



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

***NEPETA ITALICA* SUBSP. *CADMEA* EKSTRAKTİNİN
DONDURULMUŞ-ÇÖZDÜRÜLMÜŞ TEKE SPERMLERİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sıddıka BOZTAŞ

Ocak 2023
DENİZLİ

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***NEPETA ITALICA* SUBSP. *CADMEA* EKSTRAKTININ
DONDURULMUŞ-ÇÖZDÜRÜLMÜŞ TEKE SPERMLERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Sıddıka BOZTAŞ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nazan KESKİN

Denizli, 2023

Doktora Tezleri İçin Yayın Beyanı Sayfası

Pamukkale Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uygulama Esasları Yönergesi Madde 24-(2) "Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencileri için: Doktora tez savunma sınavından önce, doktora bilim alanında kendisinin yazar olduğu uluslararası atıf indeksleri kapsamında yer alan bir dergide basılmış ya da basılmak üzere kesin kabulü yapılmış en az bir makalesi olan öğrenciler tez savunma sınavına alınır. Yüksek lisans tezinin yayın haline getirilmiş olması bu kapsamda değerlendirilmez. Bu ek koşulu yerine getirmeyen öğrenciler, tez savunma sınavına alınmazlar" gereğince yapılan yayın/yayınların listesi aşağıdadır (Tam metin/metinleri ekte sunulmuştur):

Ek -1: **Boztaş S**, Urgancı BE, Seçme M, Keskin N. "*Nepeta italica* L. subsp. *cadmea* (Boiss.) A. L. Budantsev oil has a pro-apoptotic effect on Saos-2 cell line". **Nat Pro Biotech** 2022; 2(2): 88-98.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Sıddıka BOZTAŞ

İmza :

ÖZET

NEPETA İTALİCA SUBSP. CADMEA EKSTRAKTININ DONDURULMUŞ-ÇÖZDÜRÜLMÜŞ TEKE SPERMLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

BOZTAŞ, Sıddıka
Doktora Tezi, Histoloji - Embriyoloji AD
Tez Yöneticisi: Doç Dr. Nazan KESKİN

Ocak 2023, 82 Sayfa

Sperm kriyoprezervasyonu, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) aşırı üretimine bağlı olarak sperm kalitesini ve ardından fertilizasyon yeteneğini olumsuz etkiler. Kriyoprotektanların sulandırıcıya eklenmesi, spermi oksidatif stresin (OS) zararlı etkilerinden koruyabilir. Flavonoidler ve fenolik bileşikler açısından zengin bitki ekstraktları gibi doğal kaynaklı antioksidanların, kriyoprotektif ajanlar olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Bu çalışmada, Ankara teke spermasının, motilite, akrozom membran bütünlüğü ve DNA fragmentasyonu üzerine, antioksidan ve flavonoid içeriği bakımından zengin olan *Nepeta italica* subsp. *cadmea* esansiyel yağının üç farklı dozunun (0.75 µl/10 ml, 1.5 µl/10 ml ve 6 µl/10 ml) dondurma-çözdürme sonrası etkileri araştırılmıştır. Bitkiler, çiçeklenme döneminde Honaz dağından (Denizli, Türkiye) toplanmış ve oda sıcaklığında, gölgede kurutulmuştur. Toz haline getirilen bitkinin, esansiyel yağı Clevenger aparatı sistemi kullanılarak hidrodistilasyonla ekstrakte edildikten sonra, amber renkli şişe içinde 4°C'de saklanmıştır. Tekelerden, üreme sezonunda elektroejakülatör ile alınan ejakülatlar birleştirilmiş, tris ana stok solüsyonu ile bitki yağının üç farklı dozu sulandırıldıktan sonra dondurulmuştur. Çözdürme sonrası motilitede, kontrol grubu ile diğer gruplara göre, yağın 0.75 µl/10 ml'lik dozunun iyileştirme yaptığı belirlenmiştir (p<0.05). Akrozomal membran bütünlüğü ve DNA fragmentasyonu analizlerinden de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Dondurma-çözdürme sonu akrozomal membran bütünlüğünde esansiyel yağın 0.75 µl/10 ml dozu, kontrol ve 1.5 µl/10 ml ile 6 µl/10 ml dozlarına göre daha yüksek değerde bulunmuştur (p<0.05). DNA fragmentasyon analizinde ise, esansiyel yağın 0.75 µl/10 ml dozu, kontrol ve 1.5 µl/10 ml ile 6 µl/10 ml dozlarına göre daha düşük değerde bulunmuştur (p<0.05).

Sonuç olarak, esansiyel yağın 0.75 µl/10 ml'lik dozunun, Ankara tekesi spermlerinde dondurma-çözdürme sonrası, motilite, akrozomal membran bütünlüğü ve DNA fragmentasyonu parametreleri üzerinde kriyoprotektif etkisi belirlenmiştir. Sperm kriyoprezervasyonunda, antioksidan etkilere sahip ve flavonoid içeren *Nepeta italica* subsp. *cadmea* esansiyel yağının en uygun dozunun kriyoprotektan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte, sperm kriyoprezervasyonunda bitki esansiyel yağının belirlenen dozlarının olası kriyoprotektif etkilerini, farklı parametrelerle de çalışarak ortaya çıkarılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Ankara tekesi, Sperma kriyoprezervasyonu, *Nepeta italica* subsp. *cadmea*

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2020SABE006).

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF *NEPETA ITALICA* SUBSP. *CADMEA* EXTRACT ON FROZEN-THAWED BUCK SPERMATOZOA

BOZTAŞ, Sıddıka
PhD Thesis, Histology - Embryology Department
Supervisor: Doç. Dr. Nazan KESKİN

January 2023, 82 Page

Sperm cryopreservation adversely affects semen quality and subsequent fertilization ability due to the overproduction of reactive oxygen species (ROS). The addition of cryoprotectants to the extender can protect sperm against the harmful effects of oxidative stress (OS). Studies are carried out to use natural antioxidants such as plant extracts rich in flavonoids and phenolic compounds as cryoprotectants.

In this study, the effects of three different doses of antioxidant and flavonoids rich *Nepeta italica* subsp. *cadmea* oil (0.75 µl/10 ml, 1.5 µl/10 ml and 6 µl/10 ml) on motility, acrosomal integrity and DNA fragmentation on frozen-thawed Ankara buck spermatozoa were investigated. The plants were harvested during the flowering stage on Honaz Mountain (Denizli, Turkey) and air dried in the shade at room temperature. Essential oil of the powdered plant was extracted by hydrodistillation using a Clevenger apparatus system, then stored at 4°C in an amber colored glass bottle. The ejaculates taken from the Ankara bucks during the breeding season with an electroejaculator were combined and diluted with tris diluent and three different doses of plant oil, and then frozen. It was determined that the plant oil at the dose of 0.75 µl/10 ml was improved the post-thawed sperm motility compared to control group and other groups ($p < 0.05$). Similar results were obtained from the analysis of acrosomal integrity and DNA fragmentation. In the acrosomal membrane integrity after freeze–thawing, 0.75 µl/10 ml dose of essential oil was found to be higher than the doses of control and 1.5 µl/10 ml, 6 µl/10 ml ($p < 0.05$). In DNA fragmentation analysis, 0.75 µl/10 ml dose of essential oil was found to be lower than the doses of control and 1.5 µl/10 ml, 6 µl/10 ml ($p < 0.05$).

As a result, the cryoprotective effect of 0.75 µl/10 ml dose of essential oil on motility, acrosomal integrity and DNA fragmentation parameters in Ankara bucks sperma after freeze-thawing was determined. It has been shown that the most appropriate dose of *Nepeta italica* subsp. *cadmea* essential oil having antioxidant effects and containing flavonoids can be used as a cryoprotectant in sperma cryopreservation. However, there is a need to reveal the possible cryoprotective effects of determined doses of plant essential oil in sperm cryopreservation by studying with different parameters.

Keywords: Ankara buck, Sperm cryopreservation, *Nepeta italica* subsp. *cadmea*

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project numbers 2020SABE006.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam süresince tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Gülçin METE'ye ve tez danışmanım Doç. Dr. Nazan KESKİN'e,

bu tez çalışmamda, semen alınımı, kriyoprezervasyon aşamaları ve analizlerde her türlü desteği sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Mustafa Numan BUCAK'a,

deneysel çalışmalarımız sırasında yardımını esirgemeyen ve kritik yorumlarını paylaşan Arş. Gör. Ayşen Buket ER URGANCI'ya,

çalışmalarım boyunca her türlü desteğini esirgemeyen eşim Bayram BOZTAŞ'a ve beni sabırla bekleyen, bütün yorgunluğlarımın katlanan canım oğlum Mustafa Umut BOZTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç.....	6
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	8
2.1. Kriyoprezervasyon	8
2.2. Kriyoprotektanlar	11
2.3. Kriyoprezervasyon Sırasında Oksidatif Stresin Sperm Kalitesi Üzerine Etkileri	12
2.4. Dondurma-Çözdürme Sırasında Kriyohasarlara Prensipleri	14
2.5. Dondurma-Çözdürme Sürecinde Ortaya Çıkan Kriyohasarlara.....	16
2.6. Antioksidanların Kriyoprezervasyon Sulandırıcısına Eklenmesi	18
2.7. Flavonoidler	22
2.8. Teke Seminal Plazmasının Özellikleri	25
2.9. Tekelerden Sperm Toplanması	27
2.10. Teke Sperminin Seyreltilmesinde Kullanılan Sulandırıcılar	27
2.11. Teke Sperm Kriyoprezervasyonunda Kullanılan Kriyoprotektanlar	28
2.12. Teke Sperm Kriyoprezervasyonu Prosedürleri	29
2.13. Teke Sperminin Çözdürülmesi	29
2.14. Teke Sperm Kriyoprezervasyon Sulandırıcısına Eklenen Antioksidanlar İle İlgili Literatürler	30

2.15. Teke Sperm Kriyoprezervasyonunda Kullanılan Flavonoidler İle İlgili Literatürler	37
2.16. <i>Nepeta</i> L. Cinsinin Genel Özellikleri	43
2.17. <i>Nepeta italica</i> subsp. <i>cadmea</i>	45
2.18. Hipotez	47
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	48
3.1. <i>Nepeta italica</i> subsp. <i>cadmea</i> Bitkisinin Toplanması ve Ekstraktının Hazırlanması	48
3.2. Tekelerin Temini ve Bakımı	49
3.3. Sperma Alınması	50
3.4. Sperma Dondurulmasında Kullanılan Tris Ana Stok Sıvısının Hazırlanması ...	52
3.5. <i>Nepeta italica</i> subsp. <i>cadmea</i> Esansiyel Yağının ve Grupların Hazırlanması ..	52
3.6. Sperma Kriyoprezervasyonu	52
3.7. Spermanın Çözdürülmesi ve Değerlendirilmesi.....	53
3.8. <i>In vitro</i> Spermatolojik Parametreler.....	54
3.8.1. Sperm motilite testi	54
3.8.2. Akrozomal membran bütünlüğünün değerlendirilmesi	54
3.8.3. DNA fragmentasyonu incelemesi	54
3.9. İstatistiksel Analizler.....	55
4. BULGULAR	56
4.1. <i>Nepeta italica</i> subsp. <i>cadmea</i> Uçucu Yağının Kimyasal Kompozisyonu	56
4.2. Çözdürme Sonrası Spermatolojik Bulgular.....	57
4.2.1. Spermatozoa motilitesi.....	57
4.2.2. Spermatozoa akrozomal membran bütünlüğü	58
4.2.3. DNA fragmentasyonu (TUNEL Testi).....	60
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ	67
7. KAYNAKLAR	68
8. EKLER	
Ek-1. Boztaş S , Urgancı BE, Seçme M, Keskin N. " <i>Nepeta italica</i> L. subsp. <i>cadmea</i> (Boiss.) A. L. Budantsev oil has a pro-apoptotic effect on Saos-2 cell line". Nat Pro Biotech 2022; 2(2): 88-98.	
Ek-2. Etik Kurul Onayı 1	
Ek-3. Etik Kurul Onayı 2	
Ek-4. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü araştırma izinleri	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Reaktif oksijen türevlerinin kaynakları.....	13
Şekil 2.2 Kriyoprezervasyon işlemi sırasında oksidatif stresin sperm kalitesi üzerine etkileri.....	14
Şekil 2.3 Kriyoprezervasyon işlemi sırasında hücrede meydana gelen fiziksel olaylar.....	15
Şekil 2.4 Dondurma-çözdürme prosedürlerinden kaynaklanan temel kriyohasarlardan.....	17
Şekil 2.5 Antioksidanların sınıflandırılması.....	21
Şekil 2.6 <i>Nepeta italica</i> subsp. <i>cadmea</i>	47
Şekil 3.1 Kurutulmuş ve öğütülmüş <i>Nepeta italica</i> subsp. <i>cadmea</i>	48
Şekil 3.2 Clevenger düzeneği ile ekstrakte edilmiş <i>Nepeta italica</i> subsp. <i>cadmea</i> esansiyel yağı.....	49
Şekil 3.3 Çalışmada kullanılan Ankara tekeleri.....	50
Şekil 3.4 Elektroejakulatör.....	51
Şekil 3.5 Elektroejakulatör kullanılarak alınan semen numuneleri.....	51
Şekil 3.6 Ekilibrasyon aşamasında buzdolabına yerleştirilen metal tepsilerdeki payetler.....	53
Şekil 3.7 5 cm yükseklikte sıvı azot buharında dondurulan payetler.....	53
Şekil 4.1 Dondurma-çözdürme sonrası gruplar arası motilite oranları grafiği.....	58
Şekil 4.2 Dondurma-çözdürme sonrası akrozomal membran bütünlüğü değerleri.....	59
Şekil 4.3 Akrozomal membran bütünlüğünün gösterilmesi, FITC-PNA/PI boyaması.....	59
Şekil 4.4 Çözdürme sonrası DNA fragmentasyon yüzdeleri.....	60
Şekil 4.5 TUNEL-pozitif DNA fragmentasyonu.....	61

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Kriyoprotektif ajanlar.....	12
Tablo 2.2 Flavonoidlerin sınıflandırılması.....	25
Tablo 4.1 <i>Nepeta italica</i> subsp. <i>cadmea</i> esansiyel yağının kimyasal kompozisyonu	56
Tablo 4.2 Dondurma-çözdürme sonrası motilite değerleri.....	57
Tablo 4.3 Dondurma-çözdürme sonrası elde edilen akrozomal membran bütünlüğü değerleri.....	58
Tablo 4.4 DNA fragmentasyon sonuçlarının gruplara göre değerlendirilmesi.....	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFP:	Antifriz protein
BHA:	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT:	Bütillenmiş hidroksitoluen
BSA:	Sığır serum albümini
C:	Sistein
CAT:	Katalaz
Cd ⁺² :	Kadmium
CEE:	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> etanol ekstraktı
CENF:	Kurkumin nanoformülasyon
DMA:	Dimetilasetamid
DMSO:	Dimetil sülfoksit
EGCG:	Epigallokateşin-3-gallat
EYCE:	Yumurta sarısı pıhtılaştırma enzimi
FA:	Fulvik asit
FITC-PNA:	Floresein izotiyosiyanat-konjuge aglutin
G:	Glukoz
GR:	Glutasyon redüktaz
GSH:	Glutasyon
GSH-Px:	Glutasyon peroksidaz
GTE:	Yeşil çay ekstraktı
H:	Hyaluronik asit
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
HOST:	Hipo-ozmotik şişme testi
KPA:	Kriyoprotektan
L:	Laiciphos 488
LDL:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LPO:	Lipid peroksidasyonu
M:	Yağsız süt tozu
MDA:	Malondialdehit
MENF:	Nane nanoformülasyon
MLE:	<i>Moringa oleifera</i> yaprağı ekstraktı
MSE:	<i>Mucuna</i> tohumu ekstraktı
N:	<i>Nepeta</i>
NF:	Nanoformülasyon
NO:	Nitrik oksit
O ₂ ⁻ :	Süperoksit anyonları
OH:	Hidroksil
OS:	Oksidatif stres
QUE:	Kuersetin
PAE:	Semizotu sulu ekstrakt
PEE:	Semizotu etanolik ekstrakt
PME:	Semizotu metanolik ekstrakt
PUFA:	Çoklu doymamış yağ asidi

ROS:	Reaktif oksijen türevleri
RSV:	Resveratrol
SCD:	Sperm kromatin ayrılma testi
SCSA:	Sperm kromatin yapısı tayini
SOD:	Süperoksit dismutaz
T:	Tris
TAC:	Toplam antioksidan kapasite
TCG:	Tris-sitrik asit-glukoz
TdT:	Terminal deoksinükleotidil transferaz
TEE:	<i>Tribulus terrestris</i> etanol ekstraktı
TENF:	Kekik nanoformülasyon
TFLE:	<i>Turraea fischeri</i> yaprağı ekstraktı
WCE:	Su yoncası ekstraktı
°C:	Santigrad Derece
µl:	Mikrolitre
µM:	Mikromol

1. GİRİŞ

Hücresele Kriyoprezervasyon Hasarları

Sperm kriyoprezervasyon teknikleri, 1960'lerden bu yana rutin olarak infertilite kliniklerinde kullanılmaya başlanmıştır (Bahmyari vd 2020). Bu yöntem, özellikle en iyi germ-plazmasını çoğaltmak ve genetik çeşitliliği korumak amacıyla yapılan önemli bir teknik olarak uygulanmaktadır (Banday vd 2017).

Kriyoprezervasyon, sulandırma, soğutma, dondurma ve çözündürme aşamalarında (Yeni vd 2017, Ahmed vd 2019) meydana gelen soğuk ve ozmotik şoklara neden olan, spermelerin yüksek düzeyde adaptasyonunu içeren, fizyolojik olmayan bir işlem olarak tanımlanmaktadır (Ahmed vd 2019).

Kriyoprezervasyon sırasında sperm, soğuk şoku, kriyoprotektanların (KPA) eklenmesi, buz kristallerinin oluşumu, membran değişikliği, oksidatif stres (OS), dondurulmuş ortamın ozmolalitesinde artış (ozmotik stres) gibi birçok stres faktörüne maruz kalmaktadır (Farshad ve Akhondzadeh 2008, Moce ve Vicente 2009, Lv vd 2019a, Peris-Frau vd 2020). Fizyolojik miktarlarda, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonları (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH^-), nitrik oksit (NO) gibi reaktif oksijen türevleri (ROS) (Ahmed vd 2019); sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve zona pelusidaya bağlanma gibi sperm fonksiyonlarında önemli rol oynarlar (Amidi vd 2016). Dondurma-çözündürme işlemi sırasında ROS üretimi, OS'ye ve sperm kriyohasalarına neden olur. Kriyoprezervasyon işlemi sırasında, sıcaklığın $37^{\circ}C$ 'den $-196^{\circ}C$ 'ye düşmesi, önce ROS üretimini artırır (Bahmyari vd 2020), sonra ROS, sperm plazma membranı ile etkileşime girerek lipid peroksidasyonunun (LPO) ortaya çıkmasına neden olur. LPO oluşumu OS oluşumuna yol açar (Ahmed vd 2019). LPO'nun ürünlerinden biri malondialdehittir (MDA). MDA seviyesi, plazma membran hasarının bir göstergesidir, bunu takiben sperm canlılığı ve motilitesinde azalma meydana gelir (Mustofa vd 2021).

Sperm plazma membranı, yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) içerir. Membran, artan ROS üretimi ile birlikte, doğal antioksidanların detoksifikasyon aktiviteleri arasında dengesizlik oluşması nedeniyle, OS'ye ve özellikle ROS tarafından LPO'ya karşı oldukça hassas hale gelir (Dhillon vd 2020, Al-Mutary 2021).

OS, tekelerde motilite, plazma membran ve akrozomal bütünlükler dahil olmak üzere sperm yapılarına ve işlevlerine zarar verir. Ayrıca, spermin doğal antioksidanları ile ROS üretimi arasındaki dengenin bozulmasına neden olur. Bunlara ek olarak, OS tekelerde spermin mitokondriyal fonksiyonunu, DNA bütünlüğünü ve metabolizmasını olumsuz yönde etkiler (Ahmed vd 2019). Dolayısıyla, ROS üretimi, kriyoprezervasyon sürecinde sperm kalitesinin düşmesine yol açan önemli bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Teke sperm plazma membranı, fosfolipidler açısından zengin oksidasyona duyarlı PUFA içeriğine sahiptir (Ren vd 2019, Mustofa vd 2021). Sperm plazma membranının lipid bileşimi, membran akışkanlığını sağlamak ve ayrıca sperm kapasitasyonuna, akrozomal reaksiyona ve sperm-oosit membran füzyonuna izin vermesi için gereklidir. Sperm, PUFA içeriği nedeniyle LPO'ya duyarlıdır (Zarepourfard vd 2019). Kriyoprezervasyon sırasında aşırı ROS üretimi, sperm plazma membranındaki PUFA'ların LPO'suna neden olur ve böylelikle sperm membranında fiziksel ve kimyasal değişiklikler meydana gelir (Bahmyari vd 2020), Bu durum, spermin mitokondri ve plazma membranlarının yapılarının bozulmasına, kromozom ve DNA fragmentasyonuna yol açar, motilitesini, canlılığını (Amidi vd 2016) ve fertilizasyon potansiyelini azaltır (Bahmyari vd 2020). Spermin %50'ye varan kısmı dondurulup çözdürüldükten sonra canlılığını kaybeder (Gangwar vd 2016, Lv vd 2019a). Kriyoprezervasyon işleminde, motilitenin en fazla etkilenen parametre olduğu bildirilmiştir (Sharma vd 2015).

Dondurma-çözdürme işlemi sırasında hücre hasarının başlıca nedenlerinden birisi de, hücre içi buz kristallerinin oluşumudur. Hedef, kriyoprezervasyon sırasında farklı KPA'lar ile toplam çözünen konsantrasyonunu ve hücrel dehidrasyon derecesini artırmak ve soğutma veya ısınma hızını değiştirerek buz kristali oluşumunun miktarını azaltmaktır. Ayrıca, hücrel dehidrasyonun bir yandan da ozmotik şoka sebep olduğu bilinmektedir (Kopeika vd 2015).

Sonuç olarak, spermin dondurma-çözdürme işlemi sırasında oluşan OS ve ozmotik stres, sperm membran lipid ve protein kompozisyonunu değiştirir, motiliteyi, canlılığı, akrozom ve membran bütünlüğünü azaltır ve sperm DNA'sına ve mitokondriye zarar verir. Ayrıca, dondurma-çözdürme işlemleri, lipid membranların yeniden

düzenlenmesine yol açar, bu da dondurulmuş-çözdürülmüş spermde kapasitasyona benzer değişikliklerin başlatılmasından sorumlu olan membran akışkanlığının artmasına ve hücre içi kalsiyumun miktarının yükselmesine neden olur. Kriyoprezervasyon sırasında sperm yapısında ve fonksiyonundaki değişiklikler, aynı zamanda, lipidler, DNA ve proteinlerde reaksiyonlara sebep olduğundan, hücre hasarlarının artmasına neden olan ROS üretimine de yol açar. Sperm membranının PUFA bakımından zengin yapısı, LPO ve sekonder metabolitlerin oluşması nedeniyle OS'nin zararlı etkilerine karşı oldukça duyarlıdır (Lone vd 2019).

Kriyoprotektanların Etkileri

Seminal plazma ve sperm, yüksek oranda doğal antioksidan kapasitesine sahiptir (Zarepourfard vd 2019). Tipik olarak seminal plazma, hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanlar içerir (Al-Mutary 2021, Mustofa vd 2021). Bununla birlikte, OS'ye karşı koruyucu etkileri, saklamadan önce sulandırıcıda semen seyreltmesini takiben önemli ölçüde zayıflar (Al-Mutary 2021). Seminal plazma ve sperm, enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) (Dhillon vd 2020, Peris-Frau vd 2020, Mustofa vd 2021) ve enzimatik olmayan antioksidanlar; glutatyon (GSH), düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar (askorbat, α -tokoferol ve β -karoten), transferrin, laktoferrin ve seruloplazmin (Zamiri 2020), piruvat, ürat, taurin, hipotaurin (Peris-Frau vd 2020) ve albümin gibi ROS'u temizleyen ve olası hücre hasarı önleyen bir dizi koruyucu antioksidanları içerir (Collodel vd 2011, Moretti vd 2012).

Genel olarak, kriyoprezervasyon prosedürleri sperm hücrelerine zarar verse de, bu hasarın derecesi spermelerin direncine bağlıdır ve türler arasında değişiklikler gösterir (Yeste 2016). Sperm boyutu, şekli ve lipid-protein bileşimi açısından türler arasındaki farklılıklar, kriyoprezervasyon işleminin tüm türler arasında eşit derecede verimli olmadığını gösterir (Peris-Frau vd 2020). Türler arasında, sperm plazma membran bileşimindeki farklılıklar nedeniyle, kriyoprezervasyon sürecine dayanabilme kabiliyetlerinde de farklılıklar vardır. Bu nedenle, kriyoprezervasyon işleminde evrensel bir protokol yoktur ve her bir tür, hatta ırk için sperm kriyoprezervasyon protokolünde sulandırıcı bileşimi, KPA'lar ve KPA seviyelerinin ayarlanması gereklidir (Moce ve Vicente 2009). Sperm kriyotoleransı ile çözdürülme sonrası sperm kalitesi, donma ortamına eklenen KPA'lar, antioksidanlar ve diğer bileşenlerin türünden ve bunların konsantrasyonundan etkilenebilir (Peris-Frau vd 2020).

Kriyoprezervasyon sonucu oluşan kriyohasarlari en aza indirmek amacıyla farklı KPA'lar kullanılmaktadır. KPA'lar, düşük moleküler ağırlıklı ve spermi buz kristalleşmesi ile donma hasarından korumaya hizmet eden yüksek ölçüde geçirgen kimyasallardır (Said vd 2010, Said ve Agarwal 2012). Maddenin donma noktasını düşürerek, örneğin likit fazındaki tuz ve çözülmüş madde miktarını ve sperm içinde buz kristallerinin oluşumunu azaltarak etki gösterirler (Said vd 2010). KPA'lar, sperm üzerinde OS ile indüklenen kriyohasarlari önlenmesinde antioksidanlar olarak önemli rol oynarlar (Bansal ve Bilaspuri 2011, Said ve Agarwal 2012).

OS'yi nötralize etmek için farklı antioksidanlar (enzimatik ve enzimatik olmayan) araştırılmıştır. Son zamanlarda, Amidi ve ark. (2016) kriyoprezervasyon sırasında E vitamini, GSH, SOD, CAT, C vitamini, L-sistein, ergotionin, melatonin, selenyum, genistein, resveratrol (RSV), kuersetin (QUE), biberiye ve *Rhodiola sacra* sulu ekstraktları gibi doğal bitkilerin insan ve hayvan sperm kalitesi üzerinde etkinliğini gözden geçirmiştir. ROS üretimine karşı antioksidanların insan, teke, koç, boğa, köpek ve domuz sperm kalitesi üzerinde koruyucu etkisini bildirmişlerdir (Amidi vd 2016, Bahmyari vd 2020).

Antioksidan olan hipotaurin ve sisteamin, Ankara teke sperm kalitesini dondurulup çözülmesinden sonra ROS oluşumunu etkilemeden ve antioksidan kapasitesini yükseltmeden sperm motilitesini, morfolojisini ve fonksiyonel membran bütünlüğünü iyileştirmiştir (Bucak vd 2009a). %5 gliserol veya dimetil sülfoksit (DMSO) varlığında bütülleniş hidroksianisol (BHA), Mahabadi tekelerinde üreme mevsimi boyunca çözülme sonrası daha iyi sperm kalitesi ile sonuçlanmıştır (Rahmatzadeh vd 2017). Piridoksin'in tek başına veya E vitamini, C vitamini ve melatonin ile özel kombinasyonlar halinde, Batı Afrika cüce tekelerinde kriyoprezerve edilmiş sperm kalitesini iyileştirdiği ve OS parametrelerini azalttığı belirtilmiştir (Daramola vd 2017a).

Bitkiler tarafından sentezlenen düşük molekül ağırlıklı biyoaktif polifenoller, flavonoidler olarak tanımlanır (Deveoğlu ve Karadağ 2011, Tanwar ve Modgil 2012). Flavonoidler, meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda, kabuklarda, köklerde, saplarda, çiçeklerde, çay ve şarapta (Kahraman vd 2002, Moretti vd 2012, Zhandi vd 2017) yani bitkisel gıdalarda bol miktarda ve yaygın olarak bulunan maddelerdir (Kahraman vd 2002). Flavonoidler; temel olarak 6 sınıfa ayrılmaktadır; flavonlar, flavanonlar, flavonoller, flavanoller (Zhandi vd 2017, Ye vd 2020), izoflavonlar, antosiyanidinler (Çapanoğlu ve Boyacıoğlu 2009, Atınç ve Kalkan 2018). Flavonoidlerin birçok araştırmada antioksidan, antihipertansif, antimutajenik, antiproliferatif, antitümör,

antiinflamatuvar (Atınç ve Kalkan 2018, Wang vd 2019), antimikrobiyal (antibakteriyel, antifungal, antiviral) (Deveoğlu ve Karadağ 2011, Rashid vd 2019), hepatoprotektif, antidiyabetik (Tanwar ve Modgil 2012), bağışıklık uyarıcı, antiapoptotik (Ye vd 2020), antialerjik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Deveoğlu ve Karadağ 2011). Hemen hemen her flavonoid grubunun en iyi tanımlanan özelliği, antioksidan görevi görme kapasiteleridir. Flavonlar ve kateşinler, vücudu ROS'a karşı korumak için en güçlü flavonoidlerdir (Tanwar ve Modgil 2012). Çeşitli bitki ekstraktları flavonoidler, tanenler, kumarinler, kurkumanoidler, ksantonlar, fenolikler, lignanlar ve terpenoidler gibi antioksidan bileşikler içerir. Spermin dondurma-çözdürme sürecinde bitkisel ekstraktların doğal antioksidanlar olarak kullanılmasının sperm kalitesi üzerinde olumlu etkileri olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Vahedi vd 2018). Spermin işlenmesi sırasında aşırı ROS üretiminin etkisini azaltmak ve dondurma ortamının antioksidan kapasitesini artırmak için antioksidan aktiviteye sahip doğal maddeler ilave edilebilmektedir (Greifova vd 2017).

Birçok çalışma, farklı doğal bitkilerin antioksidan özelliklerini ortaya koymuştur. Tekelerde, bitkilerden ekstrakte edilen antioksidanların dondurma sulandırıcısına eklenmesinin, kriyoprezervasyon sırasında spermleri OS'den koruduğu rapor edilmiştir (Ren vd 2019). Ayrıca, biberiye (*Rosmarinus officinalis*), rezene (*Foeniculum vulgare*), rhodiola sacra (*Rhodiola rosea* L.) ve sardunya (*Pelargonium graveolens*) ekstraktlarının sperm kalitesini artırdığı, LPO'yu azalttığı ve *in vitro* fertilizasyon parametrelerini iyileştirdiği gösterilmiştir (Luno vd 2015). Tris sulandırıcısına %4 seviyesinde biberiye sulu ekstraktının eklenmesi, Kurdi tekelerinde çözdürme sonrası sperm kalitesini iyileştirmiştir (Zanganeh vd 2013). Tris-sitrik asit sulandırıcıya %20 konsantrasyonda avokado çekirdeği ekstresi eklenmesi, Batı Afrika cüce tekelerinde sperm motilite, canlılık, plazma ve akrozomal membran bütünlüğü ile OS indekslerini iyileştirmiştir (Olamitibo vd 2016). %3 su yoncası ekstraktı ile yumurta sarısı-yağsız süt sulandırıcı ilavesi, tekelerdeki sperm anormalliği üzerinde hiçbir etki olmaksızın çözdürme sonrası motilite, canlılık ve plazma membran bütünlüğünde (%8-15) iyileşme ile sonuçlanmıştır (Wahjuningsih vd 2019a). %6 konsantrasyonda Tris-yumurta sarısı sulandırıcısına eklenen incir meyvesinin (*Ficus carica* L) ekstraktı, 5°C'de depolanan teke sperminin kalitesindeki düşüşü azaltmıştır (Zaenuri vd 2014). Daramola ve ark. (2016), dondurulmuş Batı Afrika cüce teke spermi üzerinde Tris-yumurta sarısı sulandırıcılarında portakal (*Citrus sinensis*), salatalık (*Cucumis sativus*) ve ananas (*Ananas comosus*) sularının ve bunların kombinasyonlarının etkilerini incelemiştir. Bulguları, %10 oranında portakal ve ananas ile desteklenen sulandırıcıların, çözdürme sonrası motiliteyi, akrozomal ve membran bütünlüğünü sürekli olarak iyileştirdiğini ve

bu meyvelerin belirli bir kombinasyonunu içermeyen kontrol sulandırıcısına göre sperm anormalliğini azalttığını göstermiştir (Daramola vd 2016).

Nepeta L., Lamiaceae familyasının en büyük cinsidir (Sharma vd 2021). Bu cinsin, çoğu aromatik olan yaklaşık 300 türü bulunmaktadır (Açar vd 2011). Dünya genelinde yayılış gösteren bu cins, genellikle çok yıllık bitkileri içerir (Sarıkürkçü vd 2019). Endemizm oranı %50 olan *Nepeta* (Lamiaceae) cinsi (Açar vd 2011, Acimovic vd 2020) Türkiye’de 19’u endemik olmak üzere toplam 50 takson ve 39 tür ile temsil edilmektedir (Yılmaz vd 2020). *Nepeta* türleri; antioksidan (Azizian vd 2021), antikanser, antiparazit (Ashrafi vd 2020), antibakteriyel, antiinflamatuvar (Kaska vd 2019, Sitarek vd 2020), antiplatelet, antianjiyogenez (Al-Sheddi vd 2018), antimikrobiyal, antiviral (Sharma ve Cannoo 2013, Afshar vd 2017), antifungal, insektisit (Süntar vd 2018, Sharma vd 2021), sitotoksik, fitotoksik (Formisano vd 2011), genotoksik, antitümör, larvisit, analjezik, antidepresan, antikonvülsan gibi çok sayıda biyolojik aktiviteye sahiptir (Süntar vd 2018, Akdeniz vd 2020). *Nepeta italica* subsp. *cadmea* (Boiss.) A. L. Budantsev, *Nepeta* cinsinin endemik türlerinden biridir ve Türkiye’nin Batı, Güney ve Güneybatı Anadolu bölgelerinde yayılış göstermektedir (Dirmenci 2003). *Nepeta italica* subsp. *cadmea*’nın hidroetanolik ekstraktının total flavonoid içeriği 60.89 ± 1.30 mgQEs/g olarak tespit edilmiştir ve nepetalakton bakımından oldukça zengindir (Kaska vd 2019).

1.1. Amaç

Üreme biyolojisinde, bitkisel içeriklerin, sperm üzerindeki kriyoprotektif etkilerinin araştırıldığı çalışmalar, dondurma-çözdürme sonrası spermelerde meydana gelen kriyohasarlara KPA’lar olarak en aza indigeme potansiyeline sahip olabileceklerini göstermektedir. Bu çalışmanın amacı, farklı konsantrasyonlarındaki antioksidan ve flavonoidler içeren *Nepeta italica* subsp. *cadmea* ekstraktının, teke sperm kriyoprezervasyonu sonrası, sperm kriyohasarlara üzerinde beklenen olası iyileştirici etkilerini aşağıdaki parametrelere dayandırarak değerlendirmektir.

1. Sperm motilitesi
2. Sperm akrozomal membran bütünlüğü
3. DNA fragmentasyonu ve istatistiksel analizleri

Sonuç olarak, bu çalışmada, yukarıda belirtilen parametrelerin analizlerinin sonucunda elde edilecek veriler değerlendirilerek, bitki esansiyel yağının hangi dozunun bu parametreler üzerinde olası daha iyi kriyoprotektif etkisinin olup olmadığı belirlenecektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Kriyoprezervasyon

Kriyoprezervasyon, hücrelerin ve dokuların çok düşük sıcaklıkta soğutularak, bütün biyolojik aktivitelerinin durdurulması, minimum hasar ve fonksiyon kaybı olmaksızın gelecekte kullanılması amacıyla uzun süre saklanmasını ifade eder (Tunalı 2014, Yeni vd 2017). Kriyoprezervasyon, hücre yapısı üzerinde zararlı etkilere neden olmasına rağmen sıfır sıcaklıklarda spermin canlılığını, minimum hasarı ve işlevselliğini korumayı amaçlamaktadır (Grötter vd 2019).

Sperm kriyoprezervasyonu, ilk olarak Lazaro Spallanzani'nin 1776'da yaptığı araştırmasında spermi karda soğutarak korumaya çalıştığı (Hezavehei vd 2018, Grötter vd 2019) ve dondurulan spermlerin çözdürüldükten sonra motilitelerini az da olsa koruyabildiklerini gözlemlemesi sonrası gelişmeye başlamıştır (Tunalı 2014). 1949'da Polge ve ark. tarafından gliserolün KPA özelliklerinin keşfi ile önemli bilimsel ilerlemeler kaydedilmiştir (Hezavehei vd 2018). Geçirgen bir kriyoprotektif ajan olarak gliserolün keşfinden ve daha sonra 1959'da Lovelock ve Bishop tarafından DMSO'nun bulunmasından sonra birçok farklı hücre dondurularak saklanmıştır (Sieme vd 2016).

1949'da Polge ve ark. gliserolün kanatlı sperması üzerindeki kriyoprotektif etkisini doğrulamışlardır. Bu bulgudan esinlenerek, gliserolün teke sperması üzerindeki etkileri ilk olarak 1950'lerde değerlendirilmiştir. Spermlerin %50'ye varan kısmı dondurup çözdürüldükten sonra canlılığını kaybeder. Dondurma-çözdürme sırasında spermatozoa, buz kristallerinin oluşumu, soğuk şoku, kimyasal toksisite, ozmotik stres ve OS gibi çeşitli stres türleriyle yüzleşmek zorundadır. Bu stresler öncelikle plazma membranını etkiler ve sonuç olarak fertilizasyon oranının düşmesine yol açar (Lv vd 2019a).

Kriyoprezervasyon sırasında ozmotik stres ağırlıklı olarak hücre dışı buz kristallerinin oluşmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, kriyoprotektif ajanların eklenmesi ve çıkarılması da hücreleri ozmotik strese maruz bırakır (Sieme vd 2015, Najafi vd 2019). OS, zayıf sperm fonksiyonunun etiolojisinde önemli bir faktördür, morfolojik değişikliklere ve DNA, membranlar ve proteinlerde oksidatif hasara neden olur. Ayrıca, fazla ROS ve serbest radikal oluşumu, infertil erkeklerin seminal plazmasında ve spermde sıklıkla tespit edilmiştir (Moretti vd 2012). OS, ROS'un üretimi arttığında veya spermde antioksidan savunmaları azaldığında meydana gelen dengesizlik sonucu oluşur (Avdatek vd 2018, Najafi vd 2019). Dondurma-çözdürme süreçleri, sperm membranında OS'ye neden olarak, sperm yapısında geri dönüşü olmayan hasara ve ayrıca membran akışkanlığında ve enzimatik aktivitede değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler sadece sperm motilitesini, canlılığını ve fertilizasyon yeteneğini bozmakla kalmaz, aynı zamanda DNA hasarını da artırır (Alçay vd 2016).

Sperm kriyoprezervasyon işlemi infertilite çalışmalarında faydalı bir teknik olmakla birlikte, hücrelerde morfoloji, motilite, canlılık ve DNA bütünlüğü dahil olmak üzere hücre düzeyinde oluşturduğu hasarlarla, sperm çözülme sonrası kalitesini olumsuz etkiler (Zribi vd 2012). Bu hasarlar, çözülme sonrası sperm kalitesinde en az %50 kadar düşüşe yol açar (Amidi vd 2016, Banday vd 2017). Teke spermi plazma membranı, diğer geniş getiren hayvanlara kıyasla, fosfolipidler bakımından zengin PUFA içeriğine sahiptir (Ren vd 2019, Falchi vd 2020, Wahjuningsih vd 2021b). Dolayısıyla, ROS miktarı ile sperm doğal antioksidan aktivitesi arasındaki dengesizlik nedeniyle OS'ye ve özellikle ROS tarafından meydana gelen LPO'ya karşı oldukça hassastır (Al-Mutary 2021). Kriyoprezervasyon işleminde LPO'ya yatkınlık nedeniyle, teke spermine zarar verebilecek yüksek bir OS, toksik yağ asidi peroksitlerinin birikmesine yol açar (Ren vd 2019).

Tipik seminal plazma ve sperm, ROS'u temizleyen ve olası hücre hasarı önleyen, CAT, SOD, GSH-Px gibi çeşitli enzimatik antioksidanlar ve GSH, E vitamini, C vitamini, urat ve albümin gibi enzimatik olmayan antioksidanlar içerir (Moretti vd 2012, Najafi vd 2019). Hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanların OS'ye karşı koruyucu etkileri, saklamadan önce sulandırıcıda semen seyreltilmesini takiben önemli ölçüde azalır (Al-Mutary 2021). Semen bir antioksidan sisteme sahip olmasına rağmen, bu sistemin aktivitesi LPO'nun yoğunluğunu artıran kriyoprezervasyon işleminden etkilenir. Bu nedenle, doğal antioksidanlar, dondurma-çözdürme işlemi sırasında sperm hücrelerinde LPO'yu önlemede yetersiz kalmaktadır. Bundan dolayı,

sulandırıcıya antioksidanların eklenmesi olumlu sonuçlar ortaya çıkartır (Mehdipour vd 2020). Sonuç olarak, ROS dengesini korumak ve saklama sırasında spermleri OS'den korumak için, dondurmadan önce semen sulandırıcılarına eksojen antioksidanların eklenmesi gerekmektedir (Seifi-Jamadi vd 2016, Zhu vd 2017, Al-Mutary 2021). Dondurma ortamının çeşitli antioksidanlar (E vitamini benzeri, glutatyon, L-sistein, melatonin, L-karnitin, taurin, hipotaurin, CAT, SOD, kolesterol yüklü siklodekstrinler) ile desteklenmesi sperm motilitesini, canlılığını, DNA bütünlüğünü iyileştirir, akrozomal membran bütünlüğünü korur ve LPO'yu ve ROS üretimini azaltır (Hezavehei vd 2018).

Kriyoprezervasyon işleminde kriyoprotektanların kullanılmasına yönelik çok farklı maddelerle yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Tekelerde, Tris-sitrik asit sulandırıcısına arbutin eklenmesinin, motiliteyi, akrozomal membran bütünlüğünü ve membran akışkanlığını olumlu yönde etkileyerek kriyoprezerve teke sperm kalitesini iyileştirdiği belirlenmiştir (Aboagla ve Maeda 2011). Motilite, membran ve DNA bütünlüğü gibi spermatolojik parametrelerinin tümü, sisteamin ve bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) eklenmesinin ardından artmıştır (Alçay vd 2016). Yousefian ve ark. (2018), sulandırıcıya koenzim Q₁₀ eklenmesinden sonra çözülen spermde motilite ve canlılık açısından olumlu etkiler bildirmiştir. Fulvik asitlerin ise motiliteyi ve membran bütünlüğünü artırdığı gözlenmiştir (Xiao vd 2018).

Spermlerin şekil, hacim, organellerin boyutu ve bileşiminde farklılıklar olduğu için kriyoprezervasyon protokolleri türler arasında farklılık gösterir (Barbas ve Mascarenhas 2009). Bu işlem, minimal sitotoksik etkileri olan kriyoprotektif ajanların kullanımını gerektirmekle birlikte, maksimum canlılık için belirli bir soğutma hızını da gerektirir (Sieme vd 2016). Dondurma hızına göre, sperm kriyoprezervasyon teknikleri iki ana kategoriye ayrılır: yavaş dondurma (geleneksel) ve hızlı dondurma (vitrifikasyon) (Said vd 2010, Rosato ve Iaffaldano 2013).

Kriyoprezervasyon, hızlı dondurma ve yavaş dondurma yöntemleri kullanılarak ya da programlanabilir bir dondurucu ile yapılabilmektedir. Bu yöntemlerde, sperm hücrelerinde buz kristallerinin oluşumunu önlemek için işlenmiş bir semen örneğine düşük moleküler ağırlıklı bir KPA eklenir. Bu kimyasallar ozmotik basıncı ve pH'yı optimize eder, spermlere hücre dışı enerji sağlar ve bakteriyel kontaminasyonu engeller (Sharma vd 2015).

2.2. Kriyoprotektanlar

Kriyoprezervasyon hasarlarını en aza indirmek için kriyoprotektif ajanlar kullanılır, ancak çok yüksek konsantrasyonlarda kullanımı hücreler için toksik etki yaratır (Sieme vd 2016). Hücreyi kriyoprezervasyon sürecinde çeşitli kriyohasarlara karşı korumak için sulandırıcı ortamına eklenen KPA'lar (Saraswat vd 2013, Allai vd 2018), bir maddenin donma noktası ile (sıvı fazında bulunan tuz ve çözücü miktarını azaltarak) sperm içinde buz oluşumunu azaltarak etki gösterir (Said vd 2010). Çözdürme sonrası hücre sağkalımını en üst düzeye çıkarmak için, yeterli bir soğutma hızı sağlamak, böylece kriyoprezervasyonun meydana geldiği sulu çözeltilerin fiziksel-kimyasal davranışını değiştirmek gerekir. Bu nedenle, dondurucu ortama kriyoprotektif ajanlar eklenir. Temel işlev, belirli bir çözeltilinin sıvı halde kaldığı minimum sıcaklığın azaltılmasıdır (Grötter vd 2019).

KPA'lar, plazma membranına diffüz etme kapasitelerine göre iki sınıfa ayrılmaktadır (Saraswat vd 2013);

İnternal kriyoprotektanlar (geçirgen kriyoprotektanlar): Bunlar, Gliserol, DMSO, etilen glikol, metanol ve propilen glikoldür (Saraswat vd 2013, Gangwar vd 2016, Xin vd 2017, Li vd 2019). Geçirgen kriyoprotektif ajanlar genellikle küçük iyonik olmayan moleküllerdir. En yaygın olarak kullanılan hücre membranını geçen kriyoprotektif ajanlar DMSO ve gliseroldür (Sieme vd 2016). Hücre içindeki viskoziteyi artırır, böylece su moleküllerinin buz kristalleri oluşturmasını önlerler (Xin vd 2017). Membran lipid ve proteinlerinin yeniden düzenlenmesine neden olarak membran akışkanlığının artmasına, düşük sıcaklıklarda daha fazla dehidrasyona, hücre içi buz oluşumunun azalmasına ve kriyoprezervasyona kadar hayatta kalmanın artmasına neden olur. Ek olarak, bu KPA'lar, kriyoprezervasyon ortamında şekerleri ve tuzları çözen çözücülerdir (Barbas ve Mascarenhalar 2009).

Eksternal kriyoprotektanlar (geçirgen olmayan kriyoprotektanlar): Yumurta sarısı, fruktoz, laktoz, mannoz, rafinoz ve trehaloz (Saraswat vd 2013), sukroz, albüminler, dekstran, hidroksietil ve polietilen glikollerdir (Xin vd 2017, Li vd 2019). Bu KPA'lar, kristalleşme ve yeniden kristal oluşma durumu gibi dondurma-çözdürme olaylarının neden olduğu hücresel hasarı önler (Xin vd 2017). Ayrıca, bunlar plazma membranını geçemez ve yalnızca hücre dışı olarak etki ederler. Bu nedenle, geçirgen olmayan kriyoprotektanlar, ortamın donma sıcaklığını düşüren ve hücre dışı buz

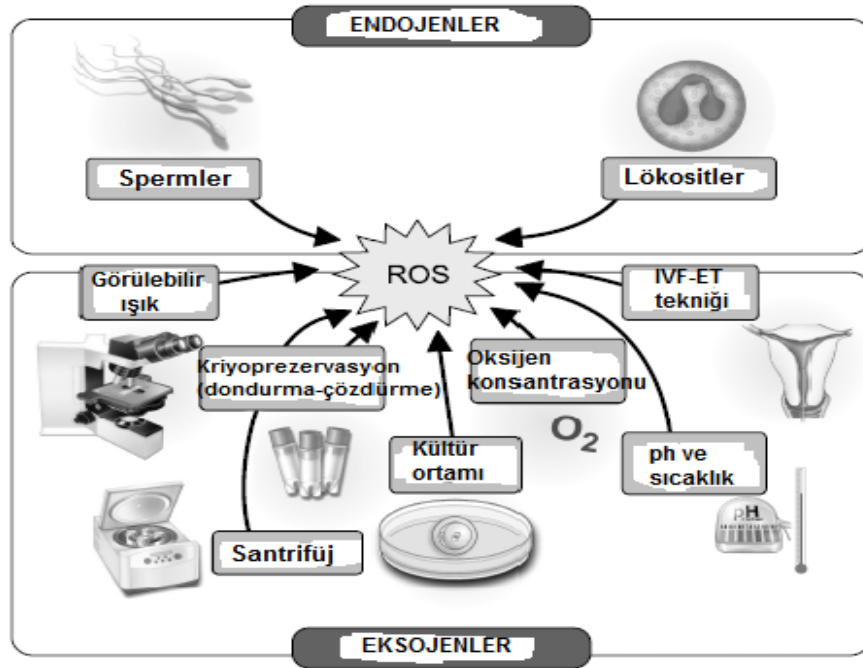
oluşumunu azaltan bir çözünen madde olarak hareket ederler (Barbas ve Mascarenhalar 2009) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 Kriyoprotektif ajanlar (Elliott vd 2017)

Alkoller ve Türevleri	Şekerler ve Şeker Alkolleri	Polimerler	Sülfoksitler ve Amidler	Aminler
Metanol	Glikoz	Polietilen glikol	Dimetil sülfoksit	Prolin
Etanol	Galaktoz	Polivinil piroolidon	Asetamid	Glutamin
Gliserol	Laktoz	Dekstranlar	Formamid	Betain
Propilen glikol	Sükroz	Fikol	Dimetil asetamid	
Etilen glikol	Trehaloz	Hidroksiletil		
	Rafinoz	Serum proteinleri		
	Mannitol	Süt proteinleri		
	Sorbitol	Peptonlar		

2.3. Kriyoperzervasyon Sırasında Oksidatif Stresin Sperm Kalitesi Üzerine Etkileri

Seminal plazmanın antioksidan kapasitesini aşan kontrolsüz ROS üretimi, sperm için zararlı olan OS'ye yol açar. Lipidler, proteinler, nükleik asitler ve şekerler dahil tüm hücrel bileşenler OS'nin potansiyel hedefleridir (Bansal ve Bilaspuri 2011) (Şekil 2.1).



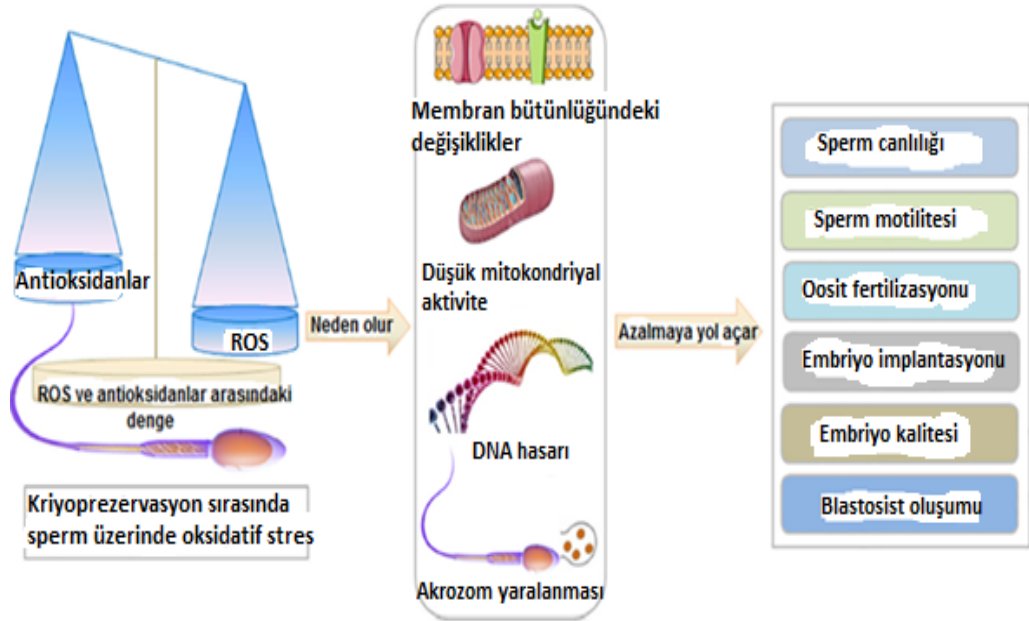
Şekil 2.1 Reaktif oksijen türevlerinin kaynakları (Agarwal ve Majzoub 2017)

Sınırlı miktarda, H_2O_2 , O^{2-} ve OH^- gibi ROS üretimi (Amidi vd 2016), sperm kapasitasyonu, hiperaktivasyon akrozom reaksiyonu, zona pelusidaya bağlanma ve orta parçadaki mitokondriyal kapsülün stabilizasyonu gibi spermin normal fizyolojik fonksiyonları ile ilişkilidir (Bansal ve Bilaspuri 2011, Amidi vd 2016, Mehdipour vd 2016).

Tipik olarak seminal plazma hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanlar içerir. Bununla birlikte, OS'ye karşı koruyucu etkileri, kriyoprezervasyondan önce semenin sulandırıcılarla seyreltilmesi sonucu önemli ölçüde zayıflar. Ayrıca, yüksek PUFA seviyeleri ve spermin doğal antioksidan aktivitesi ile ROS seviyeleri arasındaki dengesizlik nedeniyle, spermin plazma membranı OS'ye ve özellikle ROS tarafından LPO'ya karşı oldukça hassas hale gelir (Al-Mutary vd 2021).

Sperm kriyoprezervasyonu sırasında ROS üretimi arttığı için, plazma membranındaki PUFA'ların LPO'su olur ve sonuçta özellikle MDA gibi sitotoksik sekonder ürünler ortaya çıkar. Böylece ROS ile antioksidan aktiviteler arasındaki denge ortadan kalkar (Mehdipour vd 2016). Bu durum, yüksek ROS konsantrasyonlarına maruz kalma, mitokondriyal ve plazma membranlarının bozulmasına, kromozomal ve DNA fragmentasyonuna neden olmakla birlikte sperm motilitesinde ve canlılığında

azalmaya yol açar. ROS varlığı ile sperm antioksidan aktivitesi arasındaki dengesizlik, sperm kriyohasasının ana nedenidir (Amidi vd 2016). Bununla beraber, fertilizasyon bozulur, implantasyon ve gebelik engellenir, bölünme oranı en aza indirgenir, embriyo kalitesini düşer ve blastosist oluşumu gerçekleşmez (Al-Mutary vd 2021) (Şekil 2.2). Sonuç olarak, ROS varlığı ile sperm antioksidan aktivitesi arasındaki dengesizlik, sperm kriyohasasının ana nedeni olduğu söylenebilir (Amidi vd 2016).



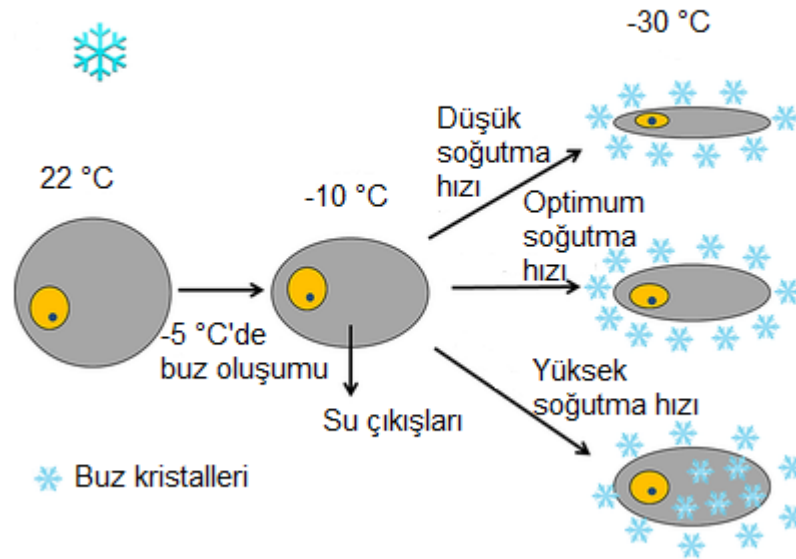
Şekil 2.2 Kriyoprezervasyon işlemi sırasında oksidatif stresin sperm kalitesi üzerine etkileri (Al-Mutary vd 2021)

2.4. Dondurma-Çözdürme Sırasında Kriyohasalarının Prensipleri

Kriyoprezervasyon, hücre yapısı üzerinde zararlı etkilere neden olmasına rağmen sıfır sıcaklıklarda sperm canlılığını ve işlevselliğini korumayı amaçlamaktadır. 1972’de “iki faktör hipotezi” kavramı ileri sürülmüştür. Belirtilen hipoteze göre, kriyoprezervasyon sırasında hücresel hasarın iki farklı mekanizma yoluyla gerçekleştiği belirtilmektedir: 1) buz kristallerinin oluşumu, 2) hücresel dehidratasyon veya ozmotik stres. Bu faktörlerin her ikisinde de soğutma hızı önemlidir (Grötter vd 2019).

Spermiler, sıcaklık değişimlerine oldukça hassastır (Aka vd 2017). Soğutma hızı, spermdeki kriyohasasının derecesini belirlemede önemli bir rol oynar (Said vd 2010).

Dondurma-çözdürme prosedürlerinde temel sorun, düşük sıcaklıklarda hücre içi ve hücre dışı suyun faz değişimi ile ilişkili olan kriyohasardır (Yeste 2016). Bununla birlikte, düşük sıcaklıklardan ziyade, dondurma ve çözdürme sırasında hücreler için temel zorluk, sıvı azot sıcaklığında depolama süresine direnme yetenekleri değil, -15°C ile -60°C arasındaki bir ara sıcaklık aralığının zararlıdır (Yeste 2016, Grötter vd 2019). Hücreler ve hücre dışı ortam, donmamış halde kalır. -5°C ile -15°C arasındaki sıcaklıklarda, çevre ortamda buz oluşur, ancak hücre içi içerikler donmamış ama aşırı soğutulmuş olarak kalır. Suyun kimyasal potansiyeli, aşırı soğutulmuş (hücre içi) donmuş (hücre dışı) durumdan daha yüksek olduğu için, su hücre dışına çıkar ve dışarıda donar. Soğutma hızı bundan sonra ne olacağını belirler. Sıcaklık -5°C 'ye düşürüldüğünde, çevre ortamda buz oluşur ve su hücreden dışarı çıkar (Yeste 2016) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Kriyoprezervasyon işlemi sırasında hücrede meydana gelen fiziksel olaylar (Grötter vd 2019).

Kriyoprezervasyon işlemi sırasında soğutma hızı çok yüksek olursa intraselüler sıvının difüzyonu yeterli olamayacağı için hücre içinden su tamamen çıkamaz ve sitoplazmada buz kristallerinin oluşması sonucunda kriyohasar oluşur (Yeste 2016, Aka vd 2017, Grötter vd 2019). Hızlı soğutmada, çok hızlı bir şekilde buz kristalleri oluşur ve yavaş soğutma yöntemine göre oluşan buz kristallerinin boyutu daha küçüktür (Aka vd 2017). Hücre içi buz oluşumu sadece soğutma hızına ve sıcaklığa değil, aynı

zamanda KPA konsantrasyonuna da bağılı olduğundan, bu ajanların kullanımı bu oluşumu hafifletebilir (Yeste 2016). Yavaş soğutmada hücre dışı buz kristalleri büyük boyutlu ve çok miktarda olur (Aka vd 2017). Soğutma hızı çok yavaşsa, hücre içi buz kristalleri oluşumu olmaz, suyun çoğu dışarı çıkar, dehidratasyon aşırı olur (Yeste 2016, Grötter vd 2019) ve hücrel dehidratasyon ve ozmolarite değişikliklerine bağlı hücre hasarı ve ölümü gerçekleşebilir (Aka vd 2017). Ortaya çıkan hipertonic stres, elektrolit dengesini değiştirebilir ve böylece, hücrelerin normal izotonik hacminin ötesinde şişmesine ve daha sonra çözülme üzerine lize olmasına neden olabilir (Yeste 2016). Spermiler, yavaş dondurma yöntemi sonrası hızlı çözdürülürse, hücre içine hızlı difüzyon sonucu, ödem ve ozmotik şok oluşur, böylelikle lize uğrayabilirler (Aka vd 2017).

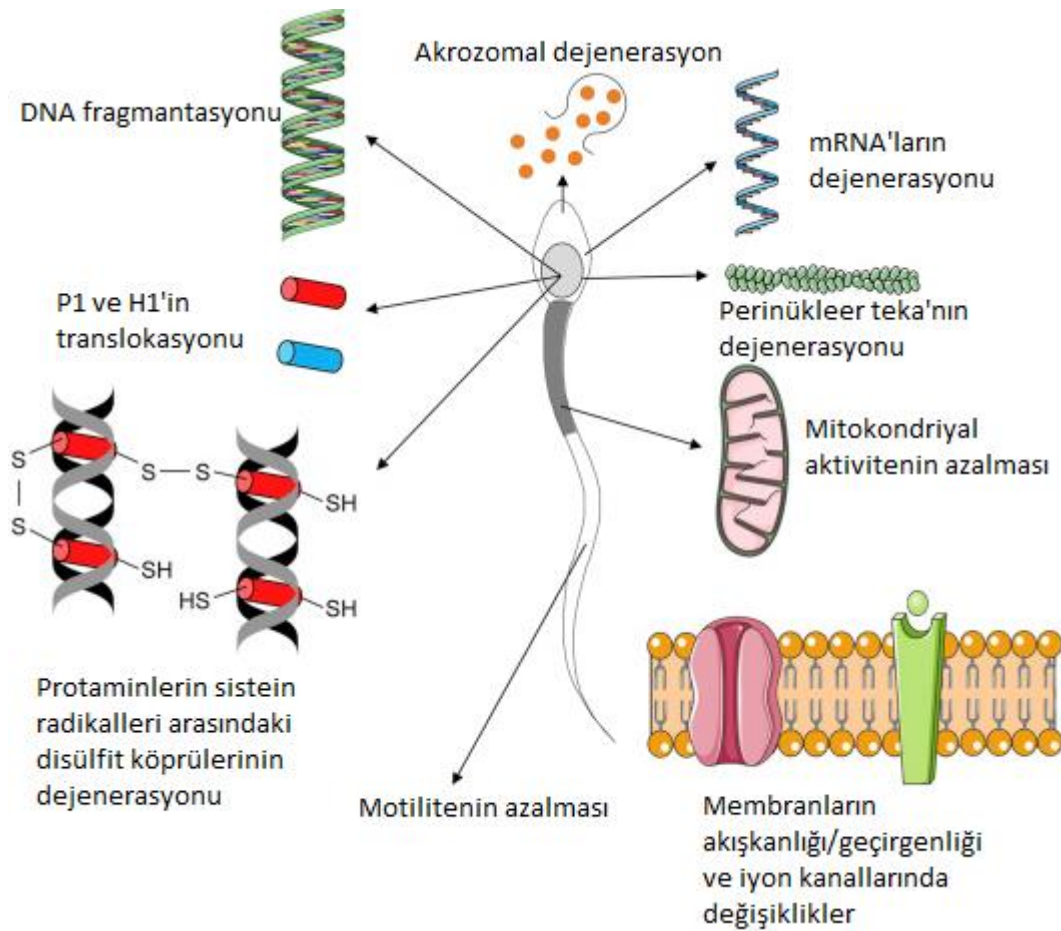
Hücre canlılığının korunmasında, soğutma işleminin optimum sürede yapılması kritik önem taşır (Aka vd 2017). Optimal soğutma hızları, hücre içi buz oluşumunu önleyecek kadar düşük, ancak çözünen konsantrasyon ve hacim büzülmesinden dolayı kriyohasarlara en aza indirecek kadar yüksektir (Yeste 2016). Sperm motilitesi, plazma membran bütünlüğü ve mitokondriyal fonksiyon soğutma hızlarıyla ters orantılıdır, bu da çok hızlı veya çok yavaş soğutma hızlarının bu parametrelerin bozulmasına neden olabileceğini gösterir (Said vd 2010).

Kriyoprezervasyon sonrası hücrenin hayatta kalmasını, sadece donma sırasında değil, aynı zamanda çözülme süresince de oluşabilen kriyohasarlara etkilemektedir. Düşük çözülme hızları yeniden kristalleşmeyle sonuçlanırken, KPA'lar hücreden yeterince hızlı ayrılamaz ve böylece, hücre içi yüksek oranlarda KPA bulunması sonucu ozmotik stres artar. Sitoplazmada bu tür ozmotik artış hücre içine suyun girmesine neden olur ve plazma membranını bozar (Yeste 2016).

2.5. Dondurma-Çözdürme Sürecinde Ortaya Çıkan Kriyohasarlara

Kriyohasara arkasındaki mekanizma, ozmotik stres, soğuk şok, hücre içi buz kristali oluşumu, ROS'un aşırı üretimi, antioksidan savunma sistemlerinde değişiklik ve bu koşulların kombinasyonları ile ilişkilidir (Amidi vd 2016). Dondurma veya çözdürme işlemi sırasında spermiler, hızlı sıcaklık değişiminden kaynaklanan streslere maruz kalırlar. OS'nin, proteinler, lipidler ve DNA dahil olmak üzere spermin hücrel bileşenlerinde geri dönüşü olmayan hasarlara neden olan ana stres olduğu bildirilmiştir (Zhu vd 2019). Kriyoprezervasyon işleminde, hem geçirgen hem de geçirgen olmayan

KPA'lar kullanılsa bile, kaçınılmaz olarak spermilerin canlılığı, akrozom bütünlüğü, motilitesi ve fertilizasyon yeteneği azalır (Yeste 2016) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Dondurma-çözdürme prosedürlerinden kaynaklanan temel kriyohasarlara (Yeste 2016).

1. Kriyoprezervasyondan etkilenen ilk yapılardan biri sperm plazma membranıdır (Peris-Frau vd 2020). Sperm kriyotoleransı, doğrudan plazma membranının bileşiminde yer alan PUFA'lar (kolesterol/fosfolipid oranı) ile ilgilidir (Yeste vd 2017). Sperm plazma membranı yüksek düzeyde doymamış fosfolipid ve düşük seviyelerde kolesterol içerir. Özellikle düşük kolesterol içeriği, sperm dondurma-çözdürme sürecine karşı direncini azaltır (Peris-Frau vd 2020). Sperm plazma membranı, doymamış fosfolipidler açısından zengindir, bu da onu soğuk şoka karşı çok hassas hale getirir. Sperm plazma membranı kolayca dengesizleşir ve iyon kanallarında değişikliklere neden olur. Böylece, kalsiyum, bikarbonat ve ortam bileşenlerinin gamete girmesine izin vererek seçici geçirgenliğini kolayca kaybeder (Yeste vd 2017).

2. Homeostaz bozulur, proteinlerin ve mRNA'ların degradasyonuna neden olur.

3. Kriyoprezervasyon, ayrıca nükleoproteinlerin (Protamin 1 ve Histon 1) lokalizasyonunu değiştirebilir.

4. Protaminlerin sistein kalıntıları arasındaki disülfid köprülerini bozabilir.

5. Sperm DNA hasarı, kriyoprezervasyon sırasındaki OS ve mekanik streslerden kaynaklanmaktadır (Peris-Frau vd 2020). Çözülme sonrası DNA fragmentasyonu hemen gözlenmese de, dondurulmuş-çözdürülmüş spermiler 37°C'de en az 2-4 saat inkübe edildiğinde gizli hasar belirginleşir.

6. Dondurma-çözdürme işlemi mitokondriye zarar verir, aktivitelerini azaltır ve sonuç olarak sperm motilitesini etkiler. Mitokondriyal hasar da ROS'un üretimini artırır, ancak bunun şiddeti türlere göre değişir (Yeste vd 2017). OS mitokondriyal aktiviteyi bozar. Kriyoprezerve edilmiş sperm in azalmış motilitesi, muhtemelen hem aksonem protein hasarının hem de enzim modifikasyonları nedeniyle enerji kullanılabilirliğindeki değişikliklerin sonucu olarak ortaya çıkar (Peris-Frau vd 2020).

2.6. Antioksidanların Kriyoprezervasyon Sulandırıcısına Eklenmesi

Sperm kriyoprezervasyonu, santrifüjleme, sperm seyreltme, soğutma, dondurma ve çözdürme gibi adımlardan oluşur ve her bir aşama, normal sperm fonksiyonunu ve fertilizasyon potansiyelini bozan sperm hasarına neden olur. Sperm in soğutulması, dondurulması ve çözdürülmesi sırasında ROS gibi aşırı miktarda oksijen metabolitlerinin oluşumu hücre hasarına ve apoptoza neden olabilir (Saraswat vd 2016).

Aşırı miktarda ROS üretimi, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşarsa hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzimlerinde hasarlar oluşturur. ROS hasarına karşı lipidler en hassas yapılardır. Yağ asitlerindeki doymamış bağlarla ROS kolayca reaksiyona girer ve LPO'ya neden olurlar. PUFA'nın oksidatif hasarı, kendi kendine devam eden zincirleme bir reaksiyondur ve geri dönüşümsüz olarak membran hasarlarına neden olmaktadır (Ömür 2015).

Spermi oksidatif hasardan koruyan seminal plazma ve sperm, çeşitli antioksidanlar ve antioksidan enzimler içerir. OS'yi azaltan ve sperm motilitesini iyileştiren antioksidanlar, erkek infertilitesinin tedavisinde kullanılabilir (Saraswat vd 2016). Antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu OS'ye karşı ana savunma faktörleridir (Amidi vd 2016).

Antioksidanların serbest oksijen radikallerine karşı etkileri sıralanacak olursa; zincir reaksiyonun başlamasını durdurmaları, başlayan radikal zincir reaksiyonunu kırmaları, radikal oluşumunun başlamasına engel olmaları, peroksitleri parçalamaları ve lokal oksijen yoğunluğunu azaltmaları şeklindedir (Ömür 2015).

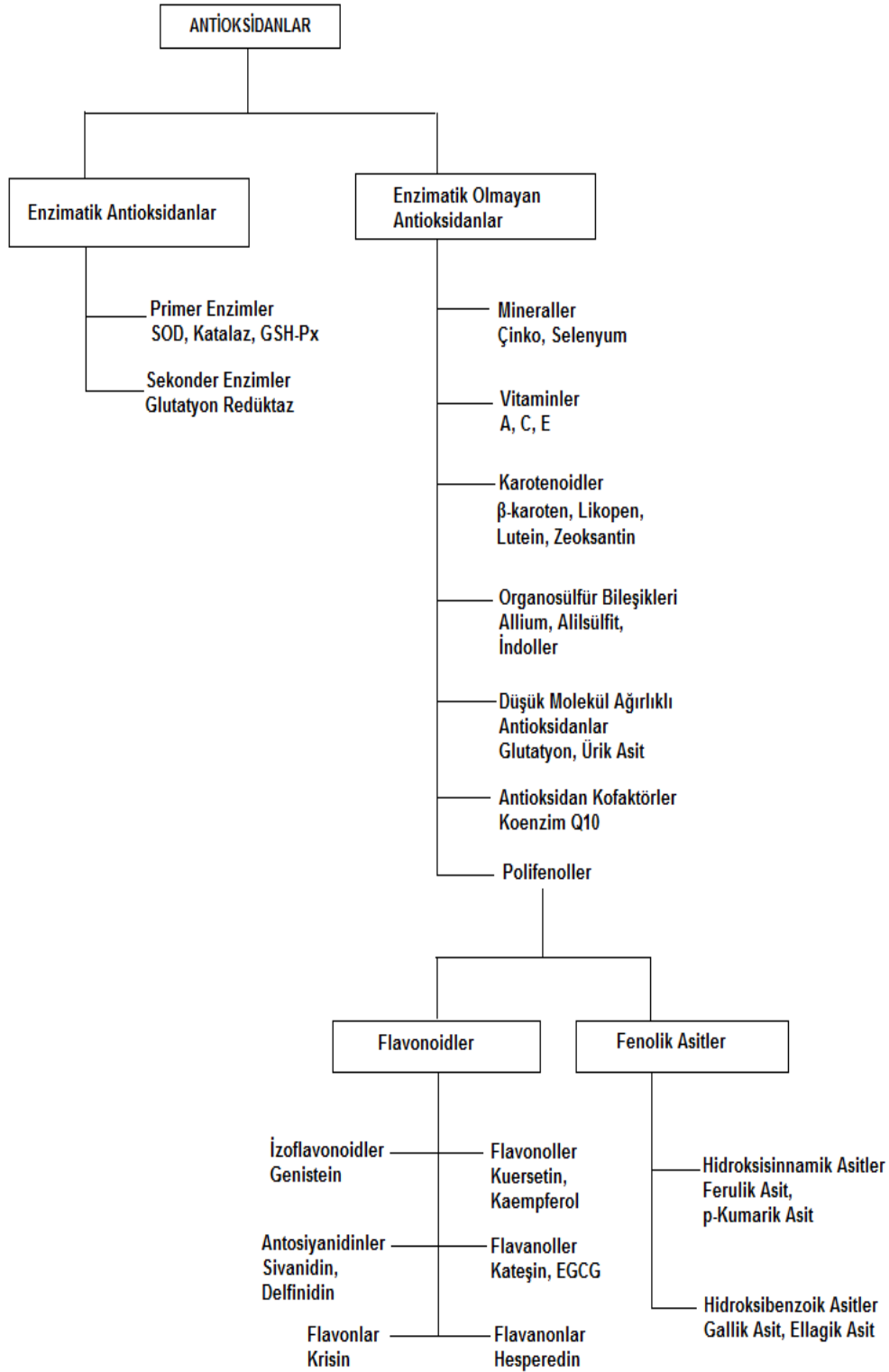
Antioksidanlar (Şekil 2.5), fonksiyonlarına göre enzimatik ve enzimatik olmayanlar olmak üzere 2 grupta sınıflandırılırlar (Amidi vd 2016, Saraswat vd 2016, Kurt 2019).

Enzimatik antioksidanlar, vücutta sentezlenen (endojen) antioksidanlardır (Kurt 2019) ve hücreleri ROS'a karşı koruyan makromoleküllerdir (Allai vd 2018). Aynı zamanda doğal antioksidanlar olarak da bilinirler; fazla ROS'u nötralize eder ve hücreSEL yapıya zarar vermesini engeller (Amidi vd 2016). Seminal plazma ve sperm; GSH-Px, GR, SOD ve CAT gibi enzimatik antioksidanlar içerir (Petruska vd 2014, Ömür vd 2015, Allai vd 2018, Kurt 2019).

Enzimatik olmayan antioksidanlar, vücutta sentezlenemeyen eksojen olarak alınan antioksidanlardır (Kurt 2019). Bu antioksidanlara sistein, ergotionin, metionin, askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini) (Allai vd 2018), indirgenmiş GSH, ürat, meletonin, taurin, hipotaurin, karotenoidler (β -karoten), ubikinonlar (Petruska vd 2014, Amidi vd 2016, Kurt 2019) ve selenyum, mangan, bakır, demir ve çinko gibi iz elementler örnek verilebilir (Kurt 2019). Sentetik antioksidanlar veya diyet takviyeleri olarak da bilinen enzimatik olmayan antioksidanlar, hidrofilik ve lipofilik antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılır. İndirgenmiş GSH, oksitlenmiş glutatyon, ürik asit, askorbik asit (C vitamini), tiyoller, proteoglikanlar ve hiyaluronik asit gibi hidrofilik (suda çözünür) antioksidanlar protein, karbonhidrat ve nükleer materyal oksidasyonuna ve LPO'ya karşı koruma sağlar. Diğer yandan, esas olarak α -tokoferol (E vitamini), β -karoten (A vitamini), flavonoidler, ubiquinol (Koenzim Q₁₀), bilirubin ve melatonin'den oluşan lipofilik antioksidanlar lipitleri peroksidasyonun zincir reaksiyonlarından korurlar. Enzimatik olmayan antioksidanların işlevi, LPO reaksiyonunda zincir başlangıcını inhibe etmek ve zincir ilerleme aşamalarını kırmaktır (Saraswat vd 2016).

Kriyoprezervasyon ortamının antioksidanlarla desteklenmesi farklı türlerde pozitif sonuçlar ortaya koymuştur. Örneğin; insanlarda, dondurma ortamına E vitamini, hipotaurin ve *Opuntia ficus-indica* gibi doğal antioksidanlar eklemek, sperm motilitesini artırmış ve çözdüme sonrası DNA fragmentasyonunu azaltmıştır (Yeste 2016). Kriyoprezervasyonu iyileştirmek ve çözdüme sonrası spermin kalitesini artırmak için antioksidanların uygulanması üzerine kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Hem enzimatik antioksidanlar hem de enzimatik olmayan antioksidanlar aşırı ROS'u nötralize edebildiği ve hücre sel yapıya zarar vermesini önlediği rapor edilmiştir (Zhang vd 2012).

Kriyoprezervasyon sulandırıcılarına antioksidan olarak; RSV, GSH, QUE, iyodiksanol, sisteamin, L-arginin, CAT, melatonin, sistein (Zhang vd 2012, Amidi vd 2016, Al-Mutary 2021), E vitamini (α -tokoferol/Trolox), SOD, askorbik asit (C vitamini), L-glutamin, ergotionin, selenyum, genistein ve doğal bitki ekstraktları [Biberiye (*Rosmarinus officinalis*)], ilave edilmesinin sperm kalitesi üzerinde kriyoprotektif bir etki sağladığını, böylece ROS'un zararlı etkisini en aza indirdiğini ve çözdüme sonrası sperm kalitesini artırdığını göstereren çalışmalar bulunmaktadır (Zhang vd 2012, Amidi vd 2016).



Şekil 2.5 Antioksidanların sınıflandırılması (Ugar 2016)

2.7. Flavonoidler

Tıbbi bitkilerin antioksidan içeriğiyle ilgili son yıllarda birçok araştırma yapılmıştır. Tıbbi bitkilerin tohum, çiçek, yaprak ve kök kısımlarından elde edilen ekstraktları flavonoid, polifenol, tanen, gallik asit, karoten ve esansiyel yağlar gibi antioksidan maddeler bakımından zengindir. Sentetik antioksidanlara göre bitkisel kaynaklı antioksidanların sitotoksitesisi daha azdır. Flavonoidler, hidrolize olabilen tanenler, terpenler, tokoferoller gibi fenolik bileşikler, bitkilerin antioksidan özelliğinden sorumlu en önemli bileşenlerdir (Kurt 2019).

Polifenoller, suda çözünen antioksidanların en önemli grubudur. Hemen hemen tüm meyve ve sebzelerde yüksek miktarlarda bulunurlar ve sağlık üzerine olumlu etkiye sahiptir. Son zamanlarda polifenollerin antioksidan aktivitesini ortaya koyan birçok araştırma yapılmıştır. Polifenoller, bitkilerde doğal olarak bulunan ve antioksidan özelliğe sahip çok önemli sekonder metabolitlerdendir (Meral vd 2012). Polifenoller, temel olarak fenolik asitler ve flavonoidler olarak ikiye ayrılır (Meral vd 2012, Kasnak ve Palamutoğlu 2015). Flavonoidler, polifenollerin geniş bir grubunu temsil eder (Güven vd 2010, Meral vd 2012).

Flavonoidler, çeşitli doğal bitkilerde yaygın olarak bulunan 4.000'den fazla polifenolik bileşik içeren önemli bir doğal organik bileşik sınıfıdır (Wang vd 2019). Flavonoidler, bitkiler tarafından sentezlenen düşük molekül ağırlıklı biyoaktif polifenollerdir (Deveoğlu ve Karadağ 2011, Tanwar ve Modgil 2012). Flavonoidler yüzyıllardır bitki pigmentleri olarak bilinmektedir. Flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili ilk araştırma 1936'da Rusznyak ve Szent-Gyorgyi tarafından yapılmıştır (Güven vd 2010).

Flavonoid sözcüğü, sarı renkli olmalarından kaynaklı Latince 'flavus' kelimesinden türetilmiştir. 15 karbon atomlu 2 benzen halkası içeren bazik bir C6-C3-C6 fenil-benzopiron omurgasına sahiptirler (Kahraman vd 2002). Flavonoidler, meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda, bitkilerin çeşitli kısımlarında (yaprak, kök, gövde, kabuk, sap, çiçek) (Deveoğlu ve Karadağ 2011, Moretti vd 2012, Zhandi vd 2017), çay ve şarapta (Moretti vd 2012, Zhandi vd 2017) yani bitkisel gıdalarda bol miktarda ve yaygın olarak bulunan bileşiklerdir (Kahraman vd 2002).

Flavonoidler; temel olarak 6 sınıfa ayrılmaktadır; flavonlar, flavanonlar, flavonoller, flavanoller (Zhandi vd 2017, Ye vd 2020), izoflavonlar, antosiyanidinler (Çapanoğlu ve Boyacıoğlu 2009, Atınç ve Kalkan 2018) (Tablo 2.2).

Flavonoller, bitkisel gıdalardaki flavonoidlerin en yaygın olanlarıdır (Tanwar ve Modgil 2012). Yapraklar, meyveler ve sebzeler dahil olmak üzere bitkilerin çeşitli kısımlarında bulunur (Rahsid vd 2019). Esas olarak QUE, kaempferol ve mirisetin ile temsil edilirken, metillenmiş türev isorhamnetin de oldukça yaygındır. Diyetle bulunan çeşitli flavonollerden kuersetin en yaygın olanıdır. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda soğanda (*Allium cepa*) bulunur (Tanwar ve Modgil 2012). Flavonollerin, antioksidan aktivitesinin bitkilerde H₂O₂ tarafından oluşan nükleer DNA hasarını önlediği deneysel olarak gösterilmiştir (Melidou vd 2005).

Flavonlar, yapısal olarak flavonollere çok benzerler ve sadece C halkası üzerinde 3-konumunda hidroksilasyon yokluğunda farklılık gösterirler. Flavonlar esas olarak diyetle apigenin ve luteolin tarafından temsil edilir (Tanwar ve Modgil 2012).

Flavanonlar, esas olarak naringenin, hesperetin ve eriodiktol ile temsil edilir. Flavanon yapısı oldukça reaktiftir ve hidroksilasyon, glikosilasyon ve O-metilasyon reaksiyonlarından geçtiği rapor edilmiştir. Flavanonlar sadece turunçgillerde glikozidik formlarında bulunur (Tanwar ve Modgil 2012).

Antosiyanidinler, suda çözünür bitki pigmentleridir ve özellikle çeşitli kırmızı, mavi ve mor renklerden sorumlu oldukları meyve ve çiçek dokusunda belirgindir. Doğada yaklaşık 17 antosiyanidin bulunur, ancak sadece 6 tanesi (siyanidin, delfinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin ve malvidin) yaygın olarak bulunur ve beslenme açısından önemlidir (Tanwar ve Modgil 2012).

İzoflavonlar, flavonoidlerin çoğunun aksine B halkasının C2 konumundan ziyade C3'e bağlanır. Bitkilerde çok sınırlı bir dağılıma sahiptirler ve baklagil (soya fasulyesi) türlerinde bulunurlar. İzoflavonlar, östrojenik aktiviteleriyle bilinirler ve meme kanseri ve osteoporozun önlenmesinde önemli rollere sahiptir. Genistein, daidzein ve glisitin izoflavonlara örnektir. Polar, suda çözünür bileşiklerdir. İzoflavonlar ayrıca metilasyon, hidroksilasyon ve polimerizasyon gibi çeşitli modifikasyonlara uğrar (Tanwar ve Modgil 2012).

Flavanoller, yapısal olarak, basit monomerlerden (kateşin, epikateşin) oligomerik ve polimerik proantosiyanidinlere (tanenler) kadar değişen flavonoidlerin en karmaşık sınıfıdır. Bitkilerde en çok proantosiyanidin türü, (epi)kateşin birimlerinden oluşan prosiyanidinlerdir. Flavanoller, kayısı, vişne, üzüm ve böğürtlen gibi meyvelerde bol miktarda bulunur (Tanwar ve Modgil 2012).

Flavonoidlerin birçok araştırmada, doğal antioksidanlar olarak hücrelerde OS'nin neden olduğu zararları azalttığı (Rashid vd 2019) ve ayrıca antihipertansif, antimutajenik, antiproliferatif, antitümör, antiinflamatuvar (Atınç ve Kalkan 2018, Wang vd 2019), antimikrobiyal (antibakteriyel, antifungal, antiviral) (Deveoğlu ve Karadağ 2011, Rashid vd 2019), hepatoprotektif, antidiyabetik (Tanwar ve Modgil 2012, Wang vd 2019), bağışıklık uyarıcı, antiapoptotik, nöroproteksiyon etki ve antialerjik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Deveoğlu ve Karadağ 2011, Wang vd 2019, Ye vd 2020).

Flavonoidler, yüksek düzeyde antioksidan ve şelatlama özelliklerine sahip maddelerdir (Çapanoğlu ve Boyacıoğlu 2009, Kasnak ve Palamutoğlu 2015). Hemen hemen her flavonoid grubunun en iyi tanımlanan özelliği, antioksidan görevi görme kapasiteleridir. Flavonlar ve kateşinler, vücudu ROS'a karşı korumak için en güçlü flavonoidlerdir (Tanwar ve Modgil 2012). Flavonoidler, antioksidan özelliklerini gösterebilmek için serbest radikallerle reaksiyona girerek ROS'u etkisiz hale getirirler (Moretti vd 2012, Atınç ve Kalkan 2018). Flavonoidlerin kimyasal yapısı ile antioksidan aktiviteleri arasında bir ilişki kurulmuştur (Moretti vd 2012, Ye vd 2020), özellikle OH gruplarının sayısı ve konumu onların antioksidan gücünü etkilemektedir (Moretti vd 2012).

Çok sayıda çalışma flavonoidlerin erkek üreme sistemi işlev bozukluğunda koruyucu etkiler gösterdiğini bildirmiş ve ilgili moleküler mekanizmayı ortaya çıkarmıştır. Potansiyel inhibitör olarak birçok doğal ürün arasında flavonoidler, erkek üreme sistemi disfonksiyonunun tedavisi için kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Flavonoidler amfipatik moleküllerdir ve membranların lipid çift tabakasına nüfuz ederek tüm sperm ve akrozom membranı için olası bir koruma sağlar, oksidatif hasarı önler ve fertilizasyon için gerekli olan sperm akrozom reaksiyonunu oluşturur (Ye vd 2020).

Bitkisel kaynaklı birçok maddenin, sperm canlılığı üzerindeki etkileri araştırılmaktadır. Çeşitli bitki ürünleri flavonoidler, tanenler, kumarinler, kurkumanoidler, ksantonlar, fenolikler, lignanlar ve terpenoidler gibi antioksidan bileşikler içerir (Vahedi vd 2018, Kurt 2019). Flavonoidler, tanenler, terpenler, tokoferoller gibi fenolik bileşikler

bitkilerin antioksidan özelliğinden sorumlu en önemli bileşenlerdir. Fenolik maddeler, C vitamini, E vitamini ve karotenoidler sahip oldukları hidrojen iyonlarını serbest radikallere vererek onları kararlı hale getiren güçlü antioksidan maddelerdir (Kurt 2019). Bu nedenle, bitkisel ürünlerin doğal antioksidanlar olarak kullanılmasına araştırmacılar arasında artan bir ilgi vardır. Spermin dondurma-çözdürme sürecinde bitkisel antioksidanların kullanılmasının sperm kalitesi üzerinde olumlu etkileri olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Vahedi vd 2018).

Tablo 2.2 Flavonoidlerin sınıflandırılması (Deveoğlu ve Karadağ 2011, Meral vd 2012, Atınç ve Kalkan 2018, Rashid vd 2019)

Flavon	Flavanon	Flavonol	Flavanol	İzoflavon	Antosiyanidin
Apigenin	Eriocitrin	Fisetin	Kateşin	Biochanin	A Siyanidin
Baicalein	Eriodictyol	Galangin	Epikateşin	Daidzein	Delfinidin
Krisin	Hesperetin	Gossypetin	Epigallokateşin-	Formononetin	Malvidin
Genkwanin	Hesperidin	İzorhamnetin	3- gallat	Genistein	Pelargonidin
Luteolin	Naringenin	Kaempferide		Glisit	Petunidin
Tangeritin	Naringin	Kemferol			Peonidin
	Narirutin	Rhamnetin			
	Neeriocitrin	Rhamnazin			
	Prunin	Kuersetin			
		Morin Mirisetin			
		Natsudaiddain			
		Astragalin			
		Rutin			

2.8. Teke Seminal Plazmasının Özellikleri

Teke spermleri için kullanılan en yaygın kriyoprezervasyon sulandırıcıları yumurta sarısı veya yağsız süt içerir. Ancak, teke spermlerinin yumurta sarısı veya süt içeren sulandırıcılarla seyreltilmesi sperm hücrelerine zarar verebilir. Seminal plazma ve yumurta sarısı arasındaki zararlı etkileşimler ilk olarak Roy 1957'de tarafından, süt ile olan zararlı etkileşimler ise Nunes ve ark. (1982) tarafından ortaya konmuştur (Purdy 2006, Gangwar vd 2016). Teke seminal plazması, süt veya yumurta sarısı varlığında spermlerin canlılığını tehlikeye atabilecek özel bir yumurta sarısı pıhtılaşma

enzimi (EYCE) içerir (Lv vd 2019a). Roy yaptığı çalışmada, yumurta sarısının, bulbourethral kökenli bir enzim (fosfolipaz A) nedeniyle pıhtılaştığını rapor etmiş ve bu sebeple enzim, EYCE olarak adlandırılmıştır (Purdy 2006, Gangwar vd 2016). EYCE, yumurta sarısını pıhtılaştırabilen ve lesitini yağ asitlerine ve lizolesitine hidrolize edebilen bir enzimdir. Bu enzim ayrıca, akrozomal reaksiyonu ve kromatin yoğunlaşmasını indükler (Lv vd 2019a). Benzer şekilde, Nunes ve ark. tarafından, teke bulbourethral bezinden süt bazlı sulandırıcılarda seyreltilmiş, soğutulmuş ve dondurulmuş teke sperminin hayatta kalmasını azaltan (Purdy 2006, Gangwar vd 2016), 55-60 kDa'luk bir glikoprotein lipaz SBUIII (daha sonra BUSgp60 olarak adlandırılan) tanımlanmıştır. Bu enzim aynı zamanda akrozomal reaksiyonu indükleyebilmektedir (Lv vd 2019a). Bazı araştırmacılar, EYCE ve SBUIII'ün aynı protein olabileceğini düşünmektedir (Purdy 2006, Lv vd 2019a). Dolayısıyla, teke sperm kriyoprezervasyonu sırasında EYCE ve SBUIII ile yumurta sarısı veya süt arasındaki negatif etkileşim dikkate alınmalıdır (Lv vd 2019a).

Teke spermasının seyreltilmesinde, Tris, sodyum sitrat ve yağsız süt yaygın kullanılmaktadır. Yumurta sarısı içerisinde bulunan fosfolipit, kolesterol ve düşük yoğunluktaki lipoproteinler soğuk şoktan koruyucu etkiye, sütteki kazein miselleri ise pH değişikliklerine karşı koruyucu özelliğe sahiptir. Ancak tekelerde, bulbourethral bezden salgılanan EYCE ve SBUIII, sulandırıcılarla tepkimeye girdiğinde, spermlerde motilitede düşüş, toksikasyon, akrozomal ve hücrel bozulmalarda artış görülmüştür (Çetin ve Karaca 2019).

Seminal plazma ile yumurta sarısı ve süt proteinlerinin zararlı etkileşimlerinin üstesinden gelmenin geleneksel yöntemi, teke sperm örneğini tamponlu bir sulandırıcı içinde seyreltmek ve ardından seminal plazmayı santrifüjleme yoluyla spermden uzaklaştırmaktır (Purdy 2006). Bununla birlikte, seminal plazmanın uzaklaştırılması, teke sperminin dondurularak hayatta kalmasını artırsa da, seminal plazmada doğal olarak bulunan bazı bileşenlerinde kaybolmasına sebep olur (Lv vd 2019a).

EYCE ve SBUIII'ün olumsuz etkilerinden kaçınmanın bir başka yolu da yağsız süt bazlı dondurma sulandırıcıları kullanmaktır. Son araştırmalar, yumurta sarısı konsantrasyonunun %2.5'e düşürülmesinin teke sperminin çözündürülme sonrası canlılığına zarar veremeyeceğini göstermektedir. Bu nedenle, teke sperminin dondurulması için düşük konsantrasyonlarda yumurta sarısı içeren dondurma sulandırıcıları kullanılabilir. Fosfatidilkolin gibi yumurta sarısındaki fosfolipidler, sperm plazma membranının kriyokoruması için önemlidir. Bununla birlikte, soya fasulyesi

lesitini gibi bazı benzer bileşenlerin, teke sperm kriyoprezervasyonu için kullanılan yumurta sarısının yerini alabileceği bildirilmiştir (Lv vd 2019a).

2.9. Tekelerden Sperm Toplanması

Semen suni vajina veya elektroejakulasyon yöntemi kullanılarak toplanabilir (Lv vd 2019a, Konyalı 2020). Ancak bu yöntem, seminal plazmanın bileşenlerini değiştirerek spermin kriyohasarlara tolere etme yeteneğini azaltmaktadır (Lv vd 2019a). Söz konusu yöntemlerden en yaygın ve etkin kullanılanı suni vajina yöntemidir. Suni vajina yöntemi, tüm ejakülatın kolay ve temiz bir şekilde alındığı, stresi engellediği ve basit bir yöntem olduğu için de yaygın olarak kullanılmaktadır. Tekelerde kullanılan suni vajina yaklaşık 17 cm uzunluğunda, sıcaklığı 43-46°C aralığında olmalıdır. Bu yöntemin uygulanmasında dikkat edilmesi gereken ise, tekelerin alıştırmış olmaları gerektiğidir (Konyalı 2020). Semen toplandıktan hemen sonra kalitesi değerlendirilir. Semen kalitesinin değerlendirilmesinde, spermin konsantrasyonu, motilite, morfolojik normallik, termal direnç testi, akrozom ve membran bütünlüğü, hipo-ozmotik şişme testi (HOST) ve *in vitro* fertilizasyon testleri gibi parametreler kullanılır (Lv vd 2019a).

2.10. Teke Sperminin Seyreltilmesinde Kullanılan Sulandırıcılar

Semen kriyoprezervasyonu için kullanılan sulandırıcıların amacı, hücreleri sıcaklığa bağlı hasarlardan korumak, plazma membranının stabilizasyonunu teşvik etmek, enerji kaynağı sağlayarak hem motiliteyi hem de fertilizasyonu korumak ve spermlerin geçici olarak hayatta kalmasını sağlamak için uygun bir ortam oluşturmaktır (Purdy 2006, Vidal vd 2013). Bu özellikler, pH ve ozmolaritedeki değişikliklerin zararlı etkilerini azaltır, bakteri üremesini engeller ve sperm hücrelerini soğutma, dondurma ve çözülmenin neden olduğu hasarlardan korur (Vidal vd 2013).

Yağsız süt-glukoz, tris-sitrik asit-glukoz-yumurta sarısı ve sodyum sitrat-glukoz-yumurta sarısı gibi sulandırıcılar, teke spermasının kısa veya uzun süreli saklanması için yaygın olarak kullanılmaktadır (Dorado vd 2007, Kulaksız ve Daşkın 2009). Yumurta sarısının düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) spermleri saklama, soğutma ve dondurma sırasında hasara karşı korur. Süt kazeinleri, saklama sırasında sperm motilitesini ve canlılığını korurken, seminal plazma proteinlerinin sperme bağlanmasını sağlar ve aynı zamanda sperm lipid kaybını da azaltır. Ek olarak, bu

bileşenlerde bulunan lesitinin, soğuk şok sırasında kaybedilen fosfolipitleri geri yükleyerek plazma membranını koruduğu düşünülmektedir (Vidal vd 2013)

Yumurta sarısı, donma aşamasında soğuk şokuna karşı koruma sağlar. Fiziksel ve kimyasal stresler sırasında akrozomal ve mitokondri membranlarının bütünlüğünün yanı sıra, sperm motilitesini ve uzun ömürlülüğünü korumadaki etkisi nedeniyle de sulandırıcılarda kullanılmıştır. Sulandırıcıdaki yumurta sarısının optimum konsantrasyonu, türler ve diğer bileşenlerin türü ve seviyesi dahil olmak üzere birçok faktörden etkilenir. Ancak, teke sperminde yumurta sarısının kullanımında, sperm pıhtılaşması ve ölüm gibi komplikasyonlarla karşılaşmıştır. Teke seminal plazma ve yumurta sarısı arasındaki zararlı etkileşim daha sonra süt bazlı sulandırıcılar için rapor edilmiş ve bunun fosfolipaz A ve bulbouretralden salgılanan bir glikoprotein lipaz (SBUIII = BUSgp60) nedeniyle olduğu gösterilmiştir. Bu salgıların sperm membranı ile etkileşimi sonucu toksik maddelerin açığa çıkması spermin pıhtılaşmasına ve ölümüne neden olur. Bununla birlikte, bu salgıların kesin etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır (Zamiri vd 2020).

Genel olarak, teke spermi kriyoprezervasyon ortamı, geçirgen olmayan bir kriyoprotektan (süt veya yumurta sarısı), geçirgen bir kriyoprotektan (gliserol, etilen glikol veya DMSO), bir tampon (Tris), bir veya daha fazla şeker (glikoz, fruktoz, laktoz, rafinoz, sakaroz veya trehaloz), tuzlar (sodyum sitrat), organik asit (sitrik asit) ve antibiyotiklerden (penisilin, streptomisin) oluşmaktadır (Purdy 2006, Barbas ve Mascarenhas 2009, Gangwar vd 2016).

2.11. Teke Sperm Kriyoprezervasyonunda Kullanılan Kriyoprotektanlar

Kriyoprezervasyon sürecini optimize etmek, teke spermlerinin kriyohasarını azaltmak için antioksidanlar, oligosakkaritler (trehaloz) ve antifriz proteinler (AFP) kullanılmıştır (Lv vd 2019a). Birçok membran geçirgen kriyoprotektan (gliserol, DMSO, etilen glikol ve propilen glikol) ve bunların kombinasyonları, teke spermiyle test edilmiştir, ancak en sık kullanılan geçirgen kriyoprotektanın gliserol olduğu ortaya konmuştur. Gliserol ilavesi, 37°C veya 5°C'de 1, 2 veya 3 aşamalı olarak gerçekleştirilebilir (Gangwar vd 2016). Gliserol, DMSO ve etilen glikol, genellikle %1-8 aralığında kullanılırlar, fakat çözündürme sonrası en büyük sperm geri kazanımı gliserol ile başarılmıştır (Purdy 2006).

Gliserol ilavesi spermde ozmotik hasara neden olabilir, ancak hasarın boyutu türe göre değişir. Bununla birlikte, teke spermleri bu ozmotik koşullara makul ölçüde toleranslıdır ve gliserole hızlı maruz kalmaya dayanabilirler. Adım adım gliserol ilavesini test eden denemeler, gliserolün eklendiği sıcaklığa bağlı olarak değişken sonuçlar vermiştir (Purdy 2006). Kullanılan en yaygın nüfuz etmeyen kriyoprotektanlar ise yumurta sarısı (% 2-20) ve yağsız süttür (% 10, w/v)(Purdy 2006, Gangwar vd 2016).

2.12. Teke Sperm Kriyoprezervasyonu Prosedürleri

- 1) Semen numuneleri seyreltikten sonra, sperma 0.25 veya 0.5 ml'lik payetlere yüklenir ve sulandırılmış teke sperması 1.5-2 saat 5°C'de soğutulur (Purdy 2006, Lv vd 2019a).
- 2) Ardından, soğutulmuş sperma bu sıcaklıkta 2-4 saat daha dengelenir (Lv vd 2019a).
- 3) Semen numuneleri seyreltikten ve soğutulduktan sonra, 0.25 veya 0.5 ml'lik payetlerdeki sperma örnekleri bir rafa yerleştirilerek sıvı nitrojen buharında dondurulur. Sıvı nitrojen içeren bir strafor kutu, teke spermasını dondurmak için kullanılır (Purdy 2006).
- 4) Soğutulmuş bir raf kullanıldığında, payetler genellikle sıvı nitrojen buharında (-75°C ile -125°C arasında) (sıvı nitrojen yüzeyinin 4-6 cm üzerinde) 7-10 dakika önceden dondurulur.
- 5) Son olarak, önceden dondurulmuş sperma doğrudan sıvı nitrojene daldırılır (Lv vd 2019a).

Teke sperminin dondurularak saklanması için, gliserol bir veya iki adımda eklenebilir. Gliserolün son konsantrasyonu genellikle %6-7'dir (Lv vd 2019a).

2.13. Teke Sperminin Çözdürülmesi

Spermde, bulunan herhangi bir hücre içi buzun yeniden kristalleşmesini önlemek için hızlı çözündürme gereklidir. Hızlı bir şekilde çözülen sperm, konsantre çözünen maddeye ve kriyoprotektana daha kısa sürede maruz kalır ve böylece, hücre içi ve hücre dışı dengenin restorasyonu, daha yavaş çözülmeye göre daha hızlı gerçekleşir. Teke spermi genellikle 30 saniye boyunca 38-42°C'de çözülür. Semen, dondurma sulandırıcısının (gliserol olmadan) bileşimine bağlı olarak fizyolojik serumda

veya değişken bir çözdürme solüsyonunda da çözülebilir (Barbas ve Mascarenhalar 2009).

2.14. Teke Sperm Kriyoprezervasyon Sulandırıcısına Eklenen Antioksidanlar İle İlgili Literatürler

Birçok araştırmacı çeşitli antioksidanları kullanarak farklı yöntemlerle teke spermlerini dondurmıştır.

Rezaei ve ark. (2021), Mahabadi teke spermi temel sulandırıcısına (soya fasulyesi lesitini) 0, 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 mM piridoksin ilave edilerek kriyoprezerve etmiştir. En yüksek toplam motilite %58.37 olarak 6 mM piridoksin ilavesinde gözlenmiştir. 6 mM piridoksin ile takviye edilmiş sperm sulandırıcısının Mahabadi teke sperm motilite, canlılık ve plazma membran bütünlüğü gibi kalite parametrelerini iyileştirdiğini ve çözdürüldükten sonra teke sperminde OS'yi azalttığını göstermişlerdir.

Guanzhong teke sperm sulandırıcısına farklı konsantrasyonlarda GSH [0 (kontrol), 1, 2, 3 ve 4 mmol/l] ilave edilmiş ve dondurulmuştur. 2 mmol/l GSH eklenmesi, çözdürüldükten sonra sperm toplam motiliteyi %62.14, progresif motiliteyi %25.47 ve akrozomal membran bütünlüğünü %70.87 oranlarında en yüksek seviyede korumuştur. Antioksidan indeksleri açısından, SOD ve GSH-Px önemli ölçüde yükselmiş, ROS ve MDA değerleri anlamlı derecede düşmüştür. Ayrıca, spermin fertilizasyon oranını önemli ölçüde artırmıştır (Zou vd 2021).

Saenen teke sperm kriyoprezervasyonunda, lesitin bazlı sulandırıcıya %8 oranında gökkuşacağı alabalığı seminal plazma eklenmesi (RTS 8 grubu) sperm motilitesini, akrozomal membran bütünlüğünü, plazma membranı fonksiyonel bütünlüğünü ve mitokondriyal fonksiyonunu kontrol grubuna göre daha iyi koruduğunu göstermiştir. RTS 8 grubunda, çözdürüldükten sonra, motilite 0. saatte %55.33, 6. saatte %16.67 ve ayrıca akrozomal membran bütünlüğü 0. saatte %82.13, 6. saatte %76.73 oranlarında diğer çalışma gruplarına göre en yüksek seviyede tespit edilmiştir (Alçay vd 2020).

Brito ve ark. 2020'de yaptıkları çalışmada, teke sperm sulandırıcısına farklı dozlarda (0.04, 0.08 ve 0.12 mg/ml⁻¹) RSV ilave ederek seyreltme, soğutma ve çözdürme sonrası spermlerde progresif motilite, canlılık, membran bütünlüğü ve

akrozomal membran bütünlüğünü değerlendirmişlerdir. Seyreltme sonrası ve soğutma sonrası progresif motilite, canlılık ve akrozomal membran bütünlüğü açısından hiçbir fark bulunamamıştır. Bununla birlikte, motilite ve canlılık parametreleri, çözülme sonrası fazda lineer olarak azalmıştır. RSV, çözdürülme sonrası sperm progresif motilitesindeki ve canlılığındaki kayıpları engellememiş, ancak, teke sperminin plazma membran bütünlüğünü 0.04 mg/ml⁻¹'e kadar optimum seviyede korumuştur. 0.04 mg/ml⁻¹ RSV ilave edilen grupta çözdürme sonrası motilite %70.7 ve akrozomal membran bütünlüğü %47.4 olarak diğer gruplara kıyasla en yüksek seviyede belirlenmiştir.

Yağsız süt ve Tris-yumurta sarısı sulandırıcıları ile sulandırılan teke spermine farklı oranlarda bal ilavesinin, kısa süreli saklamada spermatolojik özelliklere ve yaşam süresine herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Çetin ve Karaca 2019).

Teke sperminin, yağsız süt sulandırıcısına 4 ve 6 mM L-arginin ilave edilerek 5 gün saklanması, canlılık, membran bütünlüğü ve motilite gibi sperm parametrelerini iyileştirdiği, MDA üretimini engellediği ve apoptotik oranı azalttığı bildirilmiştir (Susilowati vd 2019).

Boğa sperması için ticari bir sulandırıcı olan Optidyl'e 10 ve 50 µM konsantrasyonlarda RSV ilave edilmesi, çözdürme sonrası teke spermlerinde toplam motilite, progresif motilite, canlılık, membran ve akrozomal membran bütünlüğü ile mitokondriyal aktiviteyi iyileştirmiştir. Ayrıca, ROS üretiminde düşüş gözlenmiştir. Sonuç olarak, sperm sulandırıcısına 10 veya 50 µM RSV takviyesi, ROS oluşumunu inhibe ederek çözülme sonrası teke sperm kalitesini iyileştirmiştir. Sulandırıcıya 50 µM RSV ilavesiyle, toplam motilite %78 ve progresif motilite yaklaşık %73 olarak tespit edilmiş ve motilitede iyileşme gözlenmiştir. 10 µM RSV takviyesi %51.35 oranında akrozomal membran bütünlüğünü korumuştur (Lv vd 2019b).

Yumurta sarısı-süt sulandırıcısına (2.5 mg/ml) bovin serum (BSA) eklenmesi, çözdürülme sırasında ve sonrasında teke sperm motilitesini ve canlılığını iyileştirmiş ve sitokrom C ekspresyonunu azaltmıştır. 2.5 mg/ml BSA ilavesinde motilite %42.75 olarak tespit edilmiş ve motilitede iyileşme gözlenmiştir (Suprayogi ve Susilowati 2018).

Yousefian ve ark. (2018) yaptıkları araştırmada, bir lipofilik antioksidan olan CoQ₁₀ kullanılarak, kriyoprezervasyonun neden olduğu OS'nin azaldığını ve çözdürülmüş teke spermlerinin kalitesini iyileştirdiğini belirlemişlerdir. Mahabadi

tekelerinden toplanan sperm örnekleri havuzlanmış ve 0 (negatif kontrol, NC), 0.5 (CQ0.05), 1 (CQ1) ve 1.5 (CQ1.5) μM içeren soya fasulyesi lesitini bazlı sulandırıcılarda seyreltilip dondurulmuştur. Çözdürüldükten sonra, toplam motilite CQ1'de (%53.40), kontrol gruplarına göre önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Sperm canlılığı, plazma membran işlevselliği ve mitokondriyal aktivite, kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde artmıştır. Sonuçlara ek olarak, kontrol ve CQ0.5 gruplarının MDA seviyeleri ile karşılaştırıldığında, CQ1 ve CQ1.5 gruplarının MDA seviyelerinin önemli oranda daha düşük olduğu belirlenmiştir. 1 μM CoQ₁₀, teke spermini kriyohasardan korumuş, sperm parametrelerinde iyileşme gözlenmiştir.

Tris-yumurta sarısı bazlı teke sperm dondurma sulandırıcısına farklı konsantrasyonda fulvik asit (FA: %0.2, 0.4 ve 0.6) ilave edilerek spermler seyreltilmiş ve dondurulmuştur. Sulandırıcıya FA'ların eklenmesi, kontrol grubuna kıyasla progresif motiliteyi, akrozomal ve plazma membran bütünlüğünü, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerini artırmış ve anormallik yüzdesi ile sperm MDA seviyesini azaltmıştır. Ancak, semen sulandırıcılarına aşırı FA ilavesi (>%0.4) etkinliği artırmamıştır. Sonuçlar, FA'ların teke spermi için umut verici bir kriyoprotektan olabileceğini göstermiştir (Xiao vd 2018).

%5 gliserol veya DMSO içeren sperm sulandırıcısına 4 mM BHA ilavesi, Mahabadi tekelerinde çözdürme sonrası sperm kalitesini (motilite, canlılık, membran bütünlüğü) iyileştirmiştir (Rahmatzadeh vd 2017).

2mM piridoksin (P) tek başına veya E vitamini (E; 0, 2, 4, 6 ve 8 mM), C vitamini (C; 0, 2, 4, 6 ve 8 mM) ve melatonin (M; 0, 2, 4, 6 ve 8 mM) ile spesifik kombinasyonlar halinde desteklenen sulandırıcılar, MDA konsantrasyonlarını azaltmıştır. Sperm dondurma sulandırıcısına 2mM piridoksin+4mM melatonin (PM4) eklenen grup, diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında motiliteyi iyileştirmiştir ve %89.2 olarak tespit edilmiştir. Akrozomal membran bütünlüğüne bakıldığında, 2mM piridoksin+8mM E vitamini (PE8) takviyeli grupta en yüksek sonuç %92 olarak alınmıştır ve akrozomal membran bütünlüğünün çok iyi korunduğu belirlenmiştir. PCEM6 kombinasyonunda motilite %80.4 oranında tespit edilmiştir. PCEM8 grubunda akrozomal membran bütünlüğü en yüksek seviyede, %79.5 olarak bulunmuştur. Bulgular, tek başına veya diğer antioksidanlarla kombinasyon halinde piridoksin ilave edilen sulandırıcıların, dondurularak saklanan Batı Afrika cüce teke spermlerinin canlılığını iyileştirdiğini ve OS parametrelerini azalttığını göstermiştir (Daramola vd 2017a).

Alçay ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada, tris-sitrik asit-fruktoz sperm sulandırıcısına, antioksidanlar olarak 5 mM metiyonin, 5 mM sisteamin ve 5 mM BHT ilave ederek, kontrol grubu (antioksidansız) dahil 4 grup oluşturmuşlardır. Sperm örnekleri, motilite, plazma membranı, akrozomal ve DNA bütünlüğü ve ayrıca LPO bakımından değerlendirilmiştir. Sperm dondurma sulandırıcısına 5 mM BHT ilave edilmiş grubun çözündürüldükten hemen sonra (0. saat) sperm motilitesi %58, akrozom hasar oranı %26.64 ve 6 saat sonra motilite %12.67 ve akrozom hasar oranı %48.6 olarak tespit edilmiştir. 5 mM BHT ile desteklendiğinde 6 saatlik inkübasyondan sonra bile çözündürülmüş teke sperminde daha yüksek bir kalite elde edilmiştir.

Tris bazlı sulandırıcıya çeşitli konsantrasyonlarda antioksidan (hipotaurin 5, 10 ve 20 mM; sistein 5, 10 ve 20 mM) ilave edilerek Boer teke spermleri kriyoprezerve edilmiştir. Hipotaurin ve sistein, kriyoprezervasyondan sonra Boer teke sperm motilitesi, membran bütünlüğü, morfolojisi, akrozomal membran bütünlüğü ve canlılığının özelliklerini önemli ölçüde iyileştirmiştir. Sperm sulandırıcısına 10 mM hipotaurin ilavesi çözündürüldükten sonra, sperm motilitesi %66 ve akrozomal membran bütünlüğü %59.6 olarak belirlenmiştir. 5 mM konsantrasyonda sistein eklenmesi, motiliteyi %64.7 iyileştirmiş ve akrozomal membran bütünlüğünü %59.2 oranında korumuştur. Sulandırıcılara 10 mM hipotaurin ve 5 mM sistein eklenmesi, sıvı ve dondurulmuş Boer teke sperminin sitolojik özelliklerinde maksimum iyileşme sağlamıştır (Memon vd 2015).

Beetal tekelerinde, Tris yumurta sarısı sulandırıcısında BHT'nin, sperm motilite, canlılık ve membran bütünlüğü üzerinde hiçbir etkisi kaydedilmemiş, ancak akrozomal bütünlükte küçük bir gelişme göstermiştir. Tris bazlı sperm sulandırıcıya BHT (0.0, 2.0 ve 5.0 mM) eklenerek akrozomal membran bütünlüğünün iyileştiği gözlenmiştir. Akrozomal membran bütünlüğündeki bu gelişmenin kademeli olduğu ve kontrole (%20.3) göre sulandırıcıda hem 2.0 mM BHT (%27) hem de 5.0 mM BHT'nin (%27.7) artan konsantrasyonlarının eklenmesiyle iyileştiği tespit edilmiştir (Iqbal vd 2015).

Salmani ve ark. (2013), Mahabadi teke sperminin dondurularak saklanması için soya fasulyesi lesitini bazlı sperm sulandırıcısına, 5 ve 10 mM GSH eklenmesinin kontrollerle karşılaştırıldığında çözdürme sonrası sperm kalite parametrelerini (motilite, canlılık ve membran bütünlüğü gibi) iyileştirmede göstermiştir.

Mahabadi teke sperminin kriyoprezervasyonu için sulandırıcıya 1 mM BHT eklenmesiyle, motilite, progresif motilite ve canlılığı iyileştirebildiğini ve MDA seviyesini

düşürebildiği gösterilmiştir. Sperm sulandırıcısına 1 mM BHT ilavesinde, motilite %60.22 ve progresif motilite %33.6 oranlarında iyileşme yaptığı tespit edilmiştir. Akrozomal membran bütünlüğü BHT konsantrasyonlarından etkilenmemiştir. Bu nedenle, teke sperminin dondurularak saklanması için optimum BHT konsantrasyonunun 1 mM olduğu sonucuna varılmıştır (Naijian vd 2013).

Boer teke spermi, Tris-sitrik asit-fruktoz sulandırıcısına antioksidan olarak askorbik asit (8.5 mg/ml), BHT (2 mM), sistein (5 mM) ve hipotaurin (10 mM) eklenmiş ve dondurulmuştur. Çözdürülme sonrası, sulandırıcıya antioksidan takviyesi spermatolojik parametreleri (canlılık, membran ve akrozomal membran bütünlüğü) iyileştirmiştir. Askorbik asit progresif motilite oranı (%68.6) ve akrozomal membran bütünlüğü oranı (%65.4) bakımından en yüksek değerleri vermiştir. Parametrelere bakıldığında en iyi değerler askorbid asitte tespit edilmiştir. Antioksidanların eklenmesi LPO oranını önemli ölçüde azaltmıştır (Memon vd 2012).

Saraswat ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, üç antioksidanın farklı konsantrasyonları, indirgenmiş GSH (3, 5, 7 ve 9 mM), askorbik asit (3, 5, 7, 9 ve 10 mM) ve α -tokoferol (1.5, 2.5, 3.5, 4.5 ve 5.5 mM) ayrı ayrı teke sperm sulandırıcısına eklemiştir. Sirohi teke sperminde başlangıç, dengeleme sonrası ve çözme sonrası progresif motilite değerlendirilmiştir. Sperm sulandırıcısına ayrı ayrı 7 mM GSH (%32), 9 mM askorbik asit (%37) ve 4.5 mM α -tokoferol (%37) antioksidanlarının eklenmesinin, çalışılan diğer gruplara kıyasla, Sirohi teke sperminin çözme sonrası progresif motilitesini artırdığı gösterilmiştir.

Boer teke spermi (0.5, 1, 2 ve 3 mM) BHT içeren Tris-yumurta sarısı bazlı bir sulandırıcı ile seyreltilmiştir. Tris-yumurta sarısı sperm sulandırıcısına 2 mM BHT konsantrasyonu ilavesi, çözme sonrası Boer teke sperminde motilite (%63.2 oranında), membran bütünlüğü, morfoloji, akrozomal membran bütünlüğü (%61.80 oranında) ve canlılıkta iyileşmeyi göstermiştir (Memon vd 2011).

Olayemi ve ark. (2011), tekelerde yaptıkları araştırmada, sodyum sitrat-yumurta sarısı sperm sulandırıcısına, 5, 10 ve 20 ml oranlarında bal ilave edip kısa süreli saklama gerçekleştirmişlerdir. En yüksek motilite ve canlılık oranlarının 5 ml bal eklenmiş grupta olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, motilite oranları 6 saat boyunca değerlendirilmiş ve sırasıyla, 0. h %95, 2. h %90, 4. h 87.5 ve 6. h %85.38 olarak belirlenmiştir.

Aboagla ve Maeda (2011), teke spermelerini çeşitli konsantrasyonlarda arbutin (0.0, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4 M) içeren Tris-sitrik asit-glukoz (TCG) sulandırıcılarında dondurmuşlardır. 0.4 M arbutin içeren grupta, motilite, progresif motilite sperm yüzdelerinin (sırasıyla %89 ve %70) en yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, arbutin hem motilite, hem de progresif motilite için, çözülme sonrası iyileşme oranlarını artırmıştır. 3 saatlik inkübasyondan sonra arbutinli sulandırıcı, dondurulmuş-çözdürülmüş sperm motilitesini (%70) düzeltmiştir. 0.4 M arbutin içinde dondurulan spermelerin, daha yüksek bozulmamış akrozom yüzdesine sahip (% 77.2) olduğu tespit edilmiştir. Sağlam akrozomlu sperm yüzdesi, TCG'li sulandırıcıda arbutin konsantrasyonları arttıkça önemli ölçüde iyileşmiştir ve en iyi sonuçlar 0.4 M arbutinde elde edilmiştir.

Saenen teke sperm örnekleri üç farklı sulandırıcı tris (T), yağsız süt tozu (M) ve Laiciphos 488 (L) ile iki farklı antioksidan 5 mM sistein (C) ve 1000 µg/ml hiyaluronik asit kullanılarak seyreltilmiş ve dondurulmuştur. Sperm örnekleri toplam dokuz farklı çalışma grubuna ayrılmıştır: T-C, T-H, T-K (kontrol); M-C, M-H, M-K; L-C, L-H, L-K. T sulandırıcı grupları için, T-C grubundaki motilite ve canlılık oranları, T-H ve T-K gruplarındaki oranlardan istatistiksel olarak daha yüksek olmasına karşın, gruplar arasında anormal akrozom bakımından önemli bir fark belirlenmemiştir. Diğer sulandırıcılarda da benzer bulgular gözlenmiştir. Elde edilen *in vitro* sperm kalitesi bulgularına göre, motilite ve canlılık oranları sistein eklenen gruplarda daha yüksek bulunmuştur. 5 mM sistein eklenen gruplarda motilite yüzdeleri T-C için %24.5, M-C için %44 ve L-C için %42 olarak tespit edilmiştir. Yağsız süt tozu ve Laiciphos sulandırıcısının tris sulandırıcısından daha üstün olduğu, ayrıca sisteinin bir antioksidan olarak hiyaluronik asitten daha iyi koruma sağladığı belirlenmiştir (Kulaksız ve Daşkın 2010).

Tuncer ve ark. (2010), Ankara tekesi spermmini farklı konsantrasyonlarda rafinoz (2.5, 5, 10 mM), metiyonin (2.5, 5, 10 mM) içeren ve antioksidan içermeyen tris sulandırıcısıyla sulandırmışlar ve dondurma-çözdürme sonrası en iyi motilite oranının 2.5 mM (%63.6) ve 5 mM (%63.4) metiyoninin eklendiğinde görüldüğünü belirtmişlerdir. Metiyoninin, sperm akrozom anomalliklerinde kriyoprotektif etki sağlamadığını, MDA oluşumunun ortadan kaldırılmasında ve antioksidan aktivitelerin sürdürülmesinde etkili olmadığını göstermişlerdir. Sulandırıcıya 5 mM rafinoz ilavesinde akrozom anomaliği %6.2, 10 mM rafinozda %5.2 olarak tespit edilmiştir. 5 mM ve 10 mM rafinoz ilavesi yapılan gruplar, kontrol gruplarına göre sperm akrozomu ve DNA bütünlüğü üzerinde kriyoprotektif etki göstermiş ve MDA düzeylerini de düşürmüştür.

Bucak ve ark. (2010), Ankara tekesi spermini kurkumin (2.5, 5, 10 mM), inositol (2.5, 5, 10 mM), karnitin (2.5, 5, 10 mM) içeren ve antioksidan içermeyen tris sulandırıcısıyla sulandırmış ve dondurmuşlardır. Dondurma-çözdürme sonrası en iyi sperm motilite oranı, sperm dondurma sulandırıcısına 2.5 mM kurkumin eklendiğinde gözlenmiş ve %65.3 olarak tespit edilmiştir.

Antioksidan olarak sperm sulandırıcısına 5 mM hipotaurin ve 5 mM sisteamin ilavesi, Ankara teke sperminin dondurulup çözdürülmesinden sonra ROS oluşumunu etkilemeden ve antioksidan kapasitesini yükseltmeden sperm motilitesini, morfolojisini ve fonksiyonel membran bütünlüğünü iyileştirmiştir. Motilite yüzdeleri 5 mM hipotaurin takviyesinde %63.33 ve 5 mM sisteamin ilavesinde %61 olarak tespit edilmiştir (Bucak vd 2009a).

2.5 ve 5 mM glutamin ile takviye edilen sperm sulandırıcısı, Ankara tekelerinde çözdürme sonrası daha yüksek motilite ve HOST oranlarına yol açmıştır. Sperm membran bütünlüğü de 500 µL/ml hiyaluronan ile iyileştirilmiştir. Motilite, 2.5 mM glutamin ile takviye edilen grupta %62.90 ve 5 mM glutamin içeren grupta %57.90 olarak belirlenmiştir. Akrozom hasarı ve total sperm anormalliği üzerine glutamin ve hiyaluronan'ın bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir (Bucak vd 2009b).

Saanen teke spermi %5 gliserol ve %10 yumurta sarısı içeren yağsız süt tozu sulandırıcısına 5 mM sistein ve 1000 µg/ml hiyaluronik asit ilave edilmiştir. Sperm dondurma sulandırıcısına 5 mM sistein ilavesinde en yüksek motilite oranı gözlenmiş ve %44 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, %35.95 oranında sulandırıcıda 5 mM sistein içeren grupta en düşük anormal akrozom oranı gözlenmiştir. Sonuç olarak, sisteinin spermatolojik özellikleri iyileştirdiği ve fertilitate parametreleri üzerine olumlu bir etki yaptığı belirlenmiştir (Kulaksız ve Daşkın 2009).

Ateşşahin ve ark. (2008), Ankara teke spermlerini, tris bazlı sulandırıcıyla ayrı ayrı sistein (5, 10, 15 mM), taurin (25, 50, 75 mM) ve trehaloz (25, 50, 75 mM) ekleyip seyrelterek dondurmuşlardır. Sulandırıcıya 15 mM sistein ilavesi, en yüksek motilite oranını vermiş ve %61.43 olarak tespit edilmiştir. Donma-çözülme sürecini takiben önemli bir gelişme gözlenmemiştir. Bu yüzden, sperm sulandırıcısına taurin, trehaloz veya sisteinin ilavesinin Ankara tekelerinde çözdürülme sonrası motilite, akrozomal bütünlük, sperm membran bütünlüğü ve MDA seviyeleri üzerinde yararlı bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Bucak ve Uysal (2008), Saanen teke spermini 5 mM sistein, 25 mM taurin, 50 mM trehaloz katılan ve antioksidan kullanılmayan tris kontrol grubu sulandırıcılarıyla dondurdukları spermilerden, çözdürülme sonrası sırasıyla %64, %46, %54, %53'lük motilite elde etmişlerdir. Motilite yüzdesi en yüksek olan sulandırıcı, 5 mM sistein ilave edilen grup olmuştur ve oranıda %64 olarak belirlenmiştir.

Mara ve ark. (2007), teke spermini yağsız süt tozu, tempol ve tempol+hiyaluronik asit sulandırıcıları kullanarak, 4°C'de 24 saat kısa süreli olarak saklamış ve hiyaluronik asit eklenmiş sulandırıcı grubunun sperm motilitesini daha iyi koruduğunu bildirmişlerdir. 24 saat sonunda tempol+hiyaluronik asit içeren sulandırıcıda motilite oranı %60 olarak tespit edilmiştir.

2.15. Teke Sperm Kriyoprezervasyonda Kullanılan Flavonoidler İle İlgili Literatürler

Mustofa ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada, sperm sulandırıcısına yeşil çay ekstraktı (GTE) eklenmesinin, çözdürülmüş Kacang teke sperminin kalitesi ve mitokondriyal deoksiribonükleik asit (mtDNA) mutasyonu üzerinde etkisinin belirlenmesini amaçlamışlardır. 12 adet Kacang tekesinden toplanan spermier havuzlanmış, T0, T1, T2 ve T3 grubu olarak, sırasıyla 0, 0.05, 0.10 ve 0.15 mg GTE/100 ml içeren yağsız süt-yumurta sarısı sulandırıcısında seyreltilmiştir. T2 grubunun (0.10 mg GTE/100 ml), çözdürüldükten sonra Kacang tekelerinde en yüksek sperm kalitesini koruduğunu gözlemlemişlerdir. T2 grubunda sperm canlılık, motilite, plazma membran bütünlüğünün en yüksek seviyede korunduğunu ve en düşük MDA konsantrasyonu, sperm DNA fragmentasyonu ve mtDNA mutasyon sıklığı yüzdelelerini tespit etmişlerdir.

Wahjuningsih ve ark. (2021a) çalışmalarında, teke sperm sulandırıcısına farklı konsantrasyon seviyelerinde (%0, 2, 4 ve 6) su yoncası (*Marsilea crenata*) ekstraktı (WCE) ilavesinin çözdürülmüş Boer teke spermier üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuçlar, Tris-fruktoz-sitrik-gliserol sulandırıcısına WCE takviyesinin, motilite, canlılık ve plazma membran bütünlüğü parametrelerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu, ancak anormallikler üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Araştırma, dondurulmuş teke spermini korumanın en iyi yolunun, tris-fruktoz-sitrik-gliserole %4 WCE eklemek olduğunu göstermiştir.

Wahjuningsih ve ark. (2021b) yaptıkları çalışmada, teke sperm sulandırıcısına farklı seviyelerde siyah cincau (*Mesona palustris* B.) yaprağı ekstraktı (% 0, 1.5, 2 ve 2.5) ilavesinin çözdürülme sonrası teke sperminin kalitesi üzerindeki etkisini ve *in vivo* fertilizasyonu test etmişlerdir. %2 siyah cincau yaprağı ekstraktı ile takviye edilmiş sulandırıcının, motiliteyi, canlılığı ve plazma membran bütünlüğünü koruduğunu, dondurulduktan sonra spermin MDA seviyesini düşürdüğünü ve fertilizasyon oranını artırdığını ortaya koymuşlardır.

Hassan ve ark. (2021) yaptıkları araştırmada, farklı konsantrasyonda *Turraea fischeri* yaprağı ekstraktını (TFLE: 0, 125, 250 ve 375 µg/ml) teke sperm sulandırıcısına ilave etmiş ve dondurmuşlardır. Çözülme sonrası, TFLE konsantrasyonuna bağlı olarak motilite, canlılık ve membran bütünlüğünde iyileşme derecesinin arttığı tespit edilmiştir. Akrozomal membran bütünlüğü ve anormal sperm oranı, ekstraktan önemli ölçüde etkilenmemiştir. Ayrıca, 375 µg/ml TFLE'de nekrotik sperm oranı önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. Sulandırıcıya TFLE eklenmesi doza bağlı olarak teke sperminin toplam antioksidan kapasitesini (TAC) artırmış ve H₂O₂ konsantrasyonunu azaltmıştır. 375 µg/ml TFLE'nin teke spermi sulandırıcısına ilavesi, antioksidan kapasiteyi koruyarak kriyoprezerve edilmiş spermin fonksiyonel ve ultrastrüktürel özelliklerini iyileştirmiş, böylece membran hasarını önlemiş ve apoptozu azaltmıştır.

Ariyan ve ark. (2021), *Tribulus terrestris* etanol ekstraktı (TEE; 25, 50 ve 100 µg/ml) ve *Cinnamomum zeylanicum* etanol ekstraktı (CEE; 25, 50 ve 100 µg/ml) ve ek olarak trehaloz (150 mM) ilavesinin teke epididimal sperm fertilizasyonu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. 50 µg/ml TEE ve 50 µg/ml CEE tek başına ilavesi ve ek trehaloz içeren sulandırıcılarda canlılık, motilite ve progresif motilite oranları önemli ölçüde artmış ve MDA konsantrasyonu seviyesi azalmıştır. Aynı zamanda DNA fragmentasyonu azalmış ve bozulmamış sperm başlarının oranı iyileşmiştir. Ayrıca, 50 µg/ml TEE ilavesi, diğer ilave edilenler arasında en düşük DNA fragmentasyonunu göstermiştir.

Azimi ve ark. (2020), teke sperm sulandırıcısına semizotu sulu (PAE), metanolik (PME; 25, 50 ve 100 µg/ml) ve etanolik (PEE; 25, 50 ve 100 µg/ml) ekstraktlarının ilavesinin teke sperm parametreleri, DNA fragmentasyonu ve apoptoz özellikleri üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Sulandırıcıya PME 50 µg/ml ilavesinde, en yüksek toplam motilite, en düşük MDA seviyesi, plazma membranlarının bütünlüğünde artış ile daha düşük miktarlarda apoptotik ve ölü sperm hücreleri tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, 50 µg/ml semizotu ekstraktlarının kriyoprezervasyon için

kullanılabileceğini ve metanolik ekstraktı sonuçlarının diğer ekstraktlara göre daha faydalı olduğunu ortaya koymuştur.

Borges ve ark. (2020), teke spermlerinin kriyoprezervasyon sürecinin farklı aşamalarında QUE katılarak antioksidan etkisini araştırmışlardır. Dört tekenin her birinden beş ejakülat toplanmış ve dört gruba ayrılmıştır: G1 (kontrol): QUE olmayan; G2: santrifüjden önce, sperm+15 µM QUE; G3: santrifüjden sonra, sperm+15 µM QUE; G4: santrifüjlemeden önce, sperm+15 µM QUE ve santrifüjlemeden sonra, sperm+15 µM QUE (toplam 30 µM QUE) ilave edilip dondurularak saklanmıştır. Tüm sperm örnekleri, çözdürmeden sonra sperm kinetiği, plazma membran bütünlüğü ve ROS seviyeleri açısından değerlendirilmiştir. Daha düşük ROS konsantrasyonları antioksidan takviyesi alan gruplarla ilişkili olmasına rağmen, toplam ve progresif motilitesinde lineer ve doza bağlı azalmalar gözlenmiştir. Benzer şekilde, plazma membran bütünlüğü kontrol grubunda, QUE uygulanan gruplara göre daha iyi korunmuştur. Sonuç olarak QUE, sperm dondurarak saklamayla ilgili OS'yi azaltmada etkili olmasına rağmen, donmuş teke sperminin kinetiği ve bütünlüğü üzerinde doza bağlı zararlı etki göstererek test edilen konsantrasyonlarda kullanımıyla çeliştiği tespit edilmiştir.

İsmail ve ark. (2020), Tris sulandırıcısına 50 veya 100 µg ilave edilen farklı bitki ekstrakt nanoformülasyonlarının (NF) [nane (MENF), kekik (TENF) ve kurkumin (CENF)] dondurularak saklanan teke sperminde, sperm kalitesi, apoptoz, kromatin yoğunlaşması, enzim aktivitesi ve kriyoprezerve edilmiş teke sperminin oksidatif durumu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. 100 µg düzeyindeki CENF'ler spermlerin dondurularak saklanması sırasında TENF'ler ve MENF'lerden daha fazla sperm parametrelerinde ve antioksidan durumunda iyileşme gösterdiği belirlenmiştir. CENF'ler, TENF'ler ve MENF'lerle karşılaştırıldığında, kriyohasarı önleme ve spermlerin kriyotoleransını destekleme açısından, çözdürme sonrası teke sperminin kalitesini iyileştirmiştir. Kurkumin ekstraktının, spermlerin progresif motilitesini, canlılığını, membran bütünlüğünü, apoptozu ve oksidatif durumu iyileştirdiği tespit edilmiştir. Kurkumin ekstrakt nanoformülasyonlarının, teke sperminin kromatin yoğunlaşmasını azalttığı belirtilmiştir.

Silva ve ark. (2019), kateşin veya epigallokateşin-3-gallat (EGCG)'nin farklı konsantrasyonlarının teke sperminin dondurulabilirliği üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. 6 adet tekeden, suni vajen yöntemiyle 48 saat arayla toplamda 72 ejakülat toplanmıştır. Kütle hareketi ≥ 3 , motilite $\geq \%70$, vigor ≥ 3 , konsantrasyon $\geq 2 \times$

10^9 sperm/ml ve toplam sperm patolojileri \leq %20 kriterlerine sahip spermier seçilip havuzlanmıştır. Her bir semen rneği 1:9 oranında dile edilmiştir. İki deney grubu oluşturulmuş; 1. Deney grubu: 0, 15, 25, 50, 75 ve 100 μ M kateşin ve 2. Deney grubu: 0, 15, 25, 50, 75 ve 100 μ M EGCG ile dondurulmuştur. zdrldkten sonra numuneler, 0 ve 1 saatte kinematik, plazma membranı ve akrozom bütünlüğü, morfoloji ve OS açısından değerlendirilmiştir. Kateşin eklenmesi, plazma ve akrozomal membran bütünlüğü, normal morfoloji ve OS olmadan sperm içeren hücrelerin yüzdesini artırmamıştır. Bununla birlikte, 100 μ M EGCG ilavesi, zldkten hemen sonra plazma membran bütünlüğünü korumuş ve aynı zamanda doza bağlı bir etki göstermiştir. Böylece, kateşin veya EGCG, daha yüksek konsantrasyonlarda, donmuş teke spermierinin kinematiğini geçici bir şekilde inhibe ettiği ve 100 μ M EGCG'nin plazma membranını koruduğu gösterilmiştir.

Wahjuningsih ve ark. (2019a), temel sperm seyrelticisi (yumurta sarısı-yağsız süt) içine su yoncası (*Marsilea crenata*) ekstraktı (WCE) eklenmesinin çözdürülme sonrası sperm parametreleri (motilite, canlılık, plazma membran bütünlüğü ve sperm anomalisi) zerinde etkisini değerlendirmişlerdir. 3 adet Boer tekesinden 5 hafta boyunca, haftada iki gün suni vajen yöntemi kullanarak sperm örneklerini toplamışlardır. Çalışmada kullanılan spermier, en az %70 motiliteye ve maksimum %10 anomaliye sahip olanlardan seçilmiştir. Alınan spermier yumurta sarısı + yağsız süt seyrelticisi ile 1:10 oranında sulandırılmıştır. Sperm rnekleri, T0 (yumurta sarısı-yağsız süt + %0 WCE), T1 (yumurta sarısı-yağsız süt + %1 WCE), T2 (yumurta sarısı-yağsız süt + %3 WCE) ve T3 (yumurta sarısı-yağsız süt + %5 WCE) olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Dondurma ve zdrme sonrası spermierinin motilite, canlılık, plazma membran bütünlüğü ve sperm anomalisi düzeylerine bakılmıştır. Sonuçlar, yumurta sarısı-yağsız süt sulandırıcısına WCE eklenmesinin, spermierinin motilitesi, canlılığı ve plazma membran bütünlüğü üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu, ancak sperm anomalilikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Araştırma, yumurta sarısı-yağsız süt sulandırıcısına %3 WCE eklenmesinin, dondurulmuş teke spermierinin kalitesini korumak için en iyi konsantrasyon olduğunu göstermiştir.

Wahjuningsih ve ark. (2019b), CEP-2 yumurta sarısı sulandırıcısında bulunan *Moringa oleifera* yaprağı ekstraktının (MLE), Senduro teke spermierinin zdrme sonrası sperm kalitesi üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Ejakülatlar, suni vajen kullanılarak olgun bir tekeden on hafta boyunca haftada bir toplanmıştır. Çeşitli konsantrasyonlarda MLE (%1, 3, 5 ve 7) içeren CEP-2 yumurta sarısı sulandırıcısı hazırlanmıştır. Semen kalitesi, çözdürüldükten sonra sperm motilitesi, canlılığı,

anormalliği ve plazma membran bütünlüğüne göre değerlendirilmiştir. Sonuç, CEP-2 yumurta sarısı sulandırıcısı içine farklı konsantrasyonlarda MLE eklenmesinin, sperm motilitesi, canlılığı ve membran bütünlüğü yüzdesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ancak, anormallik bakımından önemli bir etkisi gözlemlenmemiştir. Sonuçlar, semen sulandırıcıya %5 MLE eklenmesinin çözündürme sonrası sperm kalitesini iyileştirdiğini ortaya koymuştur.

Senduro tekesinden sperm örnekleri haftada iki kez suni vajen yoluyla alınmıştır. Bu araştırmada, sperm sulandırıcısına MLE ilave edilerek dondurulmuş Senduro teke spermlerinin kalitesi ve fertilizasyon üzerindeki etkisi analiz edilmiştir. Motilitede minimum %70'in üzerinde ve anormallikte %10'dan az olan örnekler seçilmiştir. Semen, Tris-yumurta sarısı sulandırıcı içinde seyreltilmiş ve sırasıyla %0, 1, 3 ve 5 MLE ile desteklenmiştir. %3 MLE kullanımı, çözülme sonrası en yüksek semen kalite özellikleriyle sonuçlanmıştır. Tris-yumurta sarısı sulandırıcısına %3 MLE ilavesi, Senduro tekesinin donmuş sperminin kalitesini ve fertilizasyonunu iyileştirmiştir (Wahjuningsih vd 2019c).

Mao ve ark. (2018), kadmiyum (Cd^{+2}) tarafından indüklenen OS altında QUE'nin teke spermleri ve zigotlar üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Tekelerden toplanan spermler, 60 μM $CdCl_2$, 60 μM $CdCl_2$ + 10 μM QUE, 10 μM QUE ve hiçbir şey içermeyen kontrol grubu olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Örnekler, 4, 8 ve 12 saat boyunca inkübe edilmiştir. Çalışmada, QUE, teke sperminde Cd^{+2} 'nin neden olduğu MDA ve ROS düzeylerini azaltmıştır, bu da spermin motilite, canlılık, membran bütünlüğü ve mitokondri aktivitesi gibi özelliklerini iyileştirmiştir. Özetle, QUE'nin eklenmesi, sperm kalitesini, fertilizasyon oranını ve teke erken embriyolarının *in vitro* gelişim kapasitesini etkili bir şekilde iyileştirmiştir. Cd^{+2} tarafından indüklenen OS altında, QUE ilavesinin mitokondriyal fonksiyonu koruduğunu ve GSH-Px, CAT, GSH ve SOD dahil olmak üzere antioksidan türlerinin aktivitelerini veya miktarlarını artırdığını ve daha az peroksidasyon ürünlerine yol açtığını göstermiştir.

Maidin ve ark. (2018), 5 adet Jermasia tekesinden toplanıp havuzlanmış spermleri kullanmışlardır. Spermler, tris-yumurta sarısı sulandırıcısına *Nigella sativa* (çörek otu) yağı, bal ve ikisinin kombinasyonu ilave edilmiş ve gruplara ayrılmıştır; Kontrol (ilave yok), Grup 1 (%0.5 çörek otu), Grup 2 (%2 bal) ve Grup 3 (%0.5 çörek otu ve %2 bal). Spermlerin tüm parametreleri, semen toplandıktan hemen sonra ve dondurulduktan 48 saat sonra çözündürülüp değerlendirilmiştir. Sperm parametreleri, semen toplandıktan sonra 0, 0.5, 1, 1.5 ve 2 saat sonra gözlenmiştir. Sonuçlar, çörek

otu yağı (Grup 1; sırasıyla %73.8 ve %72) ve bal (Grup 2; sırasıyla %73.3 ve %72) ilave edilenlerden 1.5 ve 2 saat sonra yeni toplanmış sperm motilitesinin, kontrollerden (%93 ve %79,8 motilite) %20 (1.5 h) ve %8 (2 h) olarak daha düşük olduğunu göstermiştir. Progresif skor ve sperm anormalliği gruplar arasında anlamlı bulunmamıştır. Grup 3'te (%60.33 motilite; çörek otu ve bal ile desteklenmiş) 0. saatte çözdürme sonrası semen motilitesinin, kontrollere (%24.33 motilite) kıyasla daha yüksek olduğu, 0.5 saatte grup 3'te motilitenin (%61.83) 0. saate göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, çörek otu yağı ve balının teke sulandırıcısına ilave edilmesinin, sperm plazma membranını OS'ye bağlı hasarlardan koruduğu ve kriyoprezervasyon sırasında buz kristali oluşumunu önlediği ileri sürülmüştür.

Daramola ve ark. (2017b), Batı Afrika cücesi tekelerinin spermlerini, *mucuna* tohumu ekstraktı (MSE) ilave edilmiş tris sulandırıcısıyla seyreltilmiş ve daha sonra vitrifiye edilmiş spermlerin, fonksiyonel bütünlükleri (akrozom ve membran bütünlükleri) ve OS indekslerini (MDA ve akrosin aktivitesi) araştırmışlardır. Semen örnekleri, tris sulandırıcısına farklı oranlarda; 0, 0.25, 0.5, 0.75 ve 1 g/100 ml MSE ilave edilerek seyreltilmiştir. Sonuçlar, MSE ile vitrifiye edilen sperm kontrolle kıyasla MDA konsantrasyonlarını azalttığını ortaya koymuştur. 0.25 g MSE dışındaki tüm gruplar kontrolle kıyasla daha yüksek akrosin aktivite göstermiştir ve optimal değerler 1 g MSE'de kaydedilmiştir. Bulgular, tris sulandırıcılarına MSE ilavesinin akrosin aktivitesini artırdığını, MDA konsantrasyonunu azalttığını ve vitrifiye edilmiş teke spermlerinin akrozom ve membran bütünlüklerini koruduğunu göstermiştir.

Seifi-Jamadi ve ark. (2017), enzimatik olmayan bir antioksidan olarak QUE'nin, gliserol veya dimetilasetamid (DMA) ile kombinasyon halinde, teke sperminin dondurulması üzerindeki etkinliğini değerlendirmişlerdir. Ejakülatlar, 4 sağlıklı olgun Mahabadi tekesinden suni vajen kullanılarak haftada iki kez art arda üç hafta boyunca toplanmıştır. Çalışma süresi boyunca toplam 24 ejakülat kullanılmıştır. Tüm ejakülatlar, \geq %80 motilite ve \leq %10 morfolojik anormalliklere sahip olanlar çalışma grubuna alınmıştır. Ejakülat örnekleri 6 eşit parçaya bölünmüştür. %5 gliserol ve DMA ile birlikte farklı konsantrasyonlarda QUE (0, 10 ve 20 μ M) ile desteklenen yumurta sarısı bazlı sulandırıcı ile seyreltilmiştir. Sulandırılmış semen dondurulmuş ve çözdürüldükten sonra spermler motilite, canlılık, anormallik, membran bütünlüğü ve LPO için MDA değerlendirilmiştir. Sonuçlar, DMA içeren sulandırıcıda sperm canlılığı, toplam motilite ve progresif motilitenin daha yüksek olduğunu, anormallik yüzdesi ile MDA konsantrasyonunun daha düşük olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, sulandırıcının DMA ile kombinasyon halinde 10 μ M QUE ile takviyesi, teke sperm motilitesini

iyileştirmiş ve dondurma ve çözdürülme sonrası LPO'sunu baskılamıştır. Ayrıca DMA'nın, teke spermi dondurulmasında daha etkili bir KPA olduğu ve bir KPA olarak gliserole alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır.

Silva ve ark. (2016), farklı konsantrasyonlarda trans-RSV veya QUE'nin teke sperminin kriyoprezervasyona dayanma kabiliyeti üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Altı tekeden elde edilen altı sperm havuzu, farklı konsantrasyonlarda RSV veya QUE ile muamele edilmiş (Deney 1: 0, 15, 25, 50, 75 ve 100 µM RSV; Deney 2: 0, 15, 25, 50, 75 ve 100 µM QUE) ve dondurulmuştur. Çözdürüldükten sonra sperm, 0 ve 1 saatlik inkübasyonun ardından sperm kinematiği, plazma ve akrozomal membran bütünlüğü, morfolojisi ve OS açısından değerlendirilmiştir. 1 saatlik inkübasyondan sonra, 15, 50 ve 75 µM QUE ilave edilenlerde, toplam motilite ve ayrıca tüm QUE konsantrasyonlarındaki plazma membran bütünlüğü 0. saate göre daha düşük çıkmıştır. Bu çalışmada, RSV veya QUE varlığında, plazma ve akrozomal membran bütünlüğü, sperm morfolojisi ve OS parametrelerinin değişmediği belirtilmiştir.

2.16. *Nepeta L.* Cinsinin Genel Özellikleri

Nepeta L., Lamiaceae familyasının en büyük cinsidir (Goldansaz vd 2019, Sharma vd 2021). Bu cinsin çoğu aromatik olan yaklaşık 300 türü bulunmaktadır (Açar vd 2011, Formisano vd 2011). Dünya genelinde yayılış gösteren bu cins, genellikle çok yıllık bitkileri içerir (Sarıkürkçü vd 2019). Bu türler, kediler üzerindeki etkilerinden dolayı catnip veya catmint olarak bilinir. Ana bileşenleri nepetalaktondur (Açar vd 2011). *Nepeta* türleri Türkçe'de "kedi nanesi" olarak bilinir (Yılmaz vd 2020).

Birçok alanda yayılış gösteren cins *Nepeta L.*'nin adı, Roma döneminde ve günümüzde yaygın olarak İtalya'nın Nepi şehri merkezli catmints olarak bilinen Nepete'den gelmektedir (Sharma ve Cannoo 2013, Acimovic vd 2020).

Nepeta türlerinin genellikle Avrupa, Güney-Batı ve Orta Asya, Kuzey Amerika, Kuzey Afrika (Açar vd 2011, Acimovic vd 2020) ve Akdeniz bölgelerinde lokalize olduğu görülmektedir (Akdeniz vd 2020, Yılmaz vd 2020). *Nepeta* cinsinin ana çeşitlilik merkezi Güneybatı Asya ve Batı Himalayalar'dır (Açar vd 2011). Endemizm oranı %50 (Açar vd 2011, Acimovic vd 2020) olan *Nepeta* (Lamiaceae) cinsi Türkiye'de 19'u endemik olmak üzere toplam 50 takson, 39 tür ile temsil edilmektedir (Yılmaz vd 2020).

Birçok bitkisel uçucu yağ, çeşitli hastalıkların ve patolojik durumların tedavisinde faydalı olan tıbbi özelliklere sahiptir (Salehi vd 2018). *Nepeta* bitkileri halk arasında idrar söktürücü, spazm giderici, astım önleyici (Goldansaz vd 2019, Kaska vd 2019), balgam söktürücü, öksürük kesici (Sharma vd 2021), sakinleştirici, antiseptik (Sarıkürkçü vd 2019), ateş düşürücü, alerji önleyici (Ashrafi vd 2020) ve kas gevşetici olarak kullanılmaktadır (Akdeniz vd 2020).

Nepeta türleri, antioksidan (Azizian vd 2021), antikanser, antiparazit (Ashrafi vd 2020), antibakteriyel, antiinflamatuvar (Kaska vd 2019, Sitarek vd 2020), antiplatelet, antianjiyogenez (Al-Sheddi vd 2018), antimikrobiyal, antiviral (Sharma ve Cannoo 2013, Afshar vd 2017), antifungal, insektisit (Süntar vd 2018, Sharma vd 2021), sitotoksik, fitotoksik (Formisano vd 2011), genotoksik, apoptoz indüksiyonu (Süntar vd 2018), antitümör, larvisit, analjezik, antidepresan, antikonvülsan gibi çok sayıda biyolojik aktiviteye sahiptir (Süntar vd 2018, Akdeniz vd 2020).

Nepeta türleri, zengin fitokimyasal içerikleri ile dikkat çekmektedir (Şafak vd 2022). *Nepeta* cinsine ait türlerin fitokimyasal bileşimi, özellikle ana bileşenleri nepetalakton izomerleri (Azizian vd 2021), terpenler (monoterpen, diterpen, triterpen ve seskiterpen), fenolik asitler, flavonoidler ve steroidlerden oluşur (Akdeniz vd 2020, Sharma vd 2021, Şafak vd 2022). Bu bitkilerden elde edilen uçucu yağlar, hoş kokuları nedeniyle çok değerlidir (Sarıkürkçü vd 2019) ve monoterpen özellikle de nepetalakton bakımından zengindir (Formisano vd 2011). Flavonlar, flavonoller, flavanoller ve flavanon dahil olmak üzere *Nepeta* türlerinden farklı türlerde otuz beşten fazla flavonoid izole edilmiştir (Sharma vd 2021). Cirsimaritin, izotimosin, genkwanin, luteolin, apigenin, salvigenin gibi flavonoidler (Sharma vd 2021, Şafak vd 2022) birçok *Nepeta* türünde bulunmaktadır ve bu cinsin ayırt edici bir kemotaksonomik özelliği olarak işlev görürler (Sharma vd 2021).

N. menthoides (Delshad ve Parvizi 2014), *N. cataria* L. (Emami vd 2016), *N. deflersiana* (Al-Taweel vd 2017), *N. gloeocephala* (Ashkezary vd 2017) gibi farklı *Nepeta* türlerinden elde edilen uçucu yağ ekstraktlarının çeşitli insan kanser hücre hatlarında apoptotik aktivitesi araştırılmıştır. Aynı zamanda, *N. Deflersiana*'nın (Al-oqail vd 2015, Al-Sheddi vd 2018) antikanser ve *N. cataria* var. *citriodora* (Becker), *N. cataria* L. (Suschke vd 2007), *N. menthoides* Boiss & Buhse (Kahkeshani vd 2014), *N. ucrainica* L. spp. *kopetdaghensis* (Shakeri vd 2014), *N. sintenisii* Bornm (Shakeri vd 2016), *N. binaloudensis* (Afshar vd 2017), *N. curvidens* Boiss. & Balansa (Ashrafi vd 2020), *N. govaniiana* (Dar vd 2014), *N. heliotropifolia* ve *N. congesta* subsp. *kriptotanta*

(Akdeniz vd 2020), *N.rtanjensis* Diklic & Milojevic, *N.sibirica* (Tsuruoka vd 2012) gibi *Nepeta* türlerinin sitotoksik potansiyellerini değerlendirmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Nepeta türleri arasında, *N. cataria* L. en çok çalışılan türdür. Öte yandan araştırmaların *N. cataria* dışında birçok *Nepeta* türüne de odaklandığı görülmüştür. *Nepeta* türlerinin tıbbi özellikleri genellikle uçucu yağlarından ve flavonoidlerinden kaynaklanmaktadır. *Nepeta* türlerinin büyük çoğunluğu yapraklarının yüzeyinde flavon grubunun lipofilik flavonoidlerini içerir. Antioksidan ve serbest radikal temizleme kapasiteleri nedeniyle, bu bitkiler terapötik etkiler gösteren etkili bileşenleri içermektedir (Delshad vd 2011).

Nepeta cinsinden izole edilen uçucu yağlar, yağdaki nepetalakton varlığına bağlı olarak iki gruba ayrılmıştır. Kategori-I, uçucu yağlarında ana bileşen olarak nepetalakton ve türevine sahip türlerden oluşmaktadır. Öte yandan, kategori-II türler nepetalakton dışındaki bileşikler ve bunların türevlerini (1,8-sineol, α -citral, β -citronellol, nerol, limonen, linalool, neral, α -pinen, α -terpinolen, terpinen-4-ol, β -elemen, β -karyofilen, karyofilen oksit, β -farnesen vb.) içerir (Sharma ve Cannoo 2013, Sharma vd 2021).

Literatürler, *Nepeta* cinsinin farklı türlerinden esansiyel yağların izolasyonunun, esas olarak Clevenger tipi aparat kullanılarak buhar ve hidrodistilasyon yoluyla gerçekleştirildiğini ortaya koymuştur. İzolasyon süresi 2 ila 6 saat arasında değişebilir, ancak çoğu durumda 3 saat olmuştur. Ayrıca, iyi sonuçlar elde etmek için esansiyel yağ izolasyonu için gerekli olan bitki materyalinin ağırlıklı olarak tam çiçeklenme döneminde toplanması öngörülmüştür (Sharma vd 2021).

2.17. *Nepeta italica* subsp. *cadmea*

Nepeta cadmea Boiss, A.L. Budantsev tarafından *Nepeta italica*'nın bir alt türüne indirgenmiştir ve *Nepeta italica* subsp. *cadmea* (Boiss.) [Bot. Zhurn. (Moscow & Leningrad) 76(11): 1603 (1992)] olarak düzenlenmiştir. Ayrıca *Nepeta italica* subsp. *cadmea* (Boiss.), *Nepeta cadmea* Boiss. ile sinonimdir. *Nepeta italica* L. subsp. *cadmea* (Boiss.) A.L. Budantsev, *Nepeta* cinsinin endemik türlerinden biridir ve Türkiye'nin Batı, Güney ve Güneybatı Anadolu bölgelerinde yayılış göstermektedir (Dirmenci 2003). Türkçede "honaz pisikotu" olarak bilinen endemik tür *N. cadmea*

Boiss., otsu, çok yıllık, genellikle aromatik, uçucu yağ içeriği bakımından zengin bir bitkidir (Dirmenci 2012, Yılmaz vd 2020).

Bu bitkiler gövdelerinde dik ve yoğun salgı tüyleri içeren 30-120 cm uzunluğunda birkaç dal bulundurur. *Nepeta italica* subsp. *cadmea* (Boiss.) bitkisinin yaprakları üçgen-ovale 3-6x1-3 cm boyutlarında ve yeşildir. Çiçeklenme, çok sayıda çiçekli vertisillatlar şeklinde, en alttakiler belirgin bir şekilde birbirinden ayrı, yukarıdakiler internodlar halinde görülemeyecek kadar yakın, vertisillatlar oldukça kısa saplıdır. Kaliks tübuler ve 9-12 mm uzunluğundadır. Korollası, sarı başlıklı ve beyaz alt dudaklıdır ve boyutları 12-15 mm'dir (Davis 1982, Yılmaz vd 2020) (Şekil 2.6).

Türkiye'nin endemik türlerinden *Nepeta cadmea* Boiss., antioksidan potansiyeli ve fenolik bileşik karakterizasyonu açısından incelenmiştir. Kaska ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada, *N. cadmea*'nın çeşitli ekstraktlarının (etanol, metanol, aseton ve su) fenolik bileşiklerini, antioksidan, antihelmintik ve sitotoksik aktivitelerini belirlemişlerdir. *N. cadmea*'nın çeşitli ekstraktlarının arasında, sulu ekstraktı en yüksek miktarda radikal süpürme potansiyeli göstermiştir. Diğer ekstrakt kombinasyonlarına göre, aseton ekstraktının toplam flavonoid içeriği daha yüksek, 77.09 ± 8.69 mgQEs/g olarak tespit edilmiştir. Ayrıca etanol ekstraktının fenolik içeriği HPLC kullanılarak incelenmiş ve epikateşin, klorojenik ve kafeik asitler belirlenmiştir (Kaska vd 2018). Başka bir araştırmada, *Nepeta italica* subsp. *cadmea*'nın hidroetanolik ekstraktının total flavonoid içeriği 60.89 ± 1.30 mgQEs/g olarak bulunmuştur (Kaska vd 2019). *Nepeta italica* subsp. *cadmea* ekstraktı naringin, epikateşin, kuersetin, rutin gibi flavonoidler içermektedir (Kaska vd 2018, 2019).



Şekil 2.6 *Nepeta italica* subsp. *cadmea*

2.18. Hipotez

Nepeta italica subsp. *cadmea* bitkisi esansiyel yağının en etkili dozunun, Ankara tekisi sperma kriyoprezervasyonunda kriyoprotektif etkisi olabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. *Nepeta italica* subsp. *cadmea* Bitkisinin Toplanması ve Ekstraktının Hazırlanması

Nepeta italica subsp. *cadmea* örnekleri, Temmuz-Ağustos aylarında Denizli ili Honaz Dağı'ndan toplanmıştır (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nden, 09.07.2020 tarihinde araştırma izni alınmıştır). Bitkiler, karanlık ve nem almayan ortamda 4 hafta boyunca sürekli takip edilerek kurutulmuştur. Daha sonra kurutulan bitkilerin çiçek, yaprak, tohum ve gövdeleri küçük parçalara ayrılarak parçalayıcıda öğütülmüş ve toz haline getirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Kurutulmuş ve öğütülmüş *Nepeta italica* subsp. *cadmea*

Bitki ekstraktının eldesi, distilasyon yöntemlerinden, su distilasyonu (Hidrodistilasyon) ile Clevenger düzeneği kullanılarak yapılmıştır. İşlem, soğutucu ile

bağlantılı bir cam balon içerisindeki su ve bitki (toz) materyalinin 4-6 saat süre ile kaynatılarak, su buharı ile birlikte hareket eden yağ moleküllerinin soğutucuda yoğunlaştırılıp sudan ayrıştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Elde edilen, esansiyel yağ, amber şişede 4°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.2 Clevenger düzeneği ile ekstrakte edilmiş *Nepeta italica* subsp. *cadmea* yağı

3.2. Tekelerin Temini ve Bakımı

Çalışmamıza, Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu'ndan 09.09.2019 tarihinde PAUHDEK-2019/28 ile 30.11.2021 tarihinde değişiklik talebimiz nedeniyle PAUHDEK-2021/01 ile onay verilmiştir. Bu çalışmada, 2-4 yaşlarında 5 adet ergin Ankara tekesinden (Şekil 3.3) alınan ejakulatlar kullanılmıştır. Tekelerin bakımı ve beslemesi Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır. Hayvanlara, günlük ihtiyaçlarını karşılayacak kadar uygun yem ve su verilmiştir.



Şekil 3.3 Çalışmada kullanılan Ankara tekeleri

3.3. Sperma Alınması

Araştırmamızda kullandığımız 5 adet tekeden, elektroejakulasyon cihazı (Şekil 3.4) ile üreme mevsiminde, haftada 3 kez olmak üzere 6 hafta süresince ejakulatlar alınmıştır. Alınan ejakulatlar (Şekil 3.5), 35-37°C'de su banyosunda bekletildikten sonra, uygun özelliğe sahip (sperma yoğunluğu $\geq 2 \times 10^9$ spermatozoa/ml; motilite ≥ 80) olanlar birleştirilerek dondurma işlemine geçilmiştir.



Şekil 3.4 Elektroejakulator



Şekil 3.5 Elektroejakulator kullanılarak alınan semen numuneleri

3.4. Sperma Dondurulmasında Kullanılan Tris Ana Stok Sıvısının Hazırlanması

Trizma: 297.58 mM, Sitrik asit: 96.32 mM, Fruktoz: 82.66 mM dozlarında 500 ml'de olacak şekilde tartılıp, distile suyla 500 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon üzerine 0.5 ml penisilin-streptomisin-amfoterisin B karışımı eklenmiş, pH'sı 6.90 ve ozmotik basıncı 304 mOsm/kg olarak ayarlanmıştır. Spermanın dondurulma işleminde, Tris Ana Stok Sıvısı üzerine %15 oranında yumurta sarısı ilave edildikten sonra santrifüj edilmiştir. Süpernatantları alınıp %5 oranında gliserol ilave edildikten sonra temel sulandırıcı oluşturulmuştur. Solüsyon 60°C'de 5 dakika bekletilmiştir (Evans vd 1987, Bucak vd 2010).

3.5. *Nepeta italica* subsp. *cadmea* Esansiyel Yağının ve Grupların Hazırlanması

Yağın çözünebilmesi için 0.5 ml yağ üzerine 1 ml DMSO ilave edilmiştir. Yağın çözüldüğünden emin olmak için, üzerine Tris Ana Stok eklenerek kontrol edilmiştir. Ardından bu hazırlanan yağ karışımından, sulandırıcı grupları hazırlanmıştır. Deney grupları, temel sulandırıcı (kontrol), ve bu sulandırıcıya üç farklı dozda *Nepeta italica* subsp. *cadmea* esansiyel yağı eklenerek oluşturulmuştur.

Gruplar:	1- Temel sulandırıcı (Kontrol)
	2- Temel sulandırıcı + 0.75 µl/10 ml
	3- Temel sulandırıcı + 1.5 µl/10 ml
	4- Temel sulandırıcı + 6 µl/10 ml

3.6. Sperma Kriyoprezervasyonu

35-37°C'deki su banyosunda birleştirilmiş spermaların yoğunluğu, hemositometrik metot ile belirlenerek, bir payette (0.25 ml) yaklaşık 200 milyon spermatozoa olacak şekilde yukarıdaki sulandırıcı grupları ile sulandırılmıştır. Sulandırılan sperma, oda sıcaklığında payetlere (0.25 ml) çekilmiş, açık uçları polivinil ile kapatılmış ve 2.5-3 saat 4°C'de ekilibrasyona bırakılmıştır (Şekil 3.6). Ekilibrasyondan sonra, payetler sıvı azot seviyesinden 5 cm yükseklikte yaklaşık -120°C'de 15 dakika sıvı azot buharında tutularak dondurulmuştur (Şekil 3.7). Daha sonra, sıvı nitrojen buharında dondurulan sperma, ~-196°C'deki sıvı azotta saklanmıştır.



Şekil 3.6 Ekilibrasyon aşamasında buzdolabına yerleştirilen metal tepsilerdeki payetler



Şekil 3.7 5 cm yükseklikte sıvı azot buharında dondurulan payetler

3.7. Spermmanın Çözdürülmesi ve Değerlendirilmesi

Dondurulmuş spermaller sıvı azot tankında en az 1 hafta muhafaza edildikten sonra, 37°C'deki su banyosunda 30 saniye tutulmuştur. Araştırma, 5 replikasyon

şeklinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, dondurma/çözdürme (1 hafta sonra) sonrası *in vitro* spermatolojik parametrelerden; motilite, akrozomal membran bütünlüğünün tespiti için FITC/PNA-PI, DNA fragmentasyonunun saptanması için TUNEL testi değerlendirilmiştir.

3.8. *In vitro* Spermatolojik Parametreler

3.8.1. Sperm motilite testi

Sperm numunesinden bir damla lam üzerine alınıp üzerine lamel kapatıldıktan sonra, 37°C'lik ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskop altında ×400 büyütmede en az 3-5 farklı mikroskop sahasında ileri yönde düzgün doğrusal hareket eden spermiler göz önüne alınarak yapılmıştır. Sahalardaki motilite değerlerinin ortalaması alınmış ve % motilite oranı olarak kaydedilmiştir (Evans ve ark 1987).

3.8.2. Akrozomal membran bütünlüğünün değerlendirmesi

Nagy ve ark (2003)'nın yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Akrozoma spesifik Florescin izotiyosiyanat (FITC-PNA)/Propidium İyot (PI) (Fluorescein isothiocyanate conjugated to *Arachis hypogaea*/Propidium iodide) floresan boyaması uygulanmıştır. 60 µl alınan sulandırılmış numunenin üzerine 10 µl FITC-PNA ve 3 µl PI çözeltilerinden eklenerek 37°C'de 10 dakika inkube edilmiştir. Ardından, 1 µl Hankok sıvısı eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. 2.5 µl'lik numune lam üzerine alındıktan sonra lamel ile kapatılmış ve 450-490 nm dalga boyunda floresan ataçmanlı faz-kontrast mikroskopta (Leica DM3000, Germany) akrozomal membran bütünlüğü yönünden değerlendirilmiştir. Akrozomu yeşil boya alanlar hasarlı akrozomlu spermi, akrozomu yeşil boya almayanlar ise sağlam akrozomlu spermi göstermiştir. Her bir numune için en az 200 hücre sayılmış ve sperma akrozomal membran bütünlüğü % olarak ifade edilmiştir (Nagy vd 2003).

3.8.3. DNA fragmentasyonu incelemesi

TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling), hücrelerin apoptotik süreçte endonukleazların aktivasyonu nedeniyle oluşan DNA kırıklarını (~180-200 baz çifti) gösteren bir yöntemdir. Bu yöntem için, sıvı azotta saklanan payetlerdeki spermiler, 37°C'deki su banyosunda 30 saniye tutularak çözdürülmüş ve ependorflara

aktarıldıktan sonra, 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek sulandırıcıları uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, fosfat tamponlu tuz (PBS) ile 3 kez yıkanan spermler üzerine 100 µl PBS eklenmiş, alınan 10 µl'lik numune poli-L-lizin kaplı lamlara smear şeklinde yayıldıktan sonra, oda sıcaklığında 30 dakika kurutulmuştur. Bu aşamadan sonra, TUNEL kit (Roche, InSitu Cell Death Detection Kit, POD, Roche- 11 684 817 910) prosedürü, üretici firmanın önerilerine göre uygulanmıştır.

Slaytlar, oda sıcaklığında 1 saat %4'lük paraformaldehitte fikse edilmiş ve PBS ile üç kez yıkanmıştır. Fiksasyondan sonra yıkanan slaytlar, bloklama solüsyonu (%3 H₂O₂, metanolde) ile 10 dakika inkübe edilerek PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra, slaytlar buz üzerinde, permabilizasyon solüsyonu (%0.1 Triton X 100 ve %0.1 Sodyum sitrat) ile 10 dakika inkübe edilmiş ve yıkanmıştır. Label solüsyonu (450 µl) + enzim (50 µl) karışımından, her bir slayt için 50 µl eklenerek, lamelle kapatılmıştır. Karanlık, nemli bir ortamda 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiş ve PBS ile üç kez yıkanmıştır. Slaytlara sinyal dönüştürme işlemi için, converter-POD'dan her örneğe 50 µl eklenerek lamel ile kapatılmıştır. Karanlık ve nemli ortamda 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra yıkama yapılmıştır. Slaytlar, renk oluşturma işlemi için örnek başına 100 µl DAB substratı eklenerek, karanlık ortamda 30 dakika bekletilmiş ve yıkamadan sonra %0.5'lik metil yeşili ile zıt boyama yapılmış ve sonra yıkanmıştır. Slaytlar kapatıldıktan sonra, her birinin 6 farklı bölgesinden x1000 büyütmede TUNEL-pozitif hücreler sayılarak istatistik analizi yapılmıştır.

3.9. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizlerde, 5 farklı replikasyondan elde edilen verilerin ortalamaları kullanılmıştır. Farklı esansiyel yağ dozu içeren ve içermeyen sulandırıcı gruplarının karşılaştırılmasında, IBM SPSS (Versiyon 22) programında Varyans analizi, aralarında önemli farklılık bulunan ikiden fazla grubu karşılaştırmak için de çoklu karşılaştırma testlerinden Post Hoc Duncan HSD testi kullanılmış ve farklılığın p<0.05 düzeyinde olması önemli olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *Nepeta italica* subsp. *cadmea* Uçucu Yağının Kimyasal Kompozisyonu

Su Distilasyonu (Hidrodistilasyon) yöntemi kullanılarak Clevenger düzeneği ile çıkarılan *Nepeta italica* subsp. *cadmea* ekstraktının uçucu yağ analizi Bezmialem Vakıf Üniversitesi Fitoterapi Eğitim, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yaptırılmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 *Nepeta italica* subsp. *cadmea* esansiyel yağının kimyasal kompozisyonu

BİLEŞİK	YÜZDE MİKTARI (%)
α -Pinene	0,522
Sabinene	0,440
α -Terpinene	0,261
1,8-Cineole	1,155
γ -Terpinene	0,509
Linalool	3,965
Caryophyllene	6,889
4-Terpineol	1,423
α -Copaene	0,349
α -Humulene	0,330
Lavandulol	0,930
α -Terpineol	0,349
Germacrene	0,863
γ -Cadinene	0,518
Calamenene	1,326
Caryophyllene oxide	2,293
Nepetalactone (İzomerler Toplamı)	74,008
Diğer	3,870
TOPLAM:	100

Nepeta italica subsp. *cadmea* yağının temel içeriği Nepetalactone %74.008 olarak bulunmuştur. Ayrıca, içerik monoterpenler bakımından da zengindir. Bu maddelerin antioksidan özellikleri bilinmektedir.

4.2. Çözdürme Sonrası Spermatolojik Bulgular

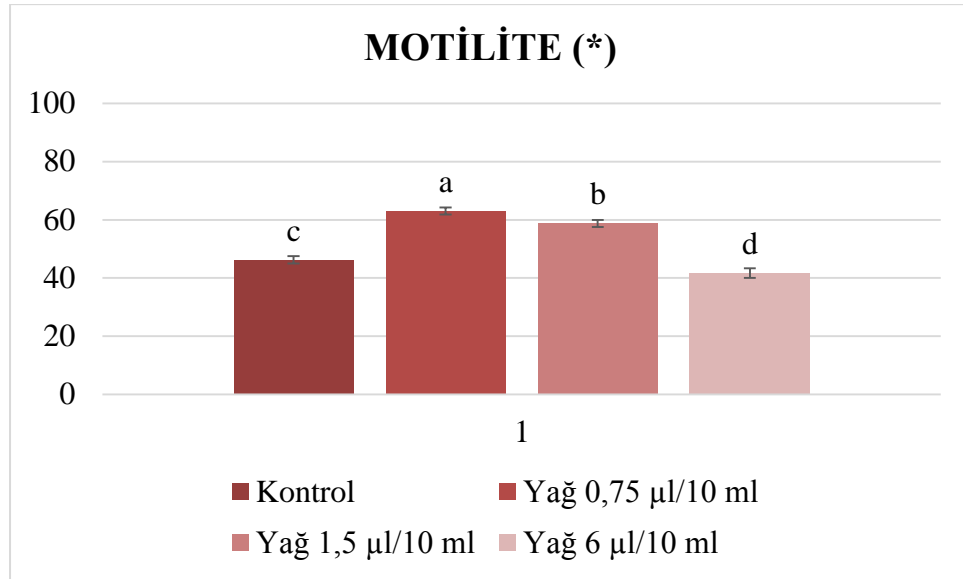
4.2.1. Spermatozoa motilitesi

Sıvı azot tankında muhafaza edilen payetler, ayarlanabilir dijital su banyosunda 37°C'de ve 30 saniyede çözdürülmüş ve spermatolojik parametreler değerlendirilmiştir. Spermatozoa motilitesi, 37°C'lik ısıya sahip ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskopta lam-lamel arasına alınan sperma örneğinde en az 3 farklı mikroskop alanına bakılarak değerlendirilmiştir. Alanlardaki motilite değerlerinin ortalaması % motilite oranı olarak kaydedilmiştir. Çözüm sonrası teke sperması motilitesi, canlı spermatozoa aktivite oranları 0.75 µl/10 ml yağ oranında (63 ± 1.23) diğer yağ oranlarına göre daha yüksek sonuç verdiği gösterilmiştir (p<0.05) (Tablo 4.2, Şekil 4.1).

Tablo 4.2 Dondurma-çözdürme sonrası motilite değerleri

Gruplar	Motilite (Ort. ± S.H.)
Kontrol	46.25 ± 1.25 ^c
Yağ 0.75 µl/10 ml	63 ± 1.23 ^a
Yağ 1.5 µl/10 ml	58.75 ± 1.25 ^b
Yağ 6 µl/10 ml	41.67 ± 1.67 ^d
P	0.0000

^{a,b,c,d}: p<0.05 olduğu için gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.1 Dondurma-çözdürme sonrası gruplar arası motilite oranları grafiği
(*): $p < 0.05$ olduğu için gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır.

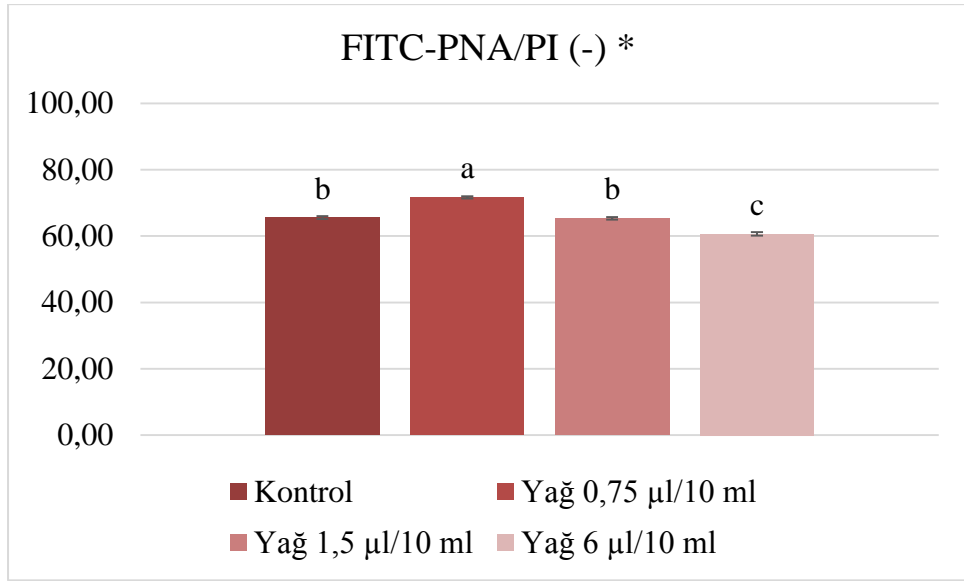
4.2.2. Spermatozoa akrozomal membran bütünlüğü

Dondurma-çözdürme sonu akrozomal membran bütünlüğü değerlendirilmesinde, sulandırıcıya eklenen yağın 0.75 µl/10 ml dozu 71.71 ± 0.33 değeri olarak, kontrol (65.58 ± 0.44) ile 1.5 µl/10 ml (65.34 ± 0.41) ve 6 µl/10 ml (60.64 ± 0.53) dozlarına göre daha yüksek değerde bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 4.3, Şekil 4.2). Yeşil kaplı sperm başı akrozomu hasarlı olan spermi, başında yeşil kap görünmeyenler akrozomu sağlam olan spermi göstermiştir (Şekil 4.3).

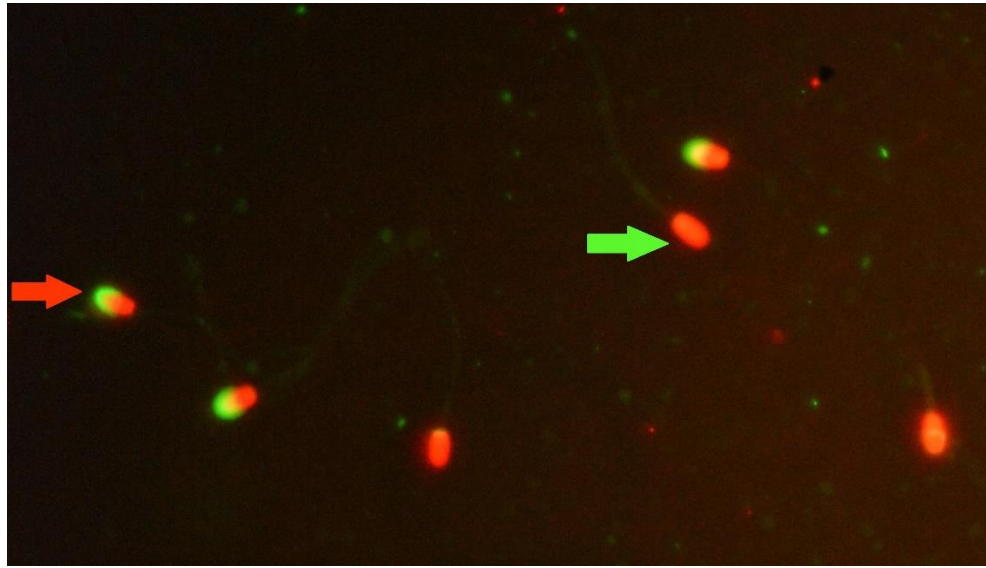
Tablo 4.3 Dondurma-çözdürme sonrası elde edilen akrozomal membran bütünlüğü değerleri

Gruplar	Akrozomal Membran Bütünlüğü (Ort. \pm S.H.)
Kontrol	65.58 ± 0.44^b
Yağ 0.75 µl/10 ml	71.71 ± 0.33^a
Yağ 1.5 µl/10 ml	65.34 ± 0.41^b
Yağ 6 µl/10 ml	60.64 ± 0.53^c
P	0.0000

^{a,b,c}: $p < 0.05$ olduğu için gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.2 Dondurma-çözdürme sonrası akrozomal membran bütünlüğü değerleri
*: $p < 0.05$ olduğu için gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.3 Akrozomal membran bütünlüğünün gösterilmesi. FITC-PNA/PI boyaması. Spermatozoonun başında yeşil kap görünenler akrozomu hasarlı olan spermatozoonlardır (kırmızı ok). Spermatozoonun başında yeşil kap görünmeyenler akrozomu sağlam olan spermatozoonlardır (yeşil ok).

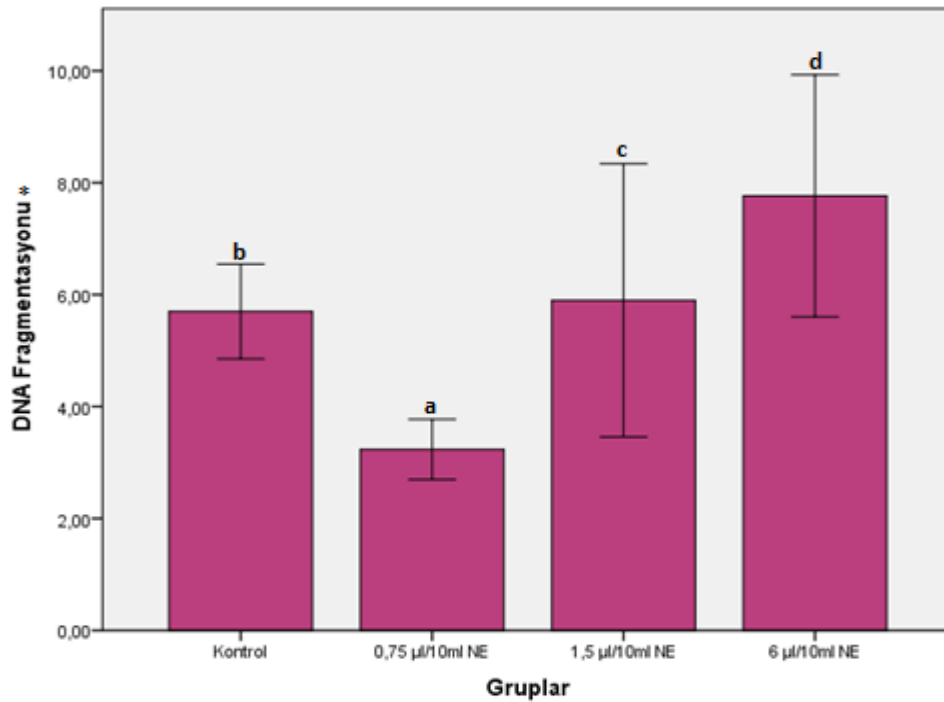
4.2.3. DNA fragmentasyonu (TUNEL Testi)

Dondurma-çözdürme sonu DNA fragmentasyonu analizinde, sulandırıcıya eklenen yağın 0.75 µl/10 ml dozu 3.23 ± 0.19 değeri olarak, kontrol (5.70 ± 0.30) ile 1.5 µl/10 ml (5.90 ± 0.88) ve 6 µl/10 ml (7.77 ± 0.78) dozlarına göre daha düşük değerde bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 4.4, Şekil 4.4). Bu bulgu, yağın 0.75 µl/10 ml dozunun DNA fragmentasyonunu diğer gruplara göre azalttığını göstermektedir. Sperm başında tunel-pozitif DNA fragmentasyonu, açık kahverengi boyanmayla ayırt edilmiştir (Şekil 4.5)

Tablo 4.4 DNA fragmentasyon sonuçlarının gruplara göre değerlendirilmesi

Gruplar	DNA fragmentasyonu (Ort. ± S.H.)
Kontrol	5.70 ± 0.30^b
Yağ 0.75 µl/10 ml	3.23 ± 0.19^a
Yağ 1.5 µl/10 ml	5.90 ± 0.88^c
Yağ 6 µl/10 ml	7.77 ± 0.78^d
P	0.001

^{a,b,c,d}: $p < 0.05$ olduğu için gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.4 Çözdürme sonrası DNA fragmentasyon yüzdeleri (NE: *Nepeta italica* subsp. *cadmea* esansiyel yağı)

*: $p < 0.05$ olduğu için gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.5 TUNEL-pozitif DNA fragmentasyonu (ok), x1000

5. TARTIŞMA

Yardımcı üreme teknolojisi, tıp, veterinerlik, tarım ve biyoteknoloji alanlarında, üremeye yönelik birçok çalışmada kullanılan farklı teknikleri içerir. Üreme hücrelerinin korunmasına yönelik tekniklerin geliştirilmesi, bu hücrelerin kalitelerini artırarak, en sağlıklı ve verimli ırkların, fertilizasyonda ve embriyolojik çalışmalarda başarılı uygulamaların gerçekleştirilmesinde oldukça önemlidir. Düşük sıcaklıklarda üreme hücrelerinin korunmasına yönelik yapılan birçok araştırmada, hücreleri kriyohasarlardan koruyacak birçok kriyoprotektan kullanılarak araştırmalar sürdürülmektedir. 1949'da Polge'nin, gliserolün sperm üzerindeki kriyoprotektif etkisini keşfetmesi ile spermeleri düşük sıcaklıklarda koruyabilen bir bileşiğin ortaya çıkması ve sperm kriyobiyojoloji alanının oluşması sağlanmıştır (Yoshimoto vd 2017). Sonuç olarak, üreme hücreleri kriyoprezervasyonu, yardımcı üreme tekniklerinin temel bir parçası haline gelmiştir (Nashtaei vd 2018).

Sperm sulandırıcılarına eklenen çeşitli antioksidan bileşiklerin etkileri üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda giderek hız kazanmaktadır. Bu konuda, birçok bitkinin antioksidan etkileri araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Flavonoidler ve fenoller gibi biyoaktif bileşikler nedeniyle bazı bitkiler, serbest radikallerin neden olduğu zararları azaltabilen antioksidan özelliklere sahiptir (Ariyan vd 2021). Flavonoidler, membranların lipid çift tabakası ile etkileşime girebilen amfipatik moleküllerdir (Moretti vd 2012). Bunların, ROS süpürme, oksidaz inhibisyonu, metal şelatlama aktivitesi ve DNA hasarına karşı koruma gibi çeşitli özellikleri bulunmaktadır (Seifi-Jamadi vd 2016). Bitkilerden elde edilen antioksidanların dondurma sulandırıcısına eklenmesinin, kriyoprezervasyon sırasında teke sperm OS'den koruyabildiği gösterilmiştir (Ren vd 2019). Dondurma ortamına rezene (*Foeniculum vulgare*) (Malo vd 2012), biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) (Motlagh vd 2014), yeşil çay (*Camellia sinensis*) (Mehdipour vd 2016) ve *Tribulus Terrestris* (Asadmobini vd 2017) ekstraktlarının eklenmesinin, kriyoprezerve edilmiş sperm hücre kalitesini iyileştirdiği gösterilmiştir (Azimi vd 2020). *Salvia officinalis* ekstraktı kriyoprezervasyon sonucu oluşan OS hasarına karşı

konsantrasyona bağılı olarak sperm kalitesini iyileştirmiş ve spermleri korumuştur (Monton vd 2015). Malo ve ark. (2012), rezeneden (*Foeniculum vulgare*) elde edilen antioksidanların plazma membranı üzerinde koruyucu etki yaptığını ve sperm motilitesini iyileştirdiğini bildirmiştir. Sperma *Albizia harveyi* yaprağı ekstraktı ile muamele edildiğinde, sperm parametrelerinde (progresif motilite, canlılık, membran bütünlüğü, kromatin hasarı, apoptoz) dondurma ve çözündürme sonrası genel bir iyileşme gözlenmiştir. Bu aktivitelerin, incelenen ekstrakttaki tanenler, flavonoidler ve fenolik asitlerin varlığından kaynaklandığı bildirilmiştir (Sobeh vd 2017).

Sperm motilitesi, suni tohumlama öncesi dikkate alınması gereken semen kalitesinin önemli bir parametresidir. Motilite, spermin yumurtayı dölleme yeteneği ile yüksek oranda ilişkilidir (Wahjuningsih vd 2021b). Yumurta sarısı ile dondurulan teke sperminin çözündürülme sonrası motilitesi birçok çalışmada %35.4 ile %63.2 arasında değişmektedir (Kulaksız ve Daşkın 2010, Tuncer vd 2010, Memon vd 2011, Küçük vd 2014, Lopez-Saucedo vd 2014, Salmani vd 2014). Teke sperm sulandırıcılarına, 50 µg/ml *Tribulus terrestris* etanol ekstraktı+trehaloz (150 mM) takviyesinde spermlerde toplam motilite %51.25 ve progresif motilite %52.25 (Ariyan vd 2021), 375 µg/ml *Turraea fischeri* yaprağı ekstraktının ilavesinde ise progresif motilite %60 (Hassan vd 2021), 50 µg/ml semizotu metanolik ekstraktının eklenmesinde toplam motilite %54.71 ve progresif motilite %28.29 (Azimi vd 2020) olarak belirlenmiştir. Yağsız süt-yumurta sarısı sperm sulandırıcısına, 0.10 mg GTE/100 mL yeşil çay ekstraktı (GTE) eklenmesinin, çözündürüldükten sonra Kacang tekelerinde en yüksek düzeyde sperm kalitesini koruduğu gözlemlenmiştir. Sperm motilitesinin iyileştiği oran, %45.25 olarak tespit edilmiştir (Mustofa vd 2021). Sperm sulandırıcısına, %4 su yoncası (*Marsilea crenata*) ekstraktı (WCE) ilavesinde çözündürülmüş Boer teke sperm motilitesi %55.5 (Wahjuningsih vd 2021a), %2 siyah *cincau* (*Mesona palustris* B.) yaprağı ekstraktı eklendiğinde ise çözündürülme sonrası motilite %50.4 (Wahjuningsih vd 2021b) olarak tespit edilmiş, çözündürülme sonrası teke sperm motilitesinin önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. İsmail ve ark. (2020) yaptığı çalışmada, Tris sulandırıcısına 100 µg ilave edilen kurkumin ekstrakt nanoformülasyonunun (CENF), teke sperm parametrelerinde daha fazla iyileşme gösterdiğini rapor etmişlerdir. 100 µg CENF eklenmesiyle sperm progresif motilitesi %42.1 olarak belirlenmiş ve sperm motilitesinin çözündürme sonrası iyileştiği gözlenmiştir. Wahjuningsih ve ark. (2019a) yaptığı çalışmada, temel sperm sulandırıcısı (yumurta sarısı-yağsız süt) içine %3 WCE eklenmesinin çözündürme sonrası, Boer teke sperminin kalitesinin korunmasında en iyi konsantrasyon olduğu ve sperm motilitesini iyileştirdiği (%58.50) sonucuna varılmıştır. Wahjuningsih ve ark. (2019b) yaptığı bir diğer çalışmada ise, CEP-2 yumurta sarısı

sulandırıcısına %5 *Moringa oleifera* yaprağı ekstraktının (MLE) eklenmesinin, Senduro teke sperminin çözündürme sonrası motilitesini artırdığı ve oranın %40.5 olduğu belirlenmiştir. Tris-yumurta sarısı sulandırıcısına %3 MLE ilavesi, Senduro tekesinin donmuş spermlerinin kalitesini ve fertilizasyonunu iyileştirmiş ve çözündürme sonrası sperm motilitesinin arttığı ve oranın %51.50 olduğu tespit edilmiştir (Wahjuningsih vd 2019c). Maidin ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada Jermasia teke sperm (tris-yumurta sarısı) sulandırıcısına %0.5 *Nigella sativa* (çörek otu) yağı ve %2 bal kombinasyonu ilavesinin, çözündürüldükten 0.5 saat sonra motiliteyi %61.83 olarak bulmuşlar ve bu kombinasyonun daha iyi koruma sağladığını ileri sürmüşlerdir.

Yaptığımız bu çalışmada, dondurma sulandırıcısına (tris+sitrik asit+fruktoz+yumurta sarısı), antioksidanlar ve flavonoidler içeren *Nepeta italica* subsp. *cadmea* esansiyel yağının farklı dozlarını (0.75, 1.5, 6 µl/10 ml) ilave ederek dondurma-çözündürme sonrası teke spermlerinde motilite, akrozomal membran bütünlüğü ve DNA fragmentasyonu parametreleri araştırılmıştır. *Nepeta italica* subsp. *cadmea* yağının 0.75 µl/10 ml, 1.5 µl/10 ml ve 6 µl/10 ml oranlarının, çözündürme sonrası sperm motilitesi üzerine etkileri kontrol grubu ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Buna göre, en yüksek sperma motilite değeri, %63 ± 1.23 olarak 0.75 µl/10 ml oranındaki yağda tespit edilmiştir. 0.75 µl/10 ml yağ oranının, sperm kalitesini/motilitesini korumak için en iyi konsantrasyon/doz olduğu belirlenmiştir. Bu motilite sonucu yukarıda belirtilen çalışmalarda ortaya konulan değerler ile genel olarak benzerlik sağlamıştır.

Akrozomal membran bütünlüğü, dondurulmuş ve çözündürülmüş spermin fertilitesi bakımından önemlidir (Alçay vd 2016). Sperma kriyoprezervasyonu, akrozomal membran bütünlüğünü olumsuz olarak etkiler. Bu olumsuz etki fertilizasyon kayıplarına yol açar (Alçay vd 2020). Teke sperm sulandırıcısına, 50 µg/ml *Cinnamomum zeylanicum* etanol ekstraktı+trehaloz (150 mM) ilavesi sonucu akrozomal membran bütünlüğünü %59.75 olarak (Ariyan vd 2021), 50 µg/ml semizotu etanolik ekstraktının (PEE) ilave edilmesinin akrozomal membran bütünlüğünü %58.71 (Azimi vd 2020) oranında koruduğu belirlenmiştir. Hassan ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada, farklı konsantrasyonda *Turraea fischeri* yaprağı ekstraktını (TFLE; 0, 125, 250 ve 375 µg/ml) teke sperm dondurma sulandırıcısına ilave ederek dondurmuşlardır. Çözülme sonrası TFLE konsantrasyonuna bağlı akrozomal membran bütünlüğü oranları, TFLE'den önemli ölçüde etkilenmemiştir. Teke sperm dondurma sulandırıcısına 50 veya 100 µg MENF, TENF ve CENF eklenmesi, çözündürme sonrası sperm akrozom membran bütünlüğü açısından gruplar arasında anlamlı farklılık oluşturmamıştır. 50 µg MENF

grubunda akrozomal membran bütünlüğü en yüksek düzeyde %91.4 olarak tespit edilmiştir (İsmail vd 2020). Daramola ve ark. (2017b) yaptıkları çalışmada, Batı Afrika cücesi tekelerinin spermelerini, 0.25 g *mucuna* tohumu ekstraktı (MSE) ilave edilmiş tris sulandırıcısıyla seyreltmisler ve dondurma-çözdürme sonrası akrozomal membran bütünlüğünü yaklaşık %65 oranında tespit etmişlerdir. Bulgular, tris sulandırıcısına MSE ilavesinin akrosin aktivitesini arttırdığını, dondurulmuş teke spermelerinin akrozomal membran bütünlüklerini koruduğunu göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada, kateşin (0, 15, 25, 50, 75 ve 100 μ M) ve epigallokateşin-3-gallat'ın (EGCG: 0, 15, 25, 50, 75 ve 100 μ M) farklı konsantrasyonları teke sperm dondurma sulandırıcısına ilave edilmiş, çözdürüldükten sonra numuneler 0. ve 1. saatte değerlendirilmiştir. Sperm sulandırıcısına kateşin veya EGCG eklenen gruplar arasında akrozomal membran bütünlüğü açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çözdürüldükten hemen sonra en yüksek akrozomal membran bütünlüğü 100 μ M EGCG ilave edilen grupta gözlenmiş ve %49.7 olarak tespit edilmiştir (Silva vd 2019). Teke spermi kullanılan birçok çalışmada, akrozomal membran bütünlüğünün çözülme sonrası sonuçları %57.9-78 oranlarındadır (Aboagla ve Terada 2004, Memon vd 2011, Lopez-Saucedo vd 2014). Çalışmamızda, motilite sonuçlarımızla uyumlu olarak, akrozomal membran bütünlüğü değerleri 0.75 μ l/10 ml esansiyel yağ dozunda, kontrol grubu dahil 1.5 μ l/10 ml ve 6 μ l/10 ml yağ dozlarına göre akrozomal membran bütünlüğünü en yüksek değerde korumuştur ($p < 0.05$). 0.75 μ l/10 ml yağ dozundaki %71.71 \pm 0.33'lik değeriyle yukarıda belirtilen çalışmalardaki konsantrasyona bağlı olarak ortaya konulan değerlerle genel olarak uyum göstermiştir.

Dondurma-çözdürme işlemine karşı sperm DNA'sı oldukça hassastır (Alçay vd 2016). Spermelerin dondurulup çözdürülmesinin, sperm motilitesi ve canlılığı üzerinde etkisi olmakla birlikte DNA hasarında da etkili olduğu bilinmektedir (Zribi vd 2012). DNA hasarı, dokularda veya hücreler içinde aşırı ROS üretiminden kaynaklanabilir (Bucak vd 2020). Sperm kriyoprezervasyonu sırasında meydana gelen OS, DNA'ya zarar verir, sonuçta spermelerin fertilizasyon yeteneği azalır (İsmail vd 2020). Dolayısıyla, DNA bütünlüğünün sperm için hayati bir işleve sahip olduğu ileri sürülebilir (Bucak vd 2013, Alçay vd 2016). Her ne kadar sperm DNA'sı yüksek oranda sıkıştırılmış ve kararlı bir şekilde paketlenmiş olsa da, ROS kaynaklı oksidatif hasar, kriyoprezervasyonun ardından kromatin anormallikleri ve DNA hasarını meydana getirir (Nashtaei vd 2018). DNA bütünlüğünün değerlendirilmesi, hasar görmüş spermelerin belirlenmesinde oldukça önemli bir parametredir. Spermin DNA hasar düzeyi, spermin kalitesi ve üreme potansiyeli hakkında oldukça önemli ipuçları sağlar. Bu nedenle TUNEL tekniği kullanılarak DNA hasarının belirlenmesi büyük önem taşır.

Birçok farklı özellikli kriyoprotektanların, DNA hasarları üzerine etkilerini gösteren çalışmalar yapılmaktadır. Anderson ve ark. (2000) flavonoidlerin, ROS tarafından DNA üzerinde indüklenen radikal bölgelere elektronları transfer ederek DNA zincir kırılmasını ve baz hasarını azaltabildiğini göstermişlerdir. Teke sperm sulandırıcısına, 50 µg/ml *Tribulus terrestris* etanol ekstraktı ilavesi en düşük (%2.53) DNA fragmentasyonunu göstermiştir (Ariyan vd 2021). Azimi ve ark. (2020), teke sperm sulandırıcısına 50 µg/ml semizotu metanolik ekstraktının takviyesinin DNA fragmentasyonunu (%2.29) azalttığını göstermişlerdir. Koç sperm sulandırıcısına %5 gliserol ve 60 mM trehaloz ile birlikte 10 µM taksifolin hidrat eklenmesinin, hem DNA fragmentasyonunu hem de dondurma-çözdürme işleminin DNA'ya zarar veren etkisini önlediği belirtilmiştir (Bucak vd 2020). Koç sperminin dondurulmasında antioksidan olarak ilave edilen 1mM sistein'in, dondurma çözdürme işlemleri ve 6 saat inkubasyon sonrası en düşük DNA hasarı (%8.8) oluşturduğu tespit edilmiştir (Alçay vd 2017). Alçay ve ark. (2016), TUNEL yönteminin sonuçlarına göre, çözdürme sonrası DNA hasarlı sperm yüzdesinin kontrol grubunda, BHT grubundan daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. 6 saatlik inkübasyondan sonra, antioksidan gruplarının kontrol grubuna göre daha iyi DNA bütünlüğüne sahip olduğu tespit edilmiştir. Sperm dondurma sulandırıcısına 5 mM BHT ilave edilmiş grubun çözdürmeden hemen sonra (0. saat) DNA fragmentasyonu tespiti için yapılan TUNEL testinde pozitif oran %4 ve 6 saat sonraki pozitif oran %5.27 olarak tespit edilmiştir. En düşük DNA fragmentasyonu 5 mM BHT ilave edilmiş grupta gözlenmiştir ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında DNA bütünlüğünü yüksek oranda koruduğu gözlenmiştir. Allai ve ark. (2016) yaptığı çalışmada, koçlardan alınan spermin dondurma sulandırıcısına %1 *Opuntia ficus indica cladodes*'den elde edilen ekstraktın eklenmesinin, sperm DNA fragmentasyonu üzerindeki olumsuz etkilerini etkili bir şekilde azalttığını bildirmişlerdir. Sperm dondurma sulandırıcısına ilave edilen 10 mM rafinoz ve 5 mM rafinoz+2.5 mM hipotaurin (H+R) çözdürülmüş koç sperminin DNA fragmentasyonunu azaltmıştır (Bucak vd 2013). Bu çalışmada ise, sulandırıcıya eklenen *Nepeta italica* subsp. *cadmea* esansiyel yağının 0.75 µl/10 ml (3.23 ± 0.19) dozu, kontrole (5.70 ± 0.30) ve yağın 1.5 µl/10 ml (5.90 ± 0.88) ile 6 µl/10 ml (7.77 ± 0.78) dozlarına göre DNA fragmentasyonunu azalttığı gösterilmiştir (p<0.05). Bu bulgu, yağın 0.75 µl/10 ml olarak deney grupları arası en düşük dozunun, motilite ve akrozom bütünlüğü çalışmalarında olduğu gibi, kriyoprezervasyon sonrasında pozitif etki gösterdiği ortaya çıkmıştır. Çalışmamız yukarıda belirtilen çalışmalarla uyumlu olarak, içeriğinde antioksidanlar barındıran bitki ekstraktlarının farklı dozlarının test edilerek, dondurma-çözdürme sonrası sperm parametreleri üzerine olası iyileştirici etkilerinin belirlenmesinin büyük önem taşıdığını göstermiştir.

6. SONUÇ

Nepeta italica subsp. *cadmea* esansiyel yağının 0.75 µl/10 ml dozunun, Ankara tekesi sperma motilitesi, akrozomal membran bütünlüğü ve DNA fragmentasyonu üzerine kriyoprotektan olarak pozitif etki gösterdiği ortaya çıkmıştır. Bitki esansiyel yağındaki nepetalakton ve diğer maddelerinin, yağın dozuna bağlı olarak kriyoprezervasyon sonucu meydana gelen OS'den kriyoprotektif ajan olarak koruyucu etki gösterdiği söylenebilir. Bununla birlikte, bitki esansiyel yağının belirlenen dozlarının olası etkilerini, farklı parametrelerle de çalışılarak ortaya konmasına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- Aboagla EM, Terada T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology** 2004; 62 (6): 1160-1172.
- Aboagla EM, Maeda T. Arbutin's suppression of cryodamage in goat sperm and its mechanism of cryoprotection. **Theriogenology** 2011; 76 (3): 538-546.
- Acimovic M, Jeremic JS, Cvetkovic M. Phyto-pharmacological aspects of *Nepeta nuda* L.: A systematic review. **Natural Medicinal Materials** 2020; 40: 75-83.
- Açar M, Özcan T, Satıl F, Dirmenci T. A comparative anatomical study on two endemic *Nepeta* L. species (*N. baytopii* and *N. sorgerae*). **Biological Diversity and Conservation** 2011; 4 (3): 58-70.
- Afshar AS, Nematpour FS, Meshkani M, Khafi A. Growth inhibition of human breast cancer cells and down-regulation of ODC1 and ADA genes by *Nepeta binaloudensis*. **Rev Bras Farmacogn** 2017; 27 (1): 84-90.
- Agarwal A, Majzoub A. Role of antioxidants in assisted reproductive techniques. **World J Mens Health** 2017; 35 (2): 77-93.
- Ahmed H, Jahan S, Salman MM, Ullah F. Stimulating effects of Quercetin (QUE) in tris citric acid extender on post thaw quality and in vivo fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Theriogenology** 2019; 134: 18-23.
- Aka D, Özkan TA, Çevik İ. Spermatozoa dondurma yöntemi gebelik sonuçlarını etkiler mi? **Kocaeli Medical J** 2017; 6 (1): 13-18.
- Akdeniz M, Ertaş A, Yener İ, Fırat M, Kolak U. Phytochemical and biological investigations on two *Nepeta* species: *Nepeta heliotropifolia* and *N. congesta* subsp. **J Food Biochem** 2020; 44 (2): 1-12.
- Alçay S, Gökçe E, Toker MB, Önder NT, Üstüner B, Uzabacı E, Gül Z, Çavuş S. Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa. **Cryobiology** 2016; 72 (3): 269-273.
- Alçay S, Toker MB, Gökçe E, Gül Z, Önder NT, Üstüner B, Nur Z, Sağırkaya H, Soylu MK. Improvement of incubation resilience with various antioxidants in cryopreserved ram semen. **Erciyes Üniv Vet Fak Derg** 2017; 14(3): 183-190.
- Alçay S, Üstüner B, Aktar A, Mulkpınar E, Duman M, Akkasoğlu M, Çetinkaya M. Goat semen cryopreservation with rainbow trout seminal plasma supplemented lecithin-based extenders. **Andrologia** 2020; 52 (4): 1-5.

Allai L, Druart X, Öztürk M, BenMoula A, Nasser B, El Amiri B. Protective effects of *Opuntia ficus-indica* extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA fragmentation during liquid storage. ***Anim Reprod Sci*** 2016; 175: 1-9.

Allai L, Benmoula A, Maia MS, Nasser B, Amiri BE. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. ***Anim Reprod Sci*** 2018; 192: 6-17.

Al-Mutary MG. Use of antioxidants to augment semen efficiency during liquid storage and cryopreservation in livestock animals: A review. ***Journal of King Saud University-Science*** 2021; 33 (1): 1-6.

Al-Oqail MM, Al-Sheddi ES, Siddiqui MA, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, Farshori NN. Anticancer activity of sub-fractions of chloroform extracts of *Nepeta deflersiana* on human breast and lung cancer cells: an in vitro cytotoxicity assessment. ***Pharmacogn Mag*** 2015; 11 (4): 598-605.

Al-Sheddi ES, Farshori NN, Al-Oqail MM, Al-Massarani SM, Saquib Q, Wahab R, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, Siddiqui MA. Anticancer potential of green synthesized silver nanoparticles using extract of *Nepeta deflersiana* against human cervical cancer cells (HeLA). ***Bioinorg Chem Appl*** 2018; 2018: 1-12.

Al-Taweel AM, Raish M, Perveen S, Fawzy GA, Ahmad A, Ansari MA, Mudassar S, Ganaie MA. *Nepeta deflersiana* attenuates isoproterenol-induced myocardial injuries in rats: Possible involvement of oxidative stress, apoptosis, inflammation through nuclear factor (NF)- κ B downregulation. ***Phytomedicine*** 2017; 34: 67-75.

Amidi F, Pazhohan A, Nashtaei MS, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. ***Cell Tissue Bank*** 2016; 17 (4): 745-756.

Anderson RF, Amarasinghe C, Fisher LJ, Mak WB, Packer JE. Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids free. ***Radiat Res*** 2000; 33 (1): 91-103.

Ariyan F, Farshad A, Rostamzadeh J. Protective effects of *Tribulus terrestris* and *Cinnamomum zeylanicum* extracts and trehalose added to diluents on goat epididymal sperm freezability. ***Cryobiology*** 2021; 98: 172-180.

Asadmobini A, Bakhtiari M, Khaleghi S, Esmaeili F, Mostafaei A. The effect of *Tribulus terrestris* extract on motility and viability of human sperms after cryopreservation. ***Cryobiology*** 2017; 75: 154-159.

Ashkezary MD, Aboee-Mehrzi F, Moradi P. SiO₂@antisense molecules covered by Nepetalactone, extracted from *Nepeta gloeocephala*, inhibits ILK phosphorylation and downstream PKB/AKT signaling in HeLa cells. ***Canc Gene Ther*** 2017; 24 (1): 28-32.

Ashrafi B, Rashidipour M, Gholami E, Sattari E, Marzban A, Kheirandish F, Khaksarian M, Taherikalani M, Soroush S. Investigation of the phytochemicals and bioactivity potential of essential oil from *Nepeta curvidens* Boiss. & Balansa. ***South African Journal of Botany*** 2020; 135: 109-116.

Ateşşahin A, Bucak MN, Tuncer PB, Kızıl M. Effect of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freezing-thawing process. ***Small Rum Res*** 2008; 77 (1): 38-44.

Atinç M, Kalkan İ. Flavonoidler ve sağlık üzerine etkileri. **Aydın Gastronomy** 2018; 2 (1): 31-38.

Avdatek F, Yeni D, İnanç ME, Çil B, Tuncer BP, Türkmen R, Taşdemir U. Supplementation of quercetin for advanced DNA integrity in bull semen cryopreservation. **Andrologia** 2018; 50 (4): 1-7.

Azimi G, Farshad A, Farzinpour A, Rostamzadeh J, Sharafi M. Evaluation of used Purslane extracts in Tris extenders on cryopreserved goat sperm. **Cryobiology** 2020; 94: 40-48.

Azizian T, Alirezalu A, Hassani A, Bahadori S, Sonboli A. Phytochemical analysis of selected *Nepeta* species by HPLC-ESI-MS/MS and GC-MS methods and exploring their antioxidant and antifungal potentials. **Journal of Food Measurement and Characterization** 2021; 15 (3): 2417-2429.

Bahmyari R, Zare M, Sharma R, Agarwal A, Iman Halvaei I. The efficacy of antioxidants in sperm parameters and production of reactive oxygen species levels during the freezethaw process: A systematic review and meta-analysis. **Andrologia** 2020; 52 (3):1-13.

Banday MN, Lone FA, Rasool F, Rashid M, Shikari A. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. **Cryobiology** 2017; 74: 25-30.

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

Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank** 2009; 10 (1): 49-62.

Borges MS, Born JLB, Conti LM, Segabinazzi LG, Nichi M, Kawai GKV, Leite RF, Peixoto KC, Dell'Aqua JA, Papa FO, Crespilho AM. Paradoxical effect of quercetin antioxidant on goat sperm parameters after cryopreservation. **Cryo Letters** 2020; 41 (3): 128-134.

Brito LS, Barbosa LP, Pinheiro AM, Resende MV, Costa NGL, Machado WM, Jesus RDL, Ribeiro MO, França CS, Cardoso RC. Does resveratrol preserve the integrity of the sperm membrane in goats after thawing? **Semina: Ciências Agrárias** 2020; 41 (6): 3189-3198.

Bucak MN, Uysal O. The role of antioxidants in freezing of Saanen goat semen. **Indian Vet J** 2008; 85 (2): 148-150.

Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Ulutaş PA, Çoyan K, Başpınar N, Özkalp B. Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. **Res Vet Sci** 2009a; 87 (3): 468-472.

Bucak MN, Sariözkan S, Tuncer PB, Ulutaş PA, Akçadağ Hİ. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. **Small Rum Res** 2009b; 81 (2-3): 90-95.

Bucak MN, Sariözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A, Kulaksız R, Çevik M. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm

parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. **Small Rum Res** 2010; 89 (1): 24-30.

Bucak MN, Keskin N, Taşpınar M, Çoyan K, Başpınar N, Cenariu MC, Bilgili A, Öztürk C, Kurşunlu AN. Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. **Cryobiology** 2013; 67 (1): 34-39.

Bucak MN, Keskin N, İli P, Bodu M, Akalın PP, Öztürk AE, Özkan H, Topraggaleh TR, Sarı F, Başpınar N, Dursun Ş. Decreasing glycerol content by co-supplementation of trehalose and taxifolin hydrate in ram semen extender: Microscopic, oxidative stress, and gene expression analyses. **Cryobiology** 2020; 96: 19-29.

Collodel G, Federico MG, Geminiani M, Martini S, Bonechi C, Rossi C, Figura N, Moretti E. Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. **Reprod Toxicol** 2011; 31 (2): 239-246.

Çapanoğlu E, Boyacıoğlu D. Meyve ve sebzelerin flavonoid içeriği üzerine işlemenin etkisi. **Akademik Gıda** 2009; 7 (6): 41-46.

Çetin NC, Karaca F. Tekelerde iki farklı sulandırıcı ile sulandırılan spermaya değişik oranlarda bal ilavesinin kısa süreli saklamaya etkisi. **FÜ Sağ Bil Vet Derg** 2019; 33 (2): 95-101.

Dar BA, Lone AM, Qurishi MA. Cytotoxic activity and GC-MS analysis of the constituents of essential oil of *Nepeta govaniiana* (Wall.ex Benth) from Jammu and Kashmir. **India Int J Herbal Med** 2014; 2 (2): 58-60.

Daramola JO, Adekunle EO, Onagbesan OM, Oke OE, Ladokun AO, Abiona JA, Abioja MO, Oyewusi IK, Oyewusi JA, Isah OA, Sogunle OM, Adeleke MA. Protective effects of fruit-juices on sperm viability of West African Dwarf goat bucks during cryopreservation. **Anim Reprod** 2016; 13 (1): 7-13.

Daramola JO, Adekunle EO, Oke OE, Onagbesan OM, Williams TJ, Iyasere OS, James IJ, Oyewusi IK, Oyewusi JA. Effects of pyridoxine in combination with different antioxidants on viability and oxidative stress parameters of cryopreserved goat buck semen. **Arch Zootec** 2017a; 66 (253): 15-21.

Daramola JO, Oyewusi JA, Sorongbe TA, Adekunle EO, Iyanda OA, Onanuga OD, Olayemi FD, Falujo FD, Tanimowo LS, Omyema PO, Sobowale OA, Sodiya OO, Salawu DO. Effects of mucuna seed extract on sperm functional integrities and seminal oxidative stress indices of vitrified goat semen. **Journal of Agricultural Sciences** 2017b; 62 (2): 155-166.

Davis, P.H. (1982). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Volume 7; Edinburgh University Press, Edinburgh, UK, pp. 264-288; ISBN 978-085-2243-96-1.

Delshad AA, Naseri M, Parvizi M, Fattah N, Sharayeli M. The Iranian traditional herbal medicine ostokhodus can prevent axotomy-induced apoptosis in spinal motoneurons in neonate rats. **J Med Plant Res** 2011; 5 (18): 4446-4451.

Delshad AA, Parvizi M. The Neuroprotective effect of *Nepeta menthoides* on axotomized dorsal root ganglion sensory neurons in neonate rats. **Journal of Basic Clinical Pathophysiology** 2014; 2 (2): 13-20.

Deveoğlu O, Karadağ R. Genel bir bakış: Doğal boyarmaddeler. **Marmara Fen Bilimleri Dergisi** 2011; 23 (1): 21-32.

Dhillon NS, Cheema RS, Kaswan S, Singhal S. Seminal attributes, antioxidant defense system and fertility rate reveal an association in Beetal goat bucks. **Int J Livest Res** 2020; 10 (6): 85-96.

Dirmenci T. *Nepeta cadmea* Boiss. ile *Nepeta sulfuriflora* P.h. Davis türlerinin morfolojik olarak karşılaştırılması. **BAU Fen Bil Enst Dergisi** 2003; 5 (2): 38-46.

Dirmenci T. *Nepeta*. In: Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Edits., Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç, MT/ Eds.; Nezahat Gökyiğit, **Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını**, İstanbul, Türkiye, 2012, s. 564-568.

Dorado J, Rodriguez I, Hidalgo M. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology** 2007; 68 (2): 168-177.

Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology** 2017; 76: 74-91.

Emami SA, Asili J, Nia SH, Yazdian-Robati R, Sahranavard M, Tayarani-Najaran Z. Growth inhibition and apoptosis induction of essential oils and extracts of *Nepeta cataria* L. on human prostatic and breast cancer cell lines. **Asian Pac J Cancer Prev** 2016; 17: 125-130.

Evans G, Maxwell WMC, Salamon S. Salamon's artificial insemination of sheep and goats, **Butterworths**, Sydney, 1987, s. 1-194.

Falchi L, Pau S, Pivato I, Bogliolo L, Zedda MT. Resveratrol supplementation and cryopreservation of buck semen. **Cryobiology** 2020; 95: 60-67.

Farshad A, Akhondzadeh S. Effects of sucrose and glycerol during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Asian-Aust J Anim Sci** 2008; 21 (12): 1721-1727.

Formisano C, Rigano D, Senatore F. Chemical constituents and biological activities of *Nepeta* species. **Chem Biodivers** 2011; 8(10): 1783-1818.

Gangwar C, Kharche SD, Kumar S, Jindal SK. Cryopreservation of goat semen: status and prospects. **Indian Journal of Small Ruminants** 2016; 22 (1): 1-10.

Goldansaz SM, Festa C, Pagano E, De Marino S, Finamore C, Parisi OA, Borrelli F, Sonboli A, D'Auria MV. Phytochemical and biological studies of *Nepeta asterotricha* Rech. f. (Lamiaceae): Isolation of nepetamoside. **Molecules** 2019; 24(9): 1-12.

Greifova H, Tvrda E, Jambor T, Lukac N. Dose- and time-dependent effects of epicatechin on bovine spermatozoa in vitro. **J Microbiol Biotech Food Sci** 2017; 18: 7 (3): 235-239.

Grötter LG, Cattaneo L, Marini PE, Kjelland ME, Ferre LB. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. **Reprod Domest Anim** 2019; 54 (4): 655-665.

Güven EÇ, Otkun GT, Boyacıoğlu D. Flavonoidlerin biyoyararlılığını etkileyen faktörler. **GIDA** 2010; 35 (5): 387-394.

Hassan SA, Khalil WA, Hassan MAE, Yousif AI, Sabry OM, Wink M, Sobeh M. Antioxidant and antiapoptotic effects of a *Turraea fischeri* leaf extract on cryopreserved goat sperm. **Animals** 2021; 11 (10): 1-13.

Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, Shahverdi A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reprod Biomed Online** 2018; 37 (3): 327-339.

Iqbal Z, Ijaz A, Aleem M, Shahzad AH, Sohail MU, Nak D, Nak Y, Abbas S. Effect of butylated hydroxytoluene on post-thawed semen quality of Beetal goat buck, *Capra hircus*. **Pakistan J Zool** 2015; 47 (1): 119-124.

İsmail AA, Abdel-Khalek AKE, Khalil WA, Yousif AI, Saadeldin IM, Abomughaid MM, Mostafa A. El-Harairy MA. Effects of mint, thyme, and curcumin extract nanoformulations on the sperm quality, apoptosis, chromatin decondensation, enzyme activity, and oxidative status of cryopreserved goat semen. **Cryobiology** 2020; 97: 144-152.

Kahkeshani N, Razzaghirad Y, Ostad SN, Hadjiakhoondi A, Ardekani MRS, Hajimehdipoor H, Attar H, Samadi M, Jovel E, Khanavi M. Cytotoxic, acetylcholinesterase inhibitor and antioxidant activity of *Nepeta menthoides* Boiss & Buhse essential oil. **J Essent Oil Bear PI** 2014; 17 (4): 544-552.

Kahraman A, Serteser M, Köken T. Flavonoidler. **Kocatepe Tıp Dergisi** 2002; 3 (1): 1-8.

Kaska A, Deniz N, Çiçek M, Mammadov R. Evaluation of antioxidant properties, phenolic compounds, anthelmintic, and cytotoxic activities of various extracts isolated from *Nepeta cadmea*: An endemic plant for Turkey. **J Food Sci** 2018; 83 (6): 1552-1559.

Kaska A, Çiçek M, Mammadov R. Biological activities, phenolic constituents and mineral element analysis of two endemic medicinal plants from Turkey: *Nepeta italica* subsp. *cadmea* and *Teucrium sandrasicum*. **South African Journal of Botany** 2019; 124 (5): 63-70.

Kasnak C, Palamutoğlu R. Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri. **Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi** 2015; 3 (5): 226-234.

Kaya ŞÖ, Gür S. Koç spermasının kısa süreli saklanabilirliği üzerine L-arjinin ilavesinin etkisi. **FÜ Sağ Bil Vet Derg** 2017; 31 (2): 73-79.

Konyalı C. Teke spermasının kriyokonservasyonu ve uygun yöntem kullanımı. **ÇOMÜ LJAR** 2020; 1 (2): 118-129.

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

Kulaksız R, Daşkın A. Farklı antioksidanlarla dondurulan Saanen teke spermasının in vitro ve in vivo değerlendirilmesi. **Ank Üniv Vet Fak Derg** 2009; 56: 201-205.

Kulaksız R, Daşkın A. In vitro evaluation of Saanen buck semen frozen in different extenders supplemented with various antioxidants. **Ank Univ Vet Fak Derg** 2010; 57: 151-156.

Kurt S. Deney hayvanlarında fertilite yönünden bitkisel kaynaklı antioksidanların kullanımı. **J Fac Pharm Ankara** 2019; 43 (2): 197-208.

Küçük N, Aksoy M, Uçan U, Ahmad E, Naseer Z, Ceylan A. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. **Cryobiology** 2014; 68 (3): 327-331.

Li YX, Zhou L, Lv MQ, Ge P, Liu YC, Zhou DX. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2019; 233: 84-92.

Lone SA, Mohanty TK, Baithalu RK, Yadav HP. Sperm protein carbonylation. **Andrologia** 2019; 51 (4): 1-7.

Luno V, Gil L, Olaciregui M, Jerez RA, de Blas I, Hozbor F. Antioxidant effect of lemon balm (*Melissa officinalis*) and mate tea (*Ilex paraguensis*) on quality, lipid peroxidation and DNA oxidation of cryopreserved boar epididymal spermatozoa. **Andrologia** 2015; 47 (9): 1004-1011.

Lopez-Saucedo J, Paramio MT, Fierro R, Izquierdo D, Catala MG, Coloma MA. Sperm characteristics and heterologous in vitro fertilisation capacity of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal sperm, frozen in the presence of the enzymatic antioxidant catalase. **Cryobiology** 2014; 68 (3): 389-394.

Lv C, Wu G, Hong Q, Quan G. Spermatozoa cryopreservation: State of art and future in small ruminants. **Biopreserv and Biobank** 2019a; 17 (2):171-182.

Lv C, Larbi A, Wu G, Hong Q, Quan G. Improving the quality of cryopreserved goat semen with a commercial bull extender supplemented with resveratrol. **Anim Reprod Sci** 2019b; 208: 106-127.

Maidin MS, Padlan MH, Azuan SAN, Jonit R, Mohammed NH, Abdullah R. Supplementation of *Nigella sativa* oil and honey prolong the survival rate of fresh and post-thawed goat sperms. **Tropical Animal Science Journal** 2018; 41 (2): 94-99.

Malo C, Gil L, Cano R, Gonzalez N, Luno V. Fennel (*Foeniculum vulgare*) provides antioxidant protection for boar semen cryopreservation. **Andrologia** 2012; 44 (1): 710-715.

Mao T, Han C, Wei B, Zhao L, Zhang Q, Deng R, Liu J, Luo Y, Zhang Y. Protective effects of quercetin against cadmium chloride-induced oxidative injury in goat sperm and zygotes. **Biol Trace Elem Res** 2018; 185 (2): 344-355.

Mara L, Dattena M, Pilichi S, Sanna D, Branca A, Cappai P. Effect of different diluents on goat semen fertility. **Anim Reprod Sci** 2007; 102 (1-2): 152-157.

Mehdipour M, Kia HD, Najafi A, Dodaran HV, Garcia-Alvarez O. Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. **Cryobiology** 2016; 73 (3): 297-303.

Mehdipour M, Kia HD, Najafi A, Mohammadi H, Alvarez-Rodriguez M. Effect of crocin and naringenin supplementation in cryopreservation medium on post-thaw rooster sperm quality and expression of apoptosis associated genes. *PLoS One* 2020; 15 (10): 1-17.

Melidou M, Riganakos K, Galaris D. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: the role of iron chelation. *Free Radic Biol Med* 2005; 39 (12): 1591-1600.

Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM, Audrey G. Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. *Anim Reprod Sci* 2011; 129 (1-2): 44-49.

Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender. *Anim Reprod Sci* 2012; 136 (1-2): 55-60.

Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM, Audrey G. Effect of hypotaurine and cysteine on sperm cytological parameters of cooled and post thaw boer goat semen. *Elixir Semen Dilu & Freez* 2015; 79: 30196-30200.

Meral R, Doğan İS, Kanberoğlu GS. Fonksiyonel gıda bileşeni olarak antioksidanlar. *Iğdır Univ J Inst Sci & Tech* 2012; 2 (2): 45-50.

Moce E, Vicente JS. Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Anim Reprod Sci* 2009; 110 (1-2): 1-24.

Monton A, Gil L, Malo C, Olaciregui M, Gonzale, N, de Blas I. Sage (*Salvia officinalis*) and fennel (*Foeniculum vulgare*) improve cryopreserved boar epididymal semen quality study. *Cryoletters* 2015; 36: 83-90.

Moretti E, Mazzi L, Terzuoli G, Bonechi C, Iacoponi F, Martini S, Rossi C, Collodel G. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. *Reprod Toxicol* 2012; 34 (4): 651-657.

Motlagh MK, Sharafi M, Zhandi M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Soleimani M, Zeinoaldini S. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. *Cryobiology* 2014; 69 (2): 217-222.

Mustofa I, Susilowati S, Wurlina W, Hernawati T, Oktanella Y. Green tea extract increases the quality and reduced DNA mutation of post-thawed Kacang buck sperm. *Heliyon* 2021; 7 (3): 1-8.

Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology of Reproduction* 2003; 68 (5): 1828-1835.

Naijian HR, Kohram H, Shahneh AZ, Sharafi M, Bucak MN. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze-thaw process. *Cryobiology* 2013; 66 (2): 151-155.

Najafi A, Kia HD, Hamishehkar H, Moghaddam G, Alijani S. Effect of resveratrol-loaded nanostructured lipid carriers supplementation in cryopreservation medium on post-thawed sperm quality and fertility of roosters. **Anim Reprod Sci** 2019; 201: 32-40.

Nashtaei MS, Nekoonam S, Naji M, Bakhshalizadeh S, Amidi F. Cryoprotective effect of resveratrol on DNA damage and crucial human sperm messenger RNAs, possibly through 5' AMP-activated protein kinase activation. **Cell Tissue Bank** 2018; 19 (1): 87-95.

Olamitibo DJ, Dayo OO, Oladimeji AM, Mathew A, Olajide O, Emmanuel OO, Oluwafemi AE, Amidu ST, Ayobami IO. Effects of avocado seed extract in different Tris extenders on sperm and oxidative stress indices of vitrified goat spermatozoa. **Journal of Agricultural Sciences** 2016; 61 (4): 359-374.

Olayemi, FO, Adeniji DA, Oyeyemi MO. Evaluation of sperm motility and viability in honey-included egg yolk based extenders. **Global Vet** 2011; 7 (1): 19-21.

Ömür AD. Koç spermasının dondurulmasında antioksidanların etkisi. **Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg** 2015; 10 (1): 61-69.

Peris-Frau P, Soler AJ, Iniesta-Cuerda M, Martin-Maestro A, Sanchez-Ajofrin I, Medina-Chavez DA, Fernandez-Santos MR, Garcia-Alvarez O, Maroto-Morales A, Montoro V, Garde JJ. Sperm cryodamage in ruminants: Understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. **Int J Mol Sci** 2020; 21 (8): 1-22.

Petruska P, Capcarova M, Sutovsky P. Antioxidant supplementation and purification of semen for improved artificial insemination in livestock species. **Turk J Vet Anim Sci** 2014; 38 (6): 643-652.

Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Rum Res** 2006; 63 (3): 215-225.

Rahmatzadeh M, Kohram H, Shahneh AZ, Seifi-Jamadi A, Ahmad E. Antioxidative effect of BHA in soya bean lecithin-based extender containing Glycerol or DMSO on freezing capacity of goat semen. **Reprod Domest Anim** 2017; 52 (6): 985-991.

Rashid MI, Fareed MI, Rashid H, Aziz H, Ehsan N, Khalid S, Ghaffar I, Ali R, Gul A, KR. Flavonoids and their biological secrets. **Plant and Human Health** 2019; 2: 579-605.

Ren F, Fang Q, Feng T, Li Y, Wang Y, Zhu H, Hu J. *Lycium barbarum* and *Laminaria japonica* polysaccharides improve Cashmere goat sperm quality and fertility rate after cryopreservation. **Theriogenology** 2019; 129: 29-36.

Rezaei Z, Zeynodini S, Baghshahi H, Towhidi A, Faraji S. The effect of adding pyridoxine to soybean lecithin-based extender on goat semen quality parameters after the freeze-thawing process. **Iran J Vet Res** 2021; 22 (3): 234-238.

Rosato MP, Iaffaldano N. Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. **Theriogenology** 2013; 79 (3): 508-516.

Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. **Reprod Biomed Online** 2010; 21 (4): 456-462.

Said T, Agarwal A. Antioxidants in sperm cryopreservation. **Male Infertility** 2012; 431-437

Salehi B, Valussi M, Jugran AK, Martorell M, Ramirez-Alarcon K, Stojanovic-Radic ZZ, Antolak H, Kregiel D, Mileski KS, Sharifi-Rad M, Setzer WN, Cadiz-Gurrea ML, Segura-Carretero A, Şener B, Sharifi-Rad J. *Nepeta* species: From farm to food applications and phytotherapy. **Trends in Food Science & Technology** 2018; 80: 104-122.

Salmani H, Nabi MM, Vaseghi-Dodaran H, Rahman MB, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Towhidi A, Shahneh AZ, Zhandi M. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. **Small Rum Res** 2013; 112 (1-3): 123-127.

Salmani H, Towhidi A, Zhandi M, Bahreini M, Sharafi M. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. **Cryobiology** 2014; 68 (2): 276-280.

Saraswat S, Jindal SK, Ramachandran N, Yadav S, Raju P. Standardization of antioxidants fortification in frozen buck semen. **Indian Journal of Small Ruminants** 2012; 18 (1): 47-51.

Saraswat S, Jindal SK, Kharche SD. Cryopreservation of sperm in ruminants- A review. **Wayamba Journal of Animal Science** 2013; 23: 753-767.

Saraswat S, Jindal SK, Kharche SD. Antioxidant and spermatozoa: a complex story- A review. **Indian Journal of Animal Sciences** 2016; 86 (5): 495-501.

Sarıkürkçü C, Eskici M, Karanfil A, Tepe B. Phenolic profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of two endemic *Nepeta* species: *Nepeta nuda* subsp. *glandulifera* and *N. cadmea*. **South African Journal of Botany** 2019; 120 (3): 298-301.

Seifi-Jamadi, A, Kohram H, Shahneh AZ, Ansari M, Macias-Garcia B. Quercetin ameliorate motility in frozen-thawed turkmen stallions sperm. **J Equine Vet Sci** 2016; 45: 73-77.

Seifi-Jamadi A, Ahmad E, Ansari M, Kohram H. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. **Cryobiology** 2017; 75: 15-20.

Shakeri A, Khakdan F, Soheili V, Sahebkar A, Rassam G, Asili J. Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepeta ucrainica* L. spp. *kopetdaghensis*. **Ind Crop Prod** 2014; 58: 315-321.

Shakeri A, Khakdan F, Soheili V, Sahebkar A, Shaddel R, Asili J. Volatile composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant evaluation of the essential oil from *Nepeta sintenisii* Bornm. **Ind Crop Prod** 2016; 84: 224-229.

Sharma A, Cannoo DS. Phytochemical composition of essential oils isolated from different species of genus *Nepeta* of Labiatae family: A review. **Pharmacophore** 2013; 4 (6): 181-211.

Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. **Syst Biol Reprod Med** 2015; 61 (1): 1-12.

Sharma A, Cooper R, Bhardwaj G, Cannoo DS. The genus *Nepeta*: Traditional uses, phytochemicals and pharmacological properties. **J Ethnopharmacol** 2021; 268: 1-25.

Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. **Reprod Domest Anim** 2015; 50 (3): 20-26.

Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Anim Reprod Sci** 2016; 169: 2-5.

Silva ECB, Arruda LCP, Silva SV, Souza HM, Guerra MMP. High resveratrol or quercetin concentrations reduce the oscillation index of frozen goat semen. **Arq Bras Med Vet Zootec** 2016; 68 (5): 1237-1243.

Silva ECB, Arruda LCP, Vieira JIT, Soares PC, Guerra MMP. (+)-Catechin and (-)-epigallocatechin gallate: are these promising antioxidant therapies for frozen goat semen? **Arq Bras Med Vet Zootec** 2019; 71 (2): 521-528.

Sitarek P, Merez-Sadowska A, Sliwinski T, Zajdel R, Kowalczyk T. An in vitro evaluation of the molecular mechanisms of action of medical plants from the Lamiaceae family as effective sources of active compounds against human cancer cell lines. **Cancers** 2020; 12 (10): 1-47.

Sobeh M, Hassan SA, El Raey MA, Khalil WA, Hassan MAE, Wink M. Polyphenolics from *Albizia harveyi* exhibit antioxidant activities and counteract oxidative damage and ultra-structural changes of cryopreserved bull semen. **Molecules** 2017; 22 (11): 1-14.

Suprayogi TW, Susilowati S. The effect of cattle seminal plasma crude protein on the cryopreservation of goat semen. **Iranian Journal of Applied Animal Science** 2018; 8 (4): 641-646.

Suschke U, Sporer F, Schneelee J, Geiss HK, Reichling J. Antibacterial and cytotoxic activity of *Nepeta cataria* L., *N. cataria* var. *citriodora* (Beck.) Balb. and *Melissa officinalis* L. essential oils. **Nat Prod Commun** 2007; 2 (12): 1277-1286.

Susilowati S, Triana IN, Wurlina W, Arimbi A, Srianto P, Mustofa I. Addition of L-arginine in skim milk extender maintains goat spermatozoa quality in chilled temperature for five days. **Vet World** 2019; 12 (11): 1784-1789.

Süntar I, Nabavi SM, Barreca D, Fischer N, Efferth T. Pharmacological and chemical features of *Nepeta* L. genus: Its importance as a therapeutic agent. **Phytother Res** 2018; 32 (2): 185-198.

Şafak EK, Karatoprak GŞ, Dirmenci T, Duman H, Küçükboyacı N. Cytotoxic effects of some *Nepeta* species against breast cancer cell lines and their associated phytochemical properties. **Plants** 2022; 11: 1-14.

Tanwar B, Modgil R. Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits. **Spatula DD** 2012; 2 (1): 59-68.

Tsuruoka T, Bekh-Ochir D, Kato F, Sanduin S, Shataryn A, Ayurzana A, Satou T, Li W, Koike K. The essential oil of Mongolian *Nepeta sibirica*: a single component and its biological activities. **J Essent Oil Res** 2012; 24 (6): 555-559.

Tunalı G. Sperm kriyoprezervasyon teknikleri ve fertilizasyon başarısındaki rolü. **Androloji Bülteni** 2014; 16 (57): 123-128.

Tuncer PB, Bucak MN, Sarıözkan S, Sakin F, Yeni D, Ciğerci İH, Ateşşahin A, Avdatek F, Gündoğan M, Büyükleblebici O. The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (*Capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. **Cryobiology** 2010; 61 (1): 89-93.

Ugar M. Glutasyon peroksidaz aktivite ölçümü için yeni bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, **İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul, 2016, s. 14.

Vahedi V, Evrigh NH, Behroozlak M, Dirandeh E. Antioxidant effects of thyme (*Thymus vulgaris*) extract on ram sperm quality during cryopreservation. **Iranian Journal of Applied Animal Science** 2018; 8 (2): 263-269.

Vidal AH, Batista AM, Silva ECB, Gomes WA, Pelinca MA, Silva SV, Guerra MMP. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. **Small Rum Res** 2013; 109 (1): 47-51.

Wahjuningsih S, Ciptadi G, Pridiawati K. The effect of water clover (*Marsilea crenata*) extract addition in egg yolk and skim milk extender on frozen goat semen quality. **Earth and Environmental Science** 2019a; 387 (1): 1-4.

Wahjuningsih S, İhsan MN, Ciptadi G, Isnaini N, Rahayu S, Afifah DD. Effect of *Moringa oleifera* leaves extract on post-thawed semen quality of Senduro goat. **Earth and Environmental Science** 2019b; 247: 1-5.

Wahjuningsih S, Ciptadi G, İhsan MN, Isnaini N, Rahayu S. Supplementation of *Moringa oleifera* leaves extract in Tris-egg yolk extender on the quality and fertility of cryopreserved Senduro goat sperm. **Livestock Research for Rural Development** 2019c; 31 (12):1.

Wahjuningsih S, İhsan MN, Pahlevi R, Pratiwi H. Effect of water clover (*Marsilea crenata*) extract within tris-fructose citric glycerol extender on frozen semen quality of boer goat. **Earth and Environmental Science** 2021a; 743 (1): 1-4.

Wahjuningsih S, İhsan MN, Siswoyo DA, Fatmila DT, Firmawati A. Extract of Cincau (*Mesona palustris* B.) supplementation in semen extender improves Boer goat sperm cryopreservation. **J Adv Vet Res** 2021b; 11 (4): 247-253.

Wang SH, Hu YL, Liu TX. Plant distribution and pharmacological activity of flavonoids. **Tradit Med Res** 2019; 4 (5): 269-287.

Xiao Y, Wu Z, Wang M. Effects of fulvic acids on goat sperm. **Zygote** 2018; 26 (3): 220-223.

Xin M, Siddique MAM, Dzyuba B, Cuevas-Urbe R, Shaliutina-Kolesova A, Linhart O. Progress and challenges of fish sperm vitrification: A mini review. **Theriogenology** 2017; 98: 16-22.

Ye RJ, Yang JM, Hai DM, Liu N, Ma L, Lan XB, Niu JG, Zheng P, Yu JQ. Interplay between male reproductive system dysfunction and the therapeutic effect of flavonoids. **Fitoterapia** 2020; 147: 1-16.

Yeni D, Avdatek F, Gündoğan M. Spermatozoon DNA hasarının belirlenmesinde Comet analiz yöntemi. *Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics* 2017; 3 (2):105-113.

Yeste M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 2016; 85 (1): 47-64.

Yeste M, Rodriguez-Gil JE, Bonet S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. *Mol Reprod Dev* 2017; 84 (9): 802-813.

Yılmaz G, Öztürk G, Çiçek M, Demirci B. Phytochemical characterization and biological activities of *Nepeta cadmea* Boiss. *Int J Sec Metabolite* 2020; 7 (1): 28-34.

Yoshimoto H, Takeo T, Nakagata N. Dimethyl sulfoxide and quercetin prolong the survival, motility, and fertility of cold-stored mouse sperm for 10 days. *Biol Reprod* 2017; 97 (6): 883-891.

Yousefian I, Emamverdi M, Karamzadeh-Dehaghani A, Sabzian-Melei R, Zhandi M, Zare-Shahneh A. Attenuation of cryopreservation-induced oxidative stress by antioxidant: impact of Coenzyme Q₁₀ on the quality of post-thawed buck spermatozoa. *Cryobiology* 2018; 81: 88-93.

Zaenuri LA, Susilawati T, Wahyuningsih S, Sumitro SB. Effects of additional crude extract of fig fruit (*Ficus carica* L) into Tris egg yolk based extender on quality of buck semen. *Journal of Biology Agriculture and Healthcare* 2014; 4 (9): 21-27.

Zamiri MJ. Update on semen cryopreservation in sheep and goats: A review. *Journal of Livestock Science and Technologies* 2020; 8 (1): 1-15.

Zanganeh Z, Zhandi M, Zare-Shahneh A, Najafi A, Nabi MM, Mohammadi-Sangcheshmeh A. Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? *Small Rum Res* 2013; 114 (1): 120-125.

Zarepourfard H, Riasi A, Frouzanfar M, Hajian M, Esfahani MHN. Pomegranate seed in diet, affects sperm parameters of cloned goats following freezing-thawing. *Theriogenology* 2019; 125: 203-209.

Zhandi M, Ansari M, Roknabadi P, Shahneh AZ, Sharafi M. Orally administered Chrysin improves post-thawed sperm quality and fertility of rooster. *Reprod Domest Anim* 2017; 52 (6): 1004-1010.

Zhang W, Yi K, Chen C, Hou X, Zhou X. Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2012; 132 (3-4): 123-128.

Zhu Z, Fan X, Pan Y, Lu Y, Zeng W. Trehalose improves rabbit sperm quality during cryopreservation. *Cryobiology* 2017; 75: 45-51.


Zhu Z, Li R, Lv Y, Zeng W. Melatonin protects rabbit spermatozoa from cryo-damage via decreasing oxidative stress. *Cryobiology* 2019; 88: 1-8.

Zou J, Wei L, Li D, Zhang Y, Wang G, Zhang L, Cao P, Yang S, Li G. Effect of glutathione on sperm quality in Guanzhong dairy goat sperm during cryopreservation. *Front Vet Sci* 2021; 8: 1-6.

Zribi N, Chakroun NF, Abdallah FB, Elleuch H, Sellami A, Gargouri J, Rebai T, Fakhfakh F, Keskes LA. Effect of freezing-thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. ***Cryobiology*** 2012; 65 (3): 326-331.

8. EKLER

Ek-1. **Boztaş S**, Urgancı BE, Seçme M, Keskin N. "*Nepeta italica* L. subsp. *cadmea* (Boiss.) A. L. Budantsev oil has a pro-apoptotic effect on Saos-2 cell line". **Nat Pro Biotech** 2022; 2 (2): 88-98.



Natural Products and Biotechnology

Vol. 2 No. 2
pp. 88-98
(2022)

Nepeta italica L. subsp. *cadmea* (Boiss.) A. L. Budantsev Oil Has a Pro-Apoptotic Effect on Saos-2 Cell Line

Siddika Boztas¹, Buket Er Urganci^{2*}, Mucahit Secme³, Nazan Keskin¹

¹ Histology and Embriology Department, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli, Turkey

² Medical Biology Department, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli, Turkey

³ Medical Biology Department, Faculty of Medicine, Odu University, Odu, Turkey

Article History


Received : Oct 03, 2022
Revised : Nov 11, 2022
Accepted : Dec 15, 2022

Keywords

Nepeta,
Saos-2,
Apoptosis,
Osteosarcoma

Abstract

Nepeta sp. are used diuretic, anti-spasmodic, antiasthmatic, expectorant, cough suppressant, sedative, antiseptic, antipyretic, antiallergy and as a muscle relaxant. Besides, it also has many biological activities such as antioxidant, antibacterial, antiinflammatory, anticancer, antiparasitic, antiplatelet, antiangiogenesis, antimicrobial, antiviral, antifungal, insecticide, cytotoxic, phytotoxic, genotoxic, and apoptotic activities. Osteosarcoma is the most common primary bone cancer in children and adolescents, and its diagnosis is difficult due to the known heterogeneous nature of its pathogenesis. Chemotherapy for osteosarcoma is far from satisfactory, especially because of the presence of metastases or poor response to combination chemotherapy. Various studies have been conducted to evaluate the anti-apoptotic, anticancer, and cytotoxic potentials of different essential oil extracts from different species of the *Nepeta*. This study was carried out to confirm the cytotoxic and apoptotic effect of essential oil obtained by hydrodistillation from the aerial parts (flower, leaf, seed and stem) of *Nepeta italica* subsp *cadmea*. To figure out apoptotic properties of *N. italica* subsp *cadmea*. MTT assay, qRT-PCR with Bcl-2, caspase-9, Caspase-3, caspase-8, caspase-7, caspase-10, Bax gene primer and TUNEL assay accomplished. IC₅₀ dose of *N. italica* subsp. *cadmea* oil was 10 µg/ml at 24 hours. Expression analysis showed that caspase8, caspase 10 were upregulated while Bcl-2 was downregulated. TUNEL assay results show the similar number of apoptotic cells in the control group then the *Nepeta* group. Therefore, it showed pro-apoptotic activity in conjunction with the expression profile.



Corresponding Author:
Buket Er Urganci, Medical Biology Department, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli, Turkey, buketer@gmail.com

Cite this article as:
Boztas, S., Er Urganci, B., Secme, M., & Keskin, N. (2022). *Nepeta italica* L. subsp. *cadmea* (Boiss.) A. L. Budantsev Oil Has a Pro-Apoptotic Effect on Saos-2 Cell Line. *Natural Products and Biotechnology*, 2(2), 88-98. <https://doi.org/10.58465/natprobiotech.2022.9>

1. INTRODUCTION

Nepeta L. is the largest genus of the *Lamiaceae* family (Goldansaz *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2021). There are about 300 species of this genus, most of them are aromatic (Acar *et al.*, 2011; Formisano *et al.*, 2011). It is represented by 39 species, 19 of which are endemic with a total of 50 taxa (Yilmaz *et al.*, 2020). It spreads throughout the world, generally includes perennial plants (Sarikurkcü *et al.*, 2019). The main diversity center of the genus *Nepeta* is Southwest Asia and the Western Himalayas (Acar *et al.*, 2011).

Nepeta are used diuretic, anti-spasmodic, antiasthmatic (Goldansaz *et al.*, 2019; Kaska *et al.*, 2019), expectorant, cough suppressant (Sharma *et al.*, 2021), sedative, antiseptic (Sarikurkcü *et al.*, 2019), antipyretic, antiallergy (Ashrafi *et al.*, 2020) and as a muscle relaxant (Akdeniz *et al.*, 2020). Besides, it also has many biological activities such as antioxidant (Azizian *et al.*, 2021), antibacterial, antiinflammatory (Kaska *et al.*, 2019; Sitarek *et al.*, 2020), anticancer, antiparasitic (Ashrafi *et al.*, 2020), antiplatelet, antiangiogenesis (Al-Sheddi *et al.*,

2018), antimicrobial, antiviral (Sharma and Cannoo, 2013; Afshar *et al.*, 2017), antifungal, insecticide (Süntar *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2021), cytotoxic, phytotoxic (Formisano *et al.*, 2011), genotoxic, apoptotic (Süntar *et al.*, 2018), antitumor, larvicide, analgesic, antidepressant and anticonvulsant (Süntar *et al.*, 2018; Akdeniz *et al.*, 2020).

The phytochemical compositions of the species belonging to the genus *Nepeta* particularly include nepetalactone isomers (Azizian *et al.*, 2021), terpenes, phenolic acids, flavonoids and steroids (Akdeniz *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2021). Essential oils obtained from these plants are very valuable due to their pleasant smell (Sarikurcu *et al.*, 2019) and are rich in monoterpenes (Formisano *et al.*, 2011). More than thirty-five flavonoids from different species have been isolated from *Nepeta* species, including flavonols, flavones, flavanols, and flavanones (Sharma *et al.*, 2021).

The medicinal effects of *Nepeta* species are generally due to their flavonoids and essential oils. The majority of *Nepeta* species contain lipophilic flavonoids of the flavone group on the surface of their leaves, and there are effective components of these plants that show their therapeutic effects due to their free radical scavenging and antioxidant capacities (Delshad *et al.*, 2011).

Osteosarcoma is the most common primary bone cancer in children and adolescents, and its diagnosis is difficult due to the known heterogeneous nature of its pathogenesis. Osteosarcoma has been associated with cytogenetic and genetic abnormalities, such as activation of oncogenes and mutations in tumor suppressors (Kumar *et al.*, 2016). Osteosarcoma arises in mesenchymal bone-forming cells, and it is one of the most common malignant tumors of the musculoskeletal system. Chemotherapy for osteosarcoma is far from satisfactory, especially because of the presence of metastases or poor response to combination chemotherapy (Anderson *et al.*, 2010). The idea that natural molecules can inhibit cancer development was put forward more than 100 years ago, and the effects of small molecules extracted from fungi and plants on tumor development and growth in laboratories have begun to be studied. In this direction, studies have focused on the ability of these natural components to regulate signaling pathways and control basic cellular functions such as cell death, cell differentiation and cell proliferation (Amado *et al.*, 2014). For this reason, natural products of plant origin have begun to attract more and more attention in recent years due to their anticancer functions (Han *et al.*, 2015).

Essential oil extracted from various *Nepeta* species such as *N. menthoides* Boiss. & Buhse (Delshad and Parvizi, 2014), *N. cataria* L. (Emami *et al.*, 2016), *N. deflersiana* Schweinf. ex Hedge (Al-Taweel *et al.*, 2017), *N. gloeocephala* Rech. f. (Ashkezary *et al.*, 2017) can be used in various human cancer cell lines were investigated for its apoptotic activity. At the same time, there is *N. deflersiana* (Al-Oqail *et al.*, 2015; Al-Sheddi *et al.*, 2018) anticancer and various studies have been conducted to evaluate the cytotoxic potential of *Nepeta* species such as *N. cataria* L. var. *citriodora* (Becker) Balb., *N. cataria* L. (Suschke *et al.*, 2007), *N. menthoides* (Boiss & Buhse) (Kahkeshani *et al.*, 2014), *N. ucrainica* L. *kopetdaghensis* (Shakeri *et al.*, 2014), *N. sintenisii* Bornm (Shakeri *et al.*, 2016), *N. binaloudensis* Jamzad (Afshar *et al.*, 2017), *N. curvidens* Boiss. & Balansa (Ashrafi *et al.*, 2020), *N. govaniana* (Wall. ex Benth.) Benth. (Dar *et al.*, 2014), *N. heliotropifolia* Lam. and *N. congesta* Fisch. & C.A. Mey. subsp. *cryptantha* (Boiss. & Hausskn.) Dirmenci & Yild (Akdeniz *et al.*, 2020), *N. rtanjensis* Diklic & Milojevic, *N. sibirica* L. (Tsuruoka *et al.*, 2012).

N. cadmea Boiss was reduced to a subspecies of *N. italica* by A.L. Budantsev and *N. italica* L. subsp. *cadmea* is arranged as. In addition, *Nepeta italica* L. subsp. *cadmea* is a synonym for *N. cadmea* Boiss (Dirmenci, 2003). The endemic species *N. cadmea* Boiss. is a herbaceous, perennial, generally aromatic plant rich in essential oil content (Yilmaz *et al.*,

2020). It is distributed in Western, Southern and Southwestern Anatolian regions of Turkey (Dirmenci, 2003).

We aimed to investigate the anticancer properties of *N. italica* L. subsp. *cadmea* oil in Saos-2 Osteosarcoma cell line through the apoptosis pathway in this study.

2. MATERIAL and METHODS

2.1. Plant Material and Essential Oil Preparation

N. italica subsp. *cadmea* samples were collected from Honaz Mountain in July-August. It was dried by monitoring continuously for 4 weeks in a dark, light and moisture-free environment. Then, the flowers, leaves, seeds and stems of the dried plants were cut into small pieces and ground into powder in a grinder. The plant extract was obtained by using the Clevenger apparatus with Hydrodistillation-HD, one of the distillation methods. The process was carried out by boiling the water and plant (powder) material in a glass balloon connected with the cooler for 4-6 hours, condensing the oil molecules moving with the water vapor in the cooler and separating them from the water.

2.2. Gas Chromatography of *Nepeta italica* subsp. *cadmea* Oil

Analysis of *Nepeta italica* subsp. *cadmea* essential oil (EO) was performed by gas chromatography (GC) using two types of detectors, flame ionization (FID) and mass-spectrometric (MS) by Bezmialem Vakıf University Phytotherapy Education Research and Application Center (BITEM).

2.3. Cell Culture

For Saos-2 human osteosarcoma cell culture, DMEM-high glucose (Gibco) culture medium supported by 10% FBS (Gibco) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco) was used. Saos-2 osteosarcoma cells were grown in 5% CO₂, 95% air humidified incubator at 37 °C under suitable cell culture conditions. The medium was removed, and fresh completed medium was added every 2-3 days. After Saos-2 cells reached 80% to 90% confluency in culture dishes, trypsinization was performed using 0.25% trypsin-EDTA (Gibco).

2.4. MTT Assay

The Effects of *N. italica* subsp. *cadmea* oil on cell proliferation in Saos-2 osteosarcoma cells were determined via MTT colorimetric-based assay according to manufacturer methodology (MTT Cell Viability Assay Kit; Biotium cat no: 30006). Saos-2 cells were seeded into 96-well plates at a concentration of 1×10^4 cells per well. Saos-2 cells were seeded in 96-well culture plates, 1×10^4 cells per well, and following their adherence, the cells were treated with different concentrations of *N. italica* subsp. *cadmea* essential oil in a dose range of 0.5 µg/ml and 10 µg/ml. Following incubation at doses treated for 24, 48, and 72 hours, the dose and time-dependent cytotoxic potential of the essential oil was investigated by MTT test. The essential oil was dissolved with ethanol and since the concentration of solvent ethanol was kept below one thousandth in applications, a working group was not formed for the solvent. Following the incubation, MTT solution was added, and reading was performed at 570 nm and 630 (reference wavelength) wavelengths with the help of a microplate reader (Biotek). Cell viability was determined in the groups treated the plant oil depending on the dose and time.

2.5. Analysis of Gene Expression by Real-Time PCR

Total RNA from the control group of Saos-2 cells and IC₅₀ dose group (10 µg/ml *Nepeta* oil) of essential oil for 24 hour was isolated by using RNeasy Mini Kit (Qiagen Cat: 74104) according to the manufacturer's protocols. Complementary DNA (cDNA) was synthesized based on the total RNAs using the Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, 205311),

according to the manufacturer's protocol. mRNA expression changes of apoptosis related genes such as caspase-9, caspase-8, caspase-3, caspase-7, caspase-10, Bcl-2, Bax genes were detected in this study. Beta-actin was used as house-keeping gene for normalization of the PCR data. Real-time PCR tests were performed by Rotor Gene (Qiagen) according to the Quantitect SYBR Green PCR kit (Qiagen, 204143) protocol.

2.6. Apoptosis Detection

Effects of *Nepeta* oil on apoptosis in Saos-2 cells were determined by In Situ Cell Death Detection kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Saos-2 cells were plated per well onto Lab-Tek II Chamber Slides (Nalge Nunc International, Tokyo, Japan) as 3×10^4 cells per plate. Sample slides of control and dose groups were incubated kit reaction mixture according to the manufacturer's protocols.

2.7. Statistical Analysis

All MTT, TUNEL and RT-PCR assays were performed as triplicated. The mean \pm standard error was evaluated by Microsoft Excel. RT-PCR data were analyzed with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and quantitated with an online analysis platform (<https://dataanalysis2.qiagen.com/pcr>). RT2-Profiles™ PCR Array Data Analysis program was used for fold calculation and statistical analysis. "Student t-test" was used for the comparison of gene expressions in the control and dose groups. ($p < 0.05$ was evaluated as significant statistically).

3. RESULTS and DISCUSSION

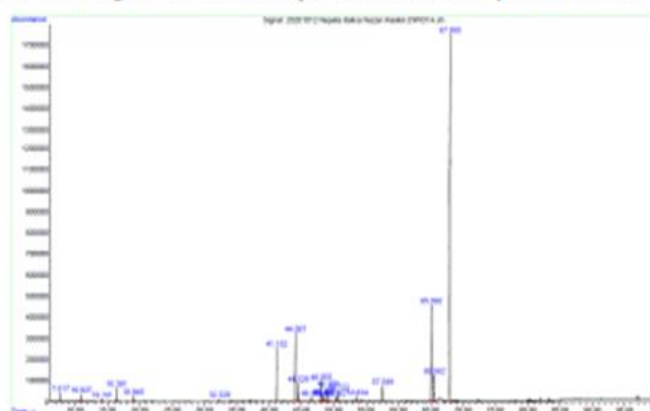
3.1. Chemical Composition

According to the GC-MS data (Table 1) and chromatogram (Figure 1), stereoisomers of nepetalactone, a monoterpene, constitutes the bulk of the essential oil composition (74%). Then the second most abundant substance was caryophyllene (6.89%). The other compounds were linalool (3.97%), caryophyllene oxide (2.29%), 4-terpineol (1.42%), Calamenene (1.33%), 1,8-cineol (1.116%) were determined.

Table 1. The percentage composition of *N. italica* subsp. *cadmea* oil detected by GC-MS and GC-FID analysis.

Compounds	(%)
α -Pinene	0,52
Sabinene	0,44
α -Terpinene	0,26
1,8-Cineole	1,16
γ -Terpinene	0,51
Linalool	3,97
Caryophyllene	6,89
4-Terpineol	1,42
α -Copaene	0,35
α -Humulene	0,33
Lavandulol	0,93
α -Terpineol	0,35
Germacrene	0,86
γ -Cadinene	0,52
Calamenene	1,33
Caryophyllene oxide	2,29
Nepetalactone (Total isomers)	74
Other Compounds	3,87
Total	100

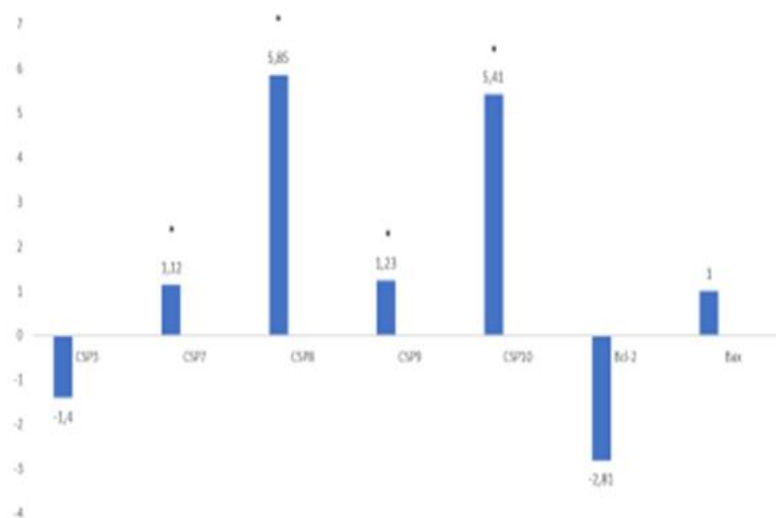
Figure 1. The chromatogram of *N. italica* subsp. *cadmea* oil detected by GC-MS and GC-FID analysis.



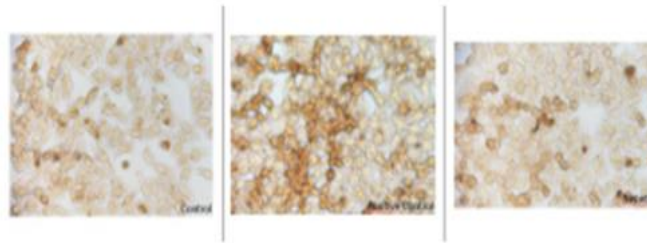
3.2. Apoptotic Effects of *Nepeta*

To investigate whether the growth inhibitory effect of *N. italica* subsp. *cadmea* oil is associated with apoptosis, expressive quantity of apoptosis-related genes such as Bcl-2, Caspase 9, Bax, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 7, Caspase 10 was carried out. Caspase8, Caspase 10 were overexpressed while Bcl-2 was downregulated (Figure 2).

Figure 2. Fold Regulation of Apoptosis Related Genes. * indicates statistically important ($p < 0.05$)



Tunel assay results showed apoptotic cells in control and induced group (Figure 3). The cells with brown staining were TUNEL-positive cells, namely the apoptotic cells. We found similar positive cells in the *Nepeta*-treated group like in the control group.

Figure 3. Apoptotic levels of *Nepeta* induced cells.

Essential oils of *Nepeta* species such as *N. ucrainica* L. spp. *kopetdaghensis*, *N. cataria* var. *citriodora* (Becker), *N. sintenisii* Bornm., *N. cataria* L., and *N. menthoides* Boiss & Buhse have been declared to have cytotoxic activity in various human cancer cell lines (Sharma *et al.*, 2021).

Apoptosis stimulated by *N. cataria* L. in human prostate and breast cancer cells under in vitro conditions. These extracts showed much more cytotoxic effects against estrogen-receptor-positive prostatic cell line PC3 compared to low hormone receptor expressing prostatic cells DU-145 (Emami *et al.*, 2016). Essential oils of *N. cataria* L. and *N. cataria* var. *citriodora* have been demonstrated to exhibit cytotoxic effect against both BEAS-2B human bronchial epithelial and HaCaT human keratinocyte cell lines (Suschke *et al.*, 2007).

N. deflersiana ethanolic extracts' (NDEE) cardioprotective effect against isoproterenol (ISP)-induced myocardial damage in rats was investigated. It is suggested that NDEE treatment can obstruct oxidative stress, inflammation, and programmed cell death, thus making an effective approach against myocardial apoptosis. It has been showed that NDEE has potent cardioprotective, antioxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory potential opposed to myocardial damage (Al-Taweel *et al.*, 2017).

It has been reported that *N. menthoides* has an anti-apoptotic effect on axotomized spinal motoneurons. *N. menthoides* can induce a neuroprotective effect on axotomized dorsal root ganglion sensory neurons by reducing apoptotic cell death (Delshad and Parvizi, 2014). Likewise, the anti-tumoral properties of *N. menthoides* Boiss & Buhse were studied. The cytotoxic activity of the essential oil opposed to T47D breast ductal carcinoma, HT-29 and Caco-2 colorectal adenocarcinoma, and NIH-3T3 fibroblast cells has been described (Kahkeshani *et al.*, 2014).

The presence of the main volatile component, which is nepetalactone derivatives, is associated with the cytotoxic potential of the essential oil. Coated with nepetalactone extracted from *N. gloecephala* Rech f. treatment induced apoptosis in Hela cervical carcinomas. Phosphorylation of integrin-related kinase in Thr-173 and Ser-246 was decreased by SiO₂-antisense molecules without affecting integrin-related kinase levels and gave rise to cell cycle arrest in G2/M. In addition, SiO₂-antisense coated with nepetalactone decreased downstream AKT-Thr308 phosphorylation and AKT-Ser473 devoid of affecting the total amount of protein kinase B/AKT (Ashkezary *et al.*, 2017).

N. ucrainica L. spp. *kopetdaghensis* essential oil exhibit cytotoxic effects against both ovarian carcinoma A2780 and mammary adenocarcinoma MCF-7 cell lines (Shakeri *et al.*, 2016). *N. curvidens* essential oil's cytotoxic, antifungal, and antimicrobial activities were investigated in vitro. Also, anti-inflammatory and antinociceptive effects were appraised in vivo. The cytotoxicity against human lung cancer A549, human oral epidermal carcinoma KB, bladder epithelial carcinoma C450 was appraised. Meanwhile, A549 lung cancer cell line has

the highest inhibition at the lowest concentration of the essential oil. The C450 bladder cancer cell line, was the most resistant to the essential oil. Furthermore, the essential oil showed mild toxicity for the human normal line and high toxicity for cancer cell proliferation (Ashrafi *et al.*, 2020).

N. govaniiana essential oil displayed depending on the concentration growth inhibition with cell line linked growth of cancer cells and has highest activity towards A-549 lung cancer cell line, followed by Colo-205 colon cancer cell line (Dar *et al.*, 2014).

The cytotoxic potential of the extract *N. glomerata* Montbret & Aucher ex Benth plant has been shown to be more active in the renal adenocarcinoma cell line (48%) than amelanotic melanoma (28%) (Rigano *et al.*, 2011). The cytotoxic and cell viability effects of niosomal form of the *N. persica* Boiss. extract in MG63 bone cancer cells were evaluated. It has been stated that *N. persica* extract has anti-cancer effects (Abocepoor *et al.*, 2020).

The cytotoxicity of *N. juncea* Benth. extracts were studied in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells and human HepG2 human hepatocellular carcinoma cells and *N. juncea* extracts showed antiproliferative activity in MCF-7 and HepG2 cells at a dose-dependent manner. It was also reported that of *N. juncea* methanolic extracts exhibit maximum cytotoxic effect in both cancer cell lines, while minimal cytotoxic effect was observed in aqueous extracts (Sharifi-Rad *et al.*, 2020).

Anticancer and antimicrobial effects of active phytochemicals of ethanol extract (NDE) obtained from the aerial parts of *N. deflersiana* (ND) and NDE identified by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) were investigated. NDE's lung cancer NCI-H460 inhibited the proliferation of A549 cells. NDE demonstrated a dose-dependent inhibition in cancer cell migration. A dose-sensitive increase in early and late phase apoptosis was investigated in these cancer cells. While significant increases were noted in Bax and Caspase 3 levels, NDE decreased anti-apoptotic Bcl-2 levels in both cell lines. Ahmad *et al.* explained that NDE has anticancer effects on lung cancer cells, which may involve mitochondria-mediated apoptosis (Ahmad *et al.*, 2020).

The cytotoxic effects of monoterpenes have previously been showed against different cancer cells. 1,8-cineol, the major compound found in *N. binaloudensis* oil, has been demonstrated to inhibit the proliferation of HepG2 and A549 cells (Kladniew *et al.*, 2014). In another study showed that 1,8-cineol suppressed proliferation of colon cancer cells by activating apoptosis (Murata *et al.*, 2013). Alpha terpineol has been declared to inhibit the growth of cancer cells through a mechanism that includes inhibition of the NF- κ B pathway (Hassan *et al.*, 2010). At a concentration of 320 μ g/mL, γ -terpineol induced typical genome DNA fragmentation after 12, 24, 36, 48 hours and hallmark apoptosis in multiples of 180-200 bp. γ -terpineol not only induced apoptosis in human liver cancer BEL-7402 cell lines, but also greatly reduced BEL-7402 cell protein expression (Wu *et al.*, 2014). The anti-tumor effect of α -pinenin has been reported on human hepatoma cell lines by inducing G2/M cell cycle arrest (Chen *et al.*, 2015). α -pinenin has been shown to inhibit BEL-7402 cells by arresting cell growth in the G2/M check point via down-regulating Cdc25C expression and decreasing cycle dependence on kinase 1 (CDK1) (Chen *et al.*, 2014).

4. CONCLUSION

This study was carried out to confirm the cytotoxic and apoptotic effect of essential oil obtained by hydrodistillation from the aerial parts (flower, leaf, seed and stem) of *N. italica* subsp. *cadmea*. Various studies have been made to appraise the anti-apoptotic, anticancer, and cytotoxic potentials of different essential oil extracts from different species of the genus *Nepeta*. Extracts of these essential oils can be exerted by a variety of mechanisms, including cytotoxic and anti-cancer potential, increased membrane permeability, depolarization of cell membrane

integrity and disruption, decreased activity of membrane-bound enzymes, modification of the mevalonate metabolism pathway, and apoptosis induction. This study will contribute to the literature about effects of *N. italica* subsp. *cadmea* and its anticancer activities in Saos-2 osteosarcoma cells.

Acknowledgements

This research has not received a specific grant from their organizations in the non-profit sectors.

Declaration of Conflicting Interests and Ethics


The authors declare no conflict of interest. This research study complies with research publishing ethics. The scientific and legal responsibility for manuscripts published in NatProBiotech belongs to the author(s).

Author Contribution Statement


Siddika Boztas: Material preparation, data collection, analysis and edited. **Buket Er Urganci:** Material preparation, data collection, analysis and first draft of the manuscript. **Mucahit Secme:** Material preparation, data collection, analysis and edited. **Nazan Keskin:** Read and approved the final manuscript.

Orcid

Siddika Boztas  <https://orcid.org/0000-0001-9315-2174>

Buket Er Urganci  <https://orcid.org/0000-0002-5339-3835>

Mucahit Secme  <https://orcid.org/0000-0002-2084-760X>

Nazan Keskin  <https://orcid.org/0000-0002-5488-9322>

5. REFERENCES

- Aboeepoor, S., Ashkezari, M. D., Aboec-Mehrzi, F., Haghirsadat, B. F., & Lotfabadi, N. N. (2020). Designing and characterizing nano-carriers containing *Nepeta persica* extract and their effect on bone cancer. *Horizon. Med. Sci.*, 26(2), 142-155. <https://doi.org/10.32598/hms.26.2.3161.1>
- Acar, M., Ozcan, T., Satil, F. & Dimenci, T. (2011). A comparative anatomical study on two endemic *Nepeta* L. species (*N. baytopii* and *N. sorgerae*). *Biological Diversity and Conservation*, 4(3), 58-70.
- Afshar, A. S., Nematpour, F. S., Meshkani, M. & Khafi, A. (2017). Growth inhibition of human breast cancer cells and down-regulation of ODC1 and ADA genes by *Nepeta binaloudensis*, *Rev. Bras. Farmacogn.*, 27(1), 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.07.005>
- Ahmad, I., Irfan, S., Dera, A. A., Zaman, G. S., Chandramoorthy, H. C., Mir, M. A., & Rajagopalan, P. (2020). GC-MS analysis of ethanol extract from areal parts of *Nepeta deflersiana* and its anticancer and antimicrobial efficacies, *Biologia*, 75, 1739-1750.
- Akdeniz, M., Ertas, A., Yener, I., Firat, M. & Kolak, U. (2020). Phytochemical and biological investigations on two *Nepeta* species: *Nepeta heliotropifolia* and *N. congesta* subsp. *cryptantha*, *J. Food Biochem.*, 44, 1-12. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13124>
- Al-Oqa'il, M. M., Al-Sheddi, E. S., Siddiqui, M. A., Musarrat, J., Al-Khedhairy, A. A., & Farshori, N. N. (2015). Anticancer activity of sub-fractions of chloroform extracts of *Nepeta deflersiana* on human breast and lung cancer cells: an in vitro cytotoxicity assessment, *Pharmacogn. Mag.*, 11(4), 598-605. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.172968>

- Al-Sheddi, E. S., Farshori, N. N., Al-Oqail, M. M., Al-Massarani, S. M., Saquib, Q., Wahab, R., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A. A. & Siddiqui, M. A. (2018). Anticancer Potential of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using Extract of *Nepeta deflersiana* against Human Cervical Cancer Cells (HeLa), *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2018, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2018/9390784>
- Al-Taweel, A. M., Raish, M., Perveen, S., Fawzy, G. A., Ahmad, A., Ansari, M. A., Mudassar, S. & Ganaie, M. A. (2017). *Nepeta deflersiana* attenuates isoproterenol-induced myocardial injuries in rats: Possible involvement of oxidative stress, apoptosis, inflammation through nuclear factor (NF)- κ B downregulation, *Phytomedicine*, 34, 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.08.003>
- Amado, N. G., Predes, D., Moreno, M. M., Carvalho, I. O., Mendes, F. A., & Abreu, J. G. (2014). Flavonoids and Wnt/ β -Catenin Signaling: Potential Role in Colorectal Cancer Therapies, *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 12094-12106.
- Anderson, P. M., Tomaras, M. & McConnell, K. (2010). Mifamurtide in osteosarcoma practical review, *Drugs Today*, 46, 327-337.
- Ashkezary, M. D., Aboec-Mehrzi, F. & Moradi, P. (2017). SiO₂ antisense molecules covered by *Nepetalactone*, extracted from *Nepeta gloecephala*, inhibits ILK phosphorylation and downstream PKB/AKT signaling in HeLa cells, *Canc. Gene Ther.*, 24(1), 28-32. <https://doi.org/10.1038/cgt.2016.75>
- Ashrafi, B., Rashidipour, M., Gholami, E., Sattari, E., Marzban, A., Kheirandish, F., Khaksarian, M., Taherikalani, M., & Soroush, S. (2020). Investigation of the phytochemicals and bioactivity potential of essential oil from *Nepeta curvidens* Boiss. & Balansa, *South African Journal of Botany*, 135, 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.015>
- Azizian, T., Alirezalu, A., Hassani, A., Bahadori, S. & Sonboli, A. (2021). Phytochemical analysis of selected *Nepeta* species by HPLC-ESI-MS/MS and GC-MS methods and exploring their antioxidant and antifungal potentials. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 2417-2429. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00819-8>
- Chen, W. Q., Xu, B., Mao, J. W., Wei, F. X., Li, M., Liu, T., Jin, X. B., & Zhang, L.R. (2014). Inhibitory effects of α -pinene on hepatoma carcinoma cell proliferation, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 15(7), 3293-3297. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.7.3293>
- Chen, W., Liu, Y., Li, M., Mao, J., Zhang, L., Huang, R., Jin, X., & Ye, L. (2015). Anti tumor effect of α -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest, *J. Pharmacol. Sci.*, 127(3), 332-338. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.01.008>
- Dar, B. A., Lone, A. M., & Qurishi, M. A. (2014). Cytotoxic activity and GC-MS analysis of the constituents of essential oil of *Nepeta govaniana* (Wall.ex Benth) from Jammu and Kashmir, *India, Int. J. Herbal Med.*, 2(2), 58-60.
- Delshad, A.A., Naseri, M., Parvizi, M., Fattah, N. & Sharayeli, M. (2011). The Iranian traditional herbal medicine ostokhodus can prevent axotomy-induced apoptosis in spinal motoneurons in neonate rats, *J. Med. Plant. Res.*, 5(18), 4446-4451.
- Delshad, A. A. & Parvizi, M. (2014). The Neuroprotective Effect of *Nepeta menthoides* on Axotomized Dorsal Root Ganglion Sensory Neurons in Neonate Rats, *Journal of Basic Clinical Pathophysiology*, 2(2), 13-20.
- Dirmenci, T., *Nepeta cadmea* Boiss. ile *Nepeta sulfuriflora* P.h. Davis türlerinin morfolojik olarak karşılaştırılması (2003) BAÜ Fen Bil. Enst. Dergisi, 5 (2), 38-46.

- Emami, S. A., Asili, J., Nia, S. H., Yazdian-Robati, R., Sahranavard, M., & Tayarani-Najaran, Z. (2016). Growth Inhibition and Apoptosis Induction of Essential Oils and Extracts of *Nepeta cataria* L. on Human Prostatic and Breast Cancer Cell Lines, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 17, 125-130. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.S3.125>
- Formisano, C., Rigano, D. & Senatore, F. (2011). Chemical constituents and biological activities of *Nepeta* species, *Chem. Biodiver.*, 8, 1783-1818.
- Goldansaz, S. M., Festa, C., Pagano, E., De Marino, S., Finamore, C., Parisi, O. A., Borrelli, F., Sonboli, A. & D'Auria, M. V. (2019). Phytochemical and Biological Studies of *Nepeta asterotricha* Rech. f. (Lamiaceae): Isolation of Nepetamoside. *Molecules*, 24(9), 1-12. <https://doi.org/10.3390/molecules24091684>
- Han, Z., Zhu, S., Han, X., Wang, Z., Wu, S., & Zheng, R. (2015). Baicalein inhibits hepatocellular carcinoma cells through suppressing the expression of CD24, *International Immunopharmacology*, 29(2), 416-22.
- Hassan, S. B., Gali-Muhtasib, H., Göransson, H., & Larsson, R. (2010). Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF- κ B signalling, *Anticancer Res.*, 30(6), 1911-1919.
- Kahkeshani, N., Razzaghirad, Y., Ostad, S. N., Hadjiakhoondi, A., Ardekani M. R. S., Hajimehdipoor, H., Attar, H., Samadi, M., Jovel, E., & Khanavi M. (2014). Cytotoxic, acetylcholinesterase inhibitor and antioxidant activity of *Nepeta menthoides* Boiss & Buhse essential oil, *J. Essent. Oil Bear Plants.*, 17(4), 544-552. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.929040>
- Kaska, A., Çiçek, M. & Mammadov, R. (2019). Biological activities, phenolic constituents and mineral element analysis of two endemic medicinal plants from Turkey: *Nepeta italica* subsp. *cadmea* and *Teucrium sandrasicum*, *South African Journal of Botany*, 124, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.04.037>
- Kladniew, B. R., Polo, M., Villegas, S. M., Galle, M., Crespo, R. & de Bravo, M. G. (2014). Synergistic antiproliferative and anticholesterogenic effects of linalool, 1,8-cineole, and simvastatin on human cell lines, *Chem. Biol. Interact.*, 214, 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.02.013>
- Kumar, R. M. R., Boro, A. & Fuchs, B. (2016). Involvement and Clinical Aspects of MicroRNA in Osteosarcoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 877.
- Murata, S., Shiragami, R., Kosugi, C., Tezuka, T., Yamazaki, M., Hirano, A., Yoshimura, Y., Suzuki, M., Shuto, K., Ohkohchi, N. & Koda, K. (2013). Antitumor effect of 1,8-cineole against colon cancer, *Oncol. Rep.*, 30(6), 2647-2652. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2763>
- Rigano, D., Arnold, N. A., Conforti, F., Menichini, F., Formisano, C., Piozzi, F. & Senatore, F. (2011). Characterisation of the essential oil of *Nepeta glomerata* Montbret et Aucher ex Benth from Lebanon and its biological activities *Nat. Prod. Res.*, 25(6), 614-626. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.488623>
- Sarikurkcü, C., Eskici, M., Karanfil, A. & Tepe, B. (2019). Phenolic profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of two endemic *Nepeta* species: *Nepeta nuda* subsp. *glandulifera* and *N. cadmea*, *South African Journal of Botany*, 120, 298-301. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.09.008>

- Shakeri, A., Khakdan, F., Soheili, V., Sahebkar, A., Rassam, G., & Asili, J. (2014). Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepeta ucrainica* L. spp. *kopetdaghensis*, *Ind. Crop. Prod.*, *58*, 315-321. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.04.009>
- Shakeri, A., Khakdan, F., Soheili, V., Sahebkar, A., Shaddel, R., & Asili, J. (2016). Volatile composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant evaluation of the essential oil from *Nepeta sintenisii* Bornm, *Ind. Crop. Prod.*, *84*, 224-229.
- Sharifi-Rad, M., Epifano, F., Fiorito, S. & Alvarez-Suarez, J. M. (2020). Phytochemical analysis and biological investigation of *Nepeta juncea* Benth. Different Extracts, *Plants*, *9*(5), 646. <https://doi.org/10.3390/plants9050646>
- Sharma, A. & Cannoo, D. S. (2013). Phytochemical composition of essential oils isolated from different species of genus *Nepeta* of Labiatae family: A Review, *Pharmacophore*, *4*(6), 181-211.
- Sharma, A., Cooper, R., Bhardwaj, G. & Cannoo, D. S. (2021). The genus *Nepeta*: Traditional uses, phytochemicals and pharmacological properties. *Journal of Ethnopharmacology*, *268* (113679), 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113679>
- Sitarek, P., Merez-Sadowska, A., Sliwinski, T., Zajdel, R. & Kowalczyk, T. (2020). An In Vitro Evaluation of the Molecular Mechanisms of Action of Medical Plants from the Lamiaceae Family as Effective Sources of Active Compounds against Human Cancer Cell Lines. *Cancers*, *12*(2957), 1-47. <https://doi.org/10.3390/cancers12102957>
- Süntar, I., Nabavi, S. M., Barreca, D., Fischer, N. & Efferth, T. (2018). Pharmacological and chemical features of *Nepeta* L. genus: Its importance as a therapeutic agent, *Phytotherapy Research*, *32*, 185-198. <https://doi.org/10.1002/ptr.5946>
- Suschke, U., Sporer, F., Schneele, J., Geiss, H. K., & Reichling, J. (2007). Antibacterial and cytotoxic activity of *Nepeta cataria* L., *N. cataria* var. *citriodora* (Beck.) Balb. and *Melissa officinalis* L. Essential Oils, *Nat. Prod. Commun.*, *2*(12), 1277-1286.
- Tsuruoka, T., Bekh-Ochir, D., Kato, F., Sanduin, S., Shataryn, A., Ayurzana, A., Satou, T., Li, W., & Koike, K. (2012). The essential oil of Mongolian *Nepeta sibirica*: a single component and its biological activities, *J. Essent. Oil. Res.*, *24*(6), 555-559. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.729925>
- Wu, Z. L., Yin, Z. Q., Du, Y. H., Feng, R. Z., Ye, K. C., Wei, Q., Hu, Y., He, L., Liao, L., & Wang, Y. (2014). γ -terpineol inhibits cell growth and induces apoptosis in human liver cancer BEL-7402 cells *in vitro*, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, *7*(10), 6524-6533.
- Yılmaz, G., Öztürk, G., Çiçek, M. & Demirci, B. (2020). Phytochemical Characterization and Biological Activities of *Nepeta cadmea* Boiss, *Int. J. Sec. Metabolite*, *7*(1), 28-34. <https://doi.org/10.21448/ijsm.675128>

Ek-2. Etik Kurul Onayı 1

Evrak Tarih ve Sayısı: 09/09/2019-E.61212



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı :60758568-020/61212
Konu :Başvurumuz hk.

09/09/2019

Sayın Doç. Dr. Nazan KESKİN

İlgi :01.08.2019 tarihli dilekçeniz.

"*Nepeta italica subsp. Cadmea* Ekstraktının Dondurulmuş-Çözdürülmüş Tavşan Spermeleri Üzerine Etkisinin Araştırılması" konulu PAUHADYEK-2019/28 no'lu çalışmamız 22.08.2019 tarih ve 2019/06 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın yapılmasının Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna ve 6 adet Tavşan kullanılarak yapılmasına oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Funda Fatma BÖLÜKBAŞI HATİP
Başkan

Ek-3. Etik Kurul Onayı 2

Evrak Tarih ve Sayısı: 30.11.2021-E.133067



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı : E-60758568-020-133067
Konu : Başvurunuz Hk.

Sayın Doç. Dr. Nazan KESKİN

İlgi : 12/10/2021 tarihli dilekçeniz. *31.206.229.100*
437

30.11.2021
"Nepeta italica subsp. cadmea Ekstraktının Dondurulmuş-Çözdürülmüş Tavşan Spermleri Üzerine Etkisinin Araştırılması" (PAUHDEK-2021/01) konulu çalışmanızda istenilen değişiklik talebiniz 09.11.2021 tarih ve 2021/08 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, çalışmanın adının "*Nepeta italica subsp. cadmea Ekstraktının Dondurulmuş-Çözdürülmüş Teke Spermleri Üzerine Etkisinin Araştırılması*" olarak değiştirilmesinin Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna ve Dondurulmuş-Çözdürülmüş Teke Spermleri kullanılarak yapılmasına oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Gülçin METE
Başkan

Ek-4. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü
araştırma izinleri



T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü

GIDA KÖRÜ
KORUMA KANUNU

Sayı : 21264211-288.04-E.1884477
Konu : Araştırma İzinleri (Nazan KESKİN)

09.07.2020

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nazan KESKİN tarafından yürütüleceği ifade edilen "**Nepeta italica subsp. cadmea ekstraktının dondurulmuş-çözdürülmüş tavşan spermeleri üzerine etkisinin araştırılması**" isimli proje çalışması kapsamında ekte yer alan araştırmacı personelin yürütmesi planlanan arazi çalışmaları ile ilgili Bilimsel Araştırma İzin Başvurusu Genel Müdürlüğümüz yetki ve sorumlulukları çerçevesinde incelenmiş olup, buna göre;

- Çalışmaların sahada bulunan flora, fauna, doğal ve kültürel değerlerin yanı sıra ekosistem bütünlüğüne de zarar vermeyecek şekilde yapılması ve böyle bir tahribatın ön görülmesi durumunda çalışmanın kesinlikle durdurulması,
- Söz konusu alanların özelliklerinin kaybolmamasına özen gösterilerek yaban hayatının tahrip edilmemesi,
- Söz konusu çalışmaların 2873 Sayılı Milli Parklar Kanunu kapsamında yer alan sınırlar dahilinde kalması nedeniyle çalışmanın süreç ve sonucu hakkında mutlak suretle ilgili Milli Park Müdürlüklerine bilgi verilmesi ve bu alanlarda gerçekleştirilecek olan çalışmalarda ilgili Milli Park Müdürlüğünün talimatları doğrultusunda hareket edilmesi,
- Arazi çalışmalarının 2873 Sayılı Milli Parklar Kanunu kapsamında yer alan sınırlar dahilinde kalması nedeniyle bu kısımlarda çalışma yapılırken Bölge Müdürlüğümüzden bir mühimdar eşliğinde araziye çıkılmasının sağlanması,
- Araştırma sırasında elde edilen fotoğraf, video vb. dijital verinin kurumumuzun ayrı bir izni olmaksızın medya vb. organlarda yayımlanmaması, bilimsel maksatlar haricinde yayın yapılmaması,
- Arazi çalışmalarının yapılacağı yerin il merkezlerinde Valiliğe, ilçelerde ise Kaymakamlığa bilgi verilmesi,
- Çalışmalar kapsamında doğadan toplanması hedeflenen tür olan **Honaz Pisikotu**'nun **endemik** ve IUCN'e göre CR kategorisinde olması nedeniyle; toplama yapılacak her popülasyondan **en fazla %5** oranında ve toplamda **en fazla 150 adet** toplama yapılması,
- Çalışmalar kapsamında yurt dışına genetik materyal ihtiva eden herhangi bir materyalin gönderilmemesi ve toplanan örneklerin kesinlikle ticarete konu edilmemesi,
- Araştırma ara ve sonuç raporunun basılı ve dijital ortamda birer kopyasının Genel Müdürlüğümüze ve ilgili Bölge Müdürlüklerine gönderilmesi,



T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIğI
Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel M¼d¼rl¼ę¼

GIDANI KÖRÜ
SOPRANA SAHP ÖZ

Sayı : 21264211-288.04-E.1884477
Konu : Araştırma İzinleri (Nazan KESKİN)

09.07.2020

şartıyla bahse konu çalışmaların yapılması Genel M¼d¼rl¼ę¼m¼zce uygun g¼r¼lm¼řt¼r.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-İmzalıdır

Hasan KANCA
Bakan a.
Genel M¼d¼r Yardımcısı

Ek : Rapor Genel Tanım Bilgileri (2 sayfa)