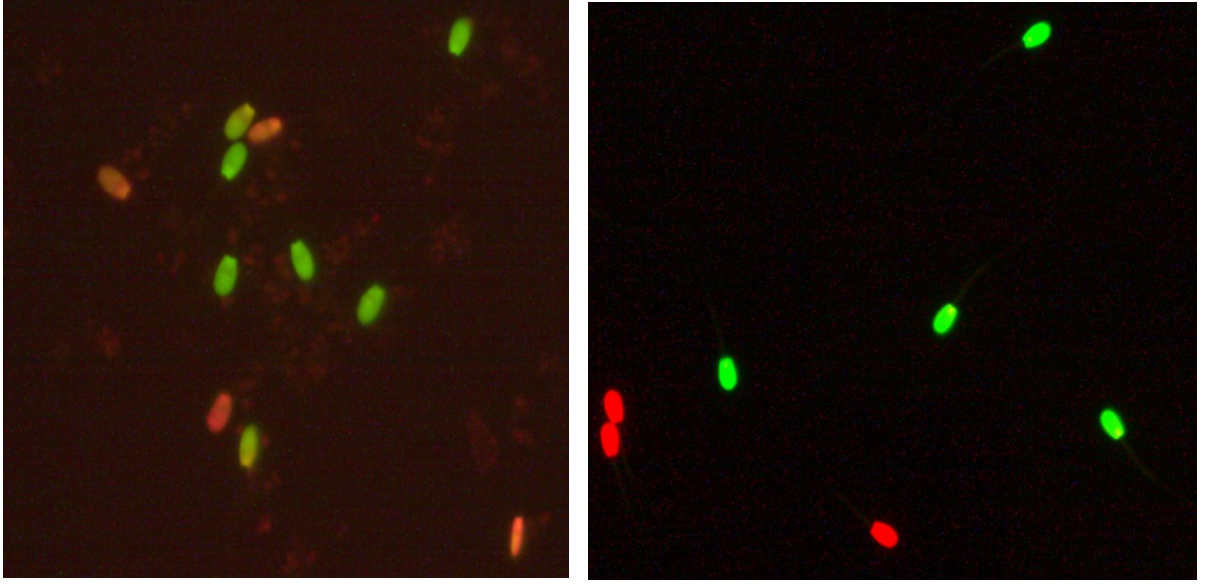
SYBR-14/PI %: Canlı spermatozoa oranı

JC-1/PI %: Mitokondriyel bütünlük oranı

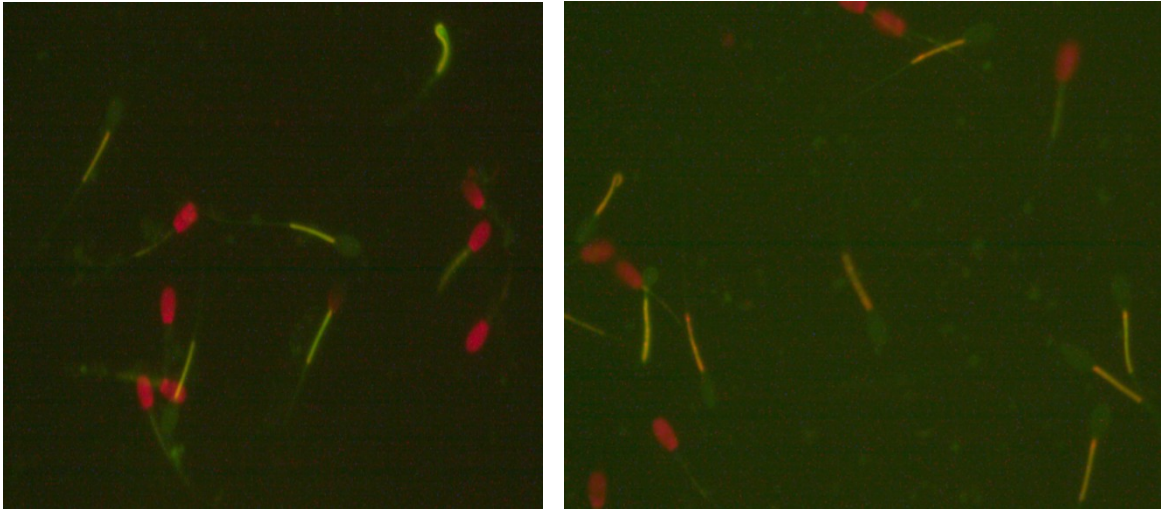
FITCH/PI %: Akrozomal bütünlük oranı

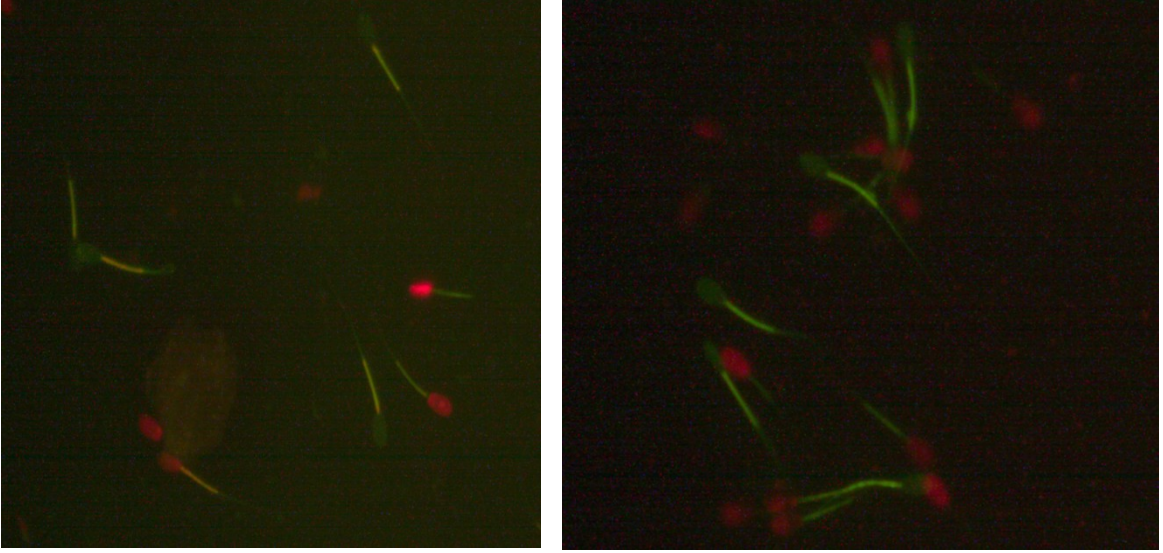
Gliserol %5 ve Gliserol %3 + 60 mM Trehaloz sulandırıcılarına, boronun farklı dozlarının ilave edildiği bu aşamada; çözüm sonu spermatozoa motilitesi, mtokondriyel aktivite, canlı spermatozoa ve akrozom bütünlüğü bakımından Gliserol %3 + Trehaloz 60 mM + Boron 0,25 mM grubu (% 57±2,00, 55,94±2,09, 64,47±2,30 ve 57,75±1,03), diğer gruplara göre en yüksek oranları vermiştir (P<0.05).



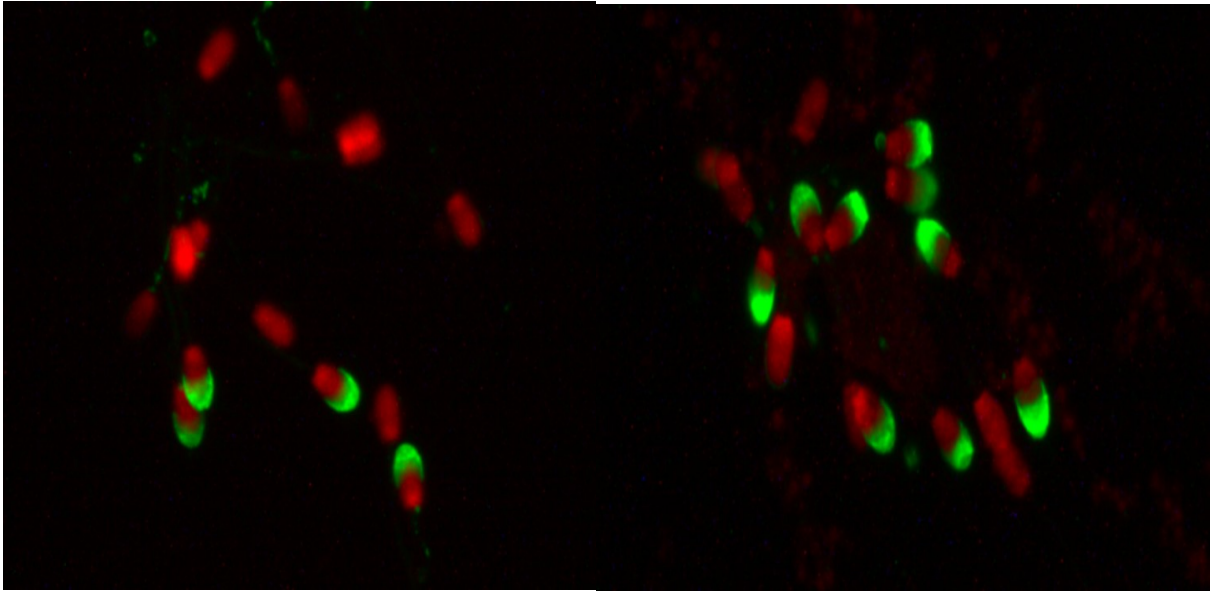
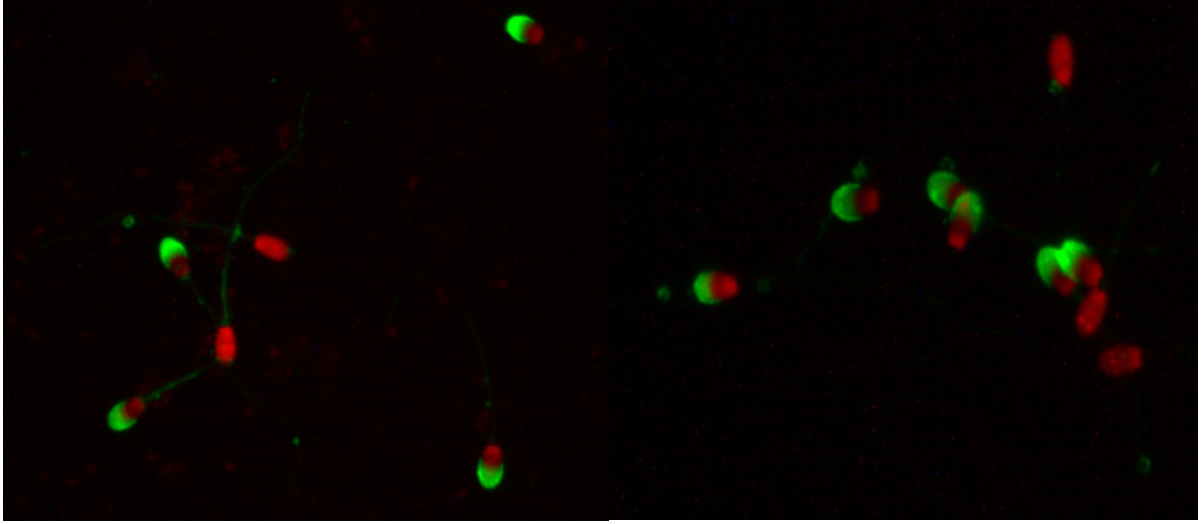


Şekil 1. Spermalarda ölü-canlı spermatozoa oranının SYBR/PI boyama tekniğiyle değerlendirilmesi. Baş kısmı yeşil floresan veren hücreler, canlı spermatozoayı; Baş kısmı kırmızı ve kırmızı-yeşil floresan veren hücreler, ölü spermatozoayı göstermektedir.





Şekil 2. Spermalarda mitokondriyel aktivite ve membran bütünlüğünün JC-1/PI boyama tekniği ile değerlendirilmesi. Gövde kısmı turuncu floresan veren hücreler, mitokondriyel aktivite gösteren spermatozayı; gövde kısmı yeşil floresan veren ve floresan vermeyen hücreler, iyi mitokondriyel aktivite göstermeyen spermatozayı göstermektedir.



Şekil 3. Spermalarda akrozom ve membran bütünlüğünün Lectin/PI boyama tekniğiyle değerlendirilmesi. Akrozom kısımları yeşil floresan veren hücreler, hasarlı akrozomu olan spermatozoayı; Akrozom kısımları yeşil floresan vermeyen yada kırmızı veren floresan hücreler, sağlam akrozomu olan spermatozoayı göstermektedir.

4.2 Oksidatif Stres Parametreleri Bulguları

Tablo 5. Koç spermasının farklı taksifolin hidrat dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu Lipit Peroksidasyon (LPO), glutatyon (GSH) ve total antioksidan kapasite (AOC) düzeyleri (Ort±SE)

Gruplar	LPO $\mu\text{M}/10^9$ hücre	GSH $\mu\text{M}/10^9$ hücre	AOC $\text{mM}/10^9$ hücre
Gliserol %5	43,48±18,01 ^a	1556,46±222,12	0,82±0,12
Gliserol %5 + Taksifolin 10 μM	24,80±3,50 ^{ab}	1614,40±276,02	0,95±0,16
Gliserol %5 + Taksifolin 100 μM	23,88±5,80 ^{ab}	1877,13±487,65	0,95±0,24
Gliserol %5 + Taksifolin 500 μM	18,75±1,53 ^b	2164,44±353,33	0,91±0,12
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM	20,75±2,03 ^{ab}	1896,49±124,59	0,80±0,04
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 10 μM	23,64±3,21 ^{ab}	2215,25±571,67	0,89±0,23
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 100 μM	18,55±3,53 ^b	1564,63±306,82	0,71±0,14
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 500 μM	24,95±1,02 ^{ab}	1960,84±387,60	0,81±0,16
<i>p</i>	<0,05	-	-

Tilmikosin uygulamalarında, LPO düzeyleri incelendiğinde Gliserol %5 grubu düzeyinin Gliserol %5 + Taksifolin 500 μM ve Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 100 μM gruplarına göre önemli düzeyde ($p<0,05$) yüksek olduğu belirlendi. GSH ve AOC yönünden ise bir farklılık gözlenmedi.

Tablo 6. Koç spermasının farklı fetuin dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu LPO, GSH ve AOC düzeyleri (Ort±SE)

Gruplar	LPO $\mu\text{M}/10^9$ hücre	GSH $\mu\text{M}/10^9$ hücre	AOC $\text{mM}/10^9$ hücre
Gliserol %5	28,64 \pm 7,12 a	1249,16 \pm 339,91 b	0,73 \pm 0,19
Gliserol %5 + Fetuin 2,5 mg	22,07 \pm 3,25 ab	1366,81 \pm 174,04 b	0,89 \pm 0,13
Gliserol %5 + Fetuin 5 mg	16,25 \pm 3,46 b	2001,77 \pm 428,23 ab	1,04 \pm 0,18
Gliserol %5 + Fetuin 15 mg	24,97 \pm 1,66 ab	2291,93 \pm 255,70 ab	1,08 \pm 0,08
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM	26,01 \pm 3,18 ab	2325,39 \pm 386,42 ab	1,07 \pm 0,17
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetuin 2,5 mg	21,98 \pm 2,38 ab	2515,18 \pm 428,17 a	1,21 \pm 0,19
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetuin 5 mg	24,15 \pm 1,25 ab	2172,74 \pm 401,83 ab	1,05 \pm 0,17
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetuin 15 mg	22,26 \pm 3,28 ab	1806,96 \pm 62,55 ab	1,01 \pm 0,12
<i>p</i>	<0,05	<0,05	-

LPO düzeyleri incelendiğinde, Gliserol %5 grubu düzeyinin, Gliserol %5 + Fetuin 5 mg grubu düzeyinden önemli düzeyde ($p < 0,05$) yüksek olduğu belirlendi. GSH düzeyleri ise Gliserol %5 ve Gliserol %5 + Fetuin 2,5 mg gruplarda, Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetuin 2,5 mg gruplarına göre önemli düzeyde düşük ($p < 0,05$) olduğu belirlendi. AOC düzeyleri yönünden bir farklılık gözlenmedi.

Tablo 7. Koç spermasının farklı boron dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu LPO, GSH ve AOC düzeyleri (Ort \pm SE)

Gruplar	LPO $\mu\text{M}/10^9$ hücre	GSH $\mu\text{M}/10^9$ hücre	AOC $\text{mM}/10^9$ hücre
Gliserol %5	21,27 \pm 6,08	585,72 \pm 67,01 ^b	0,36 \pm 0,03
Gliserol %5 + 0,25 mM Boron	34,52 \pm 6,27	534,14 \pm 65,08 ^b	0,32 \pm 0,02
Gliserol %5 + 0,5 mM Boron	29,23 \pm 4,26	589,78 \pm 80,03 ^b	0,34 \pm 0,01

Gliserol %5 + 1 mM Boron	23,37±2,88	667,06±93,98 ^{ab}	0,32±0,04
Gliserol %3	30,77±4,41	868,67±156,57 ^a	0,38±0,03
Gliserol %3 + 0,25 mM Boron	23,65±1,18	555,98±35,31 ^b	0,40±0,05
Gliserol %3 + 0,5 mM Boron	33,80±5,38	565,86±53,23 ^b	0,34±0,02
Gliserol %3 + 1 mM Boron	33,68±4,85	658,06±84,82 ^{ab}	0,41±0,04.
<i>p</i>	-	<0,05	-

Boron uygulamaları değerlendirildiğinde, GSH düzeylerinde, Gliserol %3 grubu düzeyinin, Gliserol %5, Gliserol %5 + 0,25 mM Boron, Gliserol %5 + 0,5 mM Boron, Gliserol %3 + 0,25 mM Boron ve Gliserol %3 + 0,5 mM Boron gruplarına göre önemli düzeyde yüksek ($p<0,05$), Gliserol %5 + 1 mM Boron ve Gliserol %3 + 0,5 mM Boron grupları ile farklı olmadığı belirlendi. Diğer parametreler yönünden bir farklılık gözlenmedi.

İstatistik: Sonuçlar $ORT\pm SH$ olarak verilmiştir. Elde edilen değerler SPSS 15.0 programında ANOVA ile değerlendirilerek, gruplararası farklılıklar Duncan testi ile ortaya konuldu. $p<0,05$ önem düzeyinde önemli kabul edildi.

4.3 Antioksidan Cevap Sinyal Yolakları/Genetik Analiz Bulguları

Tablo 8. Koç spermasının farklı fetuin dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu hedef genlerin grublardaki ekspresyon değerleri ($Ort\pm SH$)

Gruplar	NQO1	GCLC	GSTP1
Gliserol %5	0,61±0,25	0,26±0,25	0,28±0,24
Gliserol %5 + Fetuin 2,5 mg	0,32±0,17	0,14±0,08	0,42±0,35
Gliserol %5 + Fetuin 5 mg	1,00±0,37	0,03±0,03	0,30±0,26
Gliserol %5 + Fetuin 15 mg	2,57±0,82	0,02±0,01	0,48±0,45
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM	0,74±0,30	0,04±0,03	0,33±0,22
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetuin 2,5 mg	1,54±1,33	0,09±0,08	0,23±0,11
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetuin 5 mg	1,66±1,52	0,004±0,003	0,37±0,30

Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetuin 15 mg	0,85±0,10	0,008±0,007	0,53±0,49
P	0,645	0,612	0,998

NAD(P)H quinone oksireduktaz: NQO1

Glutamate-cysteine ligase: GCLC

Glutathione S-transferaz: GSTP1

Tablo 9. Koç spermasının farklı taksifolin hidrat dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu hedef genlerin grublardaki ekspresyon değerleri (Ort±SH)

Gruplar	NQO1	GCLC	GSTP1
Gliserol %5	9,21±8,71 ^b	0,35±0,23	2,63±1,15
Gliserol %5 + Taksifolin 10 µM	9,12±4,07 ^b	0,70±0,61	9,75±5,32
Gliserol %5 + Taksifolin 100 µM	2,38±1,59 ^b	1,23±0,79	2,33±0,76
Gliserol %5 + Taksifolin 500 µM	1,56±0,82 ^b	0,10±0,09	4,10±2,49
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM	3,37±1,54 ^b	0,04±0,03	5,42±2,80
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 10 µM	3,19±1,88 ^b	1,28±0,73	5,21±3,95
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 100 µM	48,10±1,49 ^a	7,41±7,39	1,07±0,27
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 500 µM	8,21±4,86 ^b	0,20±0,09	11,16±6,41
P	<0,001 (0,00015)	0,343	0,546

Tablo 10. Koç spermasının farklı boron dozları ile dondurulması sonrası çözüm sonu hedef genlerin grublardaki ekspresyon değerleri (Ort±SH)

Gruplar	NQO1	GCLC	GSTP1
%5 Gliserol	1,34±0,35 ^a	4,34±2,29	7,29±5,78
%5 Gliserol + 0,25 Mm Boron	0,37±0,23 ^b	9,00±8,84	4,85±4,29
%5 Gliserol + 0,5 Mm Boron	0,29±0,11 ^b	2,69±1,18	3,42±3,00
%5 Gliserol + 1 Mm Boron	0,39±0,26 ^b	9,05±8,25	2,11±1,02
%3 Gliserol + 60 Mm Trehaloz	0,17±0,04 ^b	2,51±1,77	0,75±0,31
%3 Gliserol + 60 Mm Trehaloz + 0,25 mM Boron	0,70±0,30 ^{ab}	4,91±2,48	2,56±1,50
%3 Gliserol + 60 Mm Trehaloz + 0,5 mM Boron	0,81±0,36 ^{ab}	2,51±0,82	2,37±1,24
%3 Gliserol + 60 Mm Trehaloz + 1 mM Boron	0,24±0,07 ^b	1,60±0,36	1,00±0,28
P	0,039	0,857	0,778

Çalışmamızda, Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 100 µM grubu, diğer gruplara göre NQO1 gen ekspresyonu yönüyle üstünlük sağladı (P<0,001). Aynı şekilde %3 Gliserol + 60 mM Trehaloz + 0,5 mM Boron grubu da, diğer gruplara oranla, önemli olmasa da NQO1 gen ekspresyonu düzeyinde artışlar sağladığı görüldü. Fetuin içeren grupların gen ekspresyonları yönüyle bir etkinliklerinin olmadığı belirtildi.

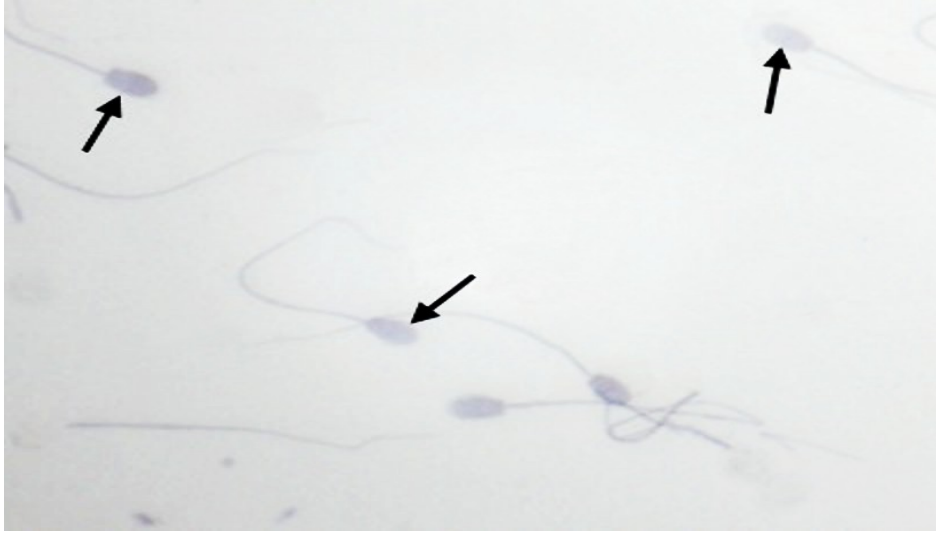
4.4 TUNEL Testi:

Uygulanan kit prosedürü sonucunda elde edilen görüntülerde (Şekil 4), nükleer bölgesi kahverengi görülen spermalar TUNEL-pozitifdir. Bu hücreler DNA fragmantasyonuna sahip olan, apoptotik hücrelerdir. Mavi renkli görülen diğer spermalar ise TUNEL-negatiftir.



Şekil 4. TUNEL testi. TUNEL-pozitif (kırmızı ok) ve TUNEL-negatif (siyah ok) hücreler. Orijinal büyütme 40X.

TUNEL testi esnasında, sadece label solüsyonu eklenerek çalışılan negatif kontrollerde, spermalarda nükleer bölgede herhangi bir renk gözlenmezken, spermalar mavi renkli gözlenmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. TUNEL testi, negatif kontrol. Sperm başları (ok). Orijinal büyütme 40X.

Temel sulandırıcı, fetuin, taksifolin ve boron gruplarında, TUNEL-pozitif boyanan hücrelerin %'si alınarak ortalama±standart sapma değerleri hesaplanmış, tablo ve grafik haline getirilmiştir.

Temel sulandırıcı gruplarının sahip oldukları % değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 1, Şekil 7)

Tablo 11. Çeşitli katkı maddeleri ile dondurulan koç spermasının çözüm sonu DNA fragmentasyonu oranları (ortalama±standart sapma).

Gruplar	TUNEL %
Gliserol %5 (T1)	14,00±5,72
Gliserol %3 + 60 mM Trehaloz (T2)	13,21±4,59
Gliserol %1,5 + 100 mM Trehaloz (T3)	11,21±4,69
Etilen Glikol %5 (T4)	9,29±4,75
Etilen Glikol %3 + 60 mM Trehaloz (T5)	9,71±4,82
Etilen Glikol %1,5 + 100 mM Trehaloz (T6)	10,14±5,07
p	-

-: Gruplar arası farklılık önemli değildir ($p>0,05$).

Fetuin gruplarının sahip oldukları % değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde,

- GC ile G5F15, G3TREF5 ve G3TREF15;
- G5F2,5 ile G3TREF5 ve G3TREF15;
- G5F5 ile G3TREF5 ve G3TREF15;
- G3TRE ile G3TREF5;

e) G3TREF2,5 ile G3TREF5 grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0,05$) (Tablo 12, Şekil 8).

Tablo 12. Fetuin grubu koç spermasının çözüm sonu DNA fragmentasyonu oranları (ortalama±standart sapma) ve p değerleri.

Sıra No	Gruplar	TUNEL (%)	p değerleri*							
			1	2	3	4	5	6	7	8
1	GC	15,40±5,72				0,028			0,009	0,028
2	G5F2,5	13,20±4,54							0,012	0,047
3	G5F5	11,50±3,55							0,009	0,047
4	G5F15	7,70±3,91								
5	G3TRE	10,80±2,99							0,021	
6	G3TREF2,5	10,90±7,60							0,047	
7	G3TREF5	4,70±2,31								
8	G3TREF15	6,90±3,52								

*Sadece aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olan grupların p değerleri tabloda gösterilmiştir. Gruplar: GC: Gliserol %5; G5F2,5: Gliserol %5+Fetuin 2,5 mg/ml; G5F5: Gliserol %5+Fetuin 5 mg/ml; G5F15: Gliserol %5+Fetuin 15 mg/ml; G3TRE: Gliserol %3+60 mM Trehaloz; G3TREF2,5: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 2,5 mg/ml; G3TREF5: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 5 mg/ml; G3TREF15: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 15 mg/ml

Taksifolin gruplarının sahip oldukları % değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, GC ile G5T10, G5T100, G5T500, G3TRE, G3TRET10, G3TRET100 ve G3TRET500 grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0,05$) (Tablo 13, Şekil 9).

Tablo 13. Taksifolin grubu koç spermasının çözüm sonu DNA fragmentasyonu oranları (ortalama±standart sapma) ve p değerleri.

Sıra no	Gruplar	TUNEL(%)	p değerleri*							
			1	2	3	4	5	6	7	8
1	GC	14,10±2,86	0,009	0,009	0,009	0,016	0,009	0,016	0,016	0,016
2	G5T10	5,90±2,70								
3	G5T100	6,50±1,87								
4	G5T500	5,70±1,52								
5	G3TRE	6,60±3,52								
6	G3TRET10	6,40±2,97								
7	G3TRET100	6,80±3,21								
8	G3TRET500	6,80±3,37								

*Sadece aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olan grupların p değerleri tabloda gösterilmiştir. Gruplar: GC: Gliserol %5; G5T10: Gliserol %5+Taksifolin 10 µM; G5T100: Gliserol %5+Taksifolin 100 µM; G5T500: Gliserol %5+Taksifolin 500 µM; G3TRE: Gliserol %3+60 mM Trehaloz; G3TRET10: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Taksifolin 10 µM; G3TRET100: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Taksifolin 100 µM; G3TRET500: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Taksifolin 500 µM

Boron gruplarının sahip oldukları % değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, GC ile G3TREB1 ve G5B1 ile G3TREB0,5 ve G3TREB1 grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0,05$) (Tablo 14, Şekil 10).

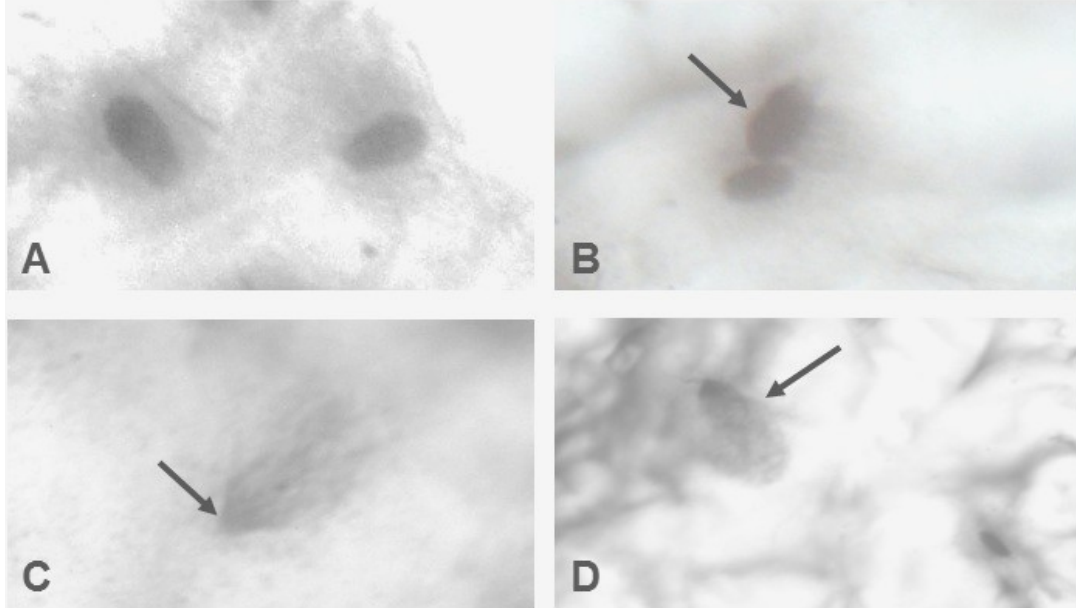
Tablo 14. Boron grubu koç spermasının çözüm sonu DNA fragmentasyonu oranları (ortalama±standart sapma) ve p değerleri.

Sıra no	Gruplar	TUNEL (%)	p değerleri*									
			1	2	3	4	5	6	7	8		
1	GC	4,25±1,76										0,047
2	G5B0,25	2,88±0,85										
3	G5B0,5	5,38±3,52										
4	G5B1	5,13±1,65								0,047		0,047
5	G3TRE	2,50±1,47										
6	G3TREB0,25	3,25±2,36										
7	G3TREB0,5	1,88± 0,63										
8	G3TREB1	2,25± 1,55										

*Sadece aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olan grupların p değerleri tabloda gösterilmiştir. Gruplar: GC: Gliserol %5; G5B0,25: Gliserol %5+Boron 0,25 mM; G5B0,5: Gliserol %5+Boron 0,5 mM; G5B1: Gliserol %5+Boron 1 mM; G3TRE: Gliserol %3+60 mM Trehaloz; G3TREB0,25: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Boron 0,25 mM; G3TREB0,5: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Boron 0,5 mM; G3TREB1: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Boron 1 mM

4.5 COMET Testi:

COMET testinde nötral şartlarda yapılan elektroforez, DNA'da çift zincir kırıklarının tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Buna göre, elektroforezde yürütülen sperm hücrelerinin DNA'sı eğer çift zincir kırıklarına sahip ise kuyruklu yıldız benzer bir görüntü oluştururlar (Şekil 6). COMET testi sonucunda gliserolü %3 ve 5; trehalozu 60 mM konsantrasyonda içeren temel sulandırıcılara eklenen farklı dozlarda fetuin (2,5; 5 ve 15 mg/ml), taksifolin (10, 100 ve 500 μ M) ve boron (0,25; 0,5 ve 1 MM) ile hazırlanan kriyoprotektanlar kullanılarak dondurulan koç spermasının çözüm sonunda bazı sperm hücrelerinde DNA çift zincir kırıklarının oluştuğu gözlenmiştir.



Şekil 6. Gliserol (%3 ve 5), trehaloz (60 mM) ve farklı oranlarda fetuin (2,5; 5 ve 15 mg/ml), taksifolin (10, 100 ve 500 μ M) ve boron (0,25; 0,5 ve 1 mM) içeren kriyoprotektanlar ile dondurulan koç spermasının çözümü sonu DNA hasarlarını gösteren COMET görüntüleri. A: Hasarsız sperm; B, C ve D: Farklı oranlarda DNA hasarlarına sahip sperm hücreleri. Orijinal büyütme 40X.

COMET testinde temel sulandırıcı, fetuin, taksifolin ve boron gruplarında, kuyruklu yıldız görünümüne sahip hücrelerin %'si alınarak ortalama \pm standart sapma değerleri hesaplanmış, tablo ve grafik haline getirilmiştir.

Temel sulandırıcı gruplarının sahip oldukları yüzde değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, T1 grubu ile T2, T3 ve T5 grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0,05$) (Tablo 15, Şekil 7).

Tablo 15. Temel sulandırıcılar ile dondurulan koç spermasının çözümü sonu DNA hasarı oranları (COMET değerleri) (ortalama \pm standart sapma).

Sıra no	Gruplar	COMET %	p değerleri*					
			1	2	3	4	5	6
1	Gliserol %5 (T1)	8,89 \pm 1,69		0,032	0,018		0,017	
2	Gliserol %3 + 60 mM Trehaloz (T2)	6,39 \pm 1,21						
3	Gliserol %1,5 + 100 mM Trehaloz (T3)	5,96 \pm 0,67						
4	Etilen Glikol %5 (T4)	7,86 \pm 1,95						
5	Etilen Glikol %3 + 60 mM Trehaloz (T5)	5,93 \pm 0,99						
6	Etilen Glikol %1,5 + 100 mM Trehaloz (T6)	7,93 \pm 0,93						

*Sadece aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olan grupların p değerleri tabloda gösterilmiştir.

Fetuin gruplarının sahip oldukları % değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde,

- GC ile G3TREF5 ve G3TREF15;
- G5F2,5 ile G3TREF5;
- G5F5 ile G3TREF2,5; G3TREF5 ve G3TREF15;
- G5F15 ile G3TREF5 ve G3TREF15;
- G3TRE ile G3TREF5 ve G3TREF15 grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0,05$) (Tablo 16, Şekil 8).

Tablo 16. Fetuin grubu koç spermalarının çözüm sonu DNA hasarı oranları (COMET değerleri) (ortalama±standart sapma) ve p değerleri.

Sıra no	Gruplar	COMET (%)	p değerleri*								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
1	GC	17,06±4,44								0,006	0,024
2	G5F2,5	14,44±3,71								0,03	
3	G5F5	19,50±6,20							0,031	0,005	0,007
4	G5F15	16,38±4,89								0,04	0,046
5	G3TRE	16,75±3,66								0,015	0,013
6	G3TREF2,5	13,75±3,75									
7	G3TREF5	11,06±3,47									
8	G3TREF15	12,25±3,64									

*Sadece aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olan grupların p değerleri tabloda gösterilmiştir. **Gruplar:** GC: Gliserol %5; G5F2,5: Gliserol %5+Fetuin 2,5 mg/ml; G5F5: Gliserol %5+Fetuin 5 mg/ml; G5F15: Gliserol %5+Fetuin 15 mg/ml; G3TRE: Gliserol %3+60 mM Trehaloz; G3TREF2,5: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 2,5 mg/ml; G3TREF5: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 5 mg/ml; G3TREF15: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 15 mg/ml

Taksifolin gruplarının sahip oldukları % değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde,

- GC ile G5T10;
- G5T10 ile G5T100, G5T500 ve G3TRE, G3TRET10, G3TRET100 ve G3TRET500;
- G5T100 ile G3TRET10 ve G3TRET100;
- G5T500 ile G3TRET10, G3TRET100 ve G3TRET500 grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0,05$) (Tablo 17, Şekil 9).

Tablo 17. Taksifolin grubu koç spermalarının çözüm sonu DNA hasarı oranları (COMET değerleri) (ortalama±standart sapma) ve p değerleri.

Sıra no	Gruplar	COMET (%)	p değerleri*								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
1	GC	22,94±6,11		0,004							
2	G5T10	13,75±2,54			0,003	0,002	0,01	0,001	0,001	0,001	0,001

3	G5T100	19,50±2,93	0,027	0,021	
4	G5T500	18,56±2,13	0,013	0,003	0,009
5	G3TRE	22,13±5,63			
6	G3TRET10	23,00±3,09			
7	G3TRET100	25,44±4,69			
8	G3TRET500	23,56±4,11			

*Sadece aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olan grupların p değerleri tabloda gösterilmiştir. **Gruplar:** GC: Gliserol %5; G5T10: Gliserol %5+Taksifolin 10 µM; G5T100: Gliserol %5+Taksifolin 100 µM; G5T500: Gliserol %5+Taksifolin 500 µM; G3TRE: Gliserol %3+60 mM Trehaloz; G3TRET10: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Taksifolin 10 µM; G3TRET100: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Taksifolin 100 µM; G3TRET500: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Taksifolin 500 µM

Boron gruplarının sahip oldukları % değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0,05) (Tablo 18, Şekil 10).

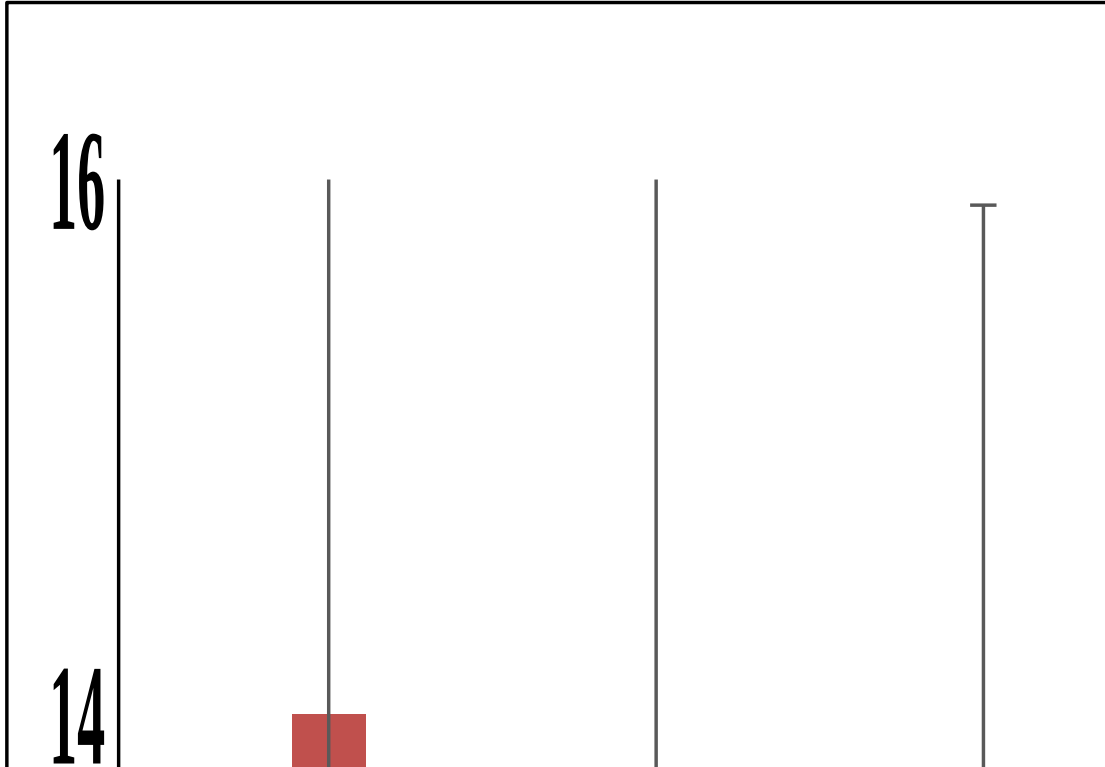
Tablo 18. Boron grubu koç spermasının çözüm sonu DNA hasarı oranları (COMET değerleri) (ortalama±standart sapma) ve p değerleri.

Sıra no	Gruplar	COMET (%)
1	GC	19,90±4,92
2	G5B0,25	15,80±3,46
3	G5B0,5	17,30±2,59
4	G5B1	19,80±5,43
5	G3TRE	18,70±8,00
6	G3TREB0,25	18,90±7,68

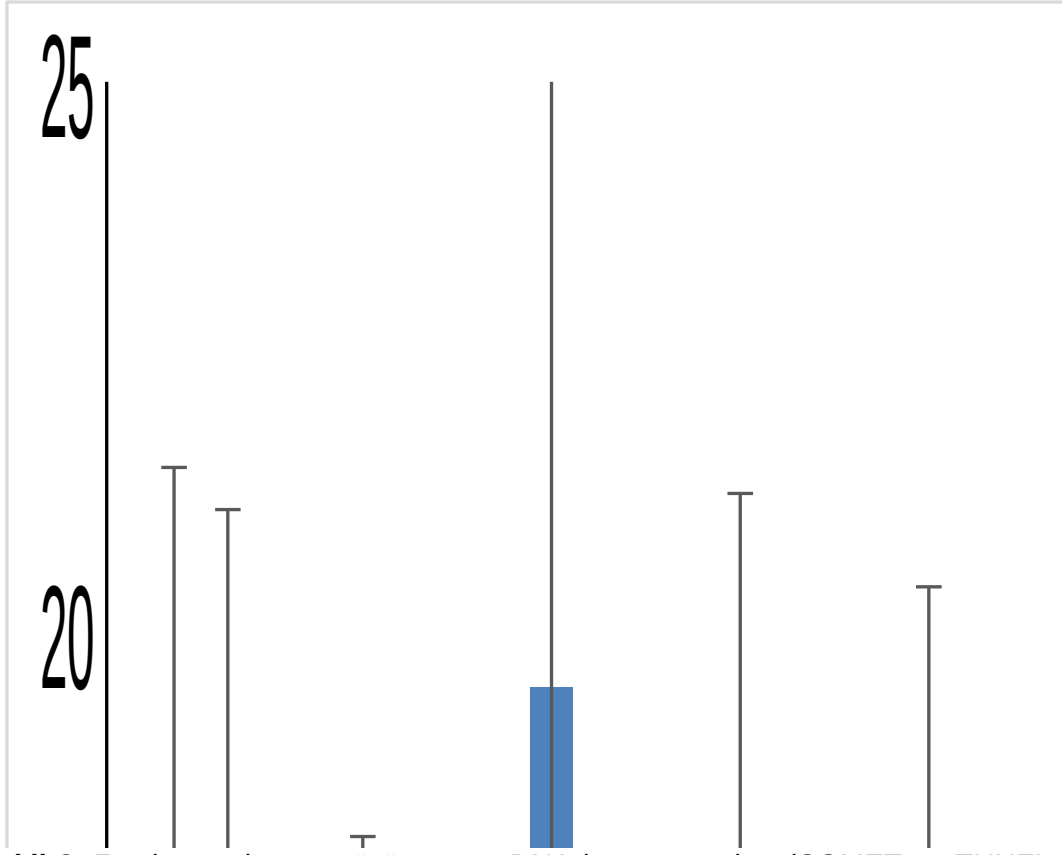
7	G3TREB0,5	16,00±5,5 3
8	G3TREB1	17,10±5,2 8
p		-

-: Gruplar arası farklılık önemli değildir ($p>0,05$). Gruplar: GC: Gliserol %5; G5B0,25: Gliserol %5+Boron 0,25 mM; G5B0,5: Gliserol %5+Boron 0,5 mM; G5B1: Gliserol %5+Boron 1 mM; G3TRE: Gliserol %3+60 mM Trehaloz; G3TREB0,25: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Boron 0,25 mM; G3TREB0,5: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Boron 0,5 mM; G3TREB1: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Boron 1 mM

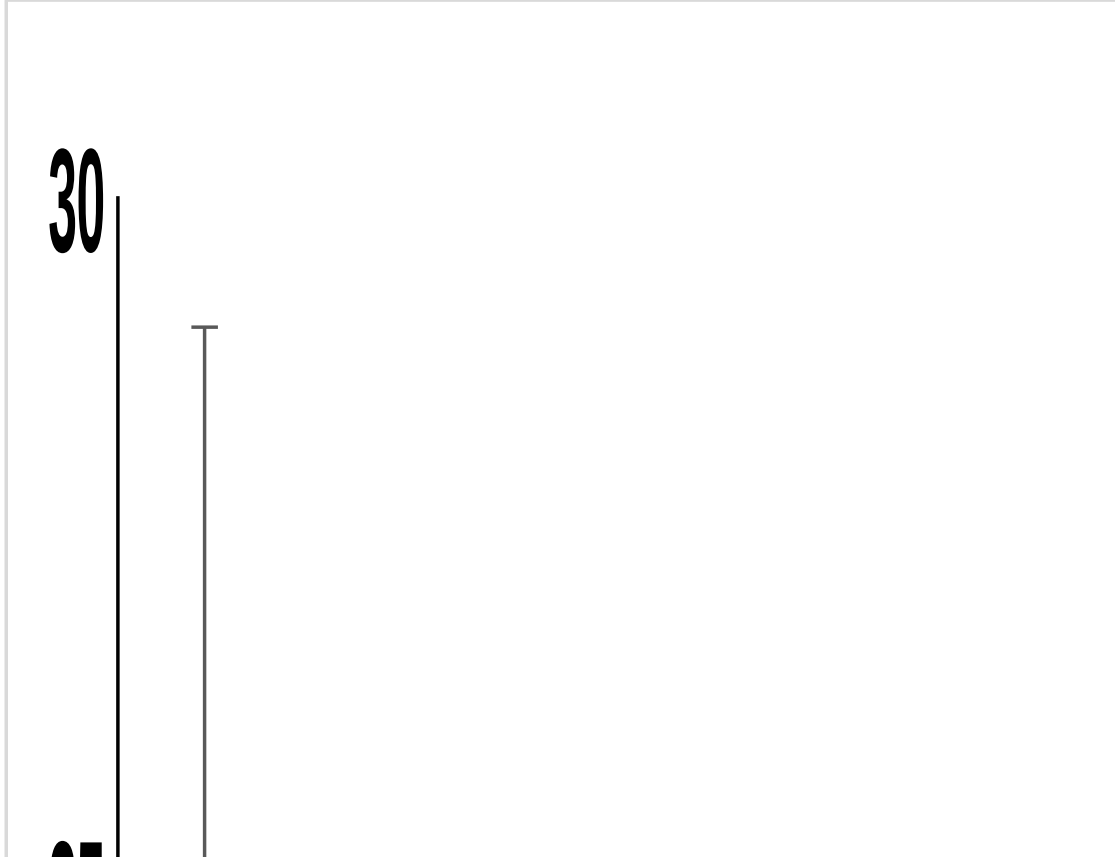
Fetuin, taksifolin ve boron grupları % değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.



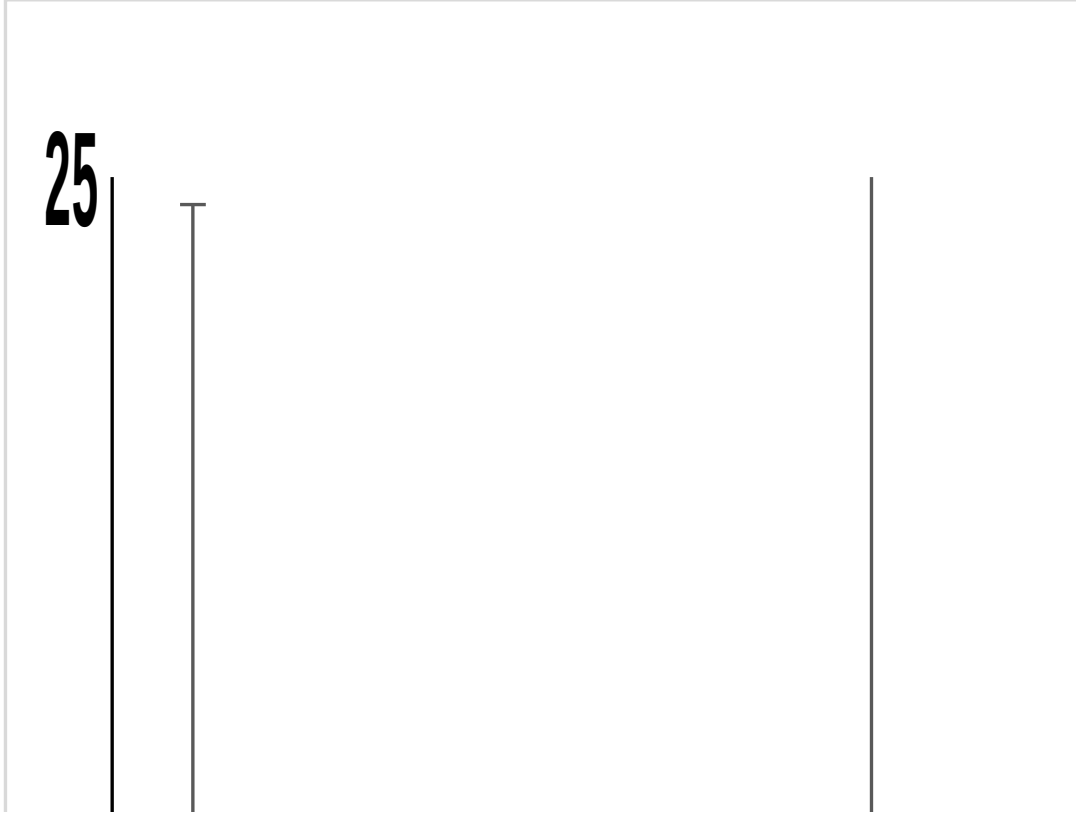
Şekil 7. Temel sulandırıcı gruplarının çözüm sonu DNA hasarı oranları (COMET ve TUNEL değerleri) yüzdeleri. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (Gruplar: T1: Gliserol %5; T2: Gliserol %3 + 60 mM Trehaloz; T3: Gliserol %1,5 + 100 mM Trehaloz; T4: Etilen Glikol %5; T5: Etilen Glikol %3 + 60 mM Trehaloz; T6: Etilen Glikol %1,5 + 100 mM Trehaloz).



Şekil 8. Fetuin gruplarının çözüm sonu DNA hasarı oranları (COMET ve TUNEL değerleri) yüzdeleri. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (Gruplar: GC: Gliserol %5; G5F2,5: Gliserol %5+Fetuin 2,5 mg/ml; G5F5: Gliserol %5+Fetuin 5 mg/ml; G5F15: Gliserol %5+Fetuin 15 mg/ml; G3TRE: Gliserol %3+60 mM Trehaloz; G3TREF2,5: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 2,5 mg/ml; G3TREF5: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 5 mg/ml; G3TREF15: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 15 mg/ml).



Şekil 9. Taksifolin gruplarının çözüm sonu DNA hasarı oranları (COMET ve TUNEL değerleri) yüzdeleri. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (Gruplar: GC: Gliserol %5; G5T10: Gliserol %5+Taksifolin 10 µM; G5T100: Gliserol %5+Taksifolin 100 µM; G5T500: Gliserol %5+Taksifolin 500 µM; G3TRE: Gliserol %3+60 mM Trehaloz; G3TRET10: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Taksifolin 10 µM; G3TRET100: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Taksifolin 100 µM; G3TRET500: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Taksifolin 500 µM).



Şekil 10. Boron gruplarının çözüm sonu DNA hasarı oranları (COMET ve TUNEL değerleri) yüzdeleri. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (Gruplar: GC: Gliserol %5; G5B0,25: Gliserol %5+Boron 0,25 mM; G5B0,5: Gliserol %5+Boron 0,5 mM; G5B1: Gliserol %5+Boron 1 mM; G3TRE: Gliserol %3+60 mM Trehaloz; G3TREB0,25: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Boron 0,25 mM; G3TREB0,5: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Boron 0,5 mM; G3TREB1: Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Boron 1 mM).

Bu tablosal ve grafiksel değerlere göre;

1. Fetuin içeren sulandırıcı gruplarından
 - a) DNA'da çift zincir kırıklarının engellenmesinde G3TREF2,5; G3TREF5 ve G3TREF15 gruplarının diğer gruplara göre daha etkili olduğu;
 - b) DNA fragmantasyonunun engellenmesinde G5F15, G3TREF5 ve G3TREF15 gruplarının diğer gruplara göre daha etkili olduğu;
 - c) Hem DNA'da çift zincir kırıklarının, hem de DNA fragmantasyonunun engellenmesinde G3TREF5 grubunun en etkili olduğu söylenbilir.
2. Taksifolin içeren sulandırıcı gruplarından;
 - a) DNA'da çift zincir kırıklarının engellenmesinde G5T10, G5T100 ve G5T500 gruplarının diğer gruplara göre daha etkili olduğu;
 - b) DNA fragmantasyonunun önlenmesinde ise kontrol grubu dışındaki tüm grupların (G5T10, G5T100 ve G5T500 ile G3TRE, G3TRET10, G3TRET100 ve G3TRET500) etkili olduğu;
 - c) DNA'da çift zincir kırıklarının nlenmesinde G5T10 ve DNA fragmantasyonunun önlenmesinde ise G5T10 ve G5T500 gruplarının diğer gruplara göre çok daha etkili olduğu;
3. Boron içeren sulandırıcı gruplarından;
 - a) DNA'da çift zincir kırıklarının engellenmesinde gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmadığı;
 - b) DNA fragmantasyonunun engellenmesinde G3TREB0,5 ve G3TREB1 gruplarının diğer gruplara göre daha etkili olduğu;
 - c) DNA fragmantasyonunun engellenmesinde G3TREB0,5 grubunun en etkili olduğu söylenbilir.
4. Fetuin, taksifolin ve boron gruplarında;
 - a) DNA'da çift zincir kırıklarının engellenmesinde fetuin grubunun diğer gruplara göre daha etkili olduğu;
 - b) DNA fragmantasyonunun engellenmesinde boron grubunun diğer gruplara göre daha etkili olduğu söylenbilir.

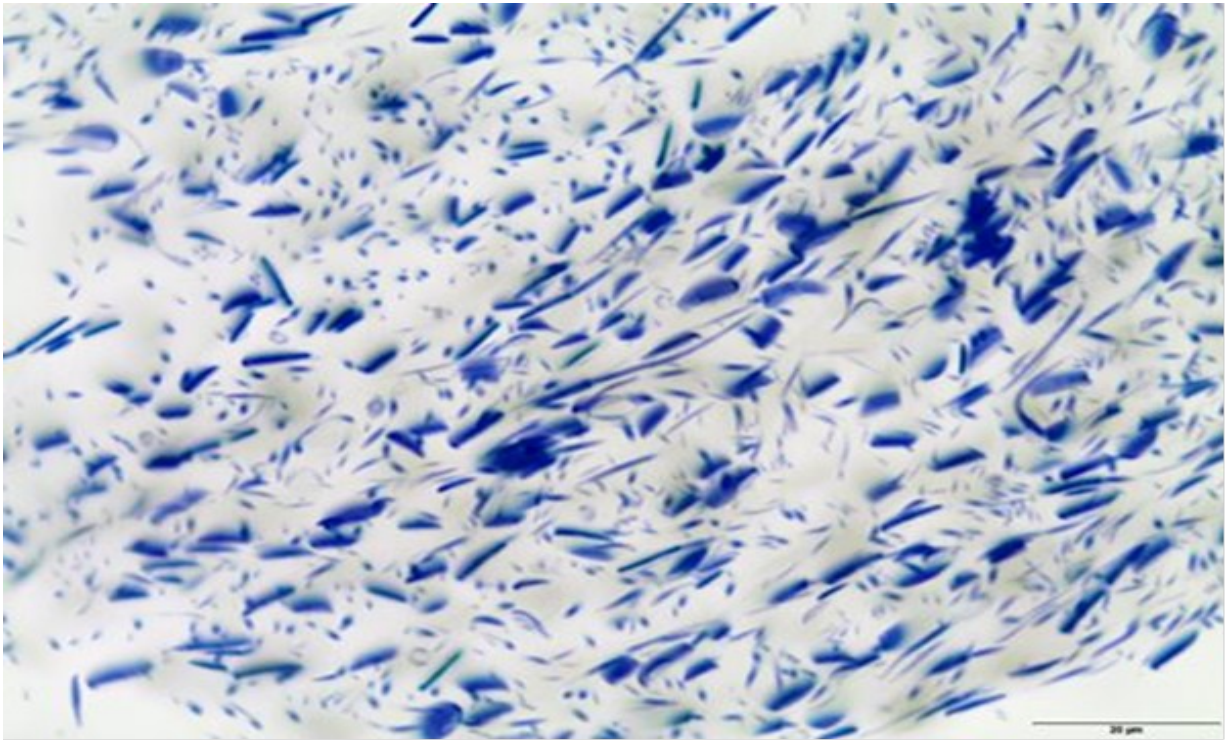
Tablo 19. COMET-TUNEL bulguları özet tablo

	FETUİN	TAKSİFOLİN	BORON
DNA çift zincir kırıklarının engellenmesi	Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 2,5 mg/ml Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 5 mg/ml Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 15 mg/ml	Gliserol %5+Taksifolin 10 µM Gliserol %5+Taksifolin 100 µM Gliserol %5+Taksifolin 500 µM gr	DNA'da çift zincir kırıklarının engellenmesinde gruplar arasında istatistiksel fark yoktur
DNA fragmentasyonunun engellenmesi	Gliserol %5+Fetuin 15 mg/ml Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 5 mg/ml Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 15 mg/ml	Gliserol %5+Taksifolin 10 µM Gliserol %5+Taksifolin 100 µM Gliserol %5+Taksifolin 500 µM Gliserol %3+60 mM Trehaloz Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Taksifolin 10 µM Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Taksifolin 100 µM Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Taksifolin 500 µM	Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Boron 0,5 Mm Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Boron 1 mM Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Boron 0,5 Mm grubu en etkili
DNA'da çift zincir kırıklarının ve DNA fragmentasyonunun engellenmesi	Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 5 mg/ml Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 15 mg/ml Gliserol %3+60 mM Trehaloz+Fetuin 5 mg/ml grubu en etkili	Gliserol %5+Taksifolin 10 µM grubu DNA çift zincir kırıklarının önlenmesinde en etkili ; Gliserol %5+Taksifolin 10 µM ve Gliserol %5+Taksifolin 500 µM grupları DNA fragmentasyonunun önlenmesinde en etkili	

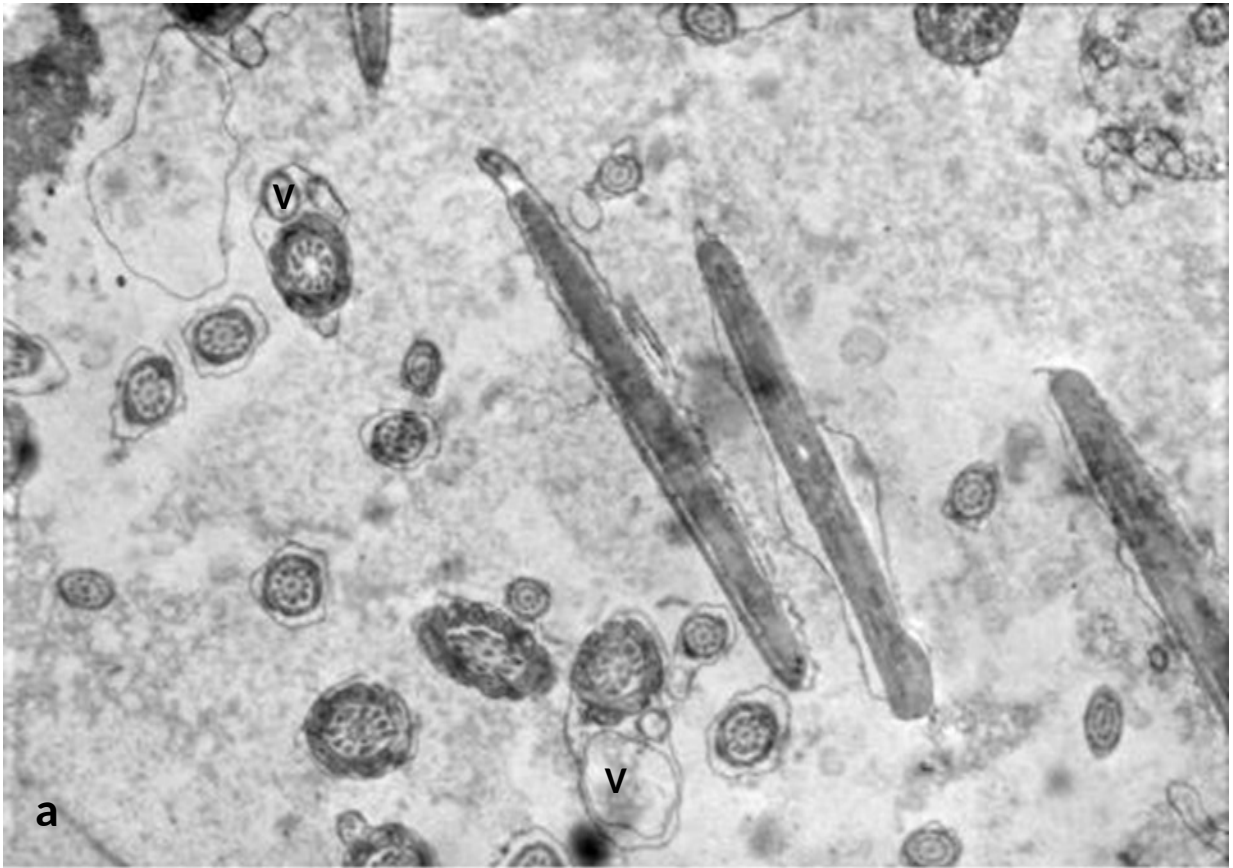
4.6. İnce yapı bulguları

4.6.1. Geçirimli Elektron Mikroskobu Bulguları

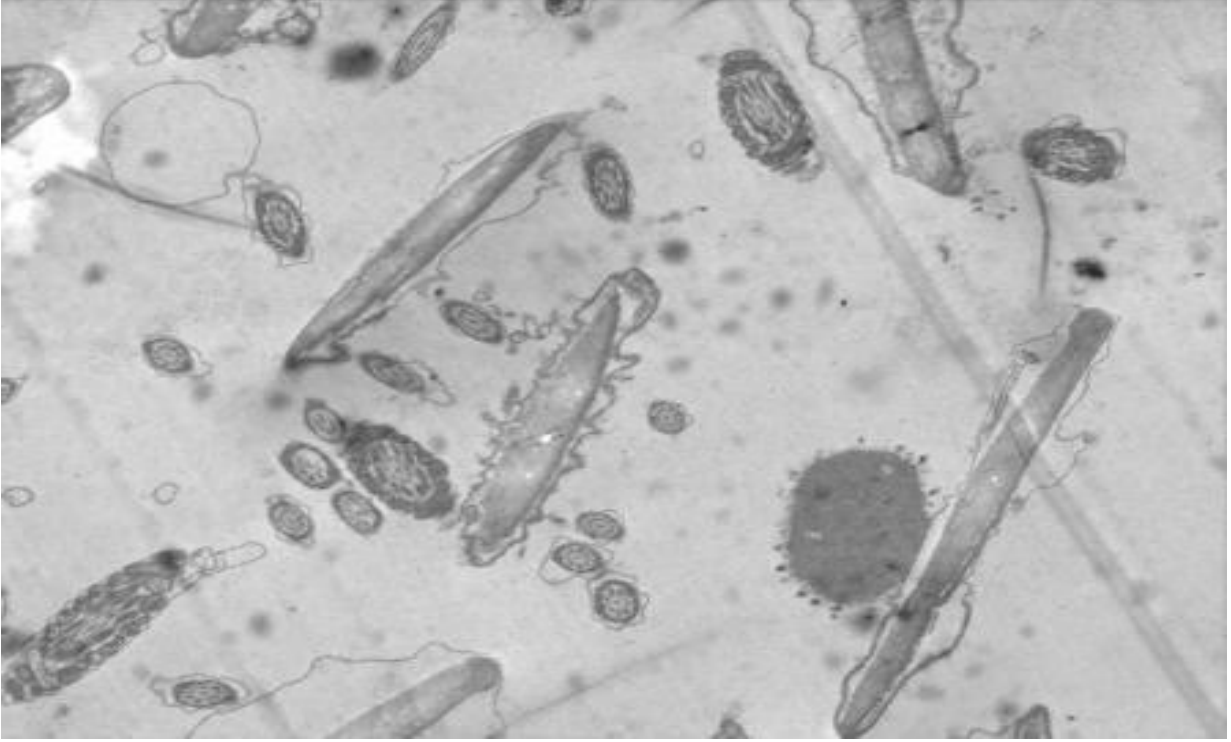
Sperm ince yapısının elektron mikroskobu incelemesi öncesinde TB ile boyanan yarı ince kesitleri ışık mikroskobu ile incelenmiş, spermlerin baş ve kuyruk yapıları ayırt edilerek fotoğraflanmıştır (Şekil 11). İnce kesitlerin geçirimli elektron mikroskobu incelemesinde ise, spermlerde başlıca, membran deformasyonları, vakuolizasyon, yapısal genişlemeler ile aksonem, mitokondri hasarları, akrozom içerik kaybı ve çift kuyruk oluşumu şeklinde kriyohasarlarda ince yapı düzeyinde ayırt edilmiştir (Şekil 12-26).



Şekil 11. Spermlerin baş (siyah oklar) ve kuyruk (kırmızı oklar) bölgelerinden geçen boyuna ve enine kesitleri. TB boyama, 1000X.

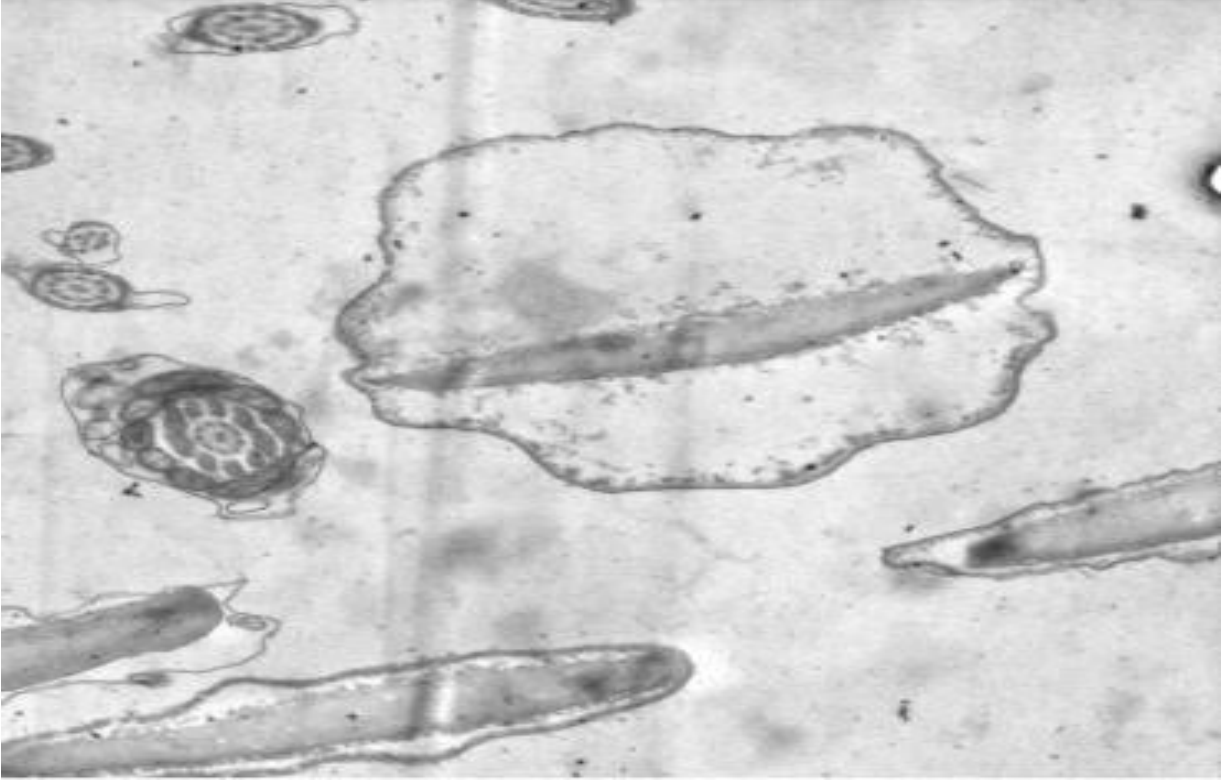


b

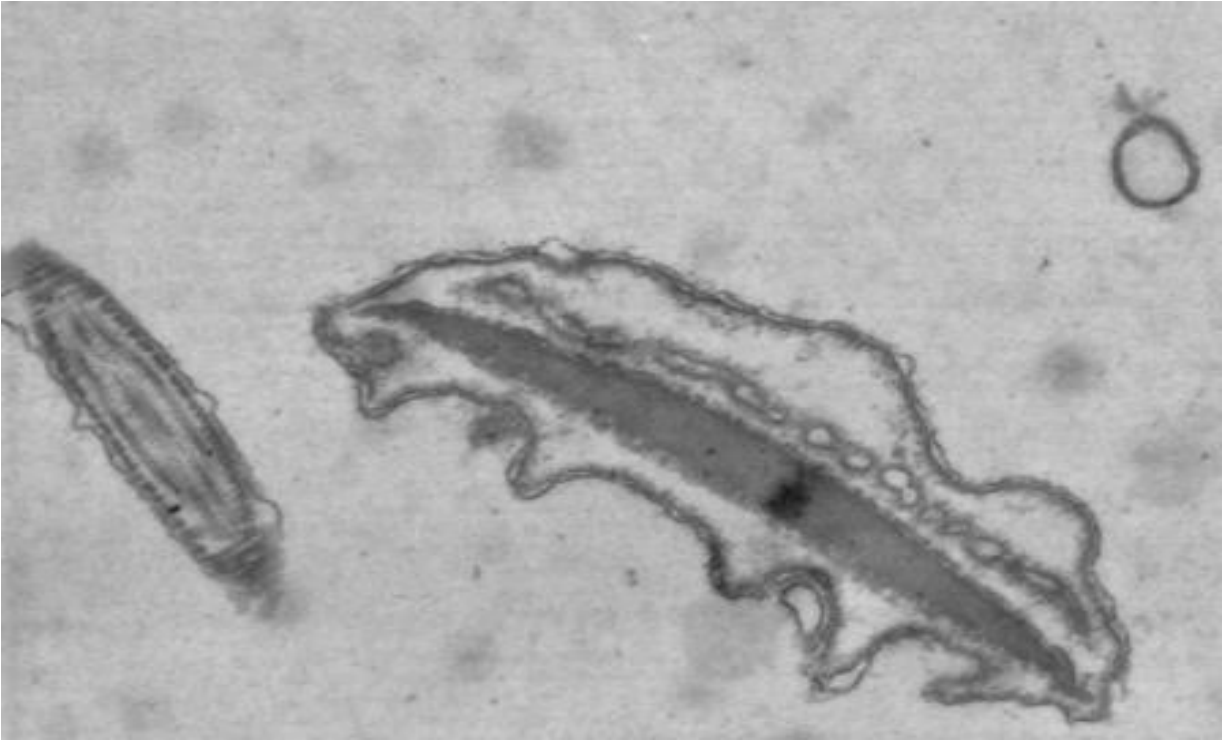


Şekil 12. Baş, orta ve kuyruk bölgelerinde zar deformasyonları (ok) ve vakuoller (v). Orijinal büyütme a: 30000X b: 22000X.

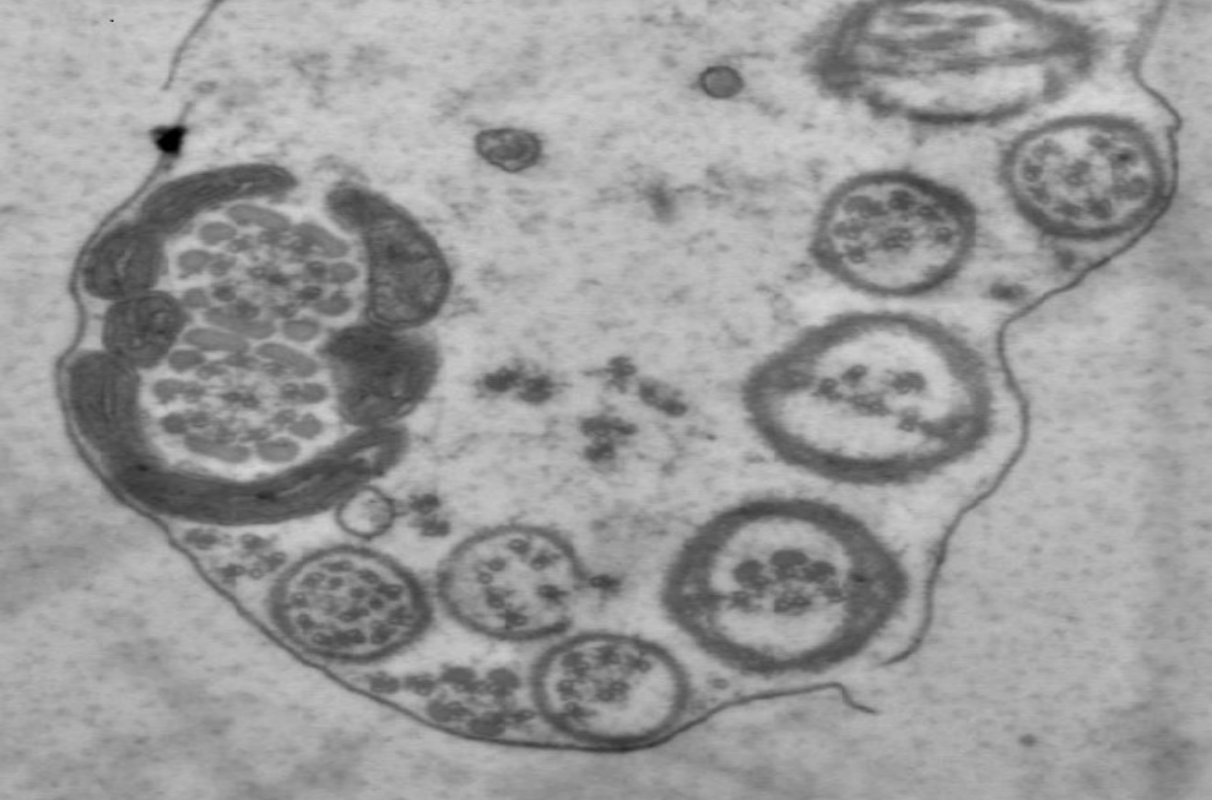




Şekil 13. Baş, orta ve kuyruk bölgelerinde zar deformasyonları (ok), genişlemeler (*), çift kuyruk (ok başı) ve vakuolleşme (v). Orijinal büyütme a: 30000X b: 40000X.



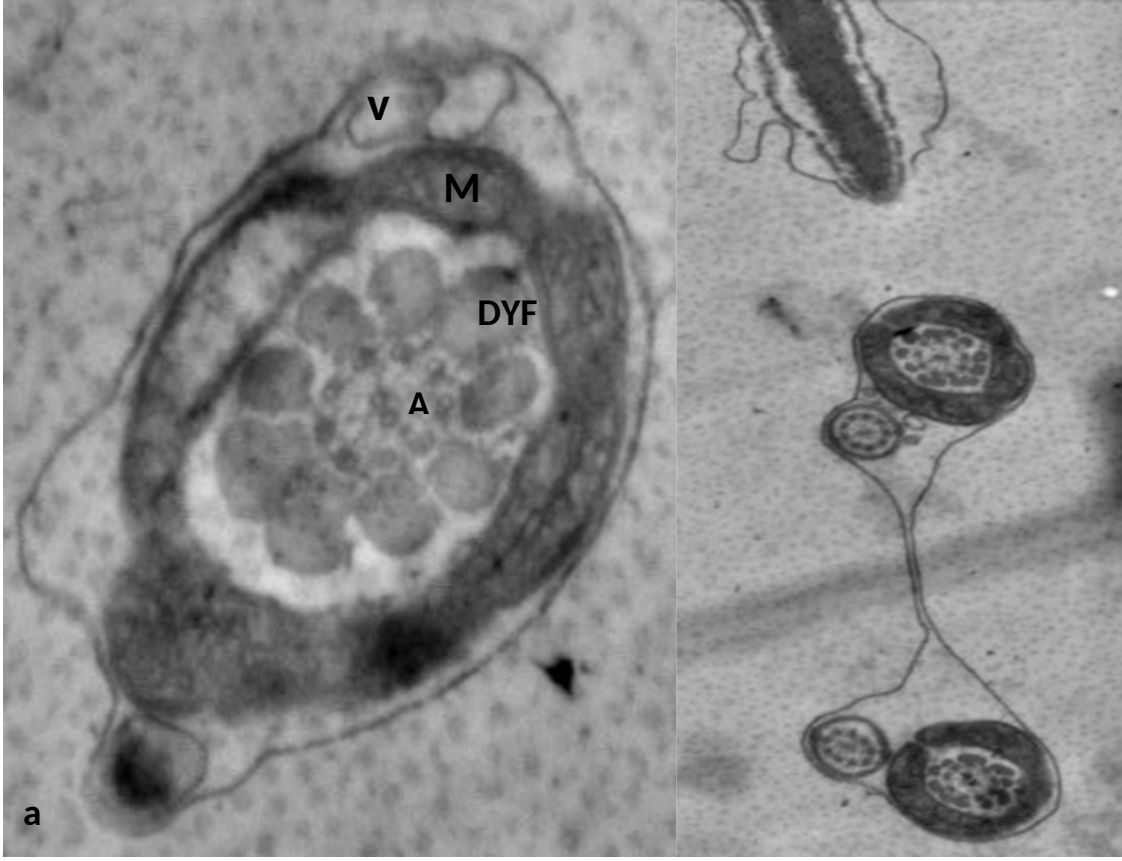
Şekil 14. Baş bölgesinde zar deformasyonları (ok), dış akrozomal zarda vezikülasyon (çift yönlü ok). Orijinal büyütme 66000X.



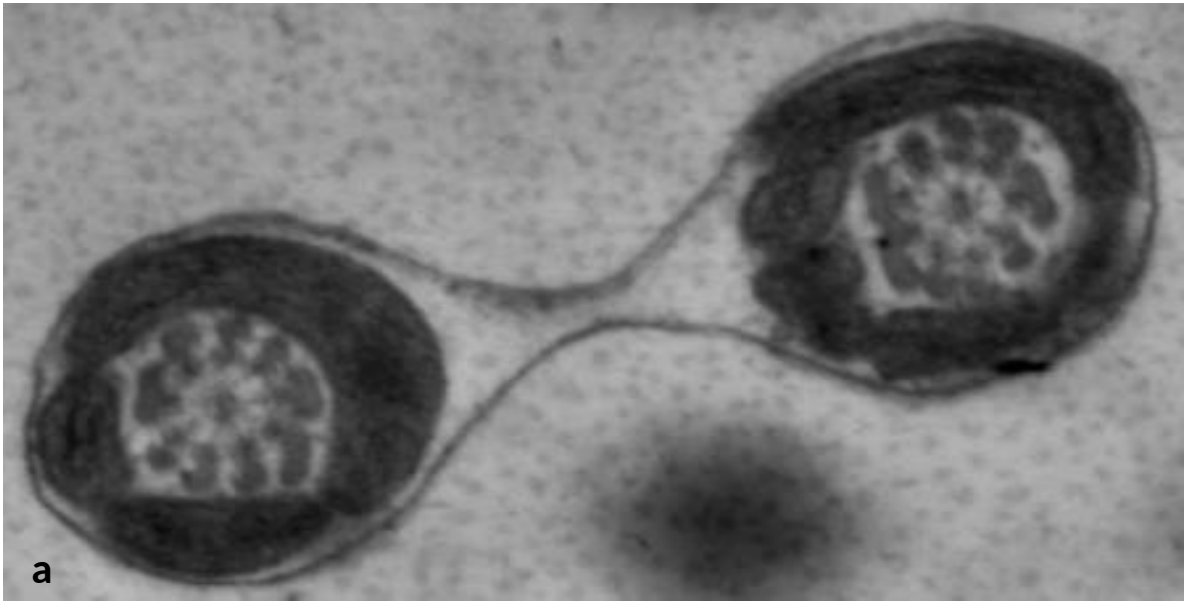
Şekil 15. Hasarsız (ok) ve hasarlı aksonemlerin (kırmızı ok) enine kesitleri ve membran parçaları (mavi ok). Orijinal büyütme 100000X.



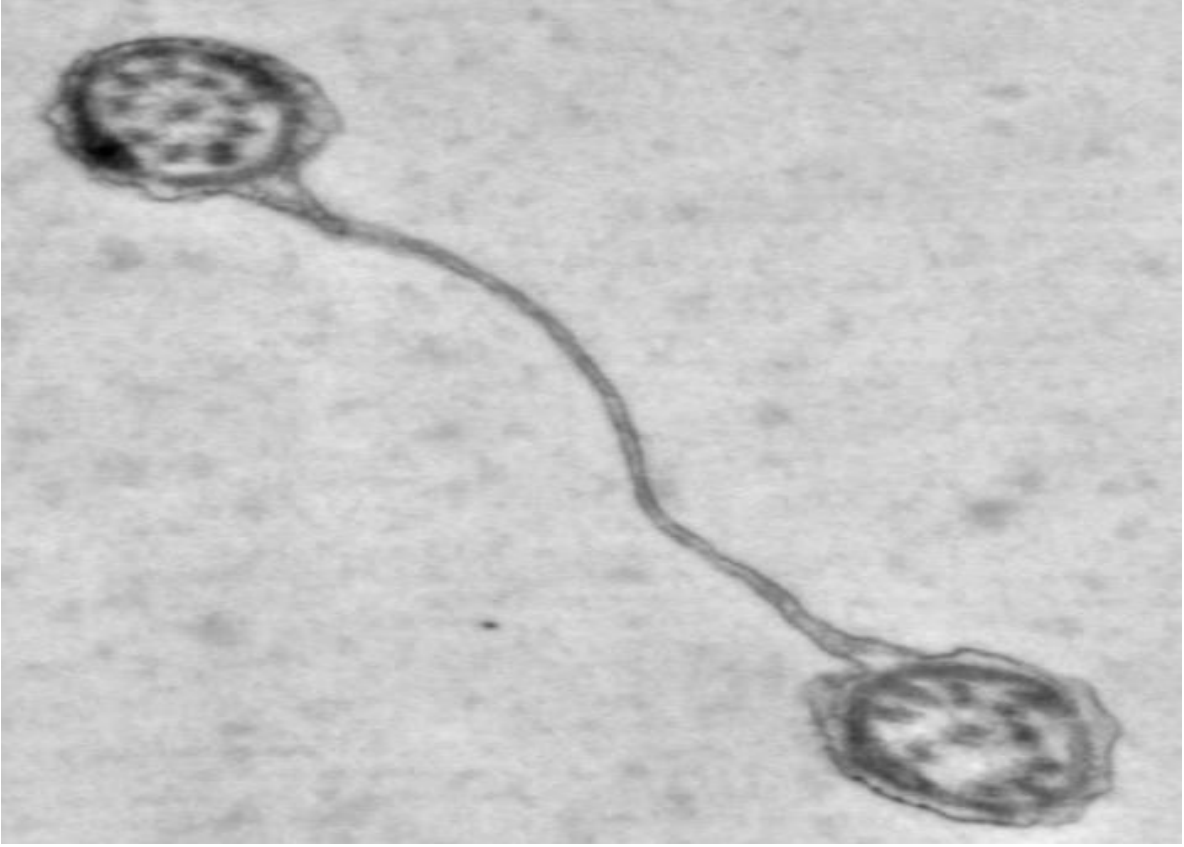
Şekil 16. Baş bölgesinde ve orta bölgede zar deformasyonları (ok), buz kristali (kırmızı ok), vakuolleşmeler (v) ve akrozomal içerik kaybı (*). (Aks: Aksonem, Mk: Mitokondriyal kılıf). Orijinal büyütme 22000X.



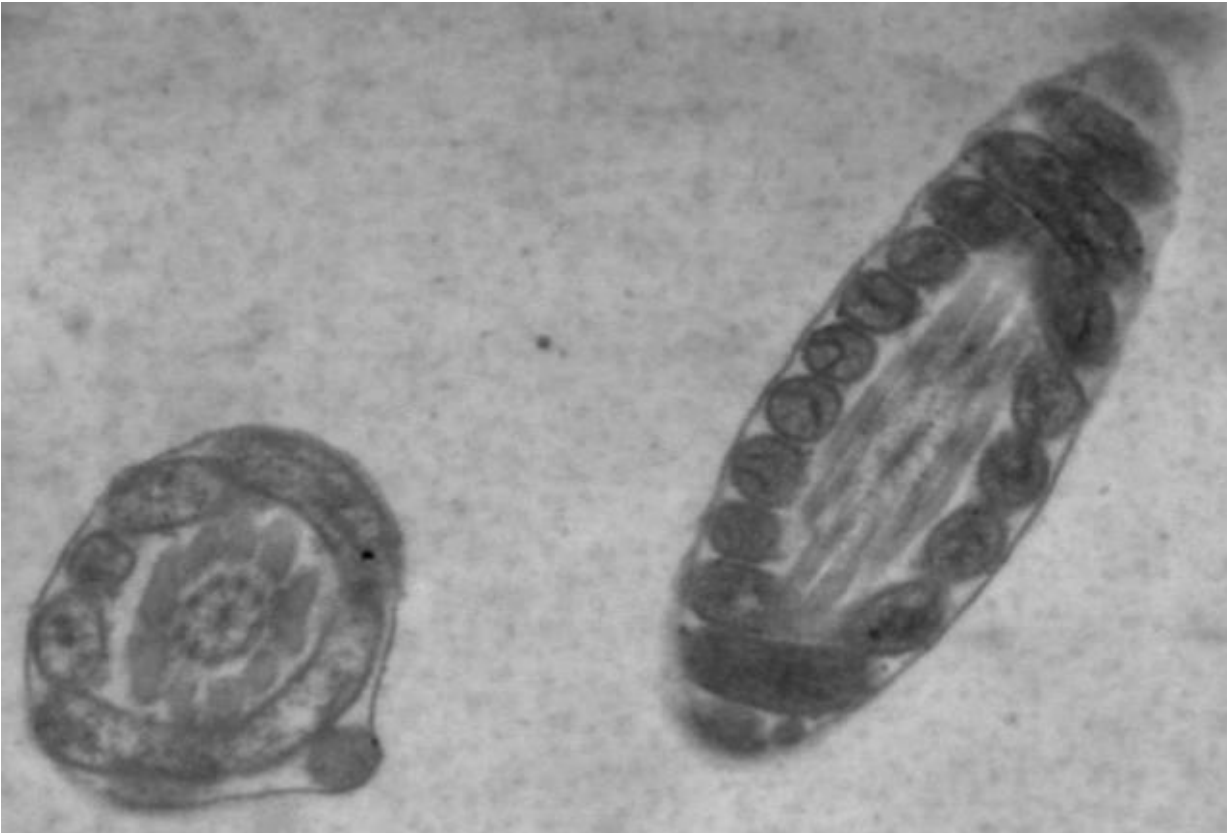
Şekil 17. a: Orta bölgede; dış yoğun fibriller (DYF), Aksonem (A), Mitokondri (M), Mitokondriyal krista hasarlanması (☆), zar deformasyonu (ok). b: Çatallanmış yapısıyla çift kuyruk. Orijinal büyütme a: 154000X b:50000X.



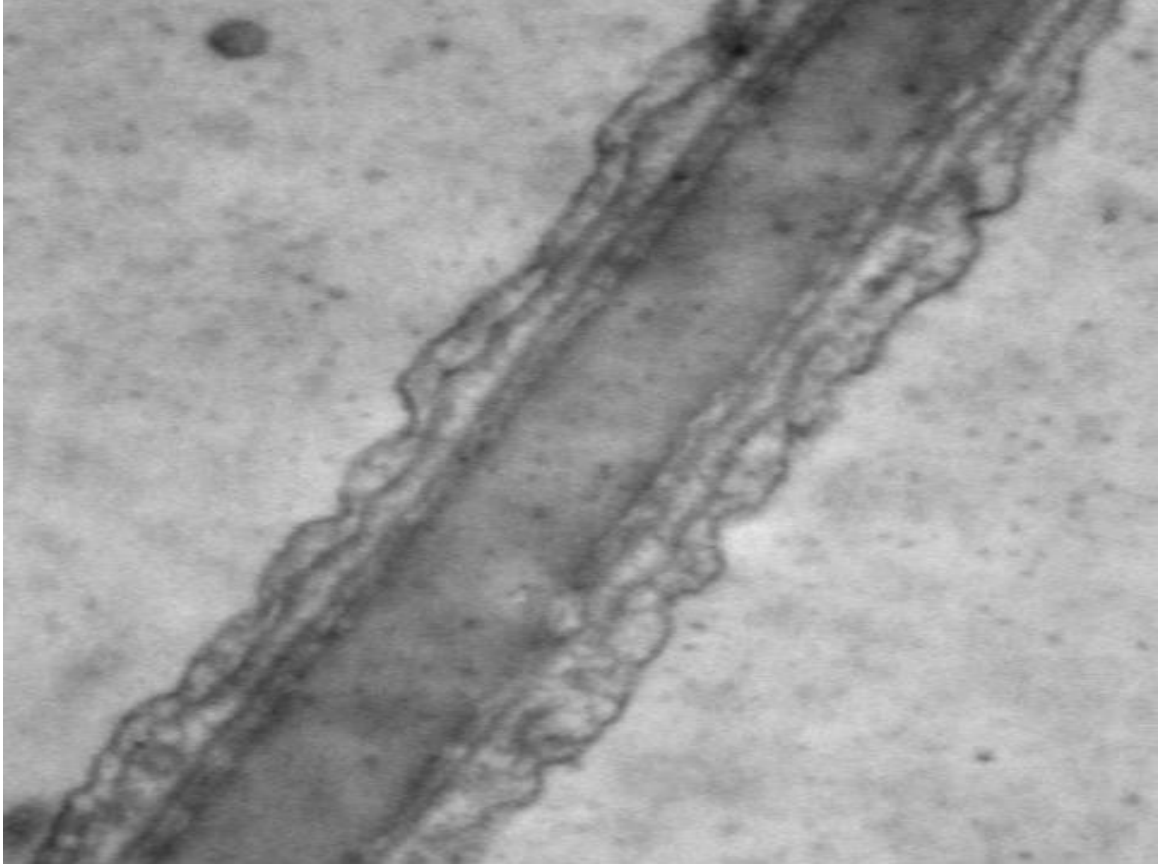
b



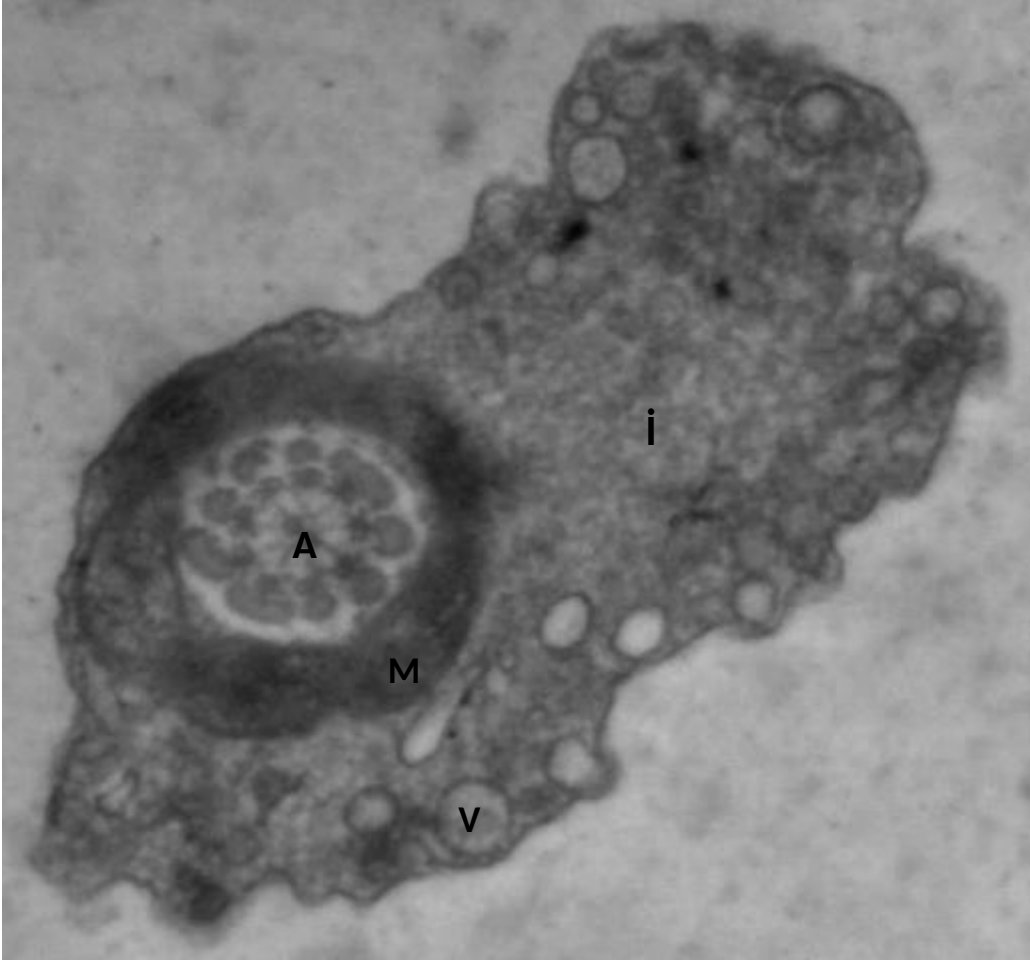
Şekil 18. Çift kuyruk. Orijinal büyütme a, b: 90000X.



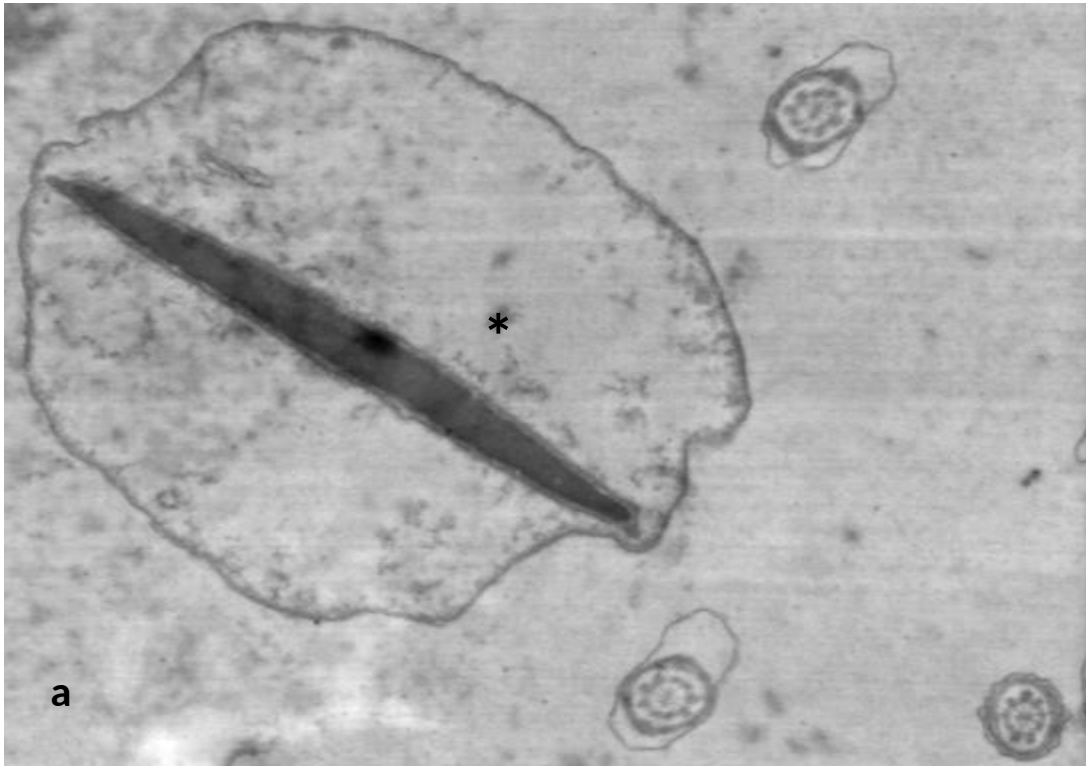
Şekil 19. Hasarsız orta bölge (mavi ok). Orijinal büyütme 75000X.



Şekil 20. Baş bölgesinde zar deformasyonu (ok). Orijinal büyütme 128000X.

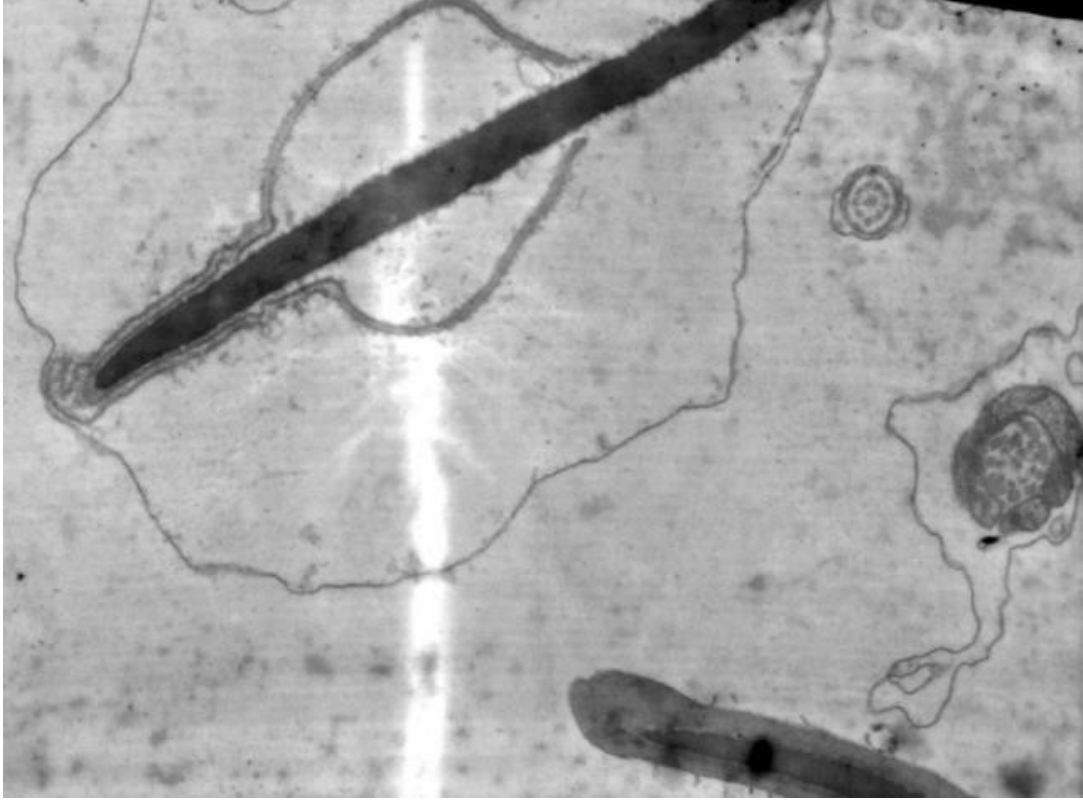


Şekil 21. Orta bölgede genişlemiş ve deforme olmuş zar altında vakuolleşmeler (V) ve inkluzyonlar (i), (A: Aksonem, M: Mitokondri). Orijinal büyütme 130000X.

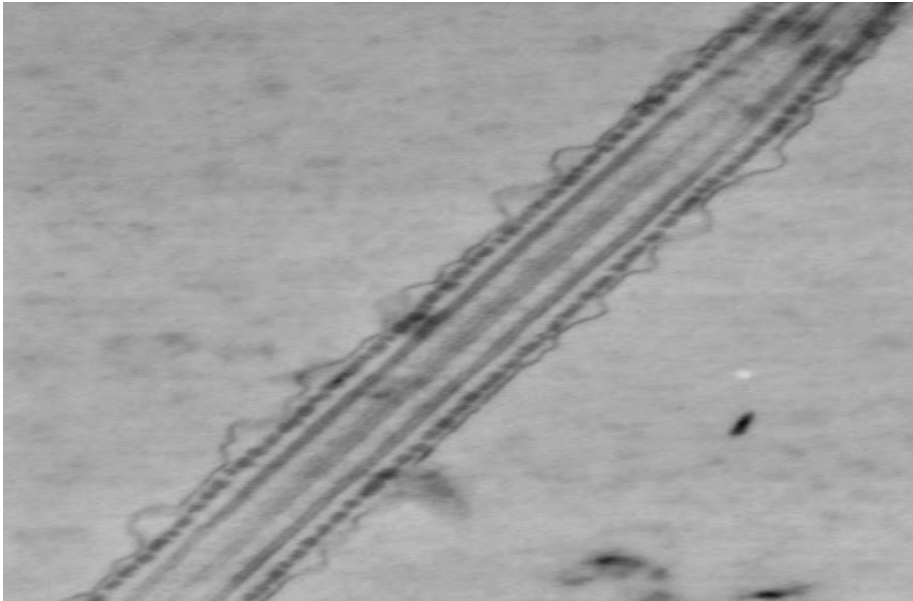


*

b



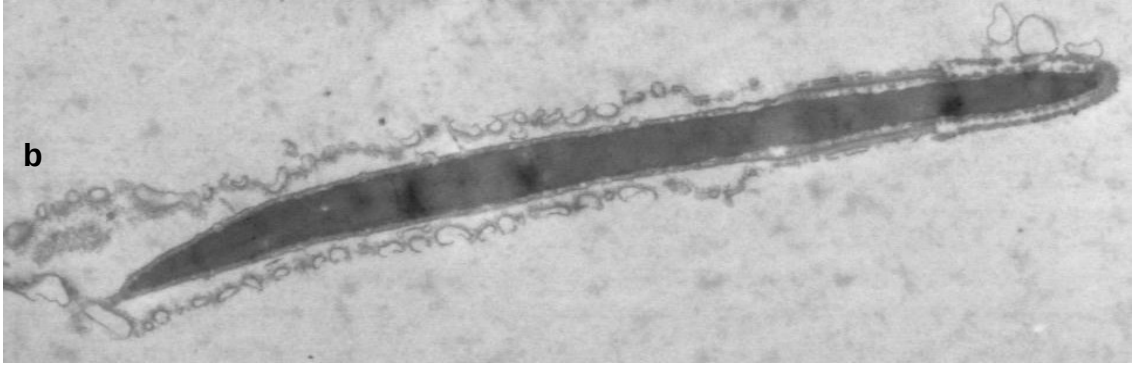
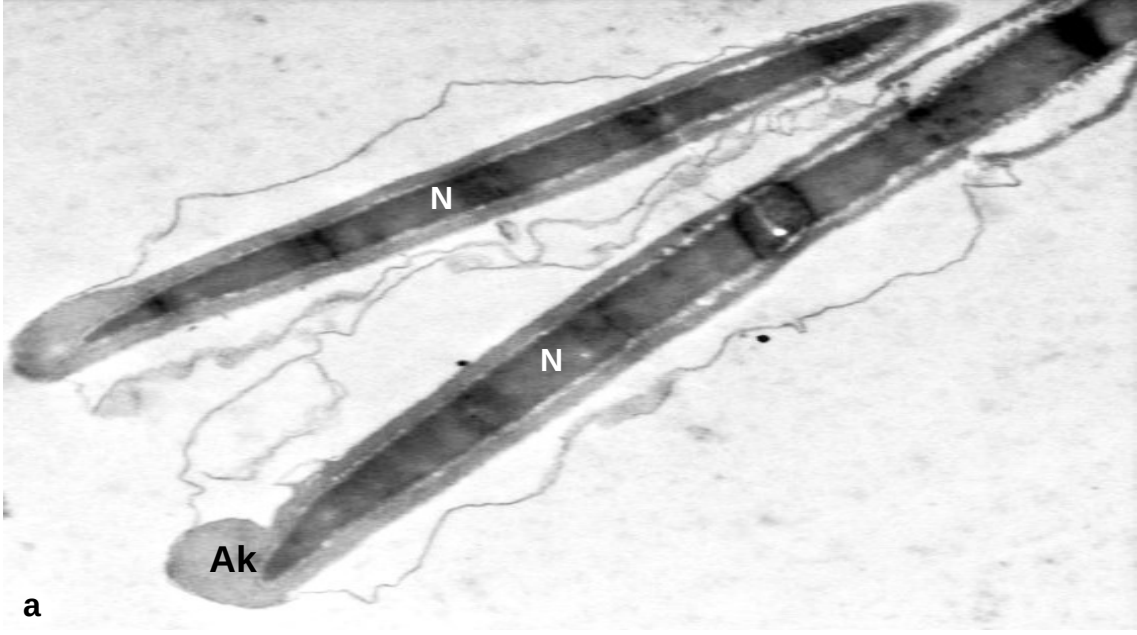
Şekil 22. a: Baş bölgesinde oldukça genişlemiş (*) ve deforme olmuş dış zar (ok), b: dış (ok) ve akrozom zarında (kesikli ok) deformasyon, plazma membran deformasyonu (mavi ok). (Ak: Akrozom, Aks: Aksonem). Orijinal büyütme a: 52000X, b: 50000X.



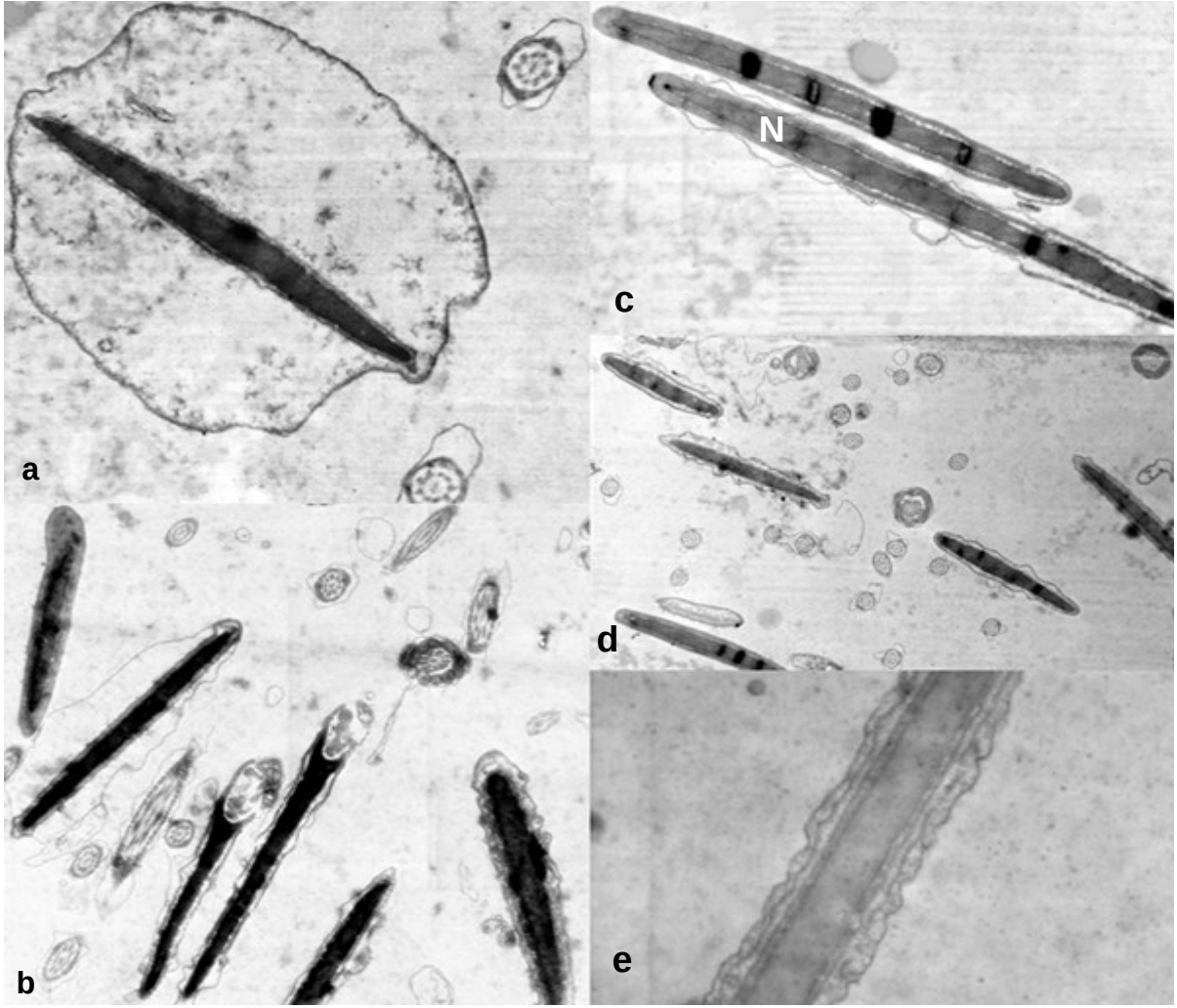
Şekil 23. Kuyruk boyunca kesitinde deforme olmuş zar (ok). Orijinal büyütme 80000X.



Şekil 24. 1: Çift kuyruk, 2: Baş bölgesinin nuklear bölümünde genetik materyal kaybından kaynaklanan deformasyon (beyaz yıldız), 3: Hasarsız orta bölge. (Mk: Mitokondriyal kılıf, DYF: Dış yoğun fibriller, Aks: Aksonem). Orijinal büyütme 48000X.



Şekil 25. a: Plazma membran deformasyonları (siyah ok), akrozomda şişme (kırmızı ok). b: kabarcıklar şeklinde membran deformasyonu (mor ok). Orijinal büyütmeler; (a): 37000X, b: 23000X. Ak: Akrozom; N: Nukleus.

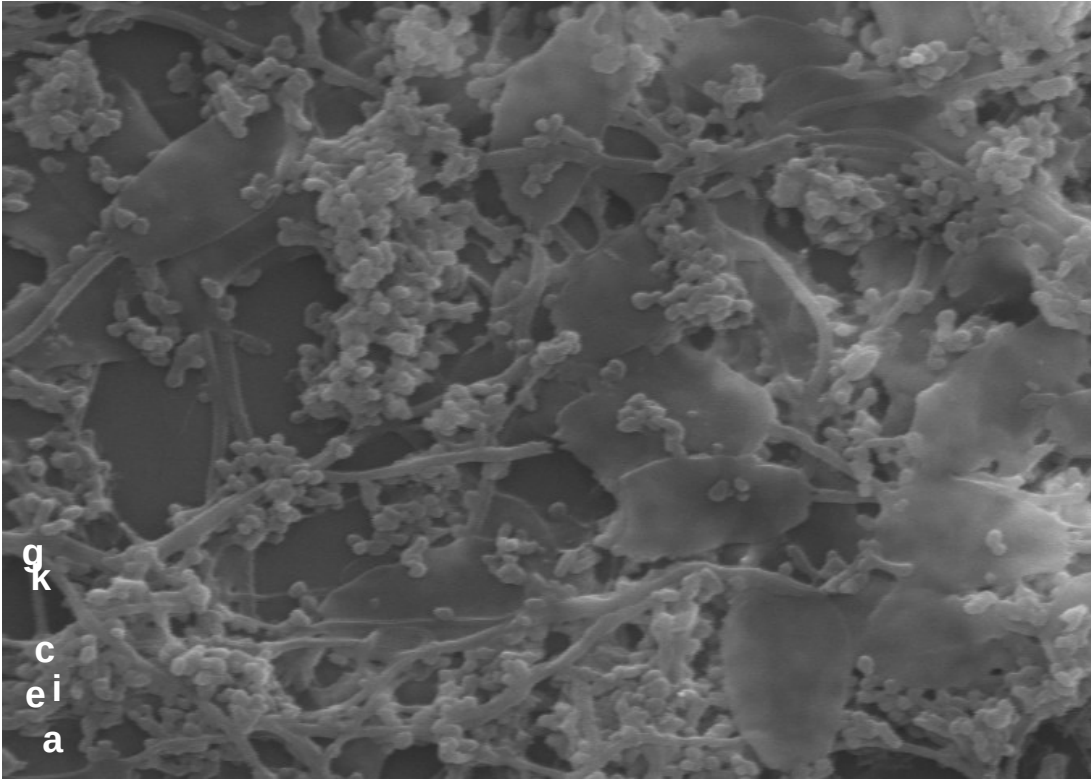


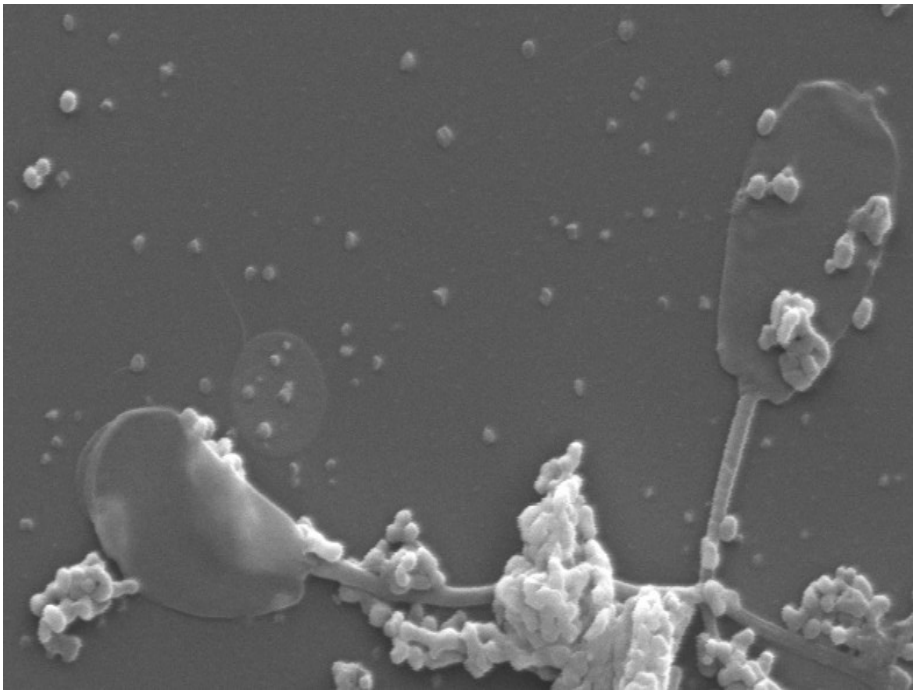
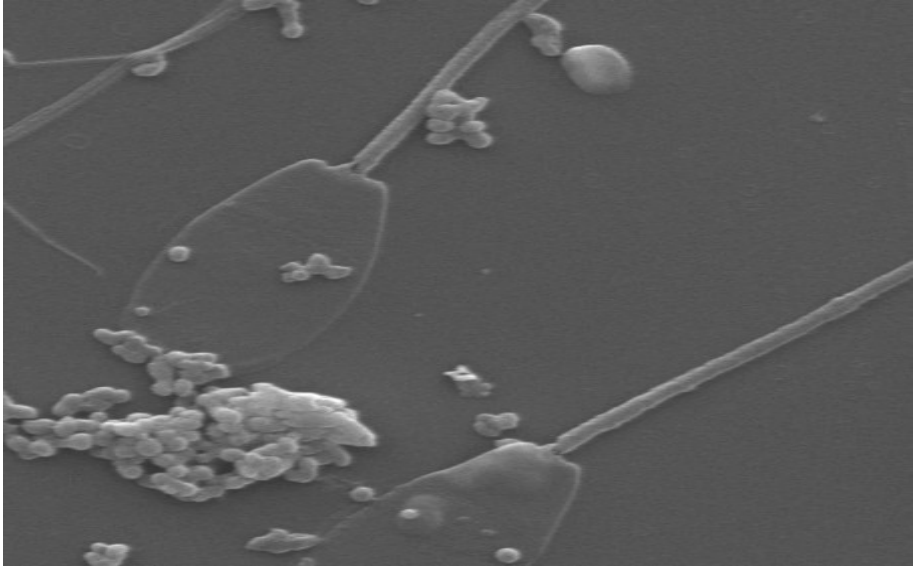
ekil 26. a: Hasarlı plazma membranı (siyah ok), dev membransal vakuol (). Orijinal büyütme 52000X. b: Enine geçmiş hasarsız kuyruk (yeşil ok), hasarlı baş kısım-nuklear vakuol (kırmızı ok), akrozom (turuncu ok) ve membran deformasyonları (siyah ok). Orijinal büyütme 27000X. c: Buz kristalleri (kesikli ok), membran deformasyonu (siyah ok), hasarsız akrozom (mavi ok). Orijinal büyütme 55000X. d: membran deformasyonu (siyah ok), buz kristali (siyah çizgi) olmakla birlikte membran deformasyonu gibi ince yapı değişikliği

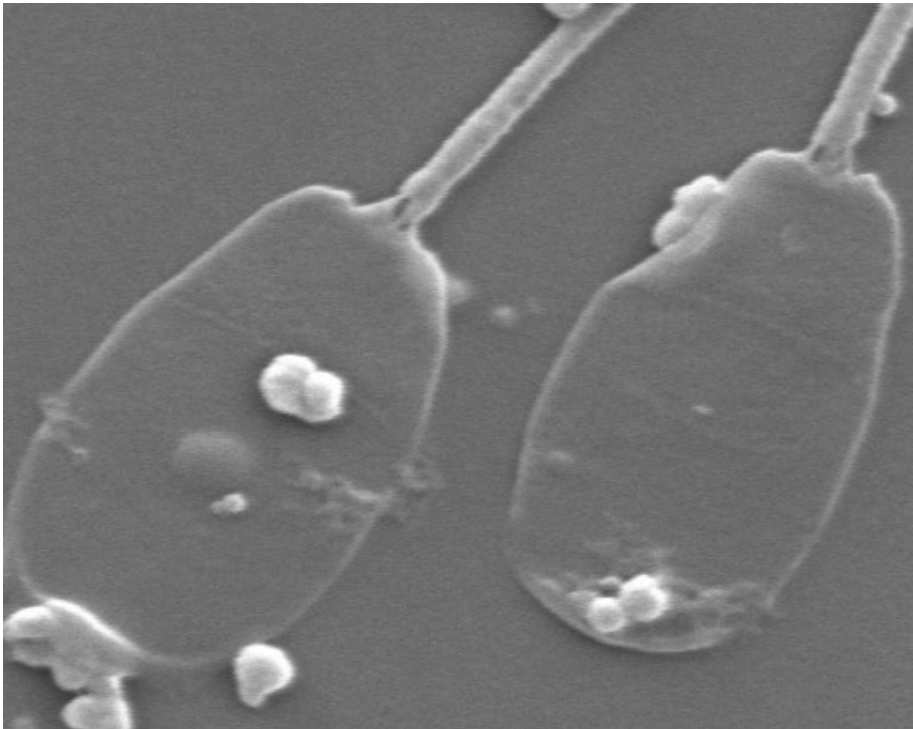
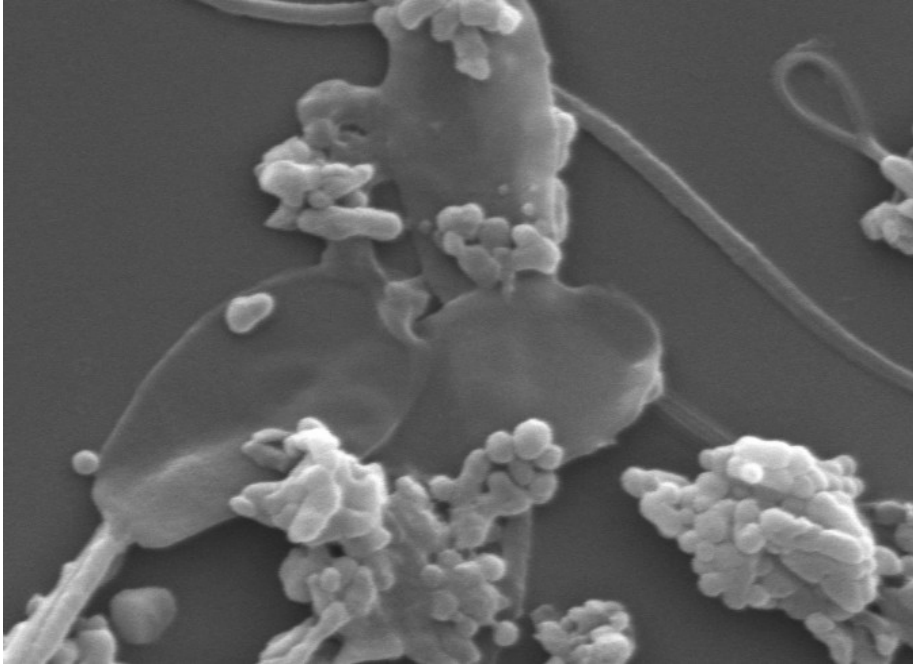
göstermeyen hasarsız baş (kırmızı ok). Orijinal büyütme 28000X. e: Plazma membran deformasyonu (siyah ok). f: Akrozom membranında kabarcıklar (mor ok), plazma membranı deformasyonu (siyah ok). Orijinal büyütme 128000X, f: 66000X. N: Nukleus.

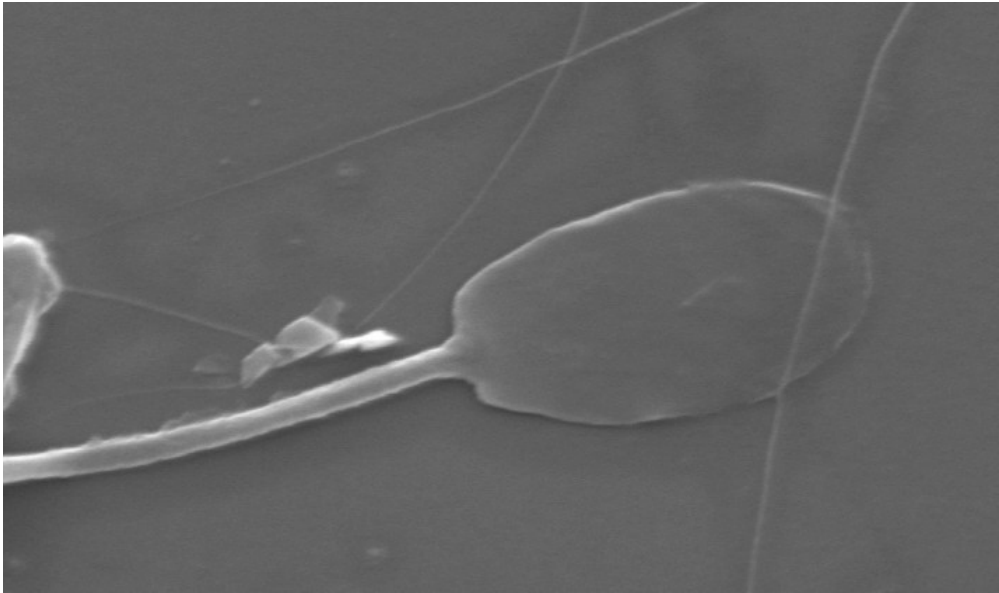
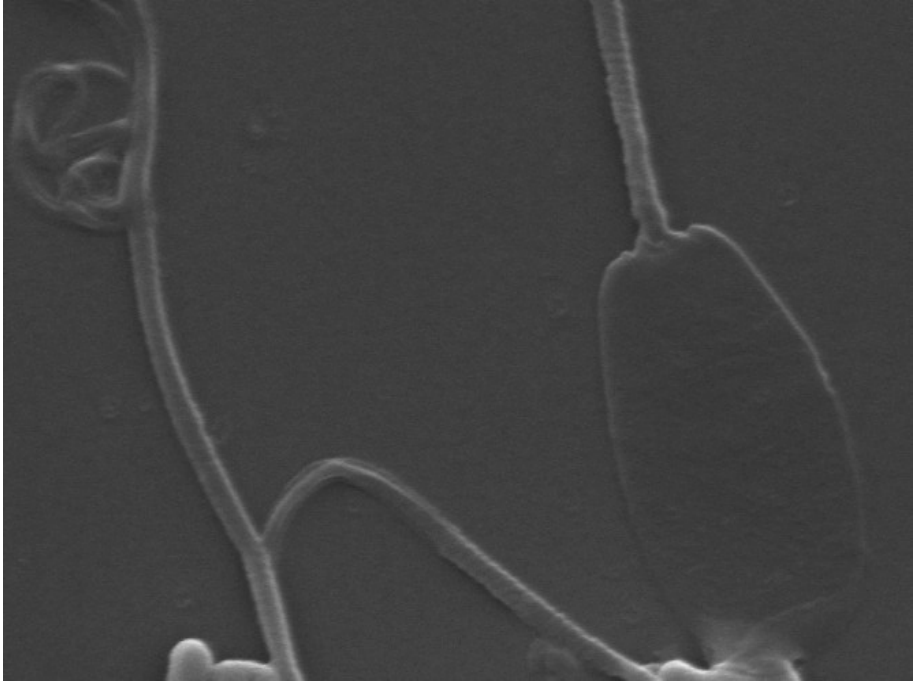
4.6.2 Taramalı Elektron Mikroskobu Bulguları

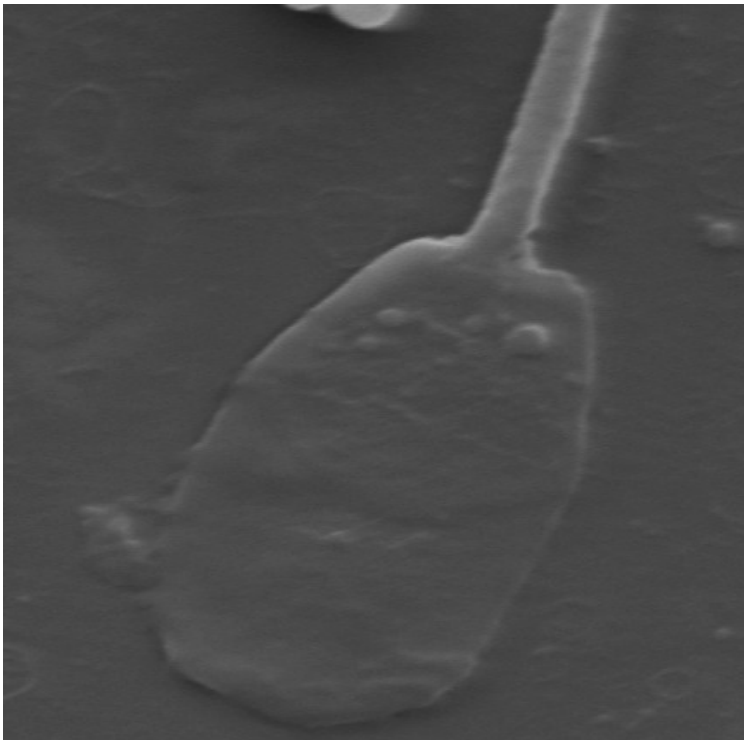
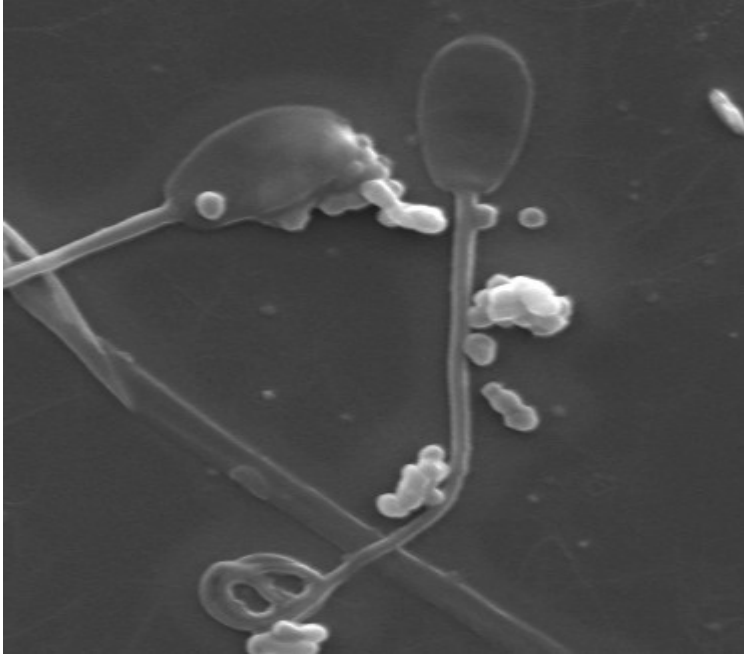
Genel olarak spermlerde baş bölgesinde vakuolleşme benzeri kabarmalar veya Geçirimli Elektron Mikroskobu bulgularına dayanılarak olası zar genişlemeleri olarak nitelendirilebilecek hasarlar, baş bölgesi kenarlarında hafif çentiklenmeler şeklinde gözlenen deformasyonlar ile akrozomda şişme/genişleme olarak görülen değişim, boyun bölgesinde deformasyon ayırt edilmektedir. Ayrıca kuyrukta çeşitli şekillerde kıvrılmalar/sarmal yapılar da görülmektedir (Şekil 27).

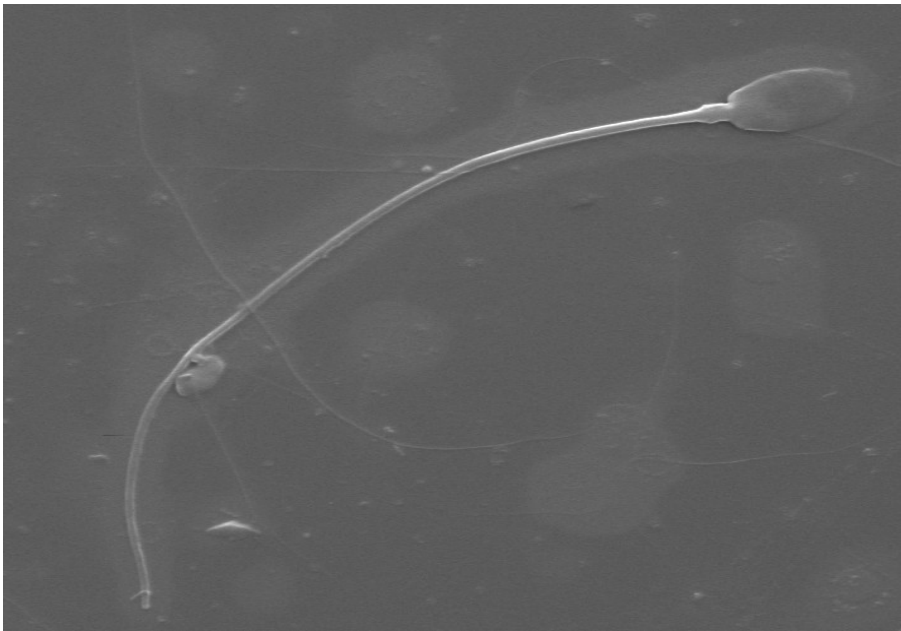
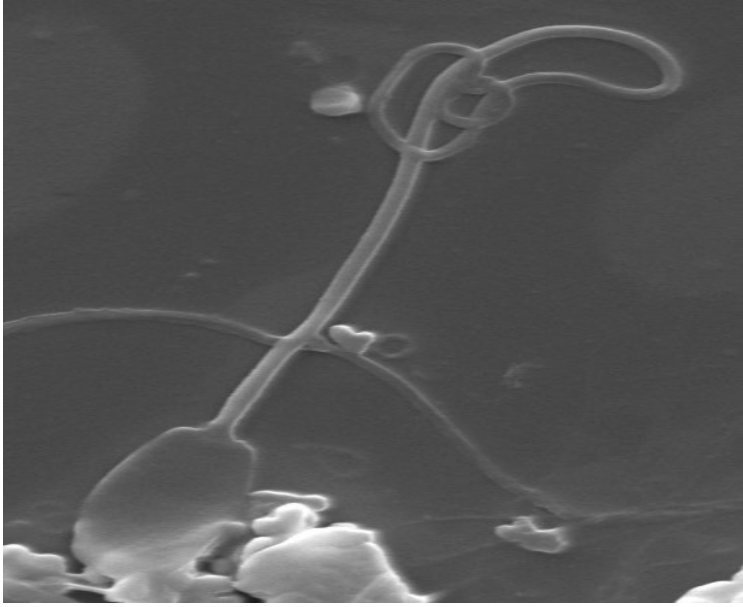


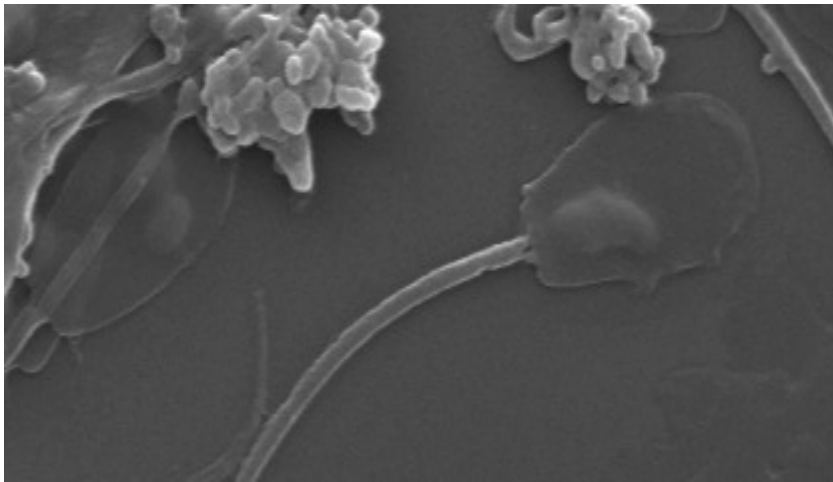
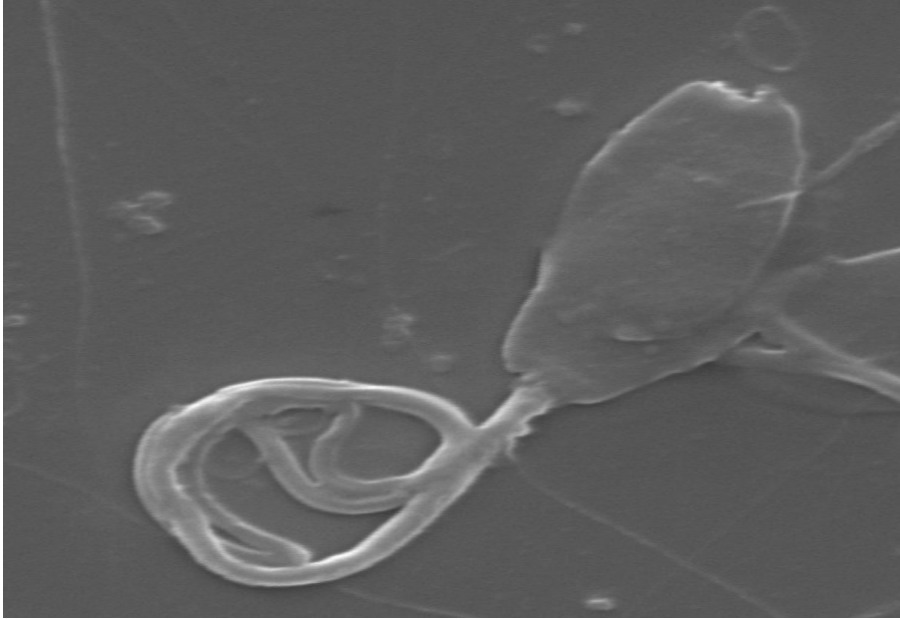


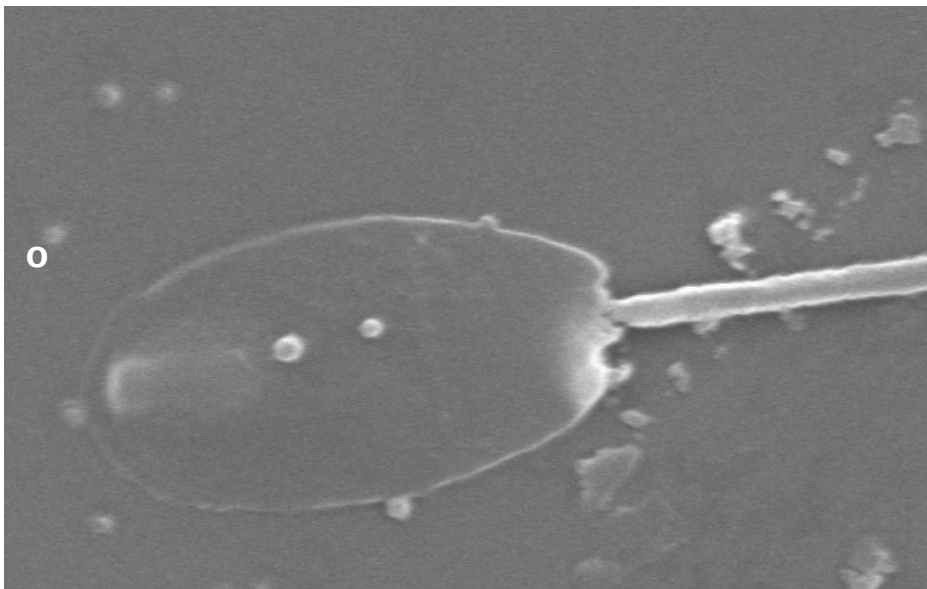
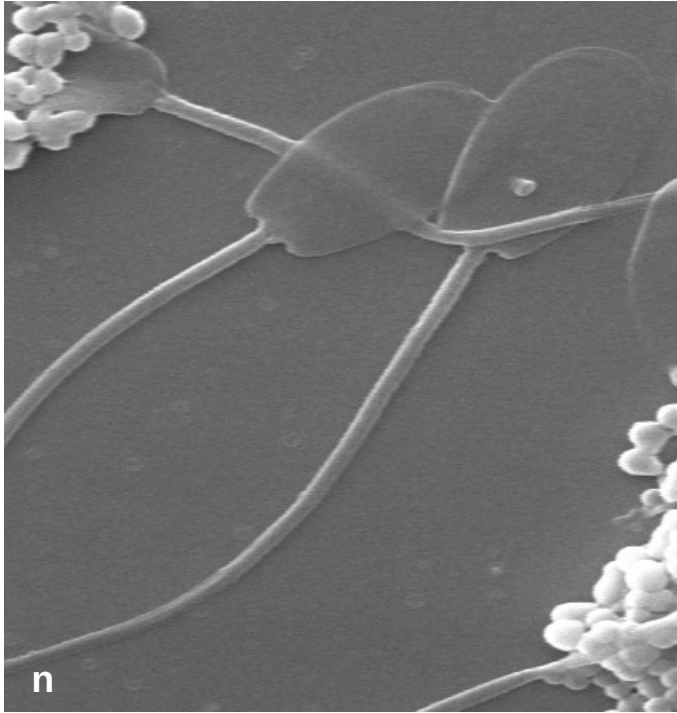


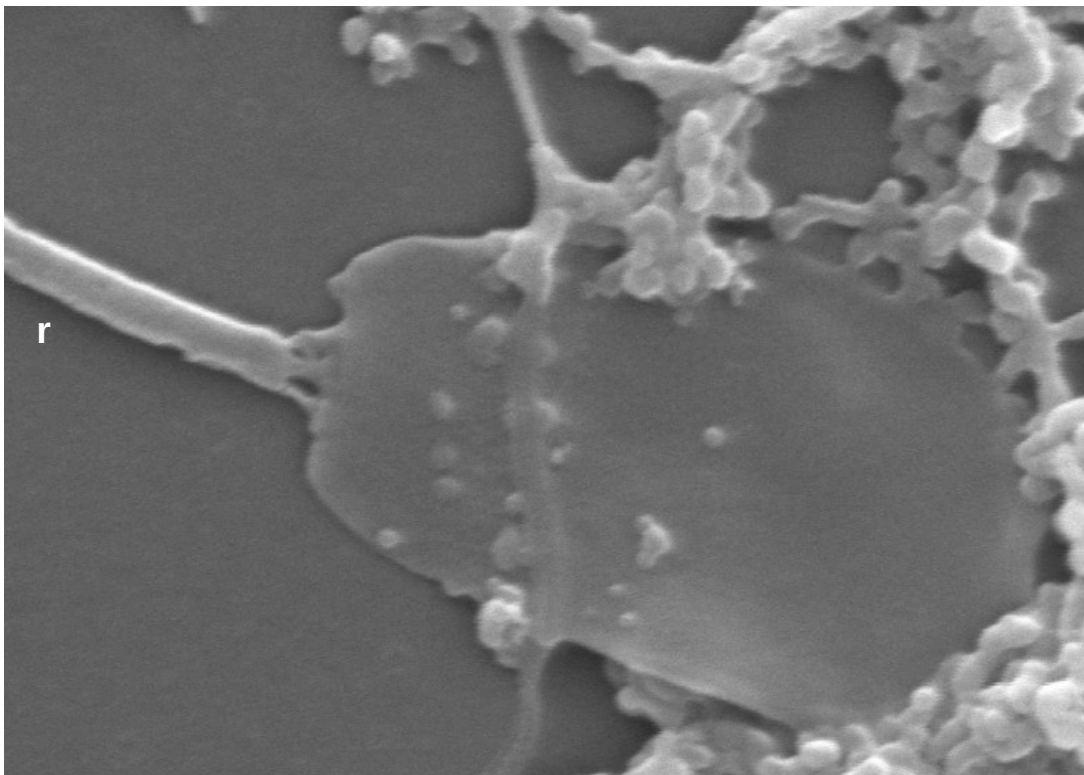
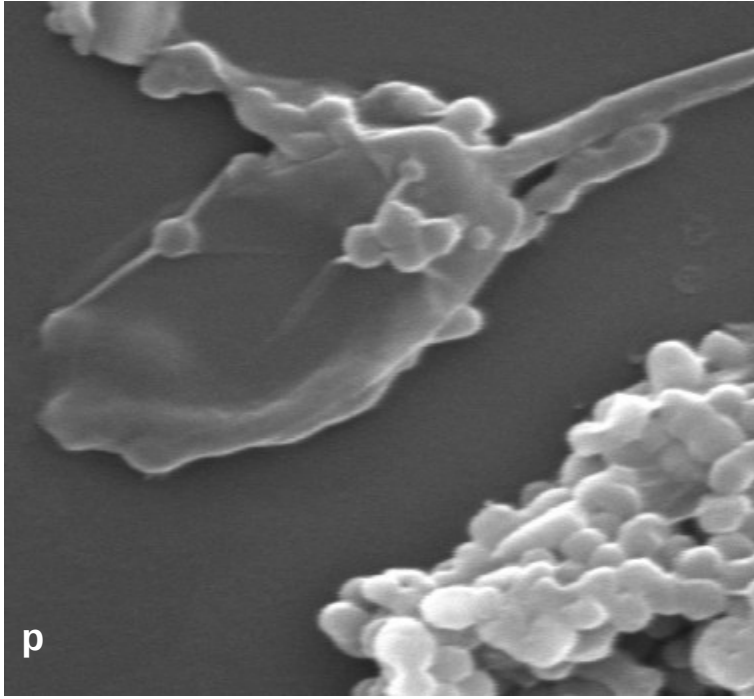












Şekil 27. Hasarsız (turuncu ok), başta vakuol benzeri kabarmalar (yeşil ok), akrozomda şişme/deformasyon (kırmızı ok), kuyrukta kıvrılma/sarmal (mor ok), baş kenarlarında deformasyon/hasar (mavi ok), boyun bölgesinde deformasyon/hasar (siyah ok), kopmuş baş (mavi yıldız). Orijinal büyütme; a: 5190X; b: 6000X; c: 7500, d, e, f, g, l, o, p: 10000X; h: 3500X, i: 15000X, j: 5000X, k: 4000X, m: 4000X, n: 3000X, r: 20000X.

4.7 Elektron Mikroskopundan Trehaloz Grubu İçin İstatistiksel Analiz Bulguları

(projeye ek çalışma)

Projenin 1. aşamasını desteklemesi amacıyla, projeye ek olarak Geçirimli Elektron mikroskobu (EM) için hazırlanan 6 gruba ait her bir preparattan elektron mikroskopunda en az 500 sperm olacak şekilde sayımlar yapılmıştır. Spermilerin sayma işlemi çeşitli yapısal hasarlanmalara göre (membran değişiklikleri, vakuolleşme, aksonem hasarları gibi), hasarlılar ve hasarsızlar olarak gruplandırılmıştır. Gruplara göre hasar dağılımları arasındaki farklılıklar ki-kare analizi ile incelenmiştir.

Tablo 20. EM'de Tespit Edilen Hasarlı Sperm Yüzdesi

Gruplar	Hasarlı	Hasarsız	Toplam	Yüzde (%)
Gliserol %5 (T1)	384	116	500	77
Gliserol %3 + 60 mM Trehaloz (T2)	334	383	717	47
Gliserol %1,5 + 100 mM Trehaloz (T3)	324	180	504	64
Etilen Glikol %5 (T4)	279	260	539	52
Etilen Glikol %3 + 60 mM Trehaloz (T5)	335	273	608	55
Etilen Glikol %1,5 + 100 mM Trehaloz (T6)	305	222	527	58

Analize göre, 6 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır. $p=0,0001^*$

T1-T2 arasında $p=0,0001^*$; T1. ve T2. grubun hasar dağılımları arasındaki fark anlamlıdır.

T1-T3 arasında $p=0,0001^*$; T1. ve T3. grubun hasar dağılımları arasındaki fark anlamlıdır.

T1-T4 arasında $p=0,0001^*$; T1. ve T4. grubun hasar dağılımları arasındaki fark anlamlıdır.

T1-T5 arasında $p=0,0001^*$; T1. ve T5. grubun hasar dağılımları arasındaki fark anlamlıdır.

T1-T6 arasında $p=0,0001^*$; T1. ve T6. grubun hasar dağılımları arasındaki fark anlamlıdır.

T2-T3 arasında $p=0,0001^*$; T2. ve T3. grubun hasar dağılımları arasındaki fark anlamlıdır.

T2-T5 arasında $p=0,002^*$; T2. ve T5. grubun hasar dağılımları arasındaki fark anlamlıdır.

T2-T6 arasında $p=0,0001^*$; T2. ve T6. grubun hasar dağılımları arasındaki fark anlamlıdır.

T3-T4 arasında $p=0,0001^*$; T3. ve T4. grubun hasar dağılımları arasındaki fark anlamlıdır.

T3-T5 arasında $p=0,002^*$; T3. ve T5. grubun hasar dağılımları arasındaki fark anlamlıdır.

T3-T6 arasında $p=0,035^*$; T3. ve T6. grubun hasar dağılımları arasındaki fark anlamlıdır.

T4-T6 arasında $p=0,045^*$; T4. ve T6. grubun hasar dağılımları arasındaki fark anlamlıdır.

T2-T4 arasında $p=0,069$; T2. ve T4. grubun hasar dağılımları arasındaki farklılık anlamlı değildir.

T4-T5 arasında $p=0,258$; T4. ve T5. grubun hasar dağılımları arasındaki farklılık anlamlı değildir.

T5-T6 arasında $p=0,347$; T5. ve T6. grubun hasar dağılımları arasındaki farklılık anlamlı değildir.

4.8 Fertilite Bulguları

Tablo 21. Koçlarda kontrol grupları ve en iyi çıkan antioksidan grupları ile dondurulmuş sperma numuneleri ile yapılan tohumlama sonuçları

	TOHURLANAN KOYUN SAYISI %	30. GÜN GEBE KOYUN SAYISI	DOĞUM YAPAN KOYUN SAYISI
Gliserol %5	27	2/27	2/27
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM	25	0/25	0/25
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetüin 5 mg	24	3/24	3/24
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 10 μ M	22	2/22	2/22
Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Boron 0,5 mM	24	4/24	4/24
P		-	-

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

Gliserol %5, Gliserol %3 + Trehaloz 60 mM, Gliserol %3 + Trehaloz 60 mM + Fetüin 5 mg,

Gliserol %3 + Trehaloz 60 mM + Taksifolin 10 µM ve Gliserol %3 + Trehaloz 60 mM + Boron 0,5 mM ile bireysel olarak dondurulan koç spermaları ile yapılan tohumlamalar sonrası elde edilen sonuçların biyoistatistiksel analizi Fisher's exact testi ile yapıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık görülmedi ($P>0,05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Spermatolojik Parametreler

Spermatozoon motilitesi genel olarak 3 temel faktöre bağımlıdır: regülasyon, yapısal bütünlük ve enerji sürekliliği. Hareketin regülasyonu orta kısımdaki flagellar ve prinsipal bölgeden kontrol edilmektedir. Flagellar kısım motilite aktivitesini sağlarken, prinsipal kısım ise hiperaktivasyondan sorumludur. Fakat orta kısımdaki doymamış yağ asitleri ve doymuş protein kanalları, bu yapıyı serbest radikal (ROS) ataklarına duyarlı kılmaktadır (Suarez vd., 2007; Hamano, 2007). Sunulan çalışmada sulandırıcıya ilave edilen trehaloz, fetuin ve boronun spermatozoonun orta kısmındaki bu fonksiyonel yapıları koruduğu varsayımıyla, dondurma çözündürme işlemi süresince spermatolojik parametreleri iyileştirdiği gözlenmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre fetuinin göstermiş olduğu pozitif etki, diğer bazı çalışma sonuçlarını destekler niteliktedir (Sarıözkan vd., 2015).

Mitokondriyel yapılar spermatozoonların orta kısmında yerleşik halde bulunmakta ve spermatozoonlara progresif motilitelerini ve zona pellusidayı geçmelerini sağlayan kuyruk filamanları için gereken ATP enerjisini üretmektedir (O'Connell vd., 2002). Bu nedenle, spermatozoon motilitesi ve fertilitesi ile mitokondriyel aktivite arasında pozitif bir ilişkinin olduğu belirtilmektedir. Başarılı bir fertilizasyon işleminde de mitokondriyel aktivitenin yüksek olması gerekmektedir (Casey vd., 1993; Kasai vd., 2002). Bu aktivitenin belirlenmesinde Rhodamin 123, Texas red ve 5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) gibi floresan boyalar kullanılmakta, fakat yüksek ya da düşük mitokondriyel aktive arasındaki farklılığı en iyi yansıtan JC-1 boyasıyla yapılan boyama tekniği olduğu bildirilmektedir (Garner ve Thomas, 1999). Boğa ve koçlarla yapılan çalışmalarda motilite ve yüksek mitokondriyel aktiviteye sahip spermatozoa arasında yüksek bir ilişkinin olduğu belirtilmiştir (Garner vd., 1997; Martinez-Pastor vd., 2004). Dondurma işlemi öncesine göre, dondurma-çözündürme işlemi sonrası yüksek mitokondriyel aktiviteli spermatozoa oranı düşmekte ve bu süreçte ortamda gelişen oksidatif stres ve ROS ürünleri de etkin olmaktadır (Gille ve Nohl, 2001; Cummins vd., 1994). Mitokondrilerde gelişen dondurma ve oksidatif stres nedenli hasarlar kaspaz 3 ve cytochrome C gibi apoptotik faktörlerin salınımına bağlanmaktadır (Martin vd., 2004).

Çalışmamızda, çözüm sonrası koç sperması motilitesi, canlı spermatozoa, mitokondriyel aktivite oranları bakımından, Gliserol %5 (45.62 ± 3.46 , 52.99 ± 3.34 ve 45.63 ± 3.51) diğer gruplara göre daha yüksek sonuç vermiştir. ($P < 0.05$). Gliserol %3 + trehaloz 60 mM sulandırıcı grubu ise, ikinci derecede çözüm sonu spermatolojik parametrelerde en yüksek korumayı sağlamıştır. Bu sonuçlara göre spermatozoon motilitesi ve mitokondriyel aktivite arasındaki pozitif bir ilişkinin olduğunu ifade edebiliriz. Bu çalışmada gliserolün kontraseptif özelliğinden dolayı ortama katım oranının düşürülerek, çözüm sonu parametrelerinin korunması amacıyla ortama trehalozun ilavesi olumlu etki oluşturmuştur.

Gliserol yüksek oranda hidrofilik yapı gösteren bir polioll bileşiktir. Kimyasal yapısındaki C/OH oranının eşit olması onun spermatozoon üzerine olan etkisini artırmaktadır. Gliserolün toksisitesi, metabolik dönüşümünde oluşan methglycosal tarafından oluşturulur. Gliserolün toksik etkisi türe bağımlılık göstermekte; aygır, tavşan, kanatlı ve balık spermaları için fertilizasyonda kontraseptif özellik göstermektedir. Hücrelerde gliserolün toksik etkisi, membran biyoenerji dengesinde değişikliğe ve ozmotik strese yol açmasıyla kendini göstermektedir (Alvarenga vd., 2000; Katkov vd., 1998; Woods vd., 2000). Ruminant ve primat spermasının dondurulmasında gliserolün katım oranı %4-8, aygırlarda ise %4-5'dir. Domuzda gliserol oranı %3'ü, farede ise %1,75'i geçtiğinde şiddetli akrozomal yıkımın olduğu bildirilmiştir (Holt, 2000; Katkov vd., 1998; Morrell ve Hodge, 1998). Bu nedenle gliserolün toksik etkisinin düşürülmesi amacıyla, katım oranının düşürülmesi gerekmektedir. Ortama katılan ilave trehaloz ile, spermaların gliserolün olası toksik etkilerinin ortadan kaldırılması amaçlanmıştır. Sonuçta da, hem gliserolün katım oranı düşürülmüş, hem de ortama katılan ilave katkı maddeleriyle çözüm sonu parametreler iyileştirilmiştir.

Son yıllarda trehaloz teke spermasının dondurulmasında da sulandırıcıya katılmaya başlanmış, sulandırıcıya 50-100 mM oranlarında ilavesi, çözüm sonrası $66,0 \pm 2,9$ - $78,0 \pm 1,8$ oranları arasında motilite eldesi önemli bulunmuştur. Sağlam akrozom yönüyle en yüksek oran (%60 üzeri) ise yine trehaloz içeren sulandırıcıdan elde edilmiştir. Trehaloz dondurma öncesi ortamda teke spermatozoasında membran bütünlük ve esnekliğini de artırmıştır (Aboagla ve Terada, 2003; Purdy, 2006). Yapılan bir çalışmada, koç spermasının dondurulmasında, sulandırıcıya 100 mM trehaloz eklenmesi, çözüm sonu motiliteyi (%65), akrozom bütünlüğünü (%75) ve HOS test oranını (%50) kontrole göre önemli oranda koruyarak iyileştirmiş, fertilitede ortalama %45,85 oranda gebelik elde edilmiştir (Aisen vd., 2000; Aisen vd., 2002). Koçlarda trehalozun (50 mM) çözüm sonrası sperma ve oksidatif stres üzerine etkilerini araştıran bir grup araştırmacı da (Bucak vd., 2007), trehalozun çözüm sonrası spermatozoon motilitesi ve canlılığında önemli oranda ($59,0 \pm 2,9$ ve $66,0 \pm 4,4$) artışlara neden olduğunu göstermiştir. Biz ise bu çalışmamızda gliserol oranını % 3'e düşürerek ve ortama 60 mM trehaloz ilave ederek çözüm sonu parametreleri iyileştirmeyi

amaçladık. Nihayetinde, projemizin ikinci aşamasında kullandığımız katkı maddelerini aynı zamanda düşük gliserollü ve trehaloz içeren sulandırıcıya ilave edip, etkinliklerini görmeye çalıştık. Trehalozun direk antioksidan yapıda olmayan özelliğiyle, spermatozoon membranında ozmoregülatör ve antiperoksidatif etkinlik gösterdiği belirtilmiştir. Etki mekanizması tam olarak ortaya konulmamasına rağmen, spermada oluşan serbest radikalleri temizlediği yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Aisen vd., 2005; Bakas ve Disalvo, 1991). Trehalozun koç spermasının dondurma çözündürme üzerine etkinliği, yapılan diğer bazı çalışmalarda da ortaya konulmuştur (Bucak vd., 2007; Uysal ve Bucak, 2009).

Taksifolinlerle ilgili olarak, yapılan taramalarda sperma üzerine etkinliği gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Taksifolinin serbest radikal oluşumunu önleyici, antimikrobiyal, antimutajenik, ve antikanserojenik özelliğe sahip olduğu belirtilmektedir. Flavonoid bileşiklerden olan taxifolinin, çam ya da karaçam köklerinde bulunduğu ve diken tohumundan köken aldığı belirtilmektedir (Vega-Villa vd., 2009). Çözüm sonu spermatozoa motilitesi ve akrozom bütünlüğü bakımından gliserol %3 + trehaloz 60 mM + taksifolin 10 µM sulandırıcı grubu, en yüksek oranları (%46,66±1,05 ve 53,47±2,57) vermiştir. Keza, gliserol %3 + trehaloz60 mM + taksifolin 10 µM sulandırıcı grubu, mitokondriyel aktivite ve canlı spermatozoa oranları bakımından (% 46,88±1,17 ve 55,96±1,01) diğer gruplara göre önemlilikle iyileştirme yapmıştır (P<0.05). Ayrıca %3 gliserollü trehaloz içeren sulandırıcı, önemli oranda olmasa da diğer gruplara göre spermatolojik parametrelerde iyileşme sağlasa da, bu iyileşme ortama taksifolin ilavesiyle daha yüksek oranda iyileştirmeler yapmasıyla kendini göstermiştir. Luo vd. (2008) ovaryum hücre kültüründe kanser hücrelerinin gelişimini baskılanması amacıyla yaptığı bir çalışmada, 0-160 µM doz aralığında taxifolini kullanmış ve yüksek konsantrasyonlara ulaşıldığında kanserli hücrelerin gelişimini baskıladığını ortaya koymuştur. Çalışmamızda ise, artan dozlarda taksifolinin kullanımı, spermatolojik parametreleri, düşük dozda kullanıma göre olumsuz etkilemiştir.

Fetuinler glikoprotein yapısında olup fetal sıgır serumunun (FCS) bir bileşeni olmasının yanında bir proteinaz inhibitörüdür (Schroeder vd., 1990). BSA yapısına benzer bir etki göstererek sperm motilitesini artırdığı araştırmacılar tarafından belirtilmektedir. Sperm sulandırıcısına katılan 3 mg/ml dozunda fetuinin sperm motilitesine olumlu katkı yapmadığı ancak 80 mg/ml dozunda ise olumlu etki gösterdiği araştırmacılar tarafından belirtilmektedir (Jaiswal vd., 2010). Sarıözkan vd. (2015) yapmış oldukları çalışmalarında boğa sperma sulandırıcısına sisteamine (2,5; 7,5 mM), hiyaluronan (0,25; 1 mg/ml) ve fetuin (5-10 mg/ml) farklı dozlarını katarak boğa spermasının dondurmuşlarıdır. Çözüm sonu CASA motilite sonuçlarını, sperm normal morfolojik oranını, HOST test sonuçlarına göre 10 mg/ml fetuin dozu ile 2,5 mM sisteaminin en iyi sonuç verdiğini ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda fetuin içeren ya da içermeyen tüm trehalozlu sulandırıcı grupları, % 5 gliserol içeren sulandırıcıya

göre oldukça üstünlük göstermiş, çözüm spermatolojik parametreler önemli oranda iyileşmiştir. Fetuinin trehalozla gösterdiği sinerjistik etkisi, donma ortamında trehalozun su molekül bağları arasına daha kolay girerek, esneklik vermesini artırmış, donmamış ortamdaki hacmi daha da artırarak, kriyotik hasarı minimize etmeye çalışmıştır. Fetuinin kullanılan her dozu önemli iyileştirmeler yapmasına karşılık, en yüksek iyileştirme; gliserol %3 + trehaloz 60 mM + fetuin 5 sulandırıcı grubundan elde edilmiş, gliserol oranı da düşürülerek olası toksik etkileri minimize edilmiştir.

Toprakta, besinlerde ve suda, borat olarak bulunan boron, endüstride ve medikal uygulama alanlarında önemli bir elementtir (Robbins vd., 2010). Boronun bitki ve bazı hayvan türlerinde esansiyel olarak alınması ve eksikliğinde 0.3mg/kg-150mg/kg doz aralığında alınması gerekliliği araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür (Nielsen vd. 1987). Bununla birlikte, yüksek dozlarda üreme ve gelişme üzerine toksik etkili olduğu da bilinmektedir (Başaran vd., 2012). 100, 200 ve 400 mg borik asitin tavşanlarda, semen kalitesini artırdığı ve fizyolojik durum üzerine pozitif etki gösterdiği belirtilmiştir (Elkomy vd., 2015). 13 mg/d boron, sperm yoğunluğu, hareketi ve total sperm sayısı üzerine belirgin bir fark oluşturmamıştır (Liu P vd., 2006). 1.4-6.5 mg/L boron içeren suyun bulunduğu Boron madeni alanındaki çalışma grubu ile yapılan çalışmada, sperm örneklerinde negatif bir etki saptanmamıştır (Korkmaz vd., 2011). 0,5 g glikoz ve 0,4 g bor eklenmiş Tris sulandırıcısı ve glikoz yerine 0.5; 0.7; 0.9 g bor eklenmiş Tris sulandırıcıları ile yapılan çalışmada, boron çözündürme işleminden sonra spermatozoanın kinetik ve yapısal özellikleri üzerinde yararlı etkileri olduğu ve ek olarak DNA fragmentasyon indeksi açısından da zararlı bir etkisinin olmadığı ortaya konmuştur. Buna göre, boron (sodyum pentaborat) alternatif bir sperma sulandırıcısı bileşeni olarak kullanılabilirliği sonucuna ulaşılmıştır (Tırpan vd., 2018). Spermanın sulandırılması ve dozlanması farklı Boron dozları (1, 2 ve 4 mM) ve % 5 gliserol içeren Tris ana sulandırıcısı ile yapılan çalışmada kullanılan Bor'un ise, spermanın dondurulması ve çözündürülmesi aşamasındaki enerji metabolizmasına ve DNA hasarına olumlu etki yaptığı ve buna bağlı olarak spermanın fertilizasyon yeteneğini arttırabileceği ileri sürülmüştür. (Yeni vd., 2018). Bu projede ise, T2 sulandırıcısına eklenen farklı dozlardaki boronun, çözüm sonu spermatoza motilitesi, mitokondriyel aktivite, canlı spermatozoa ve akrozom bütünlüğü bakımından T2+ Boron 0,25 mM grubunun en yüksek pozitif etkisi gösterilmiştir. Buna göre, diğer çalışmalarla da benzer şekilde, daha düşük orandaki boronun çözüm sonrası söz konusu spermatolojik parametreler üzerine kriyoprotektif etkisi gösterilmiştir. Bu konuda az çalışmaya rastlanılmıştır. Bu proje sonucu, birçok parametreyi kapsamı bakımından ilk olma özelliği nedeniyle ileri çalışmalara ışık tutacaktır.

Oksidatif stres parametreleri

Spermada biyokimyasal reaksiyonlar sonucu meydana gelen ROS'un zararlı etkilerine karşı süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GPx) ve glutasyon (GSH) gibi antioksidan enzim ve maddeler bulunur (Mann ve Lutwak-Mann, 1981; Kantola vd., 1988). Ancak bu enzim ve maddeler spermanın sıvı saklanması esnasında meydana gelen fazla LPO'dan hücreyi korumada yetersiz kalmaktadır (Aurich vd., 1997). Lipid peroksidasyonu hücrelerin oksidatif hasardan etkilendiğini gösteren önemli parametrelerden biridir ve hücre membranı hasarı hakkında bilgi verir (Wong-Ekkabut vd., 2007; Yajima vd., 2009). Antioksidan potansiyel ise hücrelerin serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırma potansiyelini veren, hücrenin oksidatif hasara karşı savunma mekanizmasıdır (Trachootham ve ark., 2008). Yapılan bir çalışmada, boğa sperması dondurulmasında sulandırıcıya ilave edilen fetuin, çözümü sonu lipit peroksidasyonunu azalttığı görülmüş, SOD ve GSH-PX antioksidan aktivitelerini de iyileştirmiştir (Sarıözkan vd., 2015a). Boğalarda yapılan bir diğer çalışmada da, sulandırıcıya ilave edilen 5 ve 10 mg/ml fetuin dozlarından, yüksek dozda fetuin ilavesi, çözümü sonrası SOD ve GSH-PX antioksidan aktivitelerini artırmış, lipit peroksidasyonu üzerinde herhangi bir etkide bulunmadığı görülmüştür (Sarıözkan vd., 2015b). Bu projedeki çalışma sonuçlarımızda da, taksifolinin artan dozlarda önemli oranda lipit peroksidasyonunu engellediği, glutasyon ve total antioksidan kapasite üzerine herhangi önemli bir katkı sağlamadığı görülmüştür. Farklı çalışmalarda fetuinin artan dozlarda kullanımı sonrası zıt sonuçların çıkması, çeşitli türlere ait spermalarda lipit peroksidasyon ve antioksidan kapasitesinin farklı davranışlar sergileyebildiği ve bu farklı davranışlar üzerinde tür ve ırka spesifik spermatozoon yapısının, mevsimin, sperm alma sıklığının, katkı maddesi olarak katılan antioksidan yapının, sulandırıcı tipi ve bileşenlerinin etkili olabileceği söylenebilir.

Çalışmamızda boron uygulamaları değerlendirildiğinde, GSH düzeylerinde, Gliserol %3 grubu düzeyinin, Gliserol %5, Gliserol %5 + 0,25 mM Boron, Gliserol %5 + 0,5 mM Boron, Gliserol %3 + 0,25 mM Boron ve Gliserol %3 + 0,5 mM Boron gruplarına göre önemli düzeyde yüksek ($p < 0,05$), Gliserol %5 + 1 mM Boron ve Gliserol %3 + 0,5 mM Boron grupları ile farklı olmadığı belirlenmiştir. Boronun artan dozları LPO'yu engelleyip antioksidan kapasiteyi artırmasına rağmen, spermatozoon parametreleri boronun artan dozlarında toksik etkiye uğramış, spermatolojik parametreler olumsuz etkilenmiştir. Boronun semen antioksidan düzeyleri üzerine etkisi yönüyle tek bir çalışma bulunmaktadır (Yeni vd., 2018). Bu çalışma da, boronun artan miktarlarda kullanılması, lipit peroksidasyonunu artırırken, total antioksidan kapasiteyi etkilememiştir. Yaptığımız çalışmada da elde edilen bulgular literatür ile benzerlik göstermektedir. Spermatolojik parametreler ve LPO birlikte değerlendirildiğinde boronun artan dozlarının toksik etkiler gösterdiğini ifade edebiliriz.

Taksifolin uygulamalarında, LPO düzeyleri incelendiğinde Gliserol %5 grubu düzeyinin Gliserol %5 + Taksifolin 500 μ M ve Gliserol %3 + Trehaloz 60 mM + Taksifolin 100

μM gruplarına göre önemli düzeyde ($p < 0,05$) yüksek olduğu belirlenmiştir. GSH ve AOC yönünden ise bir farklılık gözlenmemiştir. Artan dozların LPO'yu engelleyememesi ve motilitede ve semen parametrelerinde de olumsuz etkiler oluşturması, nedenler olarak LPO'un etkili bir faktör olabileceğini göstermektedir. Literatür taramasında taksifolin hidratin spermanın dondurulma çözdürülme sonrası etkinliğini araştıran bir çalışma bulunmadığından dolayı, bu çalışma yapılacak diğer çalışmalara da ışık tutabilecektir.

Antioksidan Cevap Sinyal Yolakları/Genetik Analizler

Vücuttaki moleküler mekanizmaların anlaşılmasında mRNA düzeyinde gen ekspresyonu çalışmaları önemli çıktılar üretilebilmesine olanak sağlamaktadır. Yapılan bu çalışmada, farklı dozlarda kullanılan çeşitli kimyasalların sperma kalitesine olan etkileri biyokimyasal analizlerin yanı sıra gen ekspresyonu düzeyinde incelenmiştir. NQO1 (NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1) geni NADPH dehidrogenaz ailesinin bir üyesidir. Bu genin kodladığı protein ile Quinonun Hidrokinona indirgenmesi sağlanarak hücrede serbest radikal oluşumunun engellediği/azaltıldığı bilinmektedir (He vd. 2018). Çalışmada, taksifolin ve boron uygulamalarıyla bu genin ekspresyon seviyelerinde önemli değişimlerin olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$). Taksifolin uygulamasında $100 \mu\text{M}$ taksifolinin yanı sıra %3 gliserol ve 60 mM Trehaloz kullanımıyla (grup 7) NQO1 gen ekspresyon seviyelerinin diğer gruplara göre önemli düzeyde arttığı görülmüştür (Tablo 20). Bununla birlikte boron uygulamasında bu gendeki ekspresyon değerinin en fazla grup 1 (kontrol), grup 6 (Gliserol %3 + $0,25 \text{ mM}$ Boron) ve grup 7 de (Gliserol %3 + $0,5 \text{ mM}$ Boron) olduğu belirlenmiştir. Trehaloz ve boronun ayrı ayrı kullanımıyla NQO1 gen ekspresyonunun baskılandığı görülmüştür (Tablo 21). Bu duruma sebep olarak trehaloz ve boron kullanımının oksidatif stresi azaltabileceği ve dolayısıyla NQO1 gen ekspresyon seviyelerinin azalmış olabileceği düşünülmüştür. GCLC (Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit) ve GSTP1 (Glutathione S-Transferase Pi 1) genleri NQO1 geni gibi hücredeki oksidatif stresin engellenmesinde görevlidir (Hahn vd. 2014). GCLC gen ekspresyon bulguları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bununla birlikte taksifolin uygulamasında en yüksek ekspresyon değerinin NQO1'de olduğu gibi Grup 7'de (Gliserol %3 + Trehaloz 60 mM + Taksifolin $100 \mu\text{M}$) olduğu belirlenmiştir. Boron uygulanan gruplarda GSTP1 gen ekspresyon seviyeleri NQO1'e benzer şekilde en yüksek grup 1 (kontrol grubu)'de tespit edilmekle birlikte bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmada kullanılan genlerin oksidatif stresle ilişkili yolaklarda görev aldığı göz önünde bulundurulduğunda diğer bulgularla birlikte çeşitli kimyasalların özellikle de boron uygulamasının oksidatif stres oluşumunu önlemede NQO1 ve GSTP1 aracılığıyla rol alabileceği anlaşılmaktadır. Standart hatalardaki farklılığa bağlı olarak önem düzeyi değişen gen ekspresyonu bulgularının güvenilirliğini artırmada protein düzeyinde aktivite tayininin incelenmesinin önemli olabileceği

düşünülmüştür. Zira yakın geçmişte tanımlanan miRNA'ların da aktiviteleriyle posttranslasyonel değişimler oluşmakta ve gen ve protein ekspresyonları arasında önemli farklılıklar oluşabilmektedir.

Gliserol %5, Gliserol %3 + Trehaloz 60 mM, Gliserol %3 + Trehaloz 60 mM + Fetüin 5 mg, Gliserol %3 + Trehaloz 60 mM + Taksifolin 10 µM ve Gliserol %3 + Trehaloz 60 mM + Boron 0,5 mM ile bireysel olarak dondurulan koç spermaları ile yapılan tohumlamalar sonrası elde edilen sonuçlarda, gruplar arası önemli bir farklılık görülmemiştir. Çalışmamızda en yüksek fertilité oranı % 16.6 ile Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Boron 0,5 mM içeren spermalardan elde edilmiştir. Sonuçlarımız servikal tohumlama ile edildiğinden laparoskopik tohumlama sonuçlarına göre düşük kalmaktadır (Benemar vd., 2015). Bu durum servikal tohumlamada spermanın serviksin girişine bırakılması ve oviduka giden sperma hücrelerindeki kalite düşüklüğü olabilir. Yapılan bir diğer çalışmada trehalozlu ve trehalozsuz sulandırıcıyla dondurulan spermalarla yapılan servikal tohumlamalardan %46 ve 16 oranında gebelikler elde edilmiştir (Jafaroghli vd., 2011). Biz ise trehaloz+boron içeren bir sulandırıcı ve trehaloz içermeyen sulandırıcı grubundan sırasıyla %16 ve 7 oranında doğum oranları elde ettik. Bu noktada kontrol grubuna göre elde ettiğimiz iki kat başarının, trehalozun membran koruyucu etkisiyle akrozom bütünlüğü ve spermatozoon fonksiyonel yapısını daha iyi koruması nedeniyle edildiği söylenebilir. Burada tehalozun boron ile birlikte sinerjistik etki gösterdiği rahatça söylenebilir. Elde ettiğimiz düşük sonuçlar, senkronizasyon farklılıklarına bağlı ovulasyon zamanlarının dağılmasına, ırka, yaşa ve mevsime bağlanabilir.

DNA Hasarlanması

Dölverimi ve gebelik oranlarındaki düşüşle eşlik eden sperm DNA hasarı, erkek infertilitesinin teşhisi için yararlı bir biyobelirteçtir (Lewis vd., 2013). Spermde DNA hasarına yol açan en önemli faktör oksidatif stres olarak görülmektedir (Demirtaş ve Üntan, 2011). Seminal plazma, ROS uzaklaştıran süperoksit dismutaz ve katalaz gibi bol miktarda antioksidan enzim içerir (Ünal vd., 2017), ancak seminal plazmada azalan antioksidan kapasite ya da artan ROS üretimi bozulmuş sperm fonksiyonuna neden olur (Koca vd., 2003). Spermilerin dondurulup saklanma işlemleri sonrasında DNA tek zincir kırıklarında, DNA yoğunlaşması ve fragmentasyonunda artış olduğu bilinmektedir (Kopeika vd., 2015). Dondurma-çözme döngüsü sırasında oksidatif stres nedeniyle ROS üretildiği ve DNA fragmentasyonunun ROS kaynaklı olarak ortaya çıktığı ileri sürülmüştür (Bilodeau vd., 2000; Donnelly vd., 2000). Kriyoprotektan ortamındaki farklı bileşenlerin (antioksidanlar, şekerler, vb.) DNA bütünlüğü üzerine etkisi geniş bir şekilde araştırılmaktadır (Bucak vd., 2019; El-Sheshtawy vd., 2015; Cirit vd., 2013; Bucak vd., 2010; Nur vd., 2010; Yıldız vd., 2007). TUNEL ve COMET testleri sperm DNA hasarlarını doğrudan ölçen yöntemlerdir (Avendaño

ve Oehninger, 2011). Her iki yöntem de gerek yardımcı üreme teknikleri çalışmalarında, gerekse çeşitli hayvan türlerine ait spermlerin dondurulup saklanması çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Cui vd., 2015; Üstüner vd., 2015; Ribas-Maynou vd., 2013; Cabrita vd., 2011). Bu çalışmada da DNA bütünlüğünü tespit etmede etkili olan bu iki yöntem uygulanmıştır.

Spermatozoonların dondurulması çalışmalarında optimum sulandırıcı bileşiminin belirlenmesi, dondurma-çözme prosedürlerinin başarısını etkilemektedir. Gliserol en yaygın kullanılan kriyoprotektan maddedir (Purdy, 2006). Tris bazlı sulandırıcıya ilave edilen 50 ya da 100 mM/l konsantrasyonda trehalozun boğa sperminde dondurma-çözme sonrası DNA fragmentasyonunu azalttığı bildirilmiştir (El-Sheshtawy vd., 2015). Ayrıca sulandırıcıya kriyoprotektan ajan olarak, gliserol ve şekerlerin (örneğin, sakaroz, rafinoz ve trehaloz) eklenmesi, çeşitli memeli türlerinde spermin kriyoprezervasyonu için etkili olmuştur (Aisen vd., 2005; Arriola ve Foote, 1987). Bu bilgiler ışığında bu çalışmada hazırlanan farklı bileşimlerdeki temel sulandırıcılar kullanılarak, optimum temel sulandırıcı bileşimi belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak da, gliserol %5 (T1) ve gliserol %3 + 60 mM trehaloz (T2) içeren sulandırıcılar, DNA bütünlüğünün de dahil olduğu tüm sperm parametrelerinin korunmasında en uygun temel sulandırıcılar olarak tespit edilmiştir.

Fetuinler, osteogenezin düzenlenmesi ve istenmeyen mineralleşmenin inhibisyonu dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonlara sahip serum proteinleridir (Denecke vd., 2003). Fetuinin kriyoprotektan olarak sulandırıcıya eklenmesi ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Boğa sperması kullanılarak yapılan bir çalışmada, temel sulandırıcıya belli oranlarda fetuin ilavesinin sperm parametreleri (CASA motilitesi, CASA total motilitesi, membran bütünlüğü, akrozomal ve total anormallikler gibi) üzerinde olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Sarıözkan vd., 2015). Ayrıca, Sarıözkan vd. (2015) ve Taşdemir vd. (2014) tarafından alkali COMET testi kullanılarak DNA hasarının araştırıldığı çalışmalarda, tris bazlı temel sulandırıcıya 5-10 mg/ml ve 2 mg/ml konsantrasyonda fetuin ilavesinin, dondurma-çözme işlemi sonrasında boğa spermasında DNA bütünlüğünün korunmasında istatistiksel olarak olumlu bir etki göstermediği ve ayrıca kromatin hasarını arttırdığı da bildirilmiştir. Nötral COMET testinin kullanıldığı bu çalışmada da, yukarıda bahsedilen çalışmalara benzer şekilde, temel sulandırıcıya (%5 gliserol) farklı oranlarda (2,5; 5 ve 15 mg/ml) fetuin ilavesinin, DNA çift zincir kırıklarının oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir koruma sağlamadığı, doza bağlı olarak kısmen de olsa DNA çift zincir kırıklarında bir artışa neden olduğu görülmüştür. Ancak, TUNEL testi sonuçları incelendiğinde, DNA fragmentasyonunda %5 gliserol içeren temel sulandırıcıya 15 mg/ml fetuin ilavesinin, istatistiksel olarak anlamlı bir koruma sağladığı görülmüştür. Bununla birlikte, %3 gliserol ve 60 mM trehaloz içeren temel sulandırıcıya 2,5; 5 ve 15 mg/ml fetuin ilavesi, hem DNA çift zincir kırıklarının önlenmesinde hem de DNA fragmentasyonunun önlenmesinde, hemen hemen tüm dozlarda

istatistiksel olarak anlamlı bir koruma sağlamıştır. Tris bazlı, yumurta akı temel sulandırıcısına ilave edilen 100 mM trehalozun, bufalo spermlerinde ortaya çıkan dondurma-çözmeye bağlı hasarları azalttığı bulunmuştur (Shiva Shankar Reddy vd., 2010). Ancak başka bir çalışmada da, farklı konsantrasyonlarda (12,5; 25; 50; 75; 100 ve 150 mM) trehaloz ilave edilmiş tris bazlı sulandırıcı ile dondurulan Angora keçisi spermlerinde dondurma-çözme sonrasında DNA hasarlarının önlenemediği bildirilmiştir (Tuncer vd. 2013). Çalışmamızda, tek başına trehaloz ya da fetuin DNA çift zincir kırıklarını ve DNA fragmentasyonunu önlemede istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermezken, trehaloz eklenerek hazırlanan temel sulandırıcı içerisine fetuin ilavesiyle her iki maddenin sinerjistik etki göstermesi nedeniyle DNA çift zincir kırıklarını ve DNA fragmentasyonunun önlenildiği söylenebilir. Bu bulgu, 25 mM trehaloz katılmış tris temel sulandırıcısına 1 mg/ml fetuin ilavesiyle, esmer boğa spermlerindeki dondurma-çözme sonrası DNA bütünlüğünün kontrole göre daha iyi korunduğunu gösteren Büyükleblebici vd. (2016)'nin çalışması ile benzerlik göstermektedir.

Taksifolin, antioksidan özelliklere sahip olan ve serbest radikal temizleyicisi olarak görev yapan, bitki kökenli bir flavonoiddir (Kang vd., 2016). Taksifolinin oksidatif DNA hasarına karşı güçlü bir redoks temizleyici olarak işlev gördüğü, zebra balığı embriyolarında kadmiyum toksisitesinin önemli bir baskılayıcısı olduğu ve ayrıca 1 µg/ml dozda pUC19 plazmid DNA'sında OH kaynaklı DNA hasarına karşı güçlü koruma sağladığı bildirilmiştir (Manigandan vd., 2015). Taksifolin gibi eksojen flavonoidlerin oositlerdeki ROS seviyelerini düşürdüğü, ancak yüksek konsantrasyonda (50 µg/ml) oositler için toksik olabileceği, Kang vd. (2016) tarafından yapılan çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmada ise, trehaloz içeren ya da içermeyen temel sulandırıcılara farklı konsantrasyonlardaki (10, 100 ve 500 µM) taksifolin ilavesi, %5 gliserol içeren temel sulandırıcı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde DNA fragmentasyonunu engellemiştir. Ancak DNA çift zincir kırıklarının engellenmesinde sadece %5 gliserol + 10 µM taksifolin grubunda etkili bir koruma sağlanmıştır. %3 gliserol + 60 mM trehaloz içeren gruplarda ise, DNA çift zincir kırıklarının %'si göreceli olarak artış göstermiştir. Bu durum, taksifolinin artan dozlarda toksik etki göstermesi ile açıklanabilir.

Boron bitkilerin yaşam döngüsü için gerekli olan bir mineraldir ve hayvanların gelişim ve büyümesinde de rol oynayabilir (Park vd., 2005). Boronun üreme sistemi üzerine etkisi araştırılmıştır ve yüksek dozlarda sitotoksik etkisi olduğu bulunmuştur (Espinoza-Navarro vd., 2007; Ku vd., 1993; Ku vd., 1991). Ayrıca, borik asit ve boraks içeren diyetle beslenen sıçanlarda kanda DNA hasarının düştüğü COMET testi ile gösterilmiştir (Ince vd., 2010). Bir başka çalışmada, bor bileşiklerinin en yüksek konsantrasyonlarda bile genotoksik etkiye sahip olmadığı, ancak artan dozlarda oksidatif stres oluşturduğu bildirilmiştir (Türkez vd., 2007). Boronun sperm dahil çeşitli hücrelerin dondurulup saklanması, sulandırıcılara

eklenmesine dair bazı çalışmalar bulunmaktadır. Boronun insan dışı germ kök hücrelerinin kısa ve uzun süreli kriyoprezervasyonda hayatta kalmasında koruyucu bir rolü olduğu gösterilmiştir (Demirci vd., 2014). Ankara tekesi spermasının dondurulmasında tris sulandırıcı bileşenleri yerine katılan boronun (sodyum pentaborat) çözüm sonu spermatolojik parametrelere (total motilite, progresif motilite, semen kinetik parametreleri gibi) olan olumlu bazı etkileri de bildirilmiştir (Tırpan ve Tekin, 2015). Ramlıç koç spermleri %5 gliserol içeren tris ana sulandırıcısına farklı konsantrasyonlarda eklenen boron (1, 2 ve 4 mM) ile hazırlanan sulandırıcılarda dondurulmuş, çözüm sonrası DNA hasarı COMET testi ile araştırılmış ve 1mM boronlu grubun, spermatozoadaki DNA hasarını kontrol grubuna ve diğer gruplara göre anlamlı düzeyde azalttığı bulunmuştur (Yeni vd., 2018). Bu çalışmada ise, %5 gliserole eklenen farklı konsantrasyonda boron (0,25; 0,5 ve 1 mM) hem DNA çift zincir kırıklarının ve hem de DNA fragmentasyonunun engellenmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemiştir. Ancak, %3 gliserol + 60 mM trehaloz içeren temel sulandırıcıya eklenen 0,5 ve 1 mM boronun, %5 gliserol ve %5 gliserol + 1 mM boron grupları ile kıyaslandığında, DNA fragmentasyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde engellediği görülmüştür. Bu sonuçlar, Yeni vd. (2018)'nin çalışmasının sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Ortama trehaloz ilavesi, gliserol konsantrasyonunun düşmesine rağmen benzer sonuçların ortaya çıkmasına neden olmuş olabilir.

Bu çalışmada kullanılan tüm kriyoprotektan maddeler DNA çift zincir kırıklarının ya da DNA fragmentasyonunun engellenmesinde kısmen etkili olmuştur. Tüm veriler dikkate alındığında DNA hasarlarını engellemede gliserol, trehaloz ve diğer maddelerin (fetuin, taksifolin ve boron) belli oranlarda sulandırıcı bileşiminde kullanılmasının daha etkili olacağı önerilebilir. DNA hasarlarının engellenmesinin, daha sonraki döl verimini ve embriyo sağlığını iyileştireceği açıktır. Bu nedenle, yardımcı üreme teknikleri ve çeşitli hayvan türlerine ait spermlerin dondurulup saklanması çalışmalarının etkili ve verimli olabilmesi için, DNA hasarını minimuma indirmek ve/veya engelleyebilmek amacıyla bu ve buna benzer çalışmalar oldukça büyük bir önem taşımaktadır. Projenin bu kısmındaki veriler literatüre önemli katkılar sağlamakla birlikte, bu konuda daha ileri moleküler analizlerin yapılmasına da ihtiyaç olduğu ileri sürülebilir.

Yapısal/Elektron Mikroskopik

Sperm kriyoprezervasyon işlemleri, hücrelerde düşük sıcaklığa bağlı stres ve şiddetli ozmotik değişikliklere neden olur. Kriyoprezervasyonla hücre zarında meydana gelen hasar, birçok hücresel yapıda ve ilişkili işlevlerinde hasarlara yol açar (Mayers 2005). Bunun sonucunda spermlerin fertilizasyon kapasitesi azalır (Nishizono vd., 2004; Tunalı, 2014). Kriyoprezervasyonun, sperm yapısında çeşitli deformasyonlara yol açtığı bir çok çalışmada

gösterilmiştir (Healey, 1969; Quinn vd., 1968; Barthelemy vd., 1990; Nishizono vd., 2004; Pesch ve Bergmann, 2006; Ozkavukcu vd., 2008; López Armengol vd., 2012; Přinosilová vd., 2012; Shi vd., 2014). Kriyoprezervasyonun spermelerde özellikle plazma membranı, akrozom ve kuyrukta ağır hasarlara neden olduğu ve elektron mikroskobunun spermatojenik hücrelerin araştırılmasında nihai yöntem olduğu belirtilmiştir (Ozkavukcu vd., 2008).

Son yıllarda, kriyoprezervasyonun sonucu olarak ortaya çıkan ince yapı değişiklikleri gibi yapısal değişiklikleri en aza indirecek kriyoprotektanların kullanılmasına yönelik yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin, koç'da, Tris-yumurta sarısı sulandırıcısına Vit-E (60 μ M ve 120 μ M) eklenmesinin sperm yapısal bütünlüğü (plazma zarı ve mitokondri) ile kinematiğini desteklediği (Silva vd., 2013) ortaya konmuştur. Taşdemir vd. (2014), boğa'da, kriyoprezervasyonda, sistein'inin plazma membran bütünlüğünü en iyi koruyan kriyoprotektan olduğunu bildirmişlerdir. Alçay (2015), koç'da kriyoprotektan olarak kullanılan gliserolün, çözündürme sonrası, hareketliliği ve plazma zarının fonksiyonel bütünlüğünü koruduğunu, 1,2 propanediol ve etilen glikol'ün akrozomal bütünlüğü koruduğunu ortaya koymuştur. Çalışmada, gliserolün, sperm motilitesi ve plazma membranı üzerine kriyoprotektif etkisi gösterilmekle birlikte, etilen glikol'ün akrozom bütünlüğünü koruduğunun ortaya konması, bu projede trehaloz grubu ile yapılan Taramalı-Geçirimli Elektron Mikroskobu (Scanning-Transmission Electron Microscope/STEM) sonuçlarıyla benzerlik göstermiştir.

Büyükblebici vd. (2014), boğa spermelerinde, 25 mM trehaloz ve %3 etilen glikol'ün akrozom morfolojisinde, %3 gliserol'ün zar bütünlüğünde, %5 etilen glikol ve 5 mM sistein'in kromatin hasarlarında kriyoprotektif etkisini ortaya koymuşlardır. Projemizde, elektron mikroskobu çalışması ile 100 mM olarak kullanılan trehaloz'un koruyucu etkisinin belirlenmiş olması, olasılıkla konsantrasyonu ile ilişkilendirilebilir.

Koçlarda sperm hareketliliği ve mitokondriyal membran potansiyelinin yumurta sarısı içindeki 100 mM trehalozda, ancak akrozom bütünlüğünün 100-250 mM trehalozda en iyi sonuç verdiği bildirilmiştir (Athurupana vd., 2015). Bu çalışmalarla benzer şekilde, projenin STEM sonuçlarına göre, yüksek konsantrasyonda (100 mM) ancak %1,5 etilen glikol içindeki trehalozun en iyi kriyoprotektif etkisi belirlenmiştir.

Storey vd. (1998), trehalozun plazma zarının korunmasında pozitif etki gösterdiğini, gliserol/trehaloz kombinasyonunun da invitro ve invivo olarak döllenen yumurta oluşumunu sağladığını bildirilmişlerdir. Hu vd. (2009), domuz spermelerinde, 100 mM trehalozun, hareketlilik, mitokondriyal aktivite, zar ve akrozom bütünlüğünde yüksek kriyoprotektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmalar, kriyoprotektif etkisi belirlenen trehalozun artan konsantrasyonlarında etkili olduğunu göstermektedir. Bizim STEM çalışmamızda da yüksek konsantrasyondaki trehalozun kriyoprotektif etkisinin gösterilmesi bu çalışmalarla uyum

sağlamıştır. Kriyoprezerve koç spermelerinde, 100 mM trehaloz'un vitE düzeyini belirgin bir şekilde yükselttiği, 50 mM trehalozun çözündürme sonrası hareketlilikte yüksek oran sağladığı, ancak akrozom ve total anomalilerde belirgin bir farklılık olmadığı ortaya konmuştur (Bucak vd., 2007). Bu çalışmada, 50 mM trehalozun akrozom ve total anomaliler üzerinde etkisinin olmadığını gösterilmesi, bizim çalışmamızda düşük konsantrasyondaki trehalozun (60 mM) yüksek konsantrasyondaki trehaloza (100 mM) göre daha az kriyoprotektif etki göstermesi sonucu ile uyum göstermiştir.

Ayrıca, Uysal ve Bucak da (2009), 100 mM trehalozun, kriyoprotektan olarak spermelerde hareketlilik, morfolojik anomaliler, canlılık ve membran bütünlüğü bakımından 50 mM trehaloza göre daha üstün olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmalarda yüksek orandaki trehalozun daha fazla koruyucu etkisinin gösterilmesi, bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Ayrıca, Aisen vd. (2005), koç sperm kriyoprezervasyonunda, sitrat, tris tamponu, trehaloz ve EDTA uygulamalarında, ultramikroskopi değerlendirmesinde, dondurma-çözündürme sonrası sağlam plazma zarı yüzdesinin trehaloz içeren hipertonic sulandırıcı da belirgin bir şekilde daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Trehalozun kriyoprotektif fonksiyonunun elektron mikroskobu düzeyinde gösterildiği bu çalışmayla benzer şekilde, elektron mikroskobu düzeyinde en iyi korumayı sağlayan trehaloz konsantrasyonunu belirlediğimiz bu projedeki çalışmamız, literatüre ek katkılar getirmesi bakımından önemli olacaktır.

Alvarenga vd. (2000), aygır spermasının dondurulmasında, etilen glikol'ün gliserol ile benzer etki gösterdiğini, %5 etilen glikol'de canlı sperm yüzdesinin en yüksek olduğu, %10 etilen glikol'de canlı spermatozoa'nın belirgin bir şekilde az olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, hasarsız sperm yüzdesi %5 etilen glikol grubunda yüksek bulunmuştur.

Sa-Ardit vd. (2006), fil spermasının kriyoprezervasyonunda, dondurma ve çözündürme işlemlerinin plazma zarı, akrozom ve mitokondrilerde yapısal hasarlara yol açtığını floresan ve elektron mikroskopi tekniklerinin bu konuda güçlü teknikler olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında, TEST+gliserol'de [{5.54% Tes [N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane-sulphonic acid], 1,15% Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, %0,4 glukoz, %20 yumurta sarısı ve %5 gliserol} dondurulan spermelerde yüksek oranda sağlam plazma zarı ve aktif mitokondrilerin olduğunu belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda, %5 gliserol, %1,5 etilen glikol ile karşılaştırılmış ve %1,5 etilen glikol daha üstün bulunmuştur.

Kriyoprezervasyon işleminin yapıldığı Ankara tekesi spermelerinde, Boron'un çözündürme sonrası spermatolojik parametreler üzerine olan olumlu bazı etkileri ortaya konmuştur (Tırpan ve Tekin, 2015). Boğalarda, 10 mg/ml fetuinin sperm morfolojisi üzerinde en iyi koruyucu etkiyi gösterdiği, hiyaluronan ve fetuin karışımının membran bütünlüğünü artırdığı ileri

sürülmüştür (Sarıözkan vd., 2014, 2015). Taxifolin'in antioksidan olarak düşük konsantrasyonlarda (0,1-10 µg/ml) oositlerde ROS seviyesini indirgediği gösterilmiştir (Kang vd., 2016). Kriyoprezervasyonda pozitif etkileri gösterilen bu kriyoprotektanlar, bu projede koç spermasına uygulanmış ve projenin elektron mikroskobu kısmında bu kriyoprotektanlarla oluşturulan alt grupların ince yapısı görüntülenmiştir. Diğer canlılarda kriyoprezervasyon sırasında spermiler üzerinde meydana gelen değişikliklerin gösterildiği çalışmalar taranmış ve bu projede gerçekleştirilen elektron mikroskobu çalışması sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Genel olarak, bu çalışmalarla benzer şekilde, spermilerde en fazla, membran, akrozom, mitokondri ve aksonem kriyohasalarının yanısıra kuyruk yapısında değişimler ayırt edilmiş ve elektron mikroskobu mikrograflarında gösterilmiştir.

Özetle, projenin bu kısmında farklı kriyoprotektanların farklı konsantrasyonlarının uygulandığı örneklerle, Geçirimli-Taramalı ve Taramalı Elektron mikroskobu çalışmaları yapılmış ve ince yapı değişiklikleri ortaya konmuştur. Ek olarak, trehaloz grubunda, Geçirimli-Taramalı elektron mikroskobunda oldukça büyük büyütmelemlerde, sitolojik hasarlar belirlenmiş ve alanlar dikkatle taranarak hücreler sayılmıştır. Sonuçlara göre, elektron mikroskobik istatistiksel analizde, %1,5 etilen glikol/100 mM trehaloz grubunun kriyoprotektif etkisi gösterilmiştir.

Elektron mikroskobik yöntemler ince yapı düzeyinde hasarların gösterilmesinde oldukça uygun yöntemler olmakla birlikte, ışık mikroskobu yöntemlerinin hasarlı ve hasarsız hücre sayımının yapılarak istatistiksel analizlerin ortaya konması bakımından daha pratik olduğu sonucuna da varılmıştır.

SONUÇ

1. T2+fetuin 5 mg grubu en yüksek motilite, mitokondriyel aktivite ve canlı spermatozoa oranlarını vermiştir. Spermatozoa motilitesi, akrozom bütünlüğü, mitokondriyel aktivite ve canlı spermatozoa bakımından T2+Taksifolin 10 µM ve T2+Boron 0,25 mM grupları en iyi sonuçları vermiştir.
2. DNA'da çift zincir kırıklarının engellenmesinde, T2+fetuin 5 mg/ml ile T1+taksifolin 10 µM gruplarının, DNA fragmantasyonunun engellenmesinde T2+fetuin 5 mg/ml; T1+taksifolin 10 µM ve T1+taksifolin 500 µM ile T2+boron 0,5 Mm gruplarının etkili olduğu belirlenmiştir.
3. İnce yapı düzeyinde, kriyohasalar başlıca membran, akrozom, mitokondri, aksonem ile kuyruk yapısında gözlenmiştir.
4. LPO düzeyleri Gliserol %5 grubu düzeyinin Gliserol %5 + Taksifolin 500 µM ve Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 100 µM gruplarına göre önemli düzeyde

yüksektir. GSH ve AOC yönünden bir farklılık yoktur. LPO düzeyleri, Gliserol %5 grubu düzeyinin, Gliserol %5 + Fetuin 5 mg grubu düzeyinden önemli düzeyde yüksektir.

5. GSH düzeyleri, Gliserol %5 ve Gliserol %5 + Fetuin 2,5 mg gruplarda, Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Fetuin 2,5 mg grublarına göre önemli düzeyde düşüktür. AOC düzeyleri yönünden bir farklılık yoktur. Boron uygulamaları değerlendirildiğinde, GSH düzeylerinde, Gliserol %3 grubu düzeyinin, Gliserol %5, Gliserol %5 + 0,25 mM Boron, Gliserol %5 + 0,5 mM Boron, Gliserol %3 + 0,25 mM Boron ve Gliserol %3 + 0,5 mM Boron grublarına göre önemli düzeyde yüksektir. Gliserol %5 + 1 mM Boron ve Gliserol %3 + 0,5 mM Boron gruplarında farklılık yoktur.
6. Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 100 µM grubu, yüksek NQO1 gen ekspresyonu düzeyi göstermiştir. %3 Gliserol + 60 mM Trehaloz + 0,5 mM Boron grubunda da, NQO1 gen ekspresyonu az düzeyde de olsa yüksek bulunmuştur. Fetuin gruplarında belirgin bir fark saptanmamıştır.
7. En yüksek dölverimi oranı, Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Boron 0,5 mM içeren dondurulmuş çözündürülmüş spermalardan elde edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

Abdi-Benemar H., Jafaroghli M., Khalili B., Zamiri M.J., Shadparvar A.A. 2015 "Effects of DHA supplementation of the extender containing egg yolk and α -tocopherol on the freezability and post-thawing fertility of ram semen" *Small Ruminant Research*, 30, 166-170.

Aboagla E.M.E., Terada T. 2003. "Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing" *Biol. Reprod.*, 69: 1245-1250.

Ahmadi A, Ng SC. 1999. "Fertilizing ability of DNA damaged spermatozoa" *J Exp Zool*. 284(6): 696-704.

Aisen, E. G., Alvarez, H. I., Venturino, A., Gadre, J. J. 2000. "Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents", *Theriogenology*, 53, 1053-1061.

Aisen, E. G., Medina, V. H., Venturino, A. 2002. "Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations", *Theriogenology*, 57, 1801-1808.

Aisen, E., Quintana, M., Medina, V., Morello, H., Venturino, A. 2005. "Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders", *Cryobiology*, 50(3), 239-249.

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

Aitken, R .J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J. P., Milne, P., Jennigs, Z., Irvine, D. S., 1998. "Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa" *Biol. Reprod.*, 59, 1037–1046.

Aitken, R. J., Baker, M. A. 2004. "Oxidative stress and male reproductive biology", *Reprod Fertil Dev*, 16, 581-8.

Alçay S. 2015 "Hücre İçine Girebilen Bazı Kriyoprotektanlarla Dondurulan Koç Spermalarının İn Vitro Embriyonik Gelişim Üzerine Etkisi". Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa, sf. 85.

Alvarez, J. G., Storey, B. T. 1983. "Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility" *Biol Reprod*, 29, 548-55.

Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1983. "Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation" *Biol. Reprod*, 28,1129-1136.

Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., Medeiros, A. S. L. 2005. "Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen", *Anim Reprod Sci*, 89, 105-113.

Alvarenga, M. A., Alvarenga, F. C., Moreira, R. M., Cesarino, M. M. 2000. "Acrozomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packing systems", *Equine Vet J*, 32, 541-545.

Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG, Pauls KP. 2002. "Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility" *Biol Reprod*, 66(2):354-360.

Arav, A., Hehu, D., Mattioli, M. 1993. "Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes", *J Reprod Fertil*, 99, 353-358.

Arriola, J., Foote, R. H. 1987. "Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders", *Journal of Dairy Science*, 70(8), 1664-1670.

Athurupana R, Takahashi D, Ioki S, Funahashi H. 2015 "Trehalose in glycerol-free freezing extender enhances post-thaw survival of boar spermatozoa" *J Rep Dev*, 61(3): 205-210.

Avendaño, C., Oehninger, S. 2011. "DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era?", *Journal of Andrology*, 32, 356–363.

Bakás LS, Disalvo EA. 1991. "Effect of Ca²⁺ on The Cryoprotective Action of Trehalose" *Cryobiology*, 28: 347-353.

Bansal AK, Bilaspuri Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C., Sirad, M. A. 2000. "Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing", *Molecular Reproduction and Development*, 55, 282-288.

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

Başaran N., Duydu Y., Bolt H.M., 2012. "Reproductive toxicity in boron exposed workers in Bandirma, Turkey" *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, Volume 26, Issues 2–3, Pages 165-166

Barthelemy C, Royere D, Hammah S, Lebos C, Tharanne MJ, Lansac J. 1990 "Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation" *Arch Androl* 25(1): 29-40.

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

Bucak, M. N., Bodu, M., Başpınar, N., Güngör, Ş., İli, P., Acibaeva, B., Topraggaleh, T. R., Dursun, Ş. 2019. "Influence of ellagic acid and ebselen on sperm and oxidative stress parameters during liquid preservation of ram semen", *Cell Journal*, 21(1), 7-13.

Bucak, M. N., Uysal, O. 2008. "The role of antioxidants in freezing of saanen goat semen", *Indian vet J*, 85, 148-150.

Büyükleblebici S, Tuncer PB, Bucak MN, Eken A, Sarıözkan S, Taşdemir U, Endirlik BÜ. 2014 "Cryopreservation of bull sperm: effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results" *Anim Reprod Sci* 2014; 30;150(3-4):77-83.

Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA, 2001. "Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen". *Theriogenology*, 56, 275-86.

Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Cormier, N., Sirard, M.A., 2002. "Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase" *Theriogenology*, 57: 1105-1122.

Ball, B. A., Vo, A. 2001. "Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential", *J Androl*, 22, 1061-1069.

Berendsen., D. H., Shigoyuki, A., Kurimoto, M. 2002. "Trehalose: a review of prproperties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies", *Food and Chemical Toxicology*, 40, 871-898.

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

Brown, W. M., Saunders, N. R., Møllgård, K., Dziegielewska, K. M. 1992. "Fetuin-an old friend revisited", *BioEssays* 14, 749-755.

Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sariözkan, S., Başpınar, N., Taşpınar, M., Cayan, K., Bilgili, A., Akalın, P. P., Büyükleblebici, S., Aydos, S., Ilgaz, S., Sunguroğlu, A., Oztuna, D. 2010. "Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage", *Cryobiology*, 61(3), 248-253.

Büyükleblebici, O., Büyükleblebici, S., Taşdemir, U., Tuncer, P. B. 2016. "The effects of different antioxidants on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters in the cryopreservation of brown-swiss bull semen", *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22 (1), 101-107.

Cabrita, E., Ma, S., Diogo, P., Martínez-Páramo, S., Sarasquete, C., Dinis, M. T. 2011. "The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation", *Animal Reproduction Science*, 125(1-4), 189-195.

Cirit, Ü., Bağış, H., Demir, K., Agca, C., Pabuccuoğlu, S., Varişli, Ö., Clifford-Rathert, C., Agca, Y. 2013. "Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose and cysteamine on ram semen", *Animal Reproduction Science*, 139(1-4), 38-44.

Cui, Z. L., Zheng, D. Z., Liu, Y. H., Chen, L. Y., Lin, D. H., Feng-Hua, Lan. 2015. "Diagnostic accuracies of the TUNEL, SCD, and Comet based sperm DNA fragmentation assays for male infertility: a meta-analysis study", *Clinical Laboratory*, 61(5-6), 525-535.

Denecke, B., Gräber, S., Schäfer, C., Heiss, A., Wöltje, M., Jahnen-Dechent, W. 2003. "Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A", *The Biochemical Journal*, 376(Pt 1), 135-145.

Demirci, S., Doğan, A., Şişli, B., Sahin, F. 2014. "Boron increases the cell viability of mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation", *Cryobiology*, 68(1), 139-146.

Demirtaş, A., Untan, İ. 2011. "Seminal sıvı ve spermde oksidatif stres ve antioksidanlar", Türk Üroloji Seminerleri, 2, 24-30.

Donnelly, E. T., McClure, N., Lewis, S. E. M. 2000. "Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species", Mutagenesis, 15. 61–68.

Casey P.J., Hillman, R.B., Robertson, K.R., Yudin, A.I., Liu, I.K., Drobnis, E.Z. 1993. "Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm" J. Androl, 14, 289–297.

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

Cheeseman, K.H., Slater, T.F. 1993. "An introduction to free radicals biochemistry" Br. Med. Bull, 49, 481-493.

Cabria, E., Anel, L., Herraes, M. P. 2001. "Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm", Theriogenology, 52, 623-635.

Cayatte, A. J., Kumbla, L., Subbiah, M. T. 1990. "Marked acceleration of exogenous fatty acid incorporation into cellular triglycerides by fetuin", J Biol Chem, 265, 5883-5888.

Cummins J.M., Jequier, A.M., Kan, R., 1994. "Molecular biology of the human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stres" Mol. Reprod. Dev., 37, 345–362.

Di Santo M1, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. 2012. "Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART" Adv Urol. :854-837.

Denecke, B., Gräber, S., Schäfer, C., Heiss, A., Wöltje, M., Jahnen-Dechent, W. 2003. "Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A", Biochem J, 376, 135-145.

Devirian, T. A., Volpe, S. L. 2003. "The physiological effects of dietary boron", Crit Rev Food Sci Nutr, 43, 219-231.

Dapkevicius, A., van Beek, T. A., Lelyveld, G. P., van Veldhuizen, A., de Groot, A., Linsen, J. P., Venskutonis, R. 2002. "Isolation and structure elucidation of radical scavengers from Thymus vulgaris leaves", Journal of Natural Products, 65, 892-896.

Evans G., 1988."Current topics in artificial insemination of sheep" Aust J Biol Sci, 4,103–161.

Elkomy A.E., ,Abd El-hady A.M., Elghalid O.A. 2015." Dietary Boron Supplementation and its Impact on Semen Characteristics and Physiological Status of Adult Male Rabbits". Asian Journal of Poultry Science, 9: 85-96.

El-Sheshtawy, R. I., Sisy, G. A., El-Nattat, W. S. 2015. "Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the post-thawing quality of cattle bull semen", Asian Pacific Journal of Reproduction, 4(1), 26-31.

Espinoza-Navarro, O., Vilaxa, A., Granifo, L., Rojas, S., Rodriguez, H. 2007. "Histological study on the male reproductive organs of mouse CF1 treated with Boron", International Journal of Morphology, 25, 341-346.

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

Gao, D. Y., Crister, J. K. 2000. "Mechanisms of cryoinjury in living cells", Ilar Journal (Online), 41, 187-96.

Gadea, J., Selles, E., Marco, M. A., Coy, P., Matas, C., Romar, R., Ruiz, S. 2004. "Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders", Theriogenology, 62, 690-701.

Garcez, M.E., Branco, C.S., Lara, L.V., Pasqualotto F.F., Salvador, M., 2010. "Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen" Fertil Steril, 94, 2118–21.

Garner D.L., Thomas C.A. 1999. " Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm" Mol Reprod Dev, 53, 222-229.

Garner D.L., Thomas, C.A., Joerg, H.W., DeJarnette, J.M., Marshall, C.E. 1997. "Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa" Biol Reprod, 57, 1401–1406.

Gille L., Nohl, H., 2001. "The ubiquinol/bc1 redox couple regulates mitochondrial oxygen radical formation" Arch Biochem Biophys, 388, 34-38.

Hafez ESE, Kanagawa H, 1973. "Scanning Electron Microscopy Of Human, Monkey, and Rabbit Spermatozoa" Fertility and Sterility, Vol. 24, No. 10.

Hahn, M. E., McArthur, A. G., Karchner, S. I., Franks, D. G., Jenny, M. J., Timme-Laragy, A. R., & Linney, E. 2014. "The transcriptional response to oxidative stress during vertebrate development: effects of tert-butylhydroquinone and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin" *PloS one*, 9(11), e113158.

Hamano, Y. 2007. "Continuous infusion of lipoic acid rapidly reduces plasma β hydroxybutyrate with elevation of non-esterified fatty acids in broiler chickens", *British Journal of Nutrition*, 97, 495-501.

Hamilton, T. R. D. S., Siqueira, A. F. P., Castro, L. S. D., Mendes, C. M., Delgado, J. D. C., de Assis, P. M., & Visintin, J. A. 2018 "Effect of Heat Stress on Sperm DNA: Protamine Assessment in Ram Spermatozoa and Testicle" *Oxidative medicine and cellular longevity*, Volume 2018, Article ID 5413056, 14 pages,

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

Harrison R. A. P., White I. G., 1972." Glycolytic enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull, boar and ram and their leakage after shock" *J. Reprod. Fert.*, 30, 105-115

Healey P. 1969 "Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animals". *J Reprod Fert* 18: 21-27.

He, L., Li, P., Yu, L. H., Li, L., Zhang, Y., Guo, Y., & Yang, S. H. 2018 "Protective effects of proanthocyanidins against cadmium-induced testicular injury through the modification of Nrf2-Keap1 signal path in rats" *Environmental toxicology and pharmacology*, 57, 1-8.

Holmes R. P., Goodman, H. O., Shihabi, Z. K., Jarow, J. P. 1992. "The taurine and hypotaurine content of human semen", *J Androl*,13, 289-92.

Holt W.V., 1997. "Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa" *Reprod Fertil Dev*, 9,309–319.

Holt, W. T. 2000a. "Basic aspects of frozen storage of semen", *Anim Reprod Sci*, 62, 3-22.

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

Ince, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I. H., Fidan, A. F., Eryavuz, A. 2010. "The effects of dietary Boric Acid and Borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24, 161-164.

Ince, S., Kucukkurt, I., Demirel, H. H., Acaröz, D. A., Akbel, E., Ciğerci, İ. H. 2014 "Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats", *Chemosphere*, Volume 108, Pages 197-204.

Jafaroghli M., Khalili B., Farshad A., Zamiri M.J. 2011 "The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen" *Small Ruminant Research*, 96, 58-63, 2011.

Jaiswal, B. S., Das, K., Saha, S., Dungdung, S. R., Majumder, G. C. 2010. "Purification and characterization of a motility initiating protein from caprine epididymal plasma", *J Cell Physiol*, 222, 254-263.

Kang, J. T., Moon, J. H., Choi, J. Y., Park, S. J., Kim, S. J., Saadeldin, I. M., Lee, B. C. 2016. "Effect of antioxidant flavonoids (quercetin and taxifolin) on in vitro maturation of porcine oocytes", *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.*, 29(3), 352-358.

Kasai, T., Ogawa, K., Mizuno, K., Nagai, S., Uchida, Y., Ohta, S., Fujie, M., Suzuki, K., Hirata, S., Hoshi, K. 2002. "Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential" *Asian J. Androl*, 4, 97–103.

Katepogu, K., Kurumula, D. , Kedam, T., 2012. "Effect of Cryopreservation on Rat Sperm DNA and involvement of elevated Oxidative Stress, Apoptosis – A Review" *International Journal of Pharmacy Research and Technology* Volume 2, Issue 4, 01-09.

Koca, Y., Ozdal, O. L., Celik, M., Unal, S., Balaban, N. 2003. "Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men", *Archives of Andrology*, 49(5), 355-359.

Kopeika, J., Thornhill, A., Khalaf, Y. 2015. "The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence", *Human Reproduction Update*, 21(2), 209-227.

Korkmaz M., Yenigün M., Bakırdere S., Ataman O.Y. 2011 "Effects of Chronic Boron Exposure on Semen Profile" *Biological trace element research* 143(2):738-50.

Ku, W. W., Chapin, R. E., Moseman, R. F., Brink, R. E., Pierce, K. D., Adams, K. Y. 1991. "Tissue distribution of boron in male fischer rats", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 111, 145-151.

Ku, W. W., Chapin, R. E., Wine, R. N., Gladen, B. C. 1993. "Testicular toxicity of boric acid: relationship of dose to lesion development and lack of recovery in the f344 rat", *Reproductive Toxicology*, 7, 305-319.

Kang JK, Moon JH, Choi JY, Park SJ, Kim SJ, Saadeldin IM, Lee BC., 2016 "Effect of Antioxidant Flavonoids (Quercetin and Taxifolin) on In vitro Maturation of Porcine Oocytes" *Asian Australas. J. Anim. Sci.* Vol. 29, No. 3 : 352-358.

Katkov, I. I., Katkova, N., Crister, J. K., Mazur, P. 1998. "Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations", *Cryobiology*, 37, 325-338.

Lewis, S. E., John Aitken, R., Conner, S. J., Iuliis, G. D., Evenson, D. P., Henkel, R., Giwercman, A., Gharagozloo, P. 2013. "The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment", *Reproductive Biomedicine Online*, 27(4), 325-337.

Liu P., Hu W., Xu J., Robbins W.A. 2006 "Influence of boron exposure on male semen quality"

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001." Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method". *Methods*, 25(4), 402-408.

Luo, H., Jiang, B. H., King, S. M., Chen, Y. C. 2008. "Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids", *Nutr Cancer*, 60, 800-809.

Leeuw, F. E. D., Leeuw, A. M. D., Daas, J. H. G., Colenbrander, B. V., Erkleij, A. J. 1993. "Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing", *Cryobiology*, 30, 32-44.

Leibo, S. P., Brandley. L. 1999. "Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa". *The Male Gamet*. Editör: Gagnon, C. St Louis: Cache River Press.

- López Armengol MF, Jurado SB, Pelufo V, Aisen EG. 2012 "A quantitative ultramorphological approach for systematic assessment of sperm head regions: an example in rams". *Cryobiology*, 64(3): 223-234.
- Liu, J.-X., Zhai, Y. H., Geng, F. S., Xia, J. H., Gui, J. F. 2008. "Molecular characterization and expression pattern of fetuin-B in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)", *Biochem Genet*, 46, 620-633.
- Lin, L. Z., Mukhopadhyay, S., Robbins, R. J., Harnly, J. M. 2007. "Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DADESI/ MS analysis", *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 361-369.
- Martinez-Pastor F., Jahannisson, A., Gil, J., Kaabi, M., Anel, L., Paz, P. 2004. "Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen" *Anim Reprod Sci*, 84, 121–33.
- Maxwell, W.M.C., Watson, P.F. 1996. "Recent progress in the preservation of ram semen" *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 55-65.
- Maxwell, W. M. C., Watson, P. F. 1996. "Recent progress in the preservation of ram semen", *Anim Reprod Sci*, 42, 55-65.
- Meyers SA, 2005 "Spermatozoal response to osmotic stress". *Anim Reprod Sci* 89: 57-64.
- Morrell, J. M., Hodge, J. K. 1998. "Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research", *Animal.Reprod..Sci.,53,.43-63*.
- Meister A., Anderson, M.E., 1983. "Glutathione" *Annu. Rev. Biochem.* 52, 11–60.
- Mateus, N., Costa, V. 2007. "Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2446-2451.
- Millonig, G. 1961. "Advantages of phosphate buffer for OsO₄ solution in fixation", *J. Appl. Physiol.*, 32, 1637.
- Massip A., 2001."Cryopreservation of Embryos of Farm Animals" *Reproduction in Domestic Animals*, Vol:36, Issue:2, 49-55.
- McGann, L. E. 1978. "Differing action of penetrating and nonpenetrating agents", *Cryobiology*, 15, 382-390.

Manigandan, K., Jayaraj, R. L., Jagatheesh, K., Elangovan, N. 2015. "Taxifolin mitigates oxidative DNA damage in vitro and protects zebrafish (*Danio rerio*) embryos against cadmium toxicity", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(3), 1252-1261.

Martin G., Sabido O., Durand P., Levy R., 2004. "Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm" *Biol Reprod*, 71, 28–37.

Marxwell, R.J. 1995. "Prospects for the use of antioxidants therapies" *Drugs*, 49, 345-361.

Mekkawy IAA, Osman AGM. 2006. "Ultrastructural studies of the morphological variations of the egg surface and envelopes of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) before and after fertilisation with a discussion of fertilisation mechanism" *Scientia Marina*, Vol 70, No S2.

Nishizono H, Shioda M, Takeo T, Irie T, Nakagata N. 2004 "Decrease of Fertilizing Ability of Mouse Spermatozoa after Freezing and Thawing Is Related to Cellular Injury". *Bio of Reprod* 71(3): 973-978.

Naijian, H. R., Kohram, H., Shahneh, A. Z., Sharafi, M., Bucak, M. N., 2013 "Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze-thaw process" *Cryobiology*, 66(2), 151-5.

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

Nielsen, F. H., Hunt, C. D., Mullen, L. M., Hunt, J. R. 1987. "Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women", *FASEB J.*, 1, 394-397.

Nishizono H Shioda M Takeo T Irie T & Nakagata N. 2004 "Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury" *Biology of Reproduction* 71: 973–978.

Nur, Z., Zik, B., Ustuner, B., Sagirkaya, H., Ozguden, C. G. 2010. "Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity", *Theriogenology*, 73(9), 1267-1275.

Olivier, E., Soury, E., Ruminy, P., Husson, A., Parmentier, F., Daveau, M., Salier, J. P. 2000. "Fetuin-B, a second member of the fetuin family in mammals", *Biochem J*, 350, 589-597.

O'Connell, M., McClure, N., Lewis, SEM. 2002. "The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function" *Hum Reprod*, 17, 704–709.

- Oehninger, S., Duru, N.K., Srisombut, C., Morshedi, M. 2000. "Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome" *Mol. Cell Endocrinol.*, 169, 3-10.
- Olivier E., Soury E., Ruminy P., Husson A., Parmentier F., Daveau M., Salier JP. 2000. "Fetuin-B, a second member of the fetuin family in mammals" *Biochem. J.* 350, 589-597.
- Ombrellino, M., Wang, H., Yang, H., Zhang, M., Vishnubhakat, J., Frazier, A., Scher, L. A., Friedman, S. G., Tracey, K. J. 2001. "Fetuin, a negative acute phase protein, attenuates TNF synthesis and the innate inflammatory response to carrageenan", *Shock*, 15, 181-185.
- Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. 2008 "Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa". *J Assist Reprod Genet*, 25(8): 403–411.
- Park, M., Li, Q., Shcheynikov, N., Muallem, S., Zeng, W. 2005. "Borate transport and cell growth and proliferation: not only in plants", *Cell Cycle*, 4, 24–26.
- Purdy, P. H. 2006. "A review on goat sperm cryopreservation", *Small Ruminant Research*, 63, 215–225.
- Palasz, A. T., Mapletoft, R. J. 1996. "Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances", *Biotechnol Adv*, 14, 127-149.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Criester, E. S., Eyestone, W. H., First, N.L. 1986. "Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen", *Theriogenology*, 25, 591-600.
- Pesch S, Bergmann M. 2006 "Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation" *Micron*, 37(7): 597–612.
- Přinosilová P, Sedláčková M, Kopecká V, Hlavicová J. 2012 "Boar sperm head membrane damage during cryopreservation evaluated by electron microscopy" *Research in pig breeding*, 6: 2.
- Prinosilova P., Rybar R., Zajicova A., Hlavicova J. 2012. "DNA integrity in fresh, chilled and frozen-thawed canine spermatozoa" *Veterinarni Medicina*, 57, (3): 133–142.
- Purdy, P. H. 2006. "A review on goat sperm cryopreservation", *Small Rum Res*, 63, 215-225.
- Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, Bailey JL. 2007. "Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm" *Mol Reprod Dev*, 74(7): 878-892.

Quinn PJ, White IG, Cleland KW. 1969 "Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing" *J Reprod Fertil*, 18(2):209-20.

Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Fernández-Encinas, A., Abad, C., Amengual, M. J., Prada, E., Navarro, J., Benet, J. 2013. "Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay", *Andrology*, 1(5), 715-722.

Reynolds, E. S. 1963. "The use of lead citrate at high pH as an electro opaque stain in electron microscopy", *J. Cell Biol.*, 17, 208-212.

Richards, A. B., Krakowka, S., Dexter, L. B., Schmid, H., Wolterbeek, A. P. M., Waalkens-McWilliams, R. B., Gibbons, W. E., Leibo, S. P. 1995. "Osmotic and physiological responses zygotes and human oocytes to mono-and disaccharides", *Hum Reprod*, 10, 1163-1171.

Robbins, A., Xun L., Jia J., Kennedy N., Elashoff D.A., Ping L. 2010. "Chronic boron exposure and human semen parameters", *Reproductive Toxicology*, Volume 29, Issue 2, 184-190.

Robertson I., Bailey JL., Buhr MM., 1990 "Effects of cold shock and phospholipase A2 on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes" *Molecular Reproduction and Development*, Volume 26, Issue 2 Pages 143-149.

Said, T., Agarwal, A., 2012. "Antioxidants in Sperm Cryopreservation Male Infertility" 431-437. doi 10.1007/978-1-4614-3335-4.

Sies, H. 1993. "Strategies of antioxidant defence", *Eur J Biochem*, 215, 213-219.

Sardesai, V.M., 1995. "Role of antioxidants in health maintenance" *Nutr. Clin. Pract.*, 10, 19-25.

Sieme H., Oldenhof H., Wolkers W.F. 2015. "Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation" *Reprod Dom Anim* 50 (Suppl. 3), 20–26.

Sasikumar S., Dakshayani D. 2013. "Assessment of sperm DNA integrity by Toluidine blue staining technique in infertile patients and its relation to cryopreservation" *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 2(6): 280-292.

Sa-Ardrit M, Saikhun J, Thongtip N, Damyang M, Mahasawangkul S, Angkawanish T, Jansittiwate S, Faisaikarm T, Kitiyanant Y, Pavasuthipaisit K, Pinyopummin A. 2006 "Ultrastructural alterations of frozen-thawed Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa" *Int J Androl*, 29 (2): 346-52.

Sariözkan, S., Tuncer, P. B., Büyükleblebici, S., Bucak, M. N., Cantürk, F., Eken, A. 2015. "Antioxidative effects of cysteamine, hyaluronan and fetuin on post-thaw semen quality, DNA integrity and oxidative stress parameters in the Brown Swiss bull", *Andrologia*, 47(2), 138-147.

Shiva Shankar Reddy, N., Jagan Mohanarao, G., Atreja, S. K. 2010. "Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation", *Animal Reproduction Science*, 119(3-4), 183-190.

Simões, R., Feitosa, W. B., Siqueira, A. F., Nichi, M., Paula-Lopes, F. F., Marques, M. G., Peres, M. A., Barnabe, V. H., Visintin, J. A., Assumpção, M. E. 2013. "Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome", *Reproduction Research*, 146(5), 433-441.

Said, T.M., Gaglani, A., Agarwal, A., 2010. "Implication of apoptosis in sperm cryoinjury *Reprod. Biomed*" Online 21, 456–462.

Silva SV, Soares AT, Batista AM, Almeida FC, Nunes JF, Peixoto CA, Guerra MM. 2013 "Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation" *Anim Reprod Sci*, 137(1-2):37-44.

Shamsi MB1, Kumar R, Dada R., 2008. "Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction" *Indian J Med Res.*, 127(2):115-23.

Shi L, Ren Y, Zhou H, Hou G, Xun W, Yue W, Zhang C, Yang R. 2014 "Effect of rapid freezing-thawing techniques on the sperm parameters and ultrastructure of Chinese Taihang black goat spermatozoa" *Micron* 2014; 57: 6-12.

Schroeder, A. C., Schultz, R. M., Kopf, G. S., Taylor, F. R., Becker, R. B., Eppig, J. J. 1990. "Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP2f during spontaneous Mouse oocyte maturation in vitro in the absence of serum", *Biol Reprod*, 43, 891-897.

Sarıözkan, S., Tuncer, P. B., Büyükleblebici, S., Bucak, M. N., Cantürk, F., Eken, A. 2015. "Antioxidative effects of cysteamine, hyaluronan and fetuin on post-thaw semen quality, DNA integrity and oxidative stress parameters in the Brown Swiss bull", *Andrologia*, vol: 47, issue:2, 138-147.

Sarıözkan S., Bucak MN, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Eken A, Akay C.2015 "Influence of fetuin and hyaluronan on the post-thaw quality and fertilizing ability of Holstein bull semen" Volume 71, Issue 1, 119-124.

Shikov, A. N., Pozharitskaya, O. N., Miroshnyk, I., Mirza, S., Urakova, I. N., Hirsjarvi, S., Makarov, V. G., Heinamaki, J., Yliruusi, J., Hiltunen, R. 2009. "Nanodispersions of taxifolin: Impact of solid-state properties on dissolution behavior", *International Journal of Pharmaceutics*, 377, 148-152.

Storey BT, Noiles EE, Thompson KA, 1998 "Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation" *Cryobiology*, 37(1):46-58.

Suarez S.S., Marquez B., Harris T.P., Schimenti J.C. 2007. "Different regulatory systems operate in the midpiece and principal piece of the mammalian sperm flagellum", *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 65,331-334.

Sun, X., Chen, R., Yang, Z., Sun, G., Wang, M., Maa, X., Yang, L., Sun, X. 2014. "Taxifolin prevents diabetic cardiomyopathy in vivo and in vitro by inhibition of oxidative stress and cell apoptosis", *Food and Chemical Toxicology*, 63, 221-232.

Şen G. 2015." Erken gebelikte embriyonun endometriyal antioksidan yanıtı etkileri: Koyun Modeli" Yayınlanmamış Yüksek Lisans tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya

Taşdemir U, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Özgürtaş T, Durmaz E, Büyükleblebici O. 2014 "Effects of Various Antioxidants on Cryopreserved Bull Sperm Quality" *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 20(2): 253-258.

Thomas, M.J., 1995. "The role of free radicals and antioxidants: how the we know that they are working" *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 35, 21-39.

Thompson, L. K., Fleming, S. D., Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., Zieschang, J.-A., Clark, A. M., 2009. "Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis" *Human Reproduction*, Vol. 24, No.9, 2061–2070.

Tırpan MB, Tekin N.,2015 “Effects of boron (sodium pentaborate), added instead of Tris components, on freezing and post-thaw quality of Angora buck semen” Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Vol.62 No.4 pp.295-302.

Taşdemir, U., Tuncer, P. B., Büyükleblebici, S., Özgürtaş, T., Durmaz, E., Büyükleblebici, O. 2014. “Effects of various antioxidants on cryopreserved bull sperm quality”, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 20 (2), 253-258.

Tırpan M.B., Gürler H., Olgaç K.T., Daşkın A. 2018 ”Effects of boron added bull semen extender on post-thaw spermatological parameters” Ankara Üniv Vet Fak Derg, 65, 123-128.

Tuncer, P. B., Umut, T. D., Serhat, B., Taner, Ö., Erdem, C. K., Halil, E. 2013. “Effects of different doses of trehalose supplementation in egg yolk extender in frozen–thawed Angora buck semen”, Small Ruminant Research, 113, 383-389.

Turkez, H., Geyikoglu, F., Tatar, A., Keles, S., Ozkan, A. 2007. “Effects of some Boron compounds on peripheral human blood”, Zeitschrift für Naturforschung. C, A journal of Biosciences, 62, 889-896

Tunalı, G. 2014 “Sperm kriyoprezervasyon teknikleri ve fertilizasyon başarısındaki rolü”. Androloji Bülteni Dergisi 2014; 16:123-128.

Uysal O., Bucak M.N., 2007. “Effect of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen thawed ram semen” Acta Vet Brno, 76, 383-390.

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

Uysal O, Bucak MN. 2009 “The role of different trehalose concentrations and cooling rates in freezing of ram semen” Ankara Üniv Vet Fak Derg, 56, 99-103.

Ünal, M. S., Özer, M. C., Sönmez, F. H., Bayrak, G., Demirbağ, H. O. 2017. “Seminal sıvının fertilizasyondaki rolü”, Androloji Bülteni, 19(4), 138–143.

Underwood, S. L., Bathgate, R., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. 2009. “Development of Procedures for Sex-sorting Frozen–Thawed Bovine Spermatozoa”, Reproduction in domestic animals, 44(3), 460-466.

Üstüner, B., Nur, Z., Alçay, S., Toker, M. B., Sağırkaya, H., Soylu, M. K. 2015. "Effect of freezing rate on goat sperm morphology and DNA integrity", Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 39, 110-114.

Vega-Villa, K. R., Remsberg, C. M., Ohgami, Y., Yanez, J. A., Takemoto, J. K., Andrews, P. K., Davies, N. M. 2009. "Stereospecific high-performance liquid chromatography of taxifolin, applications in pharmacokinetics, and determination in tu fu ling (*Rhizoma smilacis glabrae*) and apple (*Malus × domestica*)", Biomedical Chromatography, 23, 638-646.

Wael A. Khalil WA., El-Harairy MA., , Zeidan AEB., Hassan MAE, Elsaeed OM, 2018. "Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights" International Journal of Veterinary Science and Medicine 6: S49–S56.

Watson, P.F. 1995. "Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function", Reprod Fertil Dev, 7, 871-891.

Watson, P. F. 1995. "Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function", Reprod Fertil Dev, 7, 871-91.

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

Watson, P. F. 1995. "Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function", Reprod Fertil Dev, 7, 871-91.

White IG. 1993. "Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review". Reprod Fertil Dev. 5(6):639-58.

Woods, E. J., Gilmore, J. A., Liu, J. 2000. "Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods", Hum Reprod, 15, 335-343.

Yeni, D., Avdatek, F., Gündoğan, M. 2018. "The Effect of boron addition on spermatological parameters, oxidative stress and DNA damage after frozen-thawed process in Ramlic ram semen", Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 32(1), 53 – 57.

Yildiz, C., Ottaviani, P., Law, N., Ayearst, R., Liu, L., McKerlie, C. 2007. "Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the Mouse", *Reproduction Research*, 133, 585–595.

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

Zhao Y., Buhr, M.M.,1995. "Cryopreservation extenders affect calcium flux in bovine spermatozoa during a temperature challenge" *J Androl*, 16, 278-285.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 114O642
Proje Başlığı: KOÇ SPERMASININ DONDURULMASINDA KATKI MADDELERİNİN ETKİSİ
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç. Dr. Nazan KESKİN (Yürütücü), Prof. Dr. Mustafa Numan BUCAK (Araştırmacı), Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR (Araştırmacı), Dr. Öğr. Üyesi Şükrü DURSUN (Araştırmacı) Dr. Öğr. Üyesi Pınar İLİ (Araştırmacı)
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Denizli
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:-
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 2014-2018
Öz (en çok 70 kelime) <p>İki sulandırıcı grubu, gliserol %5 (T1) ve gliserol %3 + 60 mM trehaloz (T2) grupları belirlenmiştir. T2+fetuin 5 mg; motilite, mitokondriyel aktivite ve canlılık, T2+Taksifolin 10 µM ve T2+Boron 0,25 mM grupları; motilite, akrozom bütünlüğü, mitokondriyel aktivite ve canlılık parametrelerinde yüksek oranlar vermiştir. DNA'da çift zincir kırıklarının engellenmesinde, T2+fetuin 5 mg/ml ile T1+taksifolin 10 µM grupları, DNA fragmantasyonunun engellenmesinde T2+fetuin 5 mg/ml; T1+taksifolin 10 µM ve T1+taksifolin 500 µM ile T2+boron 0,5 Mm grupları etkili olmuştur. İnce yapı düzeyinde, kriyohaslar başlıca membran, akrozom, mitokondri, aksonem ile kuyruk yapısında gösterilmiştir. LPO düzey, Gliserol %5 grubunda yüksektir. GSH ve AOC yönünden bir farklılık yoktur. GSH düzeyi, Gliserol %5 ve Gliserol %5 + Fetuin 2,5 mg gruplarında düşüktür. AOC düzeyleri yönünden bir farklılık yoktur. Boron uygulamasında, GSH düzeyi Gliserol %3 grubunda yüksektir, Gliserol %5 + 1 mM Boron ve Gliserol %3 + 0,5 mM Boron grupları ile farklı değildir. Diğer parametreler yönünden bir farklılık yoktur. Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Taksifolin 100 µM grubu, yüksek NQO1 gen ekspresyonu düzeyi göstermiştir. %3 Gliserol + 60 mM Trehaloz + 0,5 mM Boron grubunda da, NQO1 gen ekspresyonu az düzeyde yüksek bulunmuştur. Fetuin gruplarında belirgin bir fark bulunmamıştır. Dölverimi sonuçları bakımından gruplar arası bir farklılık çıkmasa da en yüksek dölverimi Gliserol %3 + Trehaloz60 mM + Boron 0,5 mM içeren dondurulmuş çözdürülmüş spermalardan elde edilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler: Koç sperması, kriyoprezervasyon, kriyoprotektan, katkı maddesi, dondurma, in vitro parametreler, tohumlama

Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu?	Evet	Gerekli Değil X
Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.		
Projeden Yapılan Yayınlar:		
<p>Mustafa Numan BUCAK, Nazan KESKIN, Cennet Erdogan Altıntaş, Pınar İli, Nuri BAŞPINAR, Şükrü DURSUN, Şükrü GÜNGÖR, Mustafa BODU, Begimay ACIBEAVA, Effects of cryoprotectants and trehalose on electron microscopic evaluation of cryopreserved sperm. ISERB 2017, 20-22 May 2017.</p>		
<p>Mustafa Numan Bucak, Nazan Keskin, Nuri Başpınar, Mustafa Bodu, Pınar İli, Ali Erdem Öztürk, İpek Nur Şahin, Şükrü Dursun, Mehmet Bozkurt Ataman, The Effect of Tris-Based Fetuin and Trehalose Extender on Post-Thawed Ram Semen Parameters. The 16th International Symposium. Prospects for the 3rd Millennium Agriculture, 2017.</p>		
<p>Mustafa Numan BUCAK, Nazan KESKIN, Kenan ÇOYAN, Pınar İLİ, Nuri BAŞPINAR, Şükrü DURSUN, Şükrü GÜNGÖR, Mustafa BODU, Begimay ACIBEAVA, The effects of cryoprotectants and trehalose on post-thawed ram sperm parameters. 18th International Congress on Animal Reproduction, 26-30 June, 2016.</p>		
<p>Mustafa Numan Bucak, Pınar İli, Fikret Sarı, Nazan Keskin, Nuri Başpınar, Şükrü Dursun, Şükrü Güngör, Mustafa Bodu, Begimay Acibeava, Effects of different extenders containing different doses of trehalose on sperm DNA integrity during cryopreservation of Merinos Ram semen. The 6th Scientific (1st International) Conference of the College of Veterinary Medicine, University of Al-Qadisiyah, Iraq, 2017.</p>		
<p>Mustafa Numan Bucak, Nazan Keskin, Kenan Çoyan, Pınar İli, Nuri Başpınar, Şükrü Dursun, Şükrü Güngör, Mustafa Bodu, Begimay Acibaeva, Effects of cryoprotectants and trehalose on ramsperm. An electron microscopic study. ROYAN International Twin Congress, 2017.</p>		
<p>Mustafa Numan Bucak, Nazan Keskin, Pınar İli, Ali Erdem Öztürk, Some sperm quality parameters in domestic animals. The 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2018), Kyiv, UKRAINE.</p>		
<p>Cennet Erdoğan Altıntaş, 2018 "Trehaloz'un Dondurulmuş Çözdürülmüş Koç Spermeleri İnce Yapısı Üzerine Kriyoprotektif Etkisinin Araştırılması" Pamukkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji ABD Yüksek Lisans Tezi.</p>		