



**KOÇ SPERMASININ DONDURULMASI
ÜZERİNE ARBUTİN'İN ETKİSİ**

Büşra YALOVA SOYLU
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Doç. Dr. Deniz YENİ
Tez No: 2023-012
Afyonkarahisar

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME ve SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

KOÇ SPERMASININ DONDURULMASI ÜZERİNE
ARBUTİN'İN ETKİSİ

Vet. Hek. Büşra YALOVA SOYLU

Doç. Dr. Deniz YENİ

Tez No: 2023-012

AFYONKARAHİSAR

**Bu Tez Çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 21.SAĞ.BİL.20**

T.C.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

ENSTİTÜ ONAYI

Öğrencinin	Adı- Soyadı	Büşra YALOVA SOYLU
	Numarası	203324002
	Anabilim Dalı	Dölerme ve Suni Tohumlama
	Programı	Veteriner Dölerme ve Suni Tohumlama
	Program Düzeyi	☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora
Tezin Başlığı		Koç Spermasının Dondurulması Üzerine Arbutin'in Etkisi
Tez Savunma Sınav Tarihi		09.06.2023
Tez Savunma Sınav Saati		11:00

Yukarıda bilgileri verilen öğrenciye ait tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

e-imzalıdır

Prof. Dr. Esmâ KOZAN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı **beyan ederim.**

.../.../2023

Büşra YALOVA SOYLU

ÖZET

KOÇ SPERMASININ DONDURULMASI ÜZERİNE

ARBUTİN'İN ETKİSİ

Sunulan bu çalışma, dondurma çözündürme sonrası sperma sulandırıcısına ilave edilen bir antioksidan olan arbutinin spermatolojik, CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), oksidatif stres parametreleri ve DNA hasarı üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Afyonkarahisar koşullarında yetiştirilen Sönmez ırkına ait toplam 3 baş koçtan alınan spermalar birleştirilip 5 eşit hacme bölünerek kontrol başta olmak üzere farklı miktarlarda arbutin içeren Tris bazlı sulandırıcılar ile sulandırıldı. Sulandırılan örnekler 0,25 ml'lik payetlerde 5 °C'de 3 saat ekilibrasyona tabi tutulduktan sonra sıvı azot buharında donduruldu. Daha sonra sperma örnekleri inceleme gününe kadar sıvı azot tankında (-196°C) depolandı.

Çözdürülen spermalarda subjektif motilite ve CASA motilitesi açısından 2,5 mM arbutin içeren grup hem kontrol hem de diğer gruplara göre belirgin bir üstünlük sağladığı gözlenmiştir. VAP, VSL, VCL, ALH ve BCF parametreleri açısından en yüksek değerler 10 mM arbutin içeren grupta tespit edildi. Anormal spermatozoon orta kısım anomalilerinde ise 7,5 mM ve 10 mM'lık gruplardaki azalmanın diğer gruplar ve kontrol grubuna göre önemli ($p<0,05$) olduğu belirlendi. Kuyruk anomalilerine bakıldığında en düşük değer 2,5 mM'lık grupta bulundu ve 10 mM'lık grupla arasındaki farkın önemli ($p<0,05$) olduğu belirlendi. Spermatozoon HE test parametrelerinden en düşük membran bütünlüğü ve canlılığın (H+,E-) kontrol grubunda olduğu en yüksek değer 7,5 mM'lık grupta olduğu ve aralarındaki farkın istatistiki olarak ($p<0,05$) önemli olduğu belirlendi. DNA hasarı 2,5; 5; 7,5 mM'lık gruplarda elde edilen değerler kontrol grubuna göre istatistiki olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Oksidatif stres parametrelerinden MDA'nın 2,5 ve 5 mM'lık gruplarda belirlenen değerler 10 mM'lık gruba göre istatistiki olarak önemli ($p<0,05$) derecede düşük bulunmuştur. GSH parametresinde ise 10 mM'lık grupta belirlenen değer kontrol ve diğer gruplara göre istatistiki olarak farklı ($p<0,05$) bulunmuştur. Total antioksidan düzeyinde elde ettiğimiz en yüksek değer ile 7,5 ve 10 mM'lık grup ile aralarındaki fark ($p<0,05$) önemlidir. Total oksidan düzeyi ve oksidatif stres indeksi yönünden 10 mM'lık grubun kontrol ve diğer gruplar ile arasındaki farkın istatistiki olarak önemli ($p<0,05$) bulunduğu tespit edildi.

Sonuç olarak koç spermasının dondurulmasında antioksidan olarak kullanılan arbutinin motilite, CASA parametreleri, anormal spermatozoon oranı, membran bütünlüğü, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerinde olumlu etkiler yarattığı anlaşılmış, ancak etkisinin daha geniş hayvan materyali kullanılarak dölverimi sonuçları ile birlikte değerlendirilmesinin yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, arbutin, koç, kriyoprezervasyon, sperma

SUMMARY

THE EFFECT OF ARBUTIN ON THE CRYOPRESERVATION OF RAM SPERM

This study was conducted to determine the effects of arbutin, an antioxidant added to the sperm diluent after thawing, on spermological parameters, Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA), oxidative stress parameters, and DNA damage. Sperm samples were collected from a total of 3 male goats of the Sönmez breed raised under Afyonkarahisar conditions. The samples were pooled and divided into 5 equal volumes, which were then diluted with Tris-based extenders containing different amounts of arbutin, including the control group. The diluted samples were subjected to equilibration at 5 °C for 3 hours in 0.25 ml straws before being frozen in liquid nitrogen vapor. Subsequently, the sperm samples were stored in a liquid nitrogen tank (-196°C) until the day of analysis.

In terms of subjective motility and CASA motility, the group containing 2,5 mM arbutin in the thawed sperm showed a significant superiority compared to both the control group and the other groups. The parameters VAP, VSL, VCL, ALH, and BCF exhibited the highest values in the group containing 10 mM arbutin. Regarding the midpiece abnormalities of the spermatozoa, a significant decrease was observed in the 7,5 mM and 10 mM groups compared to the other groups and the control group ($p<0.05$). When looking at tail abnormalities, the lowest value was found in the 2,5 mM group, and the difference between this group and the 10 mM group was significant ($p<0.05$). Among the HE test parameters of the spermatozoa, the lowest membrane integrity and viability (H+, E-) were observed in the control group, while the highest value was found in the 7,5 mM group, and the difference between them was statistically significant ($p<0.05$). The values obtained for DNA damage in the groups containing 2,5; 5, and 7,5 mM arbutin were statistically significant ($p<0.05$) compared to the control group. Among the oxidative stress parameters, the values of MDA (malondialdehyde) in the 2,5 and 5 mM groups were significantly lower ($p<0.05$) compared to the 10 mM group. In the GSH (glutathione) parameter, the value obtained in the 10 mM group was statistically different ($p<0.05$) from the control and other groups. The highest value obtained in the total antioxidant level showed a significant difference ($p<0.05$) with the 7,5 and 10 mM groups. In terms of total oxidant level and oxidative stress index, a statistically significant difference ($p<0.05$) was observed between the 10 mM group and the control and other groups.

In conclusion, it has been observed that arbutin, used as an antioxidant in the freezing of goat sperm, has positive effects on motility, CASA parameters, abnormal spermatozoa rate, membrane integrity, oxidative stress, and DNA damage. However, it is deemed beneficial to evaluate its effects along with fertility results using a wider range of animal samples.

Keywords: Antioxidant, arbutin, ram, cryopreservation, sperm

ÖNSÖZ

“Koç Spermasının Dondurulması Üzerine Arbutin’in Etkisi” adlı bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı Programı’nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve birikimleri ile destek olan, bana yol gösteren ve yanımda olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Deniz YENİ’ye her daim desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Fatih AVDATEK hocama, tez çalışmam boyunca bana yardımcı olan Arş. Grv. Murat KIRIKKULAK’a teşekkür ederim.

İstatistik analizlerinde bana yardımcı olan Doç. Dr. Şükrü GÜNGÖR’e, oksidatif stres analizlerindeki katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Barış DENK’e, CASA analizlerinin gerçekleştirilmesindeki desteklerinden dolayı 19 Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Mesut ÇEVİK, Doç. Dr. Murat SELÇUK, Dr. Öğr. Üyesi Eser AKAL ve özellikle analizlerin yapımında yoğun emekleri olan Arş. Grv. Dr. Burcu ESİN ve Arş. Grv. Cumali Kaya’ya, tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde 21.SAĞ.BİL.20 no’lu proje olarak destekleyen AKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Birimi’ne teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, doğru yolu gösteren, etik ve ahlaki değerleri bana öğreten, maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiren sevgili annem Sema YALOVA ve babam Levent YALOVA’ya, aramızda 1143 kilometre olsada desteğini her zaman kalbimin tam ortasında hissettiğim ablam Nur YALOVA YANIK’a, her zaman yanımda olan, beni motive eden, destekleyen ve çalışmam süresince çeşitli fedakârlıklar yapan sevgili eşim Mustafa SOYLU’ya teşekkür ederim.

Büşra YALOVA SOYLU

Afyonkarahisar

2023

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	3
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ	4
ÖZET	i
SUMMARY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER.....	ix
RESİMLER.....	x
1.GİRİŞ.....	1
1.2. Spermanın Alınması	6
1.2.1. Suni Vajen Yöntemi	6
1.2.2. Elektroejakülatör Yöntemi	7
1.3. Spermanın Dondurulması	7
1.4. Sulandırıcılar.....	8
1.5. Antioksidanlar ve Reaktif Oksijen Türleri	9
1.6. Hidrokinonlar ve Arbutin	13
1.7. Motilite	17
1.8. HE-Test	19
1.9. Anormal Spermatozoon Oranı	19
1.10. DNA Hasarı	20
1.11. Oksidatif Stres Parametreleri.....	20
2. MATERYAL ve METOT	22
2.1.Araştırmada Kullanılan Hayvan Materyali, Bakım ve Beslenmesi	22
2.2.Spermanın Toplanması	22
2.3. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması	22
2.4. Spermatolojik Değerlendirilme Parametreleri	24
2.4.1. Subjektif ve CASA Motilite Değerlendirmeleri.....	24

2.4.2. Anormal Spermatozoon Oranı.....	24
2.4.3.Hipo-Osmotik Eosin (HE) Test Analizi.....	25
2.4.4 CASA diğer gereç ve yöntem Word dosyasında	24
2.5. DNA Hasarının Tespit Edilmesi	27
2.5.1.Spermanın Yıkanması ve Hazırlaması.....	28
2.5.2. Lizis.....	28
2.5.3. Slaytların Elektroforezi	29
2.5.4. Nötralizasyon ve Boyama	29
2.5.5. Slaytların Değerlendirilmesi.....	29
2.6. Oksidatif Stres Analizleri.....	29
2.7 İstatistiksel Analiz.....	31
3.BULGULAR	32
3.1. Dondurma-Çözdürme Sonrası Spermatolojik Parametreler	32
3.2. Dondurma-Çözdürme Sonrası Anormal Spermatozoon Oranları	34
3.3. Dondurma-Çözdürme Sonrası HE-Test Parametreleri	35
3.4. Dondurma-Çözdürme Sonrası DNA Hasarları	35
3.5. Dondurma-Çözdürme Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri.....	36
4. TARTIŞMA.....	38
5.SONUÇ	47
6. KAYNAKLAR.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%: Yüzde

~: Yaklaşık

<: Küçüktür

>: Büyüktür

±: Artı eksi

°C: Santigrat derece

µl: Mikrolitre

ALH: Başın Lateral Yerdeğiştirme Amplitüdü

ANOVA: Analysis of Variance (ANOVA)

AQP: Aquaporin

AU: Arbitrary Unit

BCF: Çapraz Kesişme Frekansı

BHT: Bütil Hidroksi Toluen

Ca⁺²: Kalsiyum iyonu

CASA: Bigisayar destekli sperma analiz cihazı

CAT: Katalaz

Cm: Santimetre

COMET: Tek hücre jel elektroforez yöntemi

dk: Dakika

dL: Desilitre

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

DTT: Dithioerithrol

EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid

g: Gram

GSH: Glutatyon

GSH-Px: glutasyon peroksidaz

H₂O: Su

HCl: Hidrojen klorür

HE: Hipo osmotik Eozin boya

HOS: Hipo osmotik şişme

Hz: Hertz

IU: International unit

Kg: Kilogram

KH₂PO₄: Potasyum dihidrojen fosfat

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

LIN: Linearite

LMA: Low melting agar

LPO: Lipit peroksidasyonu

M: Molar

mA: Miliamper

MDA: Malondialdehit

Mg: Miligram

Mg⁺²: Magnezyum iyonu

mL: Mililitre

mM: milimolar

mOsm: miliOsmol

Na₂-EDTA: Disodyum EDTA

Na₂HPO₄: Disodyum fosfat

NaCl: Sodyum klorür

NaOH: Sodyum hidroksit

nm: Nanometre

nmol: Nanomol

p: Anlamlılık (önemlilik) testine ilişkin olasılık değeri

PBS: Phosphate Buffered Saline

pH: Potansiyel hidrojen

PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri

ROS: Reaktif oksijen türleri

SCGE: Single Cell Gel Electrophoresis

Sn: Saniye

SOD: Süperoksit dismutaz

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

STR: Doğrusallık

t –BHP: tert -butil hidroperoksit

TBA: thiobarbituric asitin

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

V: Volt

VAP: Ortalama Rota Hızı

VCL: Eğri Çizgi Hızı

VSL: Düz Çizgi Hızı

α : Alfa

β : beta

tBHQ: tert-bütıl hidrokinon

TPP+: tetrafenilfosfonyum

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1: Spermanın sulandırılmasında kullanılacak grupların içerikleri	23
Çizelge 2.2: HE test parametreleri.....	26
Çizelge 3.1: Dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik parametreler	32
Çizelge 3.2: Dondurma-çözdürme sonrası anormal spermatozoon oranları.....	34
Çizelge 3.3: Dondurma-çözdürme sonrası HE-test parametreleri.	35
Çizelge 3.4: Dondurma-çözdürme sonrası DNA Hasarları	36
Çizelge 3.5: Dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametreleri.....	37



ŞEKİLLER

Şekil 1.1: Hayvanlardaki spermatozoon kriyohasarlarnı önlemek için ana stratejiler	12
Şekil 1.2: Arbutinin yapısı.	15
Şekil 1.3: Hidrokinonun arbutine biyotransformasyonu.....	15
Şekil 1.4: Arbutin biyogenezinde öncü maddeler olarak tirozin ve 4-hidroksibenzoik asit	16
Şekil 1.5: Spermatozoonların kinetik hareketleri.....	18
Şekil 2.1: Eosin boyasının hazırlanışı	25
Şekil 2.2: HOS Test Solüsyonunun hazırlanışı	26

RESİMLER

Resim 1.1: Doğal ve sentetik arbutin kaynaklarının türleri.....	14
Resim 2.1: Baş, orta ve kuyruk kısmına ait anomaliler	25
Resim 2.2: Spermatozoonlarda HE-testinde gözlenen şişme ve kıvrılmalar	27



1.GİRİŞ

Koyunlar (*Ovis aries*) Ruminantia alt takımındaki Bovidae familyasına dâhildir. İlk evcilleştirilen hayvanlar arasında olan koyunların etinden, sütünden ve yününden faydalanılmaktadır. Verimleri ve besleme avantajları bakımından yurdumuz hayvancılığı için kritik bir öneme sahiptir (Uluyol, 2018). TÜİK verilerine göre ülkemizde küçükbaş hayvan sayısı 2022'de bir önceki yıla göre yüzde 2,2 azalarak 56 milyon 266 bin olarak geriledi. Koyun sayısı ise bu dönemde yüzde 1,1 gerileyerek 44 milyon 688 bin, keçi sayısı ise yüzde 6,2 gerileyerek 11 milyon 578 bin baş olarak bildirilmiştir (TÜİK Hayvansal Üretim İstatistikleri 2022). Ülkemizdeki koyun popülasyonunun hayvancılık sektöründe kritik bir yerde olması, yeterli verime sahip olmayanların ıslah edilmesini ve verimlerinin yükseltilmesini mecbur kılmıştır. Bunu yapmanın en önemli yolu, yüksek verim özelliklerine sahip ve sağlık durumları iyi olan erkek hayvanların spermalarını sulandırarak sperma miktarını artırmak, bu uygulama ile bir erkek hayvandan suni tohumlama yapılacak dişi hayvan sayısını arttırmaktır. Bu alanda ki en uygulanabilir protokol koç spermasının dondurularak saklanması ve suni tohumlama uygulamalarında kullanılmasıdır. Bu protokolün uygulanabilmesi ise koç spermasının düzgün bir şekilde dondurulmasına, suni tohumlama uygulamasında kullanıldıktan sonra döl veriminde ortaya çıkan problemlerin ortadan kaldırılmasına bağlıdır (Lv vd., 2019; Yavaş, 2008; Vozaf vd.,2022).

Kriyobiyojoloji, multidisipliner bir bilim dalıdır ve canlı materyallerin (hücreler, dokular vb.) düşük sıcaklıklardaki fiziksel ve biyolojik davranışlarını inceler. Bu disiplin, hücresel biyoloji, teriogenoloji, moleküler biyoloji, mühendislik, matematik, veteriner hekimlik, beşerî hekimlik ve karada ve sulu ortamlarda yoğun ve kapsamlı tarım gibi birçok alana yayılır. Spermatozoon hücrelerinin kriyoprezervasyon prosedürlerinin optimizasyonu, spermatozoon hücresinin karmaşık hücresel yapısı, aktivasyon ve kapasitasyon mekanizmaları nedeniyle yukarıdaki tüm disiplinleri içerir (Öztürk vd., 2019).

Suni tohumlama, fertilitayı ve yüksek genetik özellikleri geliştirmek için yararlı bir araçtır. Bu anlamda, sperma kriyoprezervasyonu, suni tohumlamada kullanılacak olan spermayı optimize etmek için önemli bir yaklaşımdır. Kriyoprezervasyon koyun türleri

de dâhil olmak üzere pek çok hayvan türünde genetik çeşitliliği korumak için değerli spermaların uzun yıllar korunmasına olanak tanır. Ayrıca, sperma kriyoprezervasyonu spermaların farklı tohumlama merkezlerine, çiftliklere veya diğer ülkelere nakliyesini kolaylaştırır (Palacin-Martinez vd.,2022). Sulandırıcılar, seyreltme-soğutma-dondurma ve çözündürme tekniklerinin tümü, koç sperması kriyoprezervasyonunun başarısında rol oynar (Saha vd., 2022). Kriyoprezervasyon, fertilizasyon için spermanın kullanılabilirliğini artırır; ancak, dondurulmuş-çözdürülmüş spermanın fertilizasyon potansiyeli, spermatozoon hücresinin yapısı ve fizyolojisindeki değişiklikler nedeniyle tehlikeye girer (Medeiros vd., 2002). Özellikle, küçük ruminantların spermatozoonları, diğer türlerinkine kıyasla kriyoprezervasyona karşı son derece hassastır (Vozaf vd.,2022). Dondurarak saklamanın soğuk şoku, buz kristali oluşması, membran değişiklikleri ve oksidatif stres ile ilişkili olması nedeniyle, taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş sperma arasında spermatozoon kalitesi ve dölleme yeteneği açısından önemli farklılıklar vardır (Tuncer vd., 2010). Bu bağlamda memeli spermasının dondurularak saklanması, tatmin edici sonuçlar elde etmek için birçok faktörün dengelenmesini içeren karmaşık bir süreçtir. Minimum başarıyı bile garantilemek için, sadece uygun sulandırıcı, sperma sulandırma oranı, soğutma hızı ve çözündürülme hızı gerekli değildir, aynı zamanda spermanın çözündürülme sonrası geri kazanımını ve dolayısıyla fertilitenin en üst düzeye çıkarmak için türlere ait sperma fizyolojisine ilişkin karmaşık bir bilgi gereklidir (Purdy, 2006).

Tez çalışmamızda Sönmez tipi koçlar kullanılmıştır. Sönmez tipi koyunlarını elde etmek için Sakız ırkı koç ve Tahirova tipi koyun melezlendikten sonra, elde edilen melez dölleri ikinci aşamada Tahirova koçlarıyla çiftleştirilmektedir. Bu şekilde oluşturulan tip, % 25 Sakız + %75 Tahirova genotipi içermektedir. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Deneme Ağılı ve Beydere Tohum Test Sertifikasyon Müdürlüğü Koyunculuk Şubesi'nde elde edilmiştir (Sönmez vd., 2009). Yapılan ön çalışmalarda kuzularda hızlı gelişme ve kısa sürede yüksek canlı ağırlığa ulaşmasının yanı sıra süt ve döl veriminin fazla oluşu bu tipe olan talebi arttırmaktadır (Kaymakçı ve Taşkın.,2001). Sönmez koyunu Ege Bölgesi'nin kurak ve sıcak koşullarına uyum sağlayabilecek özellikleri içermektedir (Kaymakçı vd., 2002). Kaymakçı vd. (2002) yaptıkları çalışmada Sönmez tipi koyunlarda döl verim özelliklerine ait ortalamaları, Sakız dışında bütün yerli ırklardan, kültür ırklarıyla yapılan melezlerden ve yine Ege

Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nce geliştirilen Tahirova, Acıpayam ve Türkgeldi gibi tiplerden yüksek bulunmuşlardır. Yeni ve Avdatek (2019) yaptıkları çalışmada Sönmez ırkı koyunlarının Merinos ırkı koyunlarına göre sezon dışı intravaginal sünger uygulanmasına gösterdikleri cevabı önemli ölçüde yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmada Sönmez koyun ırkındaki gebelik oranını Merinos koyunlarına göre sırasıyla %73,9 ve %44,82 daha yüksek oranda elde etmişlerdir.

1.1. Spermatozoon Membran Yapısı ve Membranda Meydana Gelen Değişiklikler

Tüm gamet hücreleri, yani oosit ve spermatozoon, çeşitli fosfolipitler ve proteinlerden oluşan sıvı mozaik membran yapısına sahiptir. Hücreleri dış çevreden ayırma, belirli bir şekle sahip olmalarını sağlama ve hücre ile dış çevre arasındaki çeşitli çözeltilerin değişimini kontrol etmek hücre membranının bilinen üç önemli görevidir. Fosfolipitler, glikolipitler, transmembran proteinler, periferik proteinler ve kolesterol ise hücre membranda ki başlıca yapısal bileşendir (Singer ve Nicolson, 1972). Çoğu membranlarda ki baskın lipitler fosfolipitler ve kolesterol iken integral ve periferik proteinler de bulunur. Protein-lipit ilişkileri rastgele değildir ve bir proteinin etrafındaki lipit ortamı, birimin işlevsel özelliklerini etkiler, bu nedenle bazı lipitler integral membran proteinlerinin etrafında öncelikle kümeleşir. İntegral proteinlerin bazıları gözenek veya kanal olarak işlev görürken bazıları diğer moleküller için reseptör olarak işlev görür (Mocé vd., 2010). Tüm memeli hücre tiplerinde, spermatozoon dâhil, plazma membranı çift tabakalı lipit yapısına sahiptir. Bu yapı membranın dışına doğru yönlendirilmiş hidrofilik lipit baş grupları ve membranın içinde hidrofobik yağ aşıl zincirleri ile bir çift tabaka halinde düzenlenmiş lipitler ve proteinlerden oluşur. Bu lipit yapının iki tabakası arasındaki fosfolipit içeriği farklıdır. Fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin iç yaprakta yoğunlaşmışken, sfingomiyelin ve fosfatidilkolin dış yaprakta yoğunlaşmıştır (Peña, vd.,2003; Mocé vd., 2010).

Fizyolojik olarak, spermatozoonlar testisten ovuma olan yolculuklarında erkek ve dişi üreme kanallarını çevreleyen sıvıların osmolalitesinde değişiklikler yaşarlar. Osmolalite farklılıkları için iyon kanallarının yanı sıra, su kanallarının da spermatozoonun

hacminin düzenlemesinde hayati öneme sahip olduğu düşünülmektedir. Somatik hücre aquaporinleri (AQP) hakkındaki derin bilgiler ve çok sayıda çalışmanın aksine, spermatozoon AQP'lerinin anlaşılması belirli bir sınır çerçevesindedir. AQP8 spermatozoon su girişi ve çıkışından sorumludur ve bu, doğal fertilizasyon için gereklidir. AQP7 spermatozoon gliserol metabolizmasında rolü tartışmalıdır ve çıplak kısım hariç tüm spermatozoon kuyruğu boyunca yer alır. AQP11 sadece su geçirgenliğini sağlamada değil, spermiogenezis ve spermiasyon aşamasında gereksiz hale gelen fazla hücresel bileşenlerin yenilenmesi ve geri dönüştürülmesinde de rolü olduğu bilinmektedir. Bu durum, spermatozoon üretiminde etkili bir germinal epitelin bakımı için hayati önem taşıyacaktır (Yeung,2010).

Kriyohasarının önlenmesi için önemli mekanizmalardan biri de, hücre mebranının hidrofobisitesini arttırmaktır. Spermatozoonların kriyohasarının önlenmesine yardımcı olan başka bir mekanizma, kolesterol/fosfolipit oranı tarafından düzenlenen membran akışkanlığının düzenlenmesidir (Cabrita vd.,2010). Kolesterol; membranları stabilize etmek, membran geçirgenliğini azaltmak, morfolojik membran özelliklerini kolaylaştırmak ve hücre-hücre etkileşimlerini sağlamak, membran faz geçişlerini etkilemek, membranla ilişkili proteinler için uygun mikroortamlar (kimyasal ve/veya fiziksel) sağlamak ve bir membran antioksidanı olarak görev yapmak dahil olmak üzere spermatozoon fonksiyonunda birden fazla önemli etkisi vardır. Bu etkilerden biri de düşük sıcaklıklarda membranları stabilize etmektir. Bazı türler (domuz, boğa, koç veya aygır) soğuk şokuna karşı çok duyarlı spermatozoon üretirken, diğerleri (kedi ve köpek) daha az hassastır ve bazıları (tavşan, insan, kümes hayvanları) soğuk şokuna karşı yüksek dirençli spermatozoon üretirler. Farklı türlerden spermatozoonların membran bileşimleri değerlendirildiğinde, genel olarak soğuk şokuna dirençli türlerin spermatozoonları, soğuk şokuna hassasiyeti olan türlerin spermatozoonlarına kıyasla daha yüksek çoklu doymamış yağ asidi düzeyleri ve daha yüksek kolesterol/fosfolipit oranları gösterdiği bildirilmiştir. Bu nedenle, yüksek kolesterol/fosfolipit oranlarına sahip spermatozoon üreten türler, düşük kolesterol/fosfolipit oranlarına sahip spermatozoonlara göre soğuk şokuna karşı daha dirençlidir (Mocé vd., 2010).

Kriyoprezervasyon sırasında, plazma membranı hasara en yatkın yapıdır ve sıklıkla fosfolipit ve kolesterol bileşimindeki değişiklikler olarak ortaya çıkar. Membran organizasyonundaki farklılıklar, lipit-protein etkileşimleri, fosfolipit asimetrisi ve lipit bileşimi hücre membranının geçirgenliğini etkiler. Membran fosfolipitleri kriyoprezervasyon sırasında faz değişimine uğrayarak, hücre osmoregülasyon mekanizmalarını etkileyebilecek şekilde membran bileşenlerinin yeniden dağılımına ve membran proteinlerinin toplanmasına neden olur. Ayrıca, spermatozoonun dondurulabilirliğinin plazma membranlarının fiziko-kimyasal özelliklerine bağlı olduğu bilinmektedir. Bu özellikler arasında, soğuk toleransı ve kriyoprezervasyon ile ilişkili olan membran akışkanlığı gibi özellikler de yer alır. (Mocé vd., 2010). Dondurma ve çözündürme sırasında lipit-protein komplekslerindeki değişiklikler nedeniyle spermatozoon plazma membranı geri dönüşümsüz şekilde etkilenen bir yapıdır. Sıcaklık azaldıkça, fosfolipitlerin konfigürasyonu değişir ve bu bileşikler membran içinde yanal hareket ederken proteinlerin yapışmasına olanak tanır. Bu durum, spermatozoon plazmalemmasının daha sert ve kırılğan hale gelmesine neden olur, çünkü sıvı halden jel hale dönüşür ve plazmalemma geçirgenliği artarken spermatozoon metabolizması azalır (Yáñez-Ortiz vd., 2021).

Plazma membran bütünlüğü, spermatozoonun fertilizasyon yeteneğinin iyi bir göstergesi olup apoptozis seviyesinin belirlenmesi, geleneksel testlere ek olarak spermatozoon kalitesi ve fertilitiyi belirlemede bir diğer gösterge olabilir. Apoptozis, gelişimin normal bir bileşeni olarak ortaya çıkan, programlanmış bir hücre ölümü sürecidir; morfolojik, biyokimyasal ve fiziksel değişiklikler açısından nekrozdan farklılık gösterir. Temel olarak, apoptozis, embriyonik gelişim sırasında ve meme bezleri gibi dönemsel olarak değişen organlarda doğal bir süreç olarak meydana gelen fizyolojik bir hücre ölümüdür. Bu durumda, hücre yapısal bileşenlerini veziküllere dahil ederek sistematik olarak tüm fonksiyonlarını durdurur ve parçalanır (Samali ve Orrenius.,1998; Peña, vd.,2003). Farklı testlerin korelasyonu, spermatozoon apoptozisinin spermatozoon motilitesi ve plazma membran bütünlüğü ile ters orantılı olduğunu göstermiştir (Khan vd., 2009). Kriyobiyojoloji ilgili apoptoz, soğuk kaynaklı apoptoz olarak ortaya çıkmakta olup, uzun süreli saklamanın öldürücü etkisinden ziyade, kriyohasarı veya soğuk şoku hasarı meydana gelmektedir. Bu nedenle apoptozis, hücreler normal fizyolojik aralığın altındaki soğuğa maruz kaldıklarında, dokularda

veya organlarda meydana gelen doğrudan soğuk şokundan veya kronik hipotermiden kaynaklanan hücre ölümünden farklı bir kriyohasar belirtisi gibi görülmektedir. Soğuk hasarının derecesi, soğuk maruziyetinin süresi ve şiddeti ile hücrelerin veya dokuların özelliklerine bağlıdır. Bazı durumlarda, soğuk hasarı hücre ölümüne veya doku hasarına neden olabilirken, diğer durumlarda hücre fonksiyonlarında veya gen ekspresyonunda değişikliklere neden olabilir (Nagle vd.,1990). Genellikle sanılan aksine, dondurma sırasında hücrelerin karşılaştığı zorluk çok düşük sıcaklıklarda depolanmaları değil, hücrenin biri dondurma diğeri de çözündürme esnasında iki kez geçmek zorunda olduğu orta sıcaklık bölgesinin (~ -15 ila -60°C) öldürücülüğüdür. Sıvı nitrojen sıcaklığında (-196°C) ise sıvı sistemlerde herhangi bir termal reaksiyon gerçekleşmez. Bunun bir nedeni, suyun sıvı halinin -130°C 'nin altında var olmamasıdır. Dahası, -196°C 'de kimyasal reaksiyonlar için yeterli termal enerji yoktur. -196°C 'deki donmuş su sistemlerinde gerçekleşebilecek tek reaksiyon, serbest radikallerin ve makromoleküllerdeki kırıkların oluşumu gibi fotofiziksel olaylardır. Kozmik radyasyondan kaynaklanan reaksiyonlar ise -196°C 'de meydana gelebilir. Bir hücre popülasyonunun %63'üne zarar verebilen radyoaktivite dozu 200-400 radyan iken yeryüzü bir yıl içerisinde sadece 0,1 radyan kozmik radyasyonla karşılaşır. Bu ise -196°C 'deki donmuş bir memeli hücresinin 2000-4000 sene boyunca maruz kalacağı radyasyon miktarına eşdeğerdir. Böylece, -196°C 'de 4000 yıl saklanabilecek bir hücrenin biyolojik zamanının durduğu kabul edilebilir bir seviyededir (Mazur,1984).

1.2. Spermanın Alınması

Spermanın toplaması, her ejakülattan mümkün olan en yüksek kalitede maksimum spermatozoon elde etmeyi amaçlar. Sperma, küçük ruminantlarda esas olarak suni vajen veya elektroejakülatör yöntemiyle toplanır (Saha vd., 2022).

1.2.1. Suni Vajen Yöntemi

Suni vajen ile sperma toplama koyunlar için tercih edilen yöntemdir. Suni vajen ile sperma toplama yönteminin kullanımı basittir ve doğal ejakülatla aynı oranda sperma kalitesine sahip ejakülat üretir. Suni vajende ki ılık su termal stimülasyon sağlarken içerisindeki basınç glans penisini mekanik olarak uyarır. Bu prosedürün ana dezavantajı, iyi libidoya sahip ve suni vajen ile önceden ejakülasyon eğitimi verilmiş bir koç gerektirmesidir (Saha vd., 2022).

1.2.2. Elektroejakülatör Yöntemi

Suni vajene alternatif olarak elektroejakülatör yöntemi kullanılabilir. Elektroejakülatör yönteminde bel ve sağrı kısımlarından köken alan ve genital organları innerve eden sinirlerin elektrik akımıyla 15-20 sn aralıklarla 3-5 kısa uyarı (3-8 sn) uygulamak için bir elektrot probu (6-12V) uyarılması ve ampulla ductus deferensin kontraksiyonunun sağlanmasıdır (Saha vd., 2022).

1.3. Spermanın Dondurulması

Sperma kriyoprezervasyonu, sperma bankaları aracılığıyla değerli genetik kaynakların korunması ve geniş alanlara yayılması, spermanın sürekli ticari tedarikinin garantisi ve suni tohumlama yoluyla ırk iyileştirme programlarında işbirliği için özel fırsatlara izin vermiştir. Koç spermasının başarılı bir şekilde dondurularak saklanması üzerine yapılan çalışmalar günümüzde hala devam etmektedir. Çünkü kriyoprezervasyon, esas olarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimindeki artış, dondurma ve çözündürme sürecinde oksidatif metabolizmanın değişmesi nedeniyle spermatozoonun kalitesinde ve canlılığında bir azalmaya ayrıca spermatozoon organellerinde geri dönüşü olmayan hasara ve spermatozoon hareketliliği, canlılığı ve dölleme yeteneğinde bir azalma ile bağlantılı olarak membran akışkanlığı ve enzimatik aktivitede değişikliklere neden olur. Ayrıca koç spermatozoonları, diğer türlere kıyasla düşük hücre içi kolesterol-fosfolipit oranı içerir. Bu sebepten, koç spermatozoonları soğuk şokuna karşı diğer boğa

spermatozoonlarına göre daha duyarlıdırlar (Sarıözkan vd., 2009; Faigl vd., 2012; Saha vd., 2022). (Alevra vd.,2022).

Sperma kriyoprezervasyonunun prensibi, sıvı azot içerisinde (-196°C) donmuş spermatozoon hücrelerinin hücresel metabolik aktivitesini durdurmak ve daha sonra fonksiyonel sağ kalımlarını sağlamak için spermayı çözündürmektir (Saha vd., 2022). Soğutma işlemi yavaş yavaş yapılmalıdır, bu da spermatozoon hücrelerini kurtarmak için yeterlidir. 30°C ila 0°C arasında hızlı soğutma, “soğuk şoku” olarak adlandırılan sperma hasarına neden olur. Spermatozoon hücrelerinin soğuk şokundan korunması için, spermanın ilk seyreltilmesi, sulandırıcılar yavaş yavaş eklenerek, karıştırılarak ve karışımı vücut sıcaklığına yakın tutarak birkaç saat (1,5-2 saat) 5°C 'ye kadar yavaşça yapılır (Saha vd., 2022).

1.4. Sulandırıcılar

Sperma sulandırıcıları, besinleri enerji kaynağı olarak sunabilmeli, hücreleri sıcaklığa bağlı hasarlardan koruyabilmeli, zararlı pH değişimlerini önlemek için bir tampon görevi görebilmeli, bakteriyel gelişmeyi baskılayabilmeli ve depolama sırasında spermatozoon hücrelerini koruyabilmelidir. Sulandırıcı, suda maksimum çözünürlüğe ve diğer tüm çözücülerde minimum çözünürlüğe sahip olmalıdır. Seyreltici bileşimi, spermatozoon kalitesini etkileyen ve spermatozoonun fertilite yeteneğini en uzun süre koruyan temel unsurlardan biridir (Purdy, 2006; Pesch ve Hoffman, 2007; Saha vd.,2022). Sperma pH'ındaki büyük değişiklikler, spermatozoon hasarına, infertiliteye veya spermatozoon ölümlerine neden olabilir. Bu nedenle, spermatozoonun canlılığını ve dölleme kabiliyetini sürdürmek için, kriyoprezervasyon ortamındaki pH dalgalanmalarını kontrol ederek uygun bir ortamı korumak esastır (Purdy, 2006). Hücre içi kristalleşmeyi önlemek için sperma rutin olarak bir sulandırıcı ile seyreltilir (Saha vd., 2022). Koç spermasını seyreltmek ve dondurmak için disakkaritler (laktoz, trehaloz), trisakkaritler (rafinoz), kompleks polisakkaritler (arap zımkı) veya diğer karmaşık bileşikler (polivinilpirrolidon) ayrıca yumurta sarısı ve gliserol bazlı çeşitli dondurma sulandırıcıları kullanılmıştır (Saha vd., 2022). Çözdürme sonrası

spermatozoonun fonksiyonunu (hareketlilik, canlılık ve akrozom bütünlüğü) hücre dışı kriyoprotektan olarak yumurta sarısı başarıyla korurken, gliserol ise en yaygın olarak kullanılan hücre içi kriyoprotektandır. Gliserolde çözündürme sonrası en iyi hayatta kalma oranını sağlayan konsantrasyon %3 ile %7 arasında iken, yumurta sarısında %5 ile %20 arasındadır (Saha vd., 2022).

Kriyoprezervasyon için kullanılan sulandırıcı, spermatozoonu soğutma ve dondurma sırasında kriyojenik yaralanmalardan korumak için kriyoprotektif bir madde içermelidir (Saha vd., 2022). Yumurta sarısı spermayı soğuk şokundan korur, spermatozoonları hareketli tutar, akrozomal enzim kaybını önler ve mitokondriyal membranları sağlam tutar. Yumurta sarısı, fosfolipit konsantrasyonu, yüksek molekül ağırlığı ve düşük yoğunluklu lipoprotein fraksiyonu gibi özellikleri nedeniyle spermanın dondurulmasında sıklıkla kullanılır. Kriyoprezervasyon sırasında, yumurta sarısının lipit bileşeni spermatozoonun plazma membranını ve akrozomunu sıcaklık hasarından korur. Bir spermatozoon-lipoprotein kompleksi oluşturarak, yumurta sarısının fosfolipitleri ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) sperma da oluşacak soğuk şokunu ve dolayısıyla spermadaki kriyohasarı azaltır. Yumurta sarısı sulandırıcıda gliserol ile birlikte kullanıldığında, soğuk şokuna karşı korumayı arttırılabilir (Saha vd., 2022).

Bir tohumlama payetindeki yeterli sayıda spermatozoon ve yeterli sulandırıcı olacak şekilde bir sperma örneğinin uygun şekilde seyreltilmesi önemlidir, böylece en az sayıda tohumlama başına spermatozoon ve en düşük sayıda tohumlama yapılarak yüksek bir fertilite oranı elde edilebilir (Purdy, 2006).

1.5. Antioksidanlar ve Reaktif Oksijen Türleri

Spermatozoonun dondurularak saklama ortamına antioksidanların eklenmesi, spermatozoonu ROS'un motilite, canlılık, enerji üretimi ve DNA bütünlüğüne verdiği zararlara karşı korumak amacıyla yapılmaktadır (Krzyzosiak vd., 2000; Bilodeau vd., 2002). Kriyoprezervasyon işlemi oksidatif stresi ve ROS oluşumunu tetikler. Spermadaki ROS varlığı, bu moleküllerin hücresel üretimi ile antioksidatif bileşikler tarafından yok edilmeleri arasında bir denge olduğunu gösterir. ROS molekülleri, hücre

membranlarının ana bileşenleri olan çoklu doymamış yağ asitlerine (PUFA) saldıracaktır. Koç spermatozoonları hücre membranları 3/1 oranında doymamış yağ asidi ve doymuş yağ asidi bileşimi içerir. Bu büyük miktarlarda doymamış yağ asitleri nedeniyle spermatozoon ROS'un zararlı etkilerine karşı oldukça hassastır. Yüksek konsantrasyonlarda ROS'a maruz kalmak mitokondriyal membranın ve plazma membranının bozulmasına, kromozomal ve DNA parçalanmasına sebep verdiği için spermatozoon motilitesinde ve canlılığında azalmaya yol açar (Amidi vd.,2016; Frau vd., 2020b; Riesco vd., 2021).Bu nedenle ROS düzeylerini azaltmak ve redoks durumunu dengelemek için sperma kriyoprezervasyon protokollerinde antioksidan takviyesi farklı türlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Tuncer vd., 2010; Gunawan vd., 2020; Riesco vd., 2021).

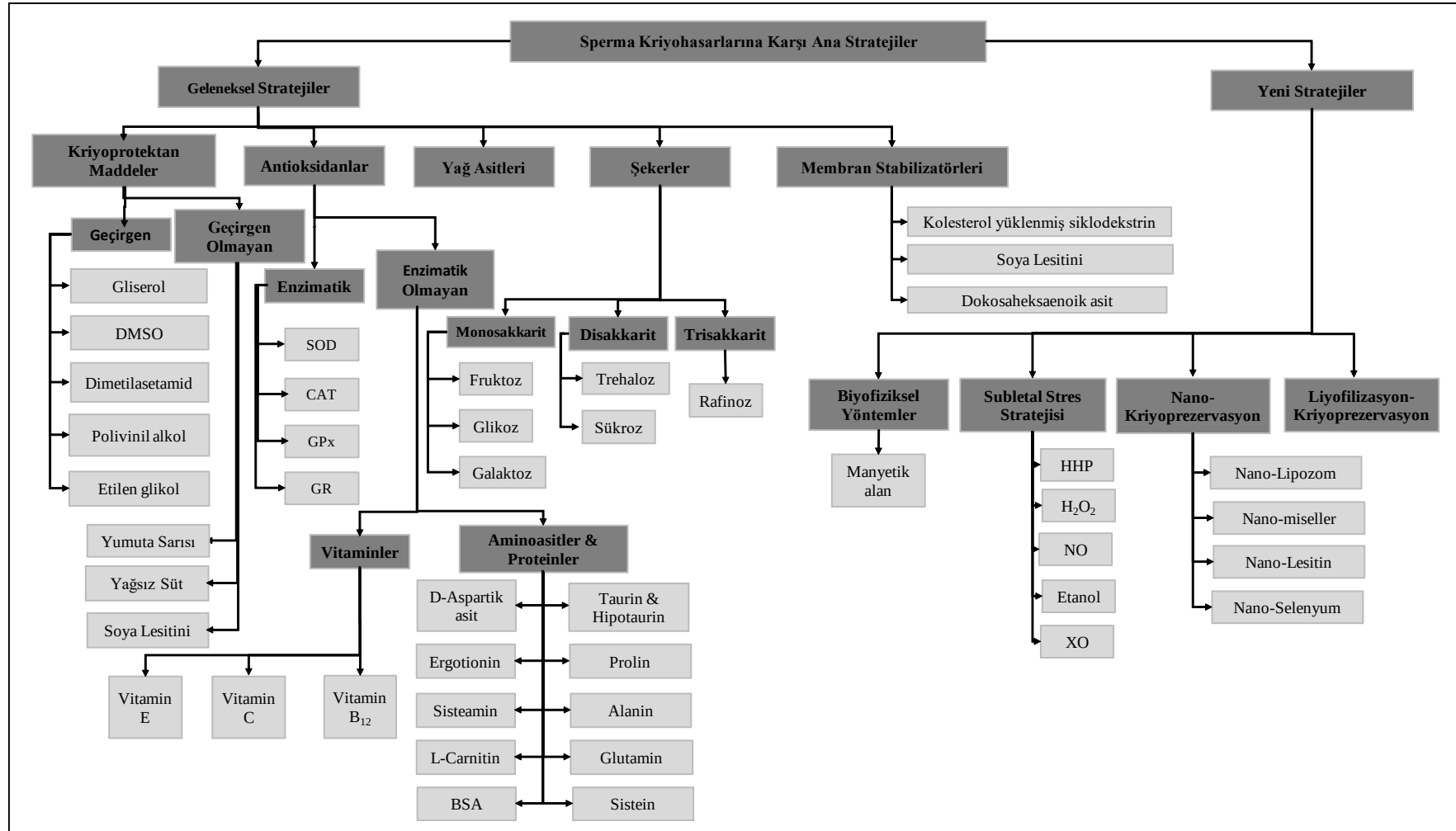
Antioksidanlar, serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif stresle mücadelede ana savunma faktörleridir (Amidi vd., 2016). Antioksidanlar kimyasal yapılarına göre enzimatik ve enzimatik olmayan şeklinde ikiye ayrılırlar. Doğal antioksidanlar olarak da bilinen enzimatik antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz bulunur ve bunların tümü spermatozoonun doğal antioksidan savunma sistemine katılır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise E vitamini (α - tokoferol/trolox), C vitamini (askorbik asit), glutatyon (GSH), ürat, taurin, hipotaurin, ubikinonlar, selenyum ve çinko içerir (Amidi vd., 2016; Hezavehei vd., 2018; Ros-Santaella ve Pintus, 2021). Alfa-tokoferol, lipit radikallerini nötralize eden, E vitaminini en güçlü yağda çözünen antioksidan bileşimidir. Bu nedenle, ROS oluşumunu etkilemeden ROS ve lipit peroksidasyonuna karşı ana membran koruma ajanlarından biridir (Amidi vd., 2016) (Şekil 1.1.).

Kriyoprezervasyon sırasında sıcaklık ve osmotik streslerin spermatozoon üzerindeki en önemli etkilerinden biri DNA hasarıdır. DNA molekülünün kriyoprezervasyon sırasında nasıl hasar gördüğü, karmaşık bir dizi sürecin birleşimi gibi görünmektedir. Kriyoprezervasyon sırasında ROS oluştuğu ve baz oksidasyonu ve zincir kırılması oluşturarak DNA'yı değiştirebileceği bilinmektedir. ROS oluşumunun yanı sıra, buz oluşumu veya osmotik stresin de dondurma/çözdürme sırasında mekanik basınçlar veya apoptotik olaylar yoluyla DNA'yı kırabileceği öne sürülmektedir. DNA parçalanmasından sorumlu mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamış olmasına

rağmen, bu durum artan oksidatif DNA hasarına bağlanmıştır. Ek olarak, DNA duyarlılığı türler arasında, bireyler arasında veya üreme mevsimi boyunca değişkenlik gösterebilir (Cabrita vd., 2010; Tuncer vd., 2010; Sharafi vd., 2022).

Spermatozoon kromatini, nükleoprotein yapısını şekillendiren histonlarla birlikte DNA ve protamin (P1 ve P2) içerir. Protamin dağılımı türler arasında farklıdır; örneğin, boğa, domuz ve koç sadece nükleoprotein yapısında P1 bulundururken fare, at ve insan hem P1 hem de P2 bulundurur. Ek olarak, P1 ve P2 oranları türler arasında farklıdır ve bu oran bu yapıların dondurma-çözdürme işlemlerine karşı direncini etkiler. Sadece P1 gösteren türlere göre hem P1 hem de P2 gösteren türlerde DNA'ya bağlı kriyohasarı daha fazladır. Yüksek DNA hasarı ve düşük mitokondriyal membran potansiyeli, dondurma-çözdürme sonrası motilitede önemli oranda azalmaya neden olur. Dondurmadan sonra meydana gelen mitokondriyal disfonksiyon, ROS oluşumuna neden olabilir. Oksidatif fosforilasyonun kesintiye uğraması ve antioksidan enzimlerin inaktivasyonu muhtemelen mitokondriyal disfonksiyonun ana nedenleridir. Mitokondriyal DNA ve iç ve dış mitokondriyal membranların hasar görmesi mitokondriyal disfonksiyonun diğer nedenleridir. Tüm bu değişiklikler, mitokondriyal membran potansiyelini azaltır ve bu da membran gözenekleri aracılığıyla serbest oksijen radikallerinin salınmasına neden olabilir (Sharafi vd., 2022).

GSH, GSH-Px, katalaz (CAT) ve SOD'dan oluşan antioksidan sistem, spermanın lipid peroksidasyonuna (LPO) karşı bir savunma mekanizması olarak tanımlanmıştır ve spermatozoonun hareketliliğinin ve canlılığının korunmasında önemlidir. Ancak spermatozoonlardaki bu antioksidan kapasitesi, dondurma-çözdürme işlemi sırasında LPO'yu önlemede yetersiz olabilir. Bu bağlamda, memeli spermatozoonları, ROS ve LPO'nun zararlı etkilerine karşı koyan antioksidanlar içeren önemli bir sitoplazmik bileşenden yoksundur (Sarıözkan vd., 2009).



Şekil 1.1: Hayvanlardaki spermatozoon kriyohasarlara karşı önlemek için ana stratejiler (Sharafî vd., 2022'den uyarlanmıştır).

1.6. Hidrokinonlar ve Arbutin

Tirozinazın aktif bölgesine bağlanan ve melanin sentezini engelleyen çeşitli bileşikler, cildi aydınlatmak ve hiperpigmentasyon lezyonlarını iyileştirmek için geliştirilmiş ajanlar vardır. Bu ajanlar arasında hidrokinon, kojik asit, arbutin, vb. bulunur (Mov,2006). Hidrokinon, 1936 yılında Oettel tarafından bir beyazlatma maddesi olarak tanımlanmıştır (Levitt,2007). Doğada ise -D-glukopiranozid konjugatı (arbutin) şeklinde bulunur. Literatürde dihidroksibenzen, 1,4-benzendiol, 1,4-dihidroksibenzen ve p-benzendiol veya kuinon isimleriyle de bilinen hidrokinon molekülü fenol tipi bir organik bileşiktir. Kimyasal formülü $C_6H_4(OH)_2$ olan hidrokinon benzen halkasına para pozisyonunda bağlanmış iki adet hidroksil grubundan oluşmaktadır. Beyaz kristaller halinde bulunur ancak hava ve ışıkla teması oksidasyona ve renk değişimine neden olabilir. Hidrokinon, suda, metanolde ve eterde çözünür. Hidrokinon, uçucu olmayan bir kimyasal olup fotoğraf, kimya ve kozmetik endüstrilerinde kullanılır (Deisinger,1996; Ergürhan, 2019). Ayrıca hidrokinon, kauçuk ve gıda endüstrisinde bir antioksidan olarak kullanılmıştır (Enguita ve Leitão.,2013).

1950'lerden 2001'e kadar hidrokinon, Avrupa Birliği ülkelerinde ticari olarak satılan kozmetik cilt aydınlatma formülasyonlarında kullanılmıştır ve 1960'lardan beri tıbbi bir ürün olarak ticareti mevcuttur ancak 1 Ocak 2001 tarihinden itibaren kozmetikte kullanımı yasaklanmıştır. Son zamanlarda yapılan bir literatür araştırması, cilt rengi açıcı bir madde olarak hidrokinonun olası uzun vadeli etkileri arasında karsinogenez, kemik iliğinde aplastik anemi ve akut miyeloid lösemi gibi risklerin de olabileceğini düşündürmektedir (Westerhof ve Kooyers., 2005; Enguita ve Leitão.,2013). Bilimsel çalışmalar, hidrokinonun organizmada oksidatif stres ve DNA hasarı gibi zararlı etkilere neden olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, doğal bitkilerden elde edilen β -arbutin ve α -arbutin gibi sentetik arbutin formları üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar arbutinin hidrokinona göre daha az sitotoksikiteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle, arbutin daha güvenilir bir cilt beyazlatıcı ajan olarak kabul edilebilir (Hazman vd.,2021). Arbutin ve türevlerinin önemli yan etkilerinin olmaması, onları hidrokinon için değerli bir alternatif haline getirmiştir (Migas ve Krauze-Baranowska, 2015).

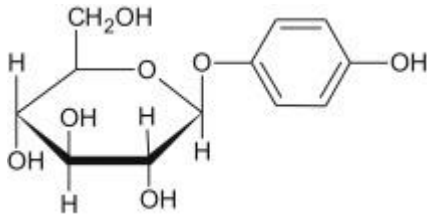
Arbutin, 4-hidroksifenil- α -glukopiranozid ve 4-hidroksifenil- β -glukopiranozid olmak üzere 2 izoformu olan bir hidrokinon glikozittir. Yaban mersini, kızılcık, mercanköşk ve çoğu armut türü gibi yenilebilir meyve üreten bitkilerde bulunan doğal bir bileşiktir (Resim 1.1). Ericaceae (ayı üzümü, çilek ağacı, yaban mersini, funda), Saxifragaceae, Asteraceae, Rosaceae, Lamiaceae ve Apiaceae familyalarındaki çeşitli bitkilerden elde edilir (Couteau ve Coiffard, 2016; Zhu vd., 2018). Arctostaphylos uva ursi'nin (Ericaceae) yapraklarından elde edilen arbutin içeren özler, yüzyıllardır fitoterapide kullanılmıştır. Günümüzde şifalı bitki olarak kabul edilmektedir (Migas ve Krauze-Baranowska, 2015; Saeedi vd., 2021). Bir bitkide bulunan arbutin yüzdesi, türe, toplama zamanına ve yetiştirme koşullarına göre önemli ölçüde değişir (Couteau ve Coiffard, 2016; Hazman vd., 2021). Örneğin, en büyük arbutin miktarı, 80-100 °C'de kurutulan *Bergenia crassifolia*'nın (Saxifragaceae) genç, tamamen gelişmiş yeşil yapraklarında belirlenmiştir (Lubsandorzhieva vd., 2000).



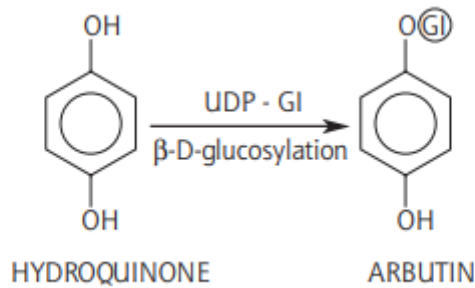
Resim 1.1: Doğal ve sentetik arbutin kaynaklarının türleri (Saeedi vd., 2021).

Çoğu birey tarafından günlük olarak alınan kahve ve çay gibi yaygın gıdalar önemli miktarlarda hidrokinon ve/veya arbutin içerir. Doğal olarak oluşan hidrokinon/arbutinin en büyük miktarları buğday ve buğday ekmeği, buğday tohumu ve armutta bulunur. Bir armut 620 µg hidrokinon/arbutin içerebilir. Özellikle armut kabuğu büyük miktarlarda hidrokinon veya arbutin içerir (Nordlund vd., 2006).

Arbutin ($C_{12}H_{16}O_7$) basit bir moleküler yapıya sahiptir (Şekil 1.2.) ve bitkilerden yüksek saflıkta elde edildiğinde beyaz renkli bir toz görünümündedir. İn vivo olarak büyüyen birçok bitki türü arbutin üretemez, ancak in vitro ortamda, eksojen olarak uygulanan hidrokinonu kendi β -D-glukoziti olan arbutine dönüştürebilir. Bu reaksiyon, O-glukosiltransferaz tarafından katalize edilir (Ekiert vd.,2012; Migas ve Krauze-Baranowska., 2015)(Şekil 1.3.). Alfa amilaz, sakkaroz fosforilaz, siklodekstrin glikosiltransferaz, α -glukosidaz, dekstranükraz, amilosukraz ve sakaroz izomeraz dâhil olmak üzere yedi farklı mikrobiyal enzim α -arbutin üretebilir (Zhu vd., 2018; Hazman vd., 2021).

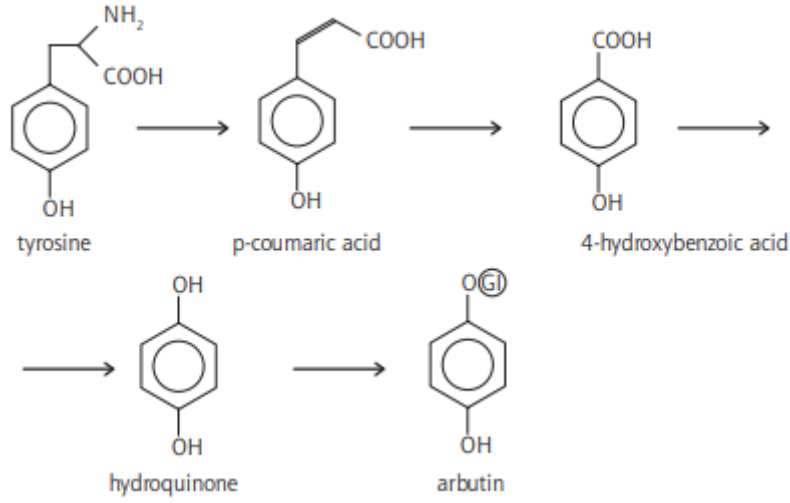


Şekil 1.2: Arbutinin yapısı (Migas ve Krauze-Baranowska, 2015).



Şekil 1.3: Hidrokinonun arbutine biyotransformasyonu. UDP-Gl (=üridin difosfat glukoz), glikoz donörü (Ekiert vd.,2012)

Ayrıca, tirozin ve 4-hidroksibenzoik asit gibi diğer bileşikler de arbutin öncülleri olarak kullanılmıştır (Ekiert vd.,2012) (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4: Arbutin biyogenezinde öncü maddeler olarak tirozin ve 4-hidroksibenzoik asit (Ekiert vd.,2012).

Arbutinin anti-enflamatuar, antioksidan, serbest radikal süpürücü, anti-hiperglisemik ve diğer etkileri olduğu bildirilmiştir. Arbutin, reaktif oksijen türlerinin ve süperoksit radikallerinin oluşumunu azaltarak uzun vadeli radikal yakalama aktiviteleri gösterir (Pavlovic vd., 2009; Adisa vd., 2011; Taha vd., 2012; Akkoyun vd., 2023). Ayrıca, arbutinin antioksidan aktivitesi hidrokinona kıyasla daha uzun sürelidir (Bang vd., 2008; Takebayashi vd., 2010). Arbutinin antioksidan etkisi in vitro çalışmalarda doğrulanmıştır. Arbutinin tert-bütül hidroperoksit (t-BHP) gibi toksik maddelere karşı sitoprotektif (hücre koruyucu etki) ajan olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Seyfizadeh vd., 2012).

Arbutin, türevleri ve arbutin içeren ekstraktların biyolojik aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar sayesinde kullanım alanları genişlemektedir. Arbutin türevlerinin sentezi için yeni kaynaklara ve yöntemlere duyulan ihtiyaç haklı olarak görülebilir. Şimdiye kadar bitki maddeleri, özellikle *Arctostaphylos uva-ursi*, arbutinin temel kaynak maddeleriydi. Günümüzde bitki özleri, kimyasal ve biyoteknolojik olarak sentezlenmiş arbutin ve türevleri ile değiştirilmektedir (Migas ve Krauze-Baranowska,2015).

Arbutin Kızılderililerin çeşitli kabileleri tarafından tıbbi amaçlar için kullanılmıştır (Nordlund vd., 2006). Örneğin idrar yolu enfeksiyonlarını (Gemot vd, 2002), böbrek taşlarını ve sistitisi (Abascal ve Yarnell, 2008) tedavi etmek için bir idrar antiseptiği ve idrar söktürücü olarak kullanılır. Aynı zamanda anti-oksidatif (Ioku vd, 1992; Bang vd, 2008), anti-mikrobiyal (Jurica vd, 2017) ve anti-inflamatuvar etkiler (Lee ve Kim, 2012) gösterir. Arbutinin anti-inflamatuvar özellikleri, ratlar üzerinde yapılan in vivo çalışmalarda doğrulanmıştır. Arbutinin mide mukozası üzerinde koruyucu etki gösterdiği, mukozal içeriği azalttığı, ülser alanı ve iltihabı gösterdiği bildirilmiştir (Taha vd, 2012).

Arbutin, hidrokinon ve kojik asit gibi geleneksel depigmentasyon bileşiklerine kıyasla melanositotoksiste etkisi olmaksızın melanin oluşumunu engellediği için ticari olarak etkili bir cilt beyazlatıcı ajan olarak kullanılan en belirgin doğal bileşiktir (Maeda ve Fukuda 1996; Zhu ve Gao, 2008). Arbutin, tirozinaz aktivitesi üzerindeki kuvvetli inhibitör etkisi sebebiyle kozmetik sanayisinde güçlü bir cilt aydınlatma maddesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Han ve ark., 2014).

1.7. Motilite

Konvansiyonel sperma kalitesinin değerlendirilmesi, kitle ve bireysel hareketlilik gibi subjektif parametrelerin değerlendirilmesi, spermatozoon yoğunluğu ve morfolojik anomaliler gibi objektif parametrelerin değerlendirilmesine dayanmaktadır. İnsanlarda ve hayvanlarda subjektif optik mikroskopik değerlendirilme kullanıldığında, aynı ejekülatların hareketlilik parametrelerinin tahmininde %30 ila %60 arasında değişkenlik rapor edilmiştir. Kriyoprezervasyon spermatozoonun hareketliliğini etkiler ve spermatozoonun başının boyutunu ve şeklini değiştirir. Spermatozoonun hücre hareketliliğinin ve morfolojisinin değerlendirilmesi, sperma kalitesinin incelenmesi ve sperma kalitesi ile fertilité arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde önemli bir parametredir. Bilgisayar destekli spermatozoon analizi (CASA), hareket, hız ve morfoloji gibi farklı hücre özelliklerinin objektif değerlendirmesine, suni tohumlama teknolojilerini geliştirmek ve fizyolojik veya toksikolojik çalışmaları geliştirmek için etkili, hassas ve güvenilir bir araçtır (Verstegen vd., 2002; Yáñez-Ortiz vd., 2021).

Spermatozoonun yoğunluğunun sperma kalitesini gösteren güçlü bir belirteç olduğu anlaşılmıştır. Taze spermanın spermatozoon yoğunlukları genellikle çok yüksektir ve bu nedenle analiz öncesi spermanın seyreltilmesi gerekir (Verstegen vd., 2002).

VCL; eğrisel hız hücrenin gerçek noktadan noktaya izlediği yolun ortalamasına göre ölçülen ortalama hızdır ve mikrometre/saniye cinsinden ifade edilir.

ALH; Yanal kafa deplasman genişliği, mikrometre cinsinden ifade edilir;

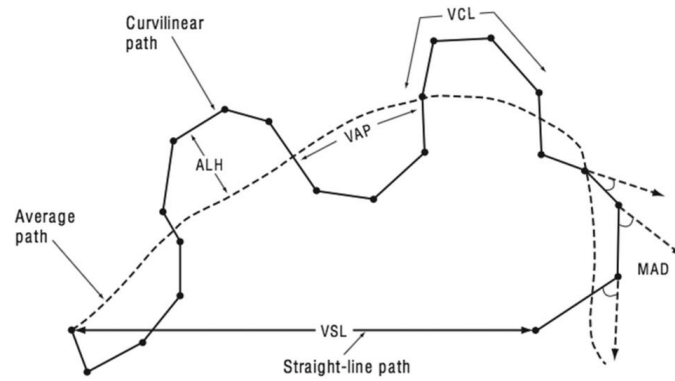
BCF; vuruş çapraz frekansı, spermatozoon hücresinin baş kısmının, spermatozoonun ortalama yolu boyunca kaç kez geçtiği frekans Hertz cinsinden ifade edilir;

VAP; ortalama yol hızı, pürüzsüzleştirilmiş hücre yolu ortalaması hızıdır ve mikrometre/saniye cinsinden ifade edilir;

VSL; doğrusal hız, bir izin başından sonuna kadar düz bir çizgide ölçülen ortalama hızdır ve mikrometre/saniye cinsinden ifade edilir;

STR; düz ilerleyiş, VSL/VAP oranının yüzdesindeki ortalama değerdir (bu düzlük, hücrenin yolunun optimal düzlüğe karşılık gelen %100'üne ne kadar yakın olduğunu tahmin eder);

LIN; doğruluk VSL/VCL oranının yüzdesindeki ortalama değerdir (bu doğruluk, hücrenin yolunun düz bir çizgiye ne kadar yakın olduğunu tahmin eder) (Verstegen vd., 2002; Malo vd., 2005). (Şekil 1.5.)



Şekil 1.5: Spermatozoonların kinetik hareketleri (Williams ve Martins da Silva., 2019).

1.8. HE-Test

Jeyendran vd. (1984), HOS testini spermatozoon fonksiyonel testi olarak ortaya koydular ve bu testin spermatozoon metabolizması, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve spermatozoonun oosit yüzeyine bağlanmasında önemli olan membran bütünlüğünü değerlendirdiğinden, yararlı bir tamamlayıcı test olarak kabul edilebileceğini öne sürdüler (Jeyendran vd.,1984). Spermatozoonların fertilizasyon yeteneği için, işlevsel bir membrana sahip olmaları gerekmektedir; zira spermatozoon kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve oosit yüzeyine bağlanma gibi hayati fonksiyonlar bu membranın işlevselliğine bağlıdır. Hipoosmotik şişme (HOS) testi ise, spermatozoon plazma membranının işlevsel bütünlüğünü değerlendirerek, fertilizasyon potansiyelini belirlemekte kullanılır. Bu test, spermatozoon hücresinin çevresiyle uyumunu ve membran bütünlüğünü tahmin etmek için hipoosmotik stres altında spermatozoonun şişme ve kıvrılma tepkilerine dayanır (Ramu ve Jeyendran., 2013). Ozmotik toleransın ve ölü-canlı muayenesinin birleştirildiği HE-test, insanlarda ve diğer memeli hayvanlarda fertilitenin tahmin edilmesinde kullanılan potansiyel sperma fonksiyon testlerinden biri olduğu bildirilmektedir (Gündoğan ve ark., 2011; Jeyendran ve ark 1984).

1.9. Anormal Spermatozoon Oranı

Teratozoospermia'nın varlığı, morfolojik anormalliklerin türüne ve sıklığına bağlı olarak subfertilite ve sterilite ile uzun süredir ilişkilendirilmektedir. Ancak, fertilizasyon yeteneğinin öngörülmesi genellikle mümkün değildir, çünkü normal spermatozoon hücreleri ile anormal spermatozoon hücreleri bir arada bulunur ve belirli sayıda normal spermatozoonun varlığı normal fertilizasyon için yeterlidir. Yine de, ejakülatta belirgin bir şekilde yüksek bir sıklıkta birkaç morfolojik anomali bulunduğunda, erkek fertilizasyonunun azalması beklenir (Oehninger ve Kruger 2021).

Bazı morfolojik anomalilerin kökeni ve etkisi bilinmemektedir, çünkü çoğu anomalinin gelişiminde fizyolojik bir unsur olabilir. Ancak bazı spermatozoon morfolojisi

bozuklukları, kromatin kondensasyonunda değişiklikler, akrozom reaksiyonundaki bozukluklar, kuyruk hareketliliği sorunları veya hatta apoptoz veya nekroz fenomenlerinin artması gibi işlevsel bozukluklarla ilişkili olabilir. Ayrıca, globozoospermia, spermatozoon makrosefali sendromu, çoklu kuyruk anomalileri veya başsız spermatozoonlar gibi genetik anomalilerle ilişkili bazı belirli bozukluklar (spermatozoonların %99 veya %100'ünü etkileyen) vardır (Gatimel vd., 2017).

1.10. DNA Hasarı

Spermatozoon çekirdeği oksidatif strese karşı koruma eksikliği nedeniyle oksidasyon aracılığıyla DNA hasarına karşı savunmasızdır ve erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde faydalı bir araçtır. Kuyruklu yıldız (Comet) testi veya tek hücre jel elektroforezi, tek spermatozoondaki DNA iplik kırıklarının değerlendirilmesi için nispeten basit ve hassas bir yöntemdir. Bu işlem sırasında, spermatozoon hücreleri, mikroskop slaytında ince bir agaroz tabakası içine gömülür ve yüksek tuz koşullarında deterjanla lize edilir. Bu işlem, protaminleri ve histonları çıkararak, çift sarmallı DNA'nın üzerine süpersarmal döngülerini içeren bir nükleoid benzeri yapı oluşturmaya sağlar. Alkalin pH koşulları çift sarmallı DNA'nın çözülmesine neden olur ve sonraki elektroforez, kırılmış ipliklerin anoda doğru göç etmesiyle bir kuyruklu yıldız oluşturur. Floresan mikroskopta gözlemlendiğinde, baştaki ve kuyruktaki DNA miktarı floresan yoğunluğuyla yansıtılır. Baş kısmına göre kuyruktaki göreceli floresan, DNA hasarının seviyesinin bir ölçüsü olarak kullanılır (Simon ve Carrell., 2013).

1.11. Oksidatif Stres Parametreleri

Hücredeki oksidan ve antioksidan maddeler arasındaki dengenin bozulması oksidatif stres olarak bilinir. Oksidatif stres oluşumu ile hücrelerde reaktif oksijen türlerinin konsantrasyonlarında artış görülür. Organizmalar kendilerini oksidatif stresten enzimatik veya enzimatik olmayan sistemlerle korurlar (Akkoyun vd., 2023). Sperma

dondurma işlemi sırasında, oksidatif stresin neden olduğu hasarlar çok fazladır. Oksidatif stres, spermatozoon membran hasarının yanı sıra mitokondriyal aktiviteyi bozar, hücre içi enzimlerin dışarı çıkmasını teşvik eder ve birçok aksonemal proteinin bozulmasına neden olarak spermada motilite kaybına yol açar (Peris-Frau vd., 2020).

Sperma ömrünü ve suni tohumlama dozlarının sayısını artırmak için gerekli bir adım olmasına rağmen, spermanın sulandırılması seminal plazmada bulunan antioksidan enzimlerin seviyelerini düşürür, böylece oksidatif strese karşı korunmalarını azaltır.

Seminal plazma birkaç antioksidan enzim içerir; katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD). Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD) en büyük aktiviteye sahip olanlardır (Ros-Santaella ve Pintus, 2021). Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, hücrede yağ asitlerinin serbest radikallere maruz kalması sonucu oluşur ve yaygın olarak kullanılan bir oksidatif stres belirtecidir (Akkoyun vd., 2023).

Araştırılan tez çalışmasının amacı ülkemiz yerli gen kaynaklarından Sönmez koçunun spermasının dondurulması esnasında sulandırıcıya katılan güçlü bir antioksidan olan arbutinin çözündürme sonrasında spermatozoon kinetik parametreleri, morfoloji, membran bütünlüğü, DNA hasarı ve oksidatif stres parametrelerinin araştırılmasıdır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1.Araştırmada Kullanılan Hayvan Materyali, Bakım ve Beslenmesi

Araştırmada Afyonkarahisar bölgesinde bulunan 3 adet sağlıklı, fertilité yeteneğine sahip ve androlojik muayenelerinde herhangi bir patolojik değışiklik saptanmayan koç kullanılmıştır. Tüm koçlar özel bir çiftlikte, aynı barınma ve beslenme koşullarında tutulmuştur. Bakım ve besleme işlemleri çiftlikte çalışanlar tarafından yapılmıştır.

2.2.Spermanın Toplanması

Koçlardan sperma sezon içi dönemde (Eylül-Kasım) başlıca spermatolojik özellikler, ejakülat miktarı (ml), yoğunluk ($10^9/\text{ml}$), motilité (%), anormal spermatozoa oranı (%), ölü spermatozoa oranı (%) ve pH yönünden muayene edildi normospermik özellik gösterenler kullanıldı. Suni vagina yardımıyla her bir koçtan haftada iki kez olmak üzere bir koç için 6 ejakülat, toplamda ise 18 ejakülat alındı. Alınan ejakülatlardan normospermik özellik gösteren spermalar çalışmada pooling yapılarak kullanıldı. Spermanın alınmasında kızgın 2 baş koyun teaser olarak kullanılmıştır.

2.3. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması

Sperma toplama kadehlerinden deney tüplerine aktarılıp birleştirilen (pooling) sperma yoğunluk muayeneleri yapıldıktan sonra 5 eşit hacme ayrılmıştır. Daha sonra önceden hazırlanmış Tris solüsyonu her gruba kullanılmış ve antioksidan olarak ise gruplara farklı oranlarda arbutin katılmış, kriyoprotektan olarak %5 gliserol içeren sulandırıcı ile son sulandırma yapılmıştır.

Tris stok solüsyonu için:

Trisma base 3,63 g

Sitrik asit 1,99 g

Fruktoz 0,5 g

100000 IU/ml kristal penisilin

100 mg/ml streptomisin

Bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanarak tris-sitrik asit-fruktoz solüsyonu hazırlandı (Evans ve Maxwell, 1987).

Spermanın uzun süreli saklanması amacıyla spermanın sulandırılmasında kullanılacak grupların içerikleri aşağıdaki gibi hazırlanmıştır;

Kontrol	Tris-sitrik asit-glukoz-yumurta sarısı %14-penicilin-streptomycin-gliserol
2,5 mM	Tris-sitrik asit-glukoz-yumurta sarısı %14-penicilin-streptomycin-gliserol + 2,5 mM arbutin
5 mM	Tris-sitrik asit-glukoz-yumurta sarısı %14-penicilin-streptomycin-gliserol + 5 mM arbutin
7,5 mM	Tris-sitrik asit, glukoz-yumurta sarısı %14-penicilin-streptomycin-gliserol+7,5mM arbutin
10 mM	Tris-sitrik asit-glukoz-yumurta sarısı %14-penicilin-streptomycin-gliserol+ 10 mM arbutin

Çizelge 2.1: Spermanın sulandırılmasında kullanılacak grupların içerikleri

Sulandırılma işlemleri yapıldıktan sonra örnekler ivedilikle Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı laboratuvarına getirilmiştir. Spermalar her bir grup için ayrı renkte olacak şekilde 0,25 ml'lik payetlere çekilip açık ağızları polivinil alkol ile doldurulup kapatılarak 5 °C'de 3 saat ekilibrasyona bırakıldı. Ekilibrasyon süresi tamamlandıktan sonra sperma örnekleri strafor kutu içerisinde ki sıvı azot buharında 12 dakika boyunca donduruldu. Daha sonra sperma örnekleri inceleme gününe kadar sıvı azot tankında (-196°C)

depolandı.

2.4. Spermatolojik Değerlendirilme Parametreleri

Dondurulmuş spermallerden her bir parametre için her gruptan 6 adet olmak üzere 30 adet payet değerlendirmeler yapılırken 37 °C ye ayarlanmış su banyosunda 30 sn'de çözündürülerek spermatolojik özellikler, oksidatif stres ve DNA hasarı yönünden değerlendirildi.

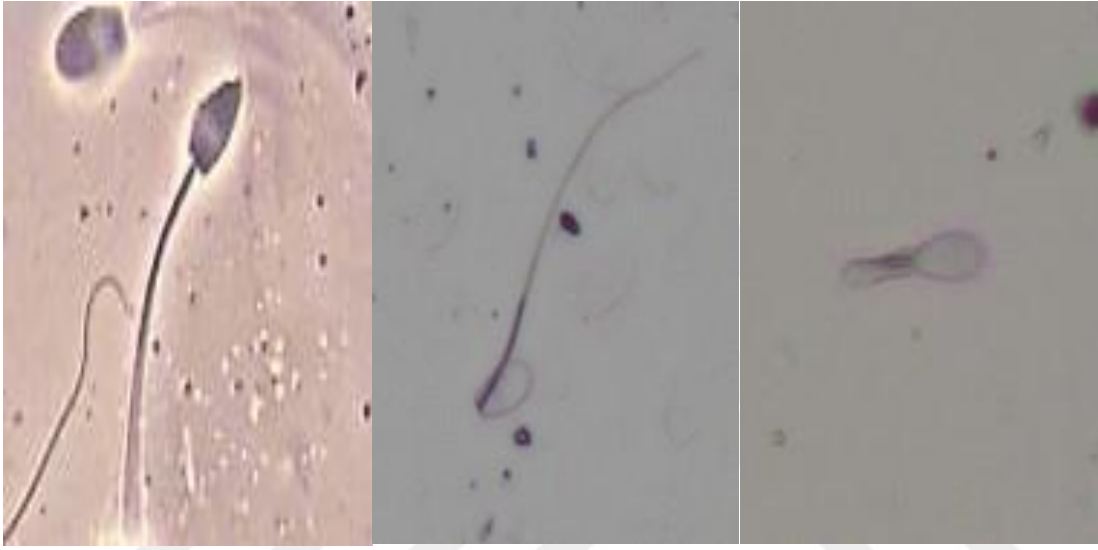
2.4.1. CASA Motilitesinin Belirlenmesi

Spermaların çözüm sonu motilitesi, detaylı hareket özellikleri ve yoğunlukları bilgisayar destekli sperma analiz cihazı (SCA®, Microptic, Barcelona, Spain) kullanılarak değerlendirilmiştir. CASA sistemi, negatif faz-kontrast, 10X objektifte ve 37°C derecede bulundurulan ısıtma tablası ile bağlantılı mikroskop (Nikon, Eclipse, Tokyo, Japan) ile desteklenmektedir. Yapılan analizlerde total motilite %, progresif motilite %, VCL (eğrisel hız, $\mu\text{m/s}^{-1}$), VAP (ortalama yol hızı, $\mu\text{m/s}^{-1}$), VSL (düz çizgisel hız, $\mu\text{m/s}^{-1}$), STR (VSL/VAP, %), LIN (VSL/VCL, %), WOB (VAP/VCL, %), ALH (lateral kafa değiştirme, μm) ve BCF (Çapraz geçiş frekans ritmi Hertz (Hz), toplam yoğunluk ve motil spermatozoon yoğunluğu parametreleri yazılım sisteminde en az 5 farklı mikroskop sahasında okumalar yapılarak yüzde (%) olarak değerlendirildi ve kaydedildi.

2.4.2. Anormal Spermatozoon Oranı

Anormal spermatozoon oranı sperma örneklerinin Giemsa boya ile boyanarak belirlendi. Lam üzerine 10 mikrolitre sperma örneğinden bırakıldı. Daha sonra froti çekilerek yatay bir şekilde kurumaya bırakıldı. Bu işlemi takiben alkolle fikse edilip kuruması için beklenildi. Boyama aşamasına kuruma işleminin ardından geçildi ve hazırlanan Giemsa boyasından pipetle lamın üzerini kapatacak şekilde yayıldı. Kırk

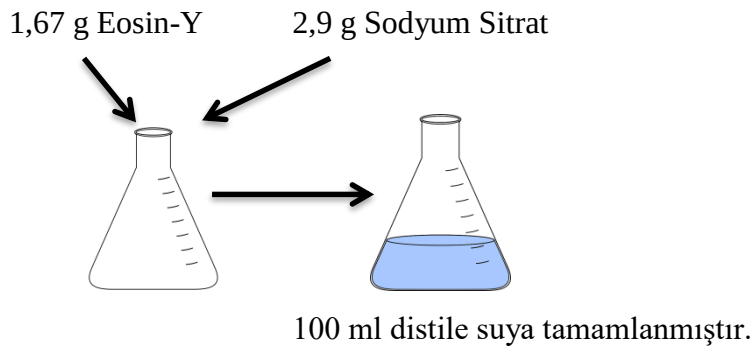
beş dakika beklenildi. Bekleme süresinin ardından lamalar yıkandı. Yıkanan lamalar kuruması için lam saklama kabına sırayla bırakıldı. Kuruma işleminden sonra faz-kontrast mikroskopta 40X'de 400 spermatozoon sayılarak anormal spermatozoon oranı % olarak belirlendi. Normal olmayan spermatozoonlar, anormal olarak kabul edildi ve spermatozoonun baş, orta kısım, kuyruk ve toplam anomalileri ayrı ayrı belirlenerek kayıt altına alındı (Watson, 1975).



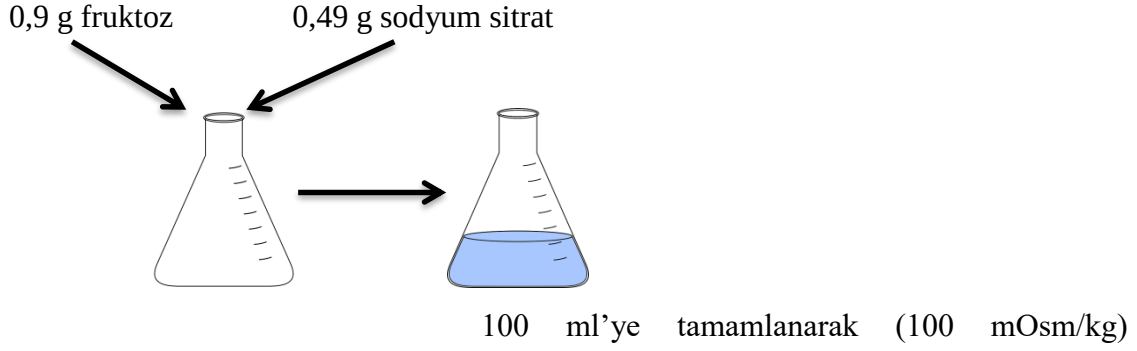
Resim 2.1: Baş, orta ve kuyruk kısmına ait anomaliler

2.4.3.Hipo-Osmotik Eosin (HE) Test Analizi

Spermatozoon membran bütünlüğünün tespiti ve ölü-canlı spermatozoon oranının belirlenmesi amacıyla uygulanmıştır.



Şekil 2.1: Eosin boyasının hazırlanışı



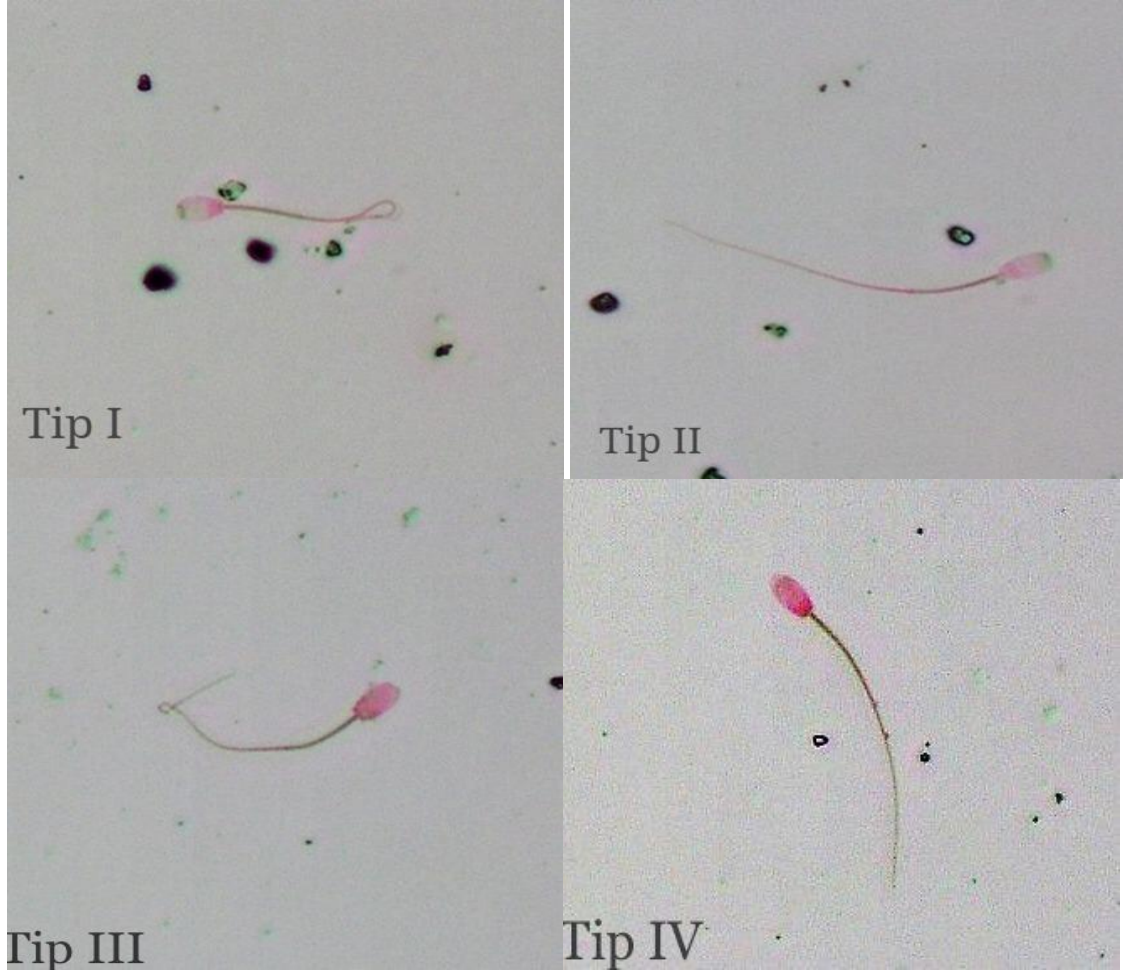
hazırlandı.

Şekil 2.2: HOS Test Solüsyonunun hazırlanışı

37 °C'deki su banyosunda bulunan ependorf tüplerdeki 100 mOsm'luk 1 ml HOS test çözeltisine sperma örneğinden 20 µl eklendi. Ardından bu çözeltiye eosin boyası ilave edilerek 37 °C'lik su banyosunda yarım saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından lam üzerine bu çözeltiden bir damla alınıp frotileri çekildi ve kısa süre içerisinde kurumaları sağlandı. Hazırlanan frotilerde 400'lük büyütmede 400 spermatozoon 4 tipte; baş kısmının tamamın ya da bir kısmının boya alıp almadığına ve kuyrukta kıvrılma veya şişme gözlenip gözlenmediğine göre sınıflandırıldı (Hafez., 1993).

Tip I	Şişmiş kuyruk, boya almamış baş	(H+,E-)
Tip II	Şişmemiş kuyruk, boya almamış baş	(H-,E-)
Tip III	Şişmiş kuyruk, boya almış baş	(H+,E+)
Tip IV	Şişmemiş kuyruk, boya almış baş	(H-,E+)

Çizelge 2.2: HE test parametreleri



Resim 2.2: Spermatozoonlarda HE-testinde gözlenen şişme ve kıvrılmalar

Tip I. Kuyruk şişmiş, baş boya almamış (H+/E-)

Tip II. Kuyruk şişmemiş, baş boya almamış (H-/E-)

Tip III. Kuyruk şişmiş, baş boya almış (H+/E+)

Tip IV. Kuyruk şişmemiş, baş boya almış (H-/E+)

2.5. DNA Hasarının Tespit Edilmesi

DNA hasarının tespit edilmesinde Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) yöntemi kullanıldı. Comet assay olarak da bilinen bu yöntem; farklı molekül ağırlıklarına ve elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin alkali pH da elektriksel alanda göç yapmaları temeline dayanır. Yorumlanması ise elde edilen DNAların göçlerinin görüntülenmesine ve bu görüntülerin değerlendirilmesine göre yapılmakta olup farklı

aşamalardan oluşmaktadır (Ostling ve Johanson, 1984; Singh vd., 2003).

2.5.1.Spermanın Yıkınması ve Hazırlaması

37 °C’de 30 sn çözdürölüp ependorf tüplerine aktarılan donduruluş sperma payetleri Ca^{+2} ve Mg^{+2} bulunmayan fosfat buffer solüsyon (PBS) ile 1:1 oranında sulandırılarak 10 dk boyunca santrifüj edilerek yıkanmıştır. Santrifüj edilen spermalardan süpernatantlar uzaklaştırılarak sperma tekrar sulandırıldı ve santrifüj işlemi bir kez daha tekrarlanmıştır. Süpernatant aynı şekilde tekrar uzaklaştırılarak sperma ml’de 20×10^6 olacak şekilde tekrar PBS ile sulandırıldı (Fraser ve Strzezek, 2004; Nandre, 2007). PBS içerisinde hazırlanmış % 0.75’lik düşük kaynama derecesine sahip agaroz (low melting agar, LMA) jelden 120 µl alınarak özel olarak traşlanmış lamalar üzerine bırakılarak froti çekildi ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Sulandırılmış spermadan 5 µl alınarak 85 µl % 1 oranında LMA jel ile 37 °C’de karıştırılarak birinci agaroz kat üzerine yayıldıktan sonra lamel ile kapatılarak +4 °C’de bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda katılaşma gerçekleşmiştir. Katılaşmayı takiben lameller dikkatlice lam üzerinden alınarak slaytlar hazırlanmıştır (Hughes vd., 1997; Singh vd., 2003).

2.5.2. Lizis

Lam üzerinde agaroz jele gömülen spermatozoonların slaytları hazırlandıktan sonra, lizis solüsyonunda (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, pH 10) dik şale içerisine dizilerek yaklaşık olarak 1 saat süre ile +4 °C’de inkübasyona bırakıldı. Bu süreyi takiben lizis solüsyonunun içerisinde olan slaytlara 40 mM dithioerithrol (DTT) eklendikten sonra slaytlar aynı süre ve sıcaklıkta 1 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra solüsyona 100 µg/ml proteinaz K ilave edilerek slaytlar 37 °C’de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Hughes vd., 1997; Singh vd., 2003).

2.5.3. Slaytların Elektroforezi

Yapılan işlemlerden sonra DNA'nın zincirlerinden ayrılması için slaytlar yeni hazırlanmış ve soğutulmuş olan elektroforez solüsyonunda 20 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Agaroz gömülü olan spermatozoonların elektroforez solüsyonunda (300 mM NaOH ve 1 mM EDTA, pH 12.5) 20 dakikalık inkübasyonu tamamlandıktan sonra DNA'lar 300 mA ve 20 volt'luk elektriksel alanda aynı tampon çözeltide 20 dakika boyunca uygulama yapıldı (Hughes vd., 1997; Singh vd., 2003).

2.5.4. Nötralizasyon ve Boyama

Elektroforezde yapılan uygulama sonrası alkali elektroforez solüsyonunu slaytlardan uzaklaştırmak için slaytlar yeni hazırlanmış Tris tamponuyla (40 mM Tris HCl, pH 7.4) yıkanarak nötralizasyon sağlanmıştır (Hughes vd., 1997; Singh vd., 2003). Nötralizasyon işlemi bittikten sonra slaytlar bir floresan boya çeşidi olan ethidium bromid (5 µg/ml) uygulanarak boyama işlemi yapılmıştır (Hu vd., 2008).

2.5.5. Slaytların Değerlendirilmesi

Slaytlara boyama işlemi yapıldıktan sonra üzerine lamel kapatılarak floresan ışıklı bir mikroskopta (Olympus CX-31) 400'lük büyütmede 100 adet DNA görüntüsü değerlendirildi. Değerlendirme yöntemi görsel skorlama ile yapılmıştır. Oluşan hasarın derecesine göre DNA görüntüleri 5 alt kategoride skorlanmıştır. Hasarsız DNA'lar 0, hasar olan DNA'lar ise hasarın derecesine göre 1 ila 4 arasında skorlandırıldı. Sonuçlar arbitrary unit (AU) olarak değerlendirildi (Collins, 2004).

2.6. Oksidatif Stres Analizleri

Payetlerin çözdürülmesinden sonra (37°C 30 saniye), sperma örnekleri PBS ile üç kez yıkanarak, dilüandan ayrılmak için soğutmalı santrifüjde 800×g'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Üst sıvı, daha sonra PBS ile 0,5 mL'ye tamamlandı. Örnekler homojenizasyon için buzlu falcon tüplerine alındı. Antioksidan analizleri için sperma örnekleri önceden işleme tabi tutuldu. 0,5 gram numune, 50 mM potasyum dihidrojen fosfat tamponuna (pH: 7) eklenerek buzlu ortamda 5 ml hacime tamamlandı (Parimelazhagan ve Thangaraj., 2016). İlk olarak, dokular mekanik bir homojenizatör (IKA-T18 Ultra Turrax) kullanılarak parçalandı ve elde edilen süspansiyon, ultrasonik homojenizatörde (Bandelin Sonopuls; 20 kHz güç) ikinci bir homojenizasyon işleminden geçirildi. Bu homojenat daha sonra, 5000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Malondialdehit düzeyleri, Draper ve Hadley (1990) tarafından önerilen, çift ısıtma yöntemi olarak da bilinen kolorimetrik testle belirlendi ve daha önce açıklandığı şekilde uygulandı. Temel olarak, MDA'nın tiyobarbiturik asitle reaksiyonu ile 532 nm'de absorbanı vermesine dayanır (Draper ve Hadley.,1990). 0.2 ml süpernatant ve 0.2 ml %8.1 sodyum dodesil sülfat karışımına, 1.5 ml %20 glasyal asetik asit ve 1.5 ml %0.8 tiyobarbiturik asit eklendi. Daha sonra karışıma 0.6 ml damıtılmış su eklendi. Karışım çalkalanıp ve 95°C'de 1 saat kaynatıldı. Ardından hızlıca soğutuldu ve tüplere 1 ml n-bütanol ve piridin (15:1, v/v) karışımı eklendi. Karışım tekrar çalkalandı ve 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Pembe renkli kısmın 532 nm'deki absorbanı ölçüldü. Redükte glutatyon (GSH) düzeyleri, sperma örneklerinden Ellman yöntemi olarak da bilinen kolorimetrik testle belirlendi. Temel olarak, DTNB ile GSH ve GSSG'nin katalitik reaksiyonuna dayanır (Hilf ve Hissin., 1976). 0.2 ml süpernatant ve 3 ml çöktürücü çözelti (300 ml damıtılmış su içinde 5 g metafosforik asit, 1 g EDTA, 90 g NaCl çözeltisi) karıştırıldı. Karışım normal filtre kağıdından geçirildi ve 2 ml filtrata 8 ml fosfat tamponu (0.3 M Na₂HPO₄) eklendi. Karışıma 0.5 ml DTNB çözeltisi (1% sodyum sitrat çözeltisinde 40 mg DTNB) eklendi. Karışım çalkalandı ve 412 nm'de absorbanı ölçüldü. GSH miktarları mg/dL biriminde hesaplandı. Total oksidan statü (TOS) ve total antioksidan statü (TAS), kolorimetrik test kitleri (Relassay Diagnostics LLC, Gaziantep, TR) kullanılarak belirlendi. TOS, biyolojik örneklerdeki oksidan maddelerin toplam konsantrasyonunu ölçmek için kullanılan bir nicel testtir. Oksitleyici bileşikler tarafından Fe⁺³'e indirgenen Fe⁺²'nin oksidasyonu spektrofotometrik olarak 660 nm'de belirlendi. TAS ise antioksidan maddelerin toplam konsantrasyonunu ölçmek

için kullanılan bir nicel testtir. Bu yöntemde, kitteki oksitlenmiş radikal 2,20-azino-bis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS), incelenen örneklerdeki antioksidan bileşikler tarafından indirgenerek renk değişiklikleri gözlemlenmiştir. Standart seyreltmeler, örnek alma ve inkübasyon kitlerin kullanım kılavuzundaki talimatlara uygun olarak gerçekleştirildi. Oksidan ve antioksidan madde düzeyleri mol/L olarak hesaplandı. Ayrıca, oksidatif stres indeksi (OSI) $OSI = [(TOS) / (TAS \times 100)]$ formülüne göre hesaplandı (Esen vd., 2012).

2.7 İstatistiksel Analiz

Yapılan çalışmada elde edilen motilite ve anormal spermatozoon oranları, HE-test parametreleri, DNA hasarları ve oksidatif stres parametrelerinin istatistiksel açıdan analizi için SPSS programının 13.0 versiyonu kullanıldı. • Elde edilen verilerin normal dağılıma sahip olup olmadığını test etmek amacıyla Shapiro Wilks testi kullanıldı. p değeri 0,05'ten küçük olan veriler normal dağılımdan sapma gösterdiği için parametrik olmayan Levene's testi kullanıldı. p değeri 0,05'ten büyük olan veriler normal dağılıma uyduğu için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc Duncan testi kullanıldı.

3.BULGULAR

3.1. Dondurma-Çözdürme Sonrası Spermatolojik Parametreler

Çizelge 3.1: Dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik parametreler ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:18)

CASA Parametreleri											
Gruplar	Progressif Motilite (%)	Nonprogressif Motilite (%)	Total Motilite	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	LİN (%)	STR (%)	WOB $\mu\text{m/s}$
Kontrol	26,79 $\pm$ 1,54 ^b	31,44 $\pm$ 2,99	58,23 $\pm$ 3,28 ^b	44,41 $\pm$ 3,34 ^b	35,53 $\pm$ 3,50 ^b	55,66 $\pm$ 2,76 ^b	1,92 $\pm$ 0,07 ^c	4,89 $\pm$ 0,22 ^c	53,87 $\pm$ 3,44	66,15 $\pm$ 2,62	74,77 $\pm$ 2,03
2,5mM	44,04 $\pm$ 3,79 ^a	30,42 $\pm$ 4,30	76,13 $\pm$ 3,73 ^a	44,81 $\pm$ 0,84 ^b	35,18 $\pm$ 0,81 ^b	57,04 $\pm$ 1,57 ^b	2,04 $\pm$ 0,09 ^{bc}	5,26 $\pm$ 0,05 ^{bc}	54,98 $\pm$ 1,76	68,15 $\pm$ 1,10	75,08 $\pm$ 1,19
5mM	48,23 $\pm$ 5,45 ^a	34,39 $\pm$ 0,99	77,62 $\pm$ 3,35 ^a	46,21 $\pm$ 2,14 ^b	35,60 $\pm$ 1,48 ^b	59,97 $\pm$ 2,59 ^b	2,19 $\pm$ 0,07 ^b	5,38 $\pm$ 0,16 ^b	51,77 $\pm$ 0,65	65,71 $\pm$ 0,45	72,98 $\pm$ 0,66
7,5mM	45,36 $\pm$ 4,18 ^a	32,88 $\pm$ 1,91	76,58 $\pm$ 3,61 ^a	45,05 $\pm$ 0,83 ^b	35,85 $\pm$ 0,59 ^b	59,86 $\pm$ 1,71 ^b	2,21 $\pm$ 0,10 ^b	5,59 $\pm$ 0,14 ^{ab}	53,87 $\pm$ 1,78	68,50 $\pm$ 1,07	72,92 $\pm$ 1,50
10mM	46,16 $\pm$ 2,40 ^a	30,48 $\pm$ 2,82	76,65 $\pm$ 2,47 ^a	55,56 $\pm$ 3,75 ^a	46,41 $\pm$ 4,00 ^a	72,61 $\pm$ 3,27 ^a	2,46 $\pm$ 0,05 ^a	5,94 $\pm$ 0,15 ^a	54,67 $\pm$ 2,51	70,22 $\pm$ 1,81	71,77 $\pm$ 1,69

a-d: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir ($P < 0.05$).

Gruplara ait dondurulmuş payetlerin çözüm sonu elde edilen CASA parametrelerine ait bulgular Çizelge 3.1’de verilmiştir. Progresif ve total motilite değerlerine bakıldığında en yüksek değerler sırasıyla $48,23 \pm 5,45$ ve $77,62 \pm 3,35$ ile 5 mM’lık grupta, en düşük değerler ise sırasıyla $26,79 \pm 1,54$ ve $58,23 \pm 3,28$ ile kontrol grubunda belirlenmiştir. Çalışma gruplarında elde edilen değerlerin kontrol grubuna göre istatistiki olarak ($p < 0.05$) önemli bulundu. Nonprogresif motilite değerlerinde grupların kendi arasında ve kontrol grubuyla aralarında istatistiki olarak ($p > 0.05$) fark olmadığı bulundu. VAP, VSL, VCL parametreleri için en yüksek değerler sırasıyla $55,56 \pm 3,75$, $46,41 \pm 4,00$, $72,61 \pm 3,27$ ile 10 mM’lık grupta olduğu belirlenmiş kontrol ve diğer gruplar ile arasındaki fark ($p < 0.05$) önemli bulunmuştur. VAP ve VCL için en düşük değerler sırasıyla $44,41 \pm 3,34$; $55,66 \pm 2,76$ ile kontrol grubunda, VSL için en düşük değer $35,18 \pm 0,81$ ile 2,5 mM’lık grupta belirlenmiştir. ALH ve BCF değerlerine bakıldığında en yüksek değer 10 mM’lık grupta sırasıyla $2,46 \pm 0,05$; $5,94 \pm 0,15$ olarak bulunmuş ve diğer gruplar ve kontrol grubuyla farkın ($p < 0.05$) önemli olduğu görülmüştür. LIN, STR ve WOB değerlerinde gruplar arasında ve kontrol grubuyla herhangi bir fark ($p > 0.05$) yoktur.

3.2. Dondurma-Çözdürme Sonrası Anormal Spermatozoon Oranları

Gruplara ait dondurulmuş çözdürülmüş payetlerin çözüm sonu elde edilen anormal spermatozoon oranları ile elde edilen bulgular Çizelge 3,2’de verilmiştir. Anormal spermatozoon oranları değerlendirildiğinde baş anomalilerinde grup içi ve kontrol grubuna kıyasla herhangi bir fark ($p>0,05$) olmadığı orta kısım anomalilerinde ise 7,5 ve 10 mM’lık gruplardaki düşüşün ($p<0,05$) diğer gruplar ve kontrol grubuna göre önemli olduğu belirlendi. Kuyruk anomalilerine bakıldığında en düşük değerin 2,5 mM’lık grupta bulunduğu kontrol, 5 ve 7,5 mM’lık gruplarla arasında fark olmamasına ($p>0,05$) rağmen 10 mM’lık gruplar arasındaki farkın önemli ($p<0,05$) olduğu belirlendi. Toplam anomalilere bakıldığında en yüksek değerin kontrol grubunda en düşük değerin ise 7,5 mM’lık grupta belirlendiği ve farkın istatistiki olarak önemli ($p<0,05$) olduğu belirlendi.

Çizelge 3.2: Dondurma-çözdürme sonrası anormal spermatozoon oranları ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:18).

Anormal Spermatozoon Oranı (%)				
Gruplar	Baş	Orta	Kuyruk	Toplam
Kontrol	2,83±0,44	3,33±0,58 ^a	13,66±1,89 ^{ab}	19,83±2,23 ^a
2,5mM	3,41±0,62	3,00±0,18 ^a	10,50±0,40 ^b	16,91±1,04 ^{ab}
5mM	2,50±0,63	3,41±0,75 ^a	11,16±1,22 ^{ab}	17,08±1,71 ^{ab}
7,5mM	2,33±0,40	1,58±0,30 ^b	10,83±0,82 ^{ab}	14,75±0,94 ^b
10mM	1,91±0,41	1,33±0,27 ^b	14,41±1,06 ^a	17,66±0,74 ^{ab}

a-b: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir ($P < 0.05$).

3.3. Dondurma-Çözdürme Sonrası HE-Test Parametreleri

Gruplara ait dondurulmuş payetlerin çözüm sonu elde edilen HE-Test Parametrelerine ait bulgular Çizelge 3.3'te verilmiştir. Spermatozoon membran bütünlüğü ve canlılığın değerlendirildiği HE testinde en düşük membran bütünlüğü ve canlılığın kontrol grubunda olduğu en yüksek değer 47,33±2,56 ile 7,5 mM'lık grupta olduğu ve aralarındaki farkın istatistiki olarak ($p<0,05$) önemli olduğu belirlendi.

Çizelge 3.3: Dondurma-çözdürme sonrası HE-test parametreleri ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:18).

Gruplar	HE-Test(%)			
	H+/E-	H-/E-	H+/E+	H-/E+
Kontrol	35,00±3,15 ^b	40,33±3,27	7,66±1,90	17,16±0,70 ^a
2,5mM	42,66±2,30 ^{ab}	43,00±2,63	6,33±1,28	7,16±0,74 ^b
5mM	42,33±3,25 ^{ab}	42,50±3,84	8,00±1,15	7,16±0,47 ^b
7,5mM	47,33±2,56 ^a	42,33±3,02	5,00±0,68	5,33±0,33 ^c
10mM	38,66±2,66 ^b	46,50±2,62	5,83±0,54	9,00±0,51 ^a

a-c: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir ($P < 0.05$). H+/E-: Kuyruk şişmiş, baş boya almamış, H-/E-: Kuyruk şişmemiş, baş boya almamış, H+/E+: Kuyruk şişmiş, baş boya almış, H-/E+: Kuyruk şişmemiş, baş boya almış

3.4. Dondurma-Çözdürme Sonrası Spermatozoon DNA Hasarları

Gruplara ait dondurulmuş payetlerin çözüm sonu elde edilen DNA hasarlarına ait elde edilen bulgular Çizelge 3.4.'de verilmiştir. Dondurma çözündürme sonrası spermatozoon DNA hasarı değerlendirildiğinde en yüksek tail length değeri 10 mM'lık en düşük ise 2,5 mM'lık grupta belirlenmiştir. 2,5; 5; 7,5 mM'lık gruplarda elde edilen değerler kontrol grubuna göre istatistiki olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Tail DNA

değerlerine bakıldığında en yüksek değer $39,53 \pm 0,40$ ile kontrol grubunda, en düşük değer ise $34,68 \pm 0,85$ ile 2,5 mM'lık grupta bulunmuştur. Yine aynı parametrede ki 2,5; 5; 7,5 mM'lık gruplarda elde edilen değerler ile kontrol ve 10 mM'lık grup arasındaki farkın istatistiki olarak önemli ($p < 0,05$) olduğu gözlemlenmiştir. Tail moment değerlerine bakıldığında en yüksek değer $31,49 \pm 1,21$ ile 10mM'lık grupta en düşük değer ise $24,64 \pm 0,53$ ile 5mM'lık grupta elde edilmiştir. Tail moment parametresindeki 2,5; 5; 7,5 mM'lık gruplarla kontrol ve 10mM'lık gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur.

Çizelge 3.4: Dondurma-çözdürme sonrası DNA Hasarları ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:18)

Gruplar	Tail lenght ($\mu\text{m/s}$)	Tail DNA (%)	Tail Moment ($\mu\text{m/s}$)
Kontrol	$37,36 \pm 0,71^a$	$39,53 \pm 0,40^a$	$30,22 \pm 0,59^a$
2,5mM	$29,76 \pm 0,90^c$	$34,68 \pm 0,85^b$	$24,95 \pm 0,82^b$
5mM	$32,99 \pm 0,77^b$	$36,31 \pm 0,37^b$	$24,64 \pm 0,53^b$
7,5mM	$34,34 \pm 0,89^b$	$36,23 \pm 0,84^b$	$24,78 \pm 0,94^b$
10mM	$39,22 \pm 1,37^a$	$39,44 \pm 0,28^a$	$31,49 \pm 1,21^a$

a-b: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir ($P < 0.05$).

3.5. Dondurma-Çözdürme Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri

Gruplara ait dondurulmuş payetlerin çözüm sonu elde edilen oksidatif Stres Parametrelerine ait bulgular Çizelge 3.5'de verilmiştir. Oksidatif stres parametreleri yönünden değerlendirildiğinde MDA'nın en yüksek değeri $6,47 \pm 0,67$ ile 10mM'lık grupta bulunmuş en düşük değeri ise $4,84 \pm 0,54$ ile 5mM'lık grupta bulunmuştur. 2,5 ve 5 mM'lık gruplarda belirlenen değerler 10 mM'lık gruba göre istatistiki olarak önemli ($p < 0,05$) derecede düşük bulunmuştur. GSH değerlerinde ise en yüksek grup

0,39±0,00 ile 5mM’lık grup olmuş iken en düşük değer ise 0,35±0,00 ile 10 mM’lık grupta belirlenmiştir. 10 mM’lık grupta belirlenen değer kontrol ve diğer gruplara göre istatistiki olarak farklı ($p<0,05$) bulunmuştur. En yüksek total antioksidan düzeyi 2,5mM’lık grupta 7,54±0,38 ile belirlenmişken en düşük değer ise 4,85±0,26 ile 10mM’lık grupta bulunmuştur. Elde ettiğimiz en yüksek değer ile kontrol ve 5mM’lık grup arasında herhangi bir istatistiki fark ($p>0,05$) bulunamamış iken 7,5 ve 10 mM’lık grup ile aralarındaki fark ($p<0,05$) önemlidir. Total oksidan düzeyi değerlendirildiğinde ise en yüksek değer 16,86±0,89 ile 10mM’lık grupta, en düşük değer ise 11,71±0,59 ile 2,5mM’lık grupta belirlenmiştir. Total oksidan düzeyi ve oksidatif stres indeksi yönünden 10 mM’lık grubun kontrol ve diğer gruplar ile arasındaki farkın istatistiki olarak önemli ($p<0,05$) bulunduğu tespit edildi.

Çizelge 3.5: Dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametreleri ($X \pm SEM$, n:18).

Gruplar	MDA (nmol/ml)	GSH (mg/dl)	TAS	TOS	OSI
Kontrol	5,48±0,30 ^{ab}	0,38±0,00 ^a	6,88±0,13 ^{ab}	12,71±0,74 ^b	18,52±1,20 ^b
2,5mM	5,16±0,44 ^b	0,38±0,01 ^a	7,54±0,38 ^a	11,71±0,59 ^b	15,78±1,23 ^b
5mM	4,84±0,54 ^b	0,39±0,00 ^a	7,20±0,44 ^{ab}	11,74±0,36 ^b	16,72±1,45 ^b
7,5mM	5,64±0,44 ^{ab}	0,38±0,00 ^a	6,42±0,14 ^b	12,50±2,15 ^b	19,58±3,40 ^b
10mM	6,47±0,67 ^a	0,35±0,00 ^b	4,85±0,26 ^c	16,86±0,89 ^a	35,28±2,65 ^a

a-b: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir ($P < 0.05$).

4. TARTIŞMA

Kriyoprezervasyon işlemi, spermatozoonda çok fazla hasara neden olur ve bu da çözündürme sonrası kalitenin en az %50 düşmesine neden olur. Koyunlarda dondurulmuş sperma ile suni tohumlama halen istenilen başarıyı yakalayamamıştır, çünkü koyunlarda serviksin kıvrımlı yapısından dolayı suni tohumlama pistolesi serviksi geçemez. Sonuç olarak, sperma vajinada veya serviksin giriş kısmına yakın bir yerde bırakılır. Çözündürme sonrası sperma motilitesi taze spermaya göre daha az olduğu için servikse daha az sayıda spermatozoon penetre olur ve bu nedenle kaudal isthmusta optimum spermatozoon deposu oluşmaz. Bunun için, yeterli sayıda spermatozoonun uterusu girmesi ve gebe kalma oranının artması, çözündürme sonrası koç sperma kalitesinin iyileştirilmesi için her türlü çaba gösterilmektedir (Banday vd., 2017).

Spermatozoon membranı kriyoprezervasyon sırasında başlıca hasar bölgesidir. Bu hasar kriyoprotektanlarla ekilibrasyon ve soğutma sırasında meydana gelen hasar olarak ikiye ayrılabilir (Hammerstedt vd., 1990). Gliserol gibi intrasellüler kriyoprotektif ajanların yüksek yoğunlukları (%5-15 v/v) pek çok hayvan türünde spermatozoon kriyoprezervasyon ortamında hemen her zaman bulunduğu spermatozoonun bu ortamlarla ekilibrasyon süreci hücre hacminde büyük değişikliklere neden olabilir (Fuller vd., 2004). Yani kriyoprotektif ajan içeren ortama maruz kaldığında spermatozoon önce küçülür ve yavaş yavaş yeniden şişer. Spermatozoon hücreleri özellikle osmotik olarak indüklenen hacim değişikliklerine karşı son derece hassastır. Bu değişiklikler membran bütünlüğü, motilite ve akrozom bütünlüğünün kaybı gibi hasarlarla sonuçlanabilir (Oldenhof vd., 2013). Kriyoprotektanlarla ekilibrasyon sonrasında sperma soğutulur. Bu durum plazma membranında sıklıkla görülen başka bir hasar kaynağıdır (Holt ve North., 1994). Öncelikle dondurma çözündürme işlemi intrasellüler kriyoprotektanlar ve diğer ortam bileşenlerin ekstrasellüler konsantrasyonlarında büyük değişikliklere neden olur. Bu dondurma çözündürme kaynaklı osmolaritede ki değişiklik ve buna bağlı olarak osmos hücre hacminde dramatik değişikliklere neden olabilir ve böylece hücre membranları üzerinde önemli mekanik stres oluşturabilir (Noiles vd., 1995).

Ortamdaki iyonik bileşenlerin donma konsantrasyonunun hasarın temel bir kaynağı olduğu düşünülmektedir ve bu hasar, geçici olarak sıfırın altındaki sıcaklıklarda göreceli iyonik konsantrasyonları azaltan geçirgen (örn. gliserol veya etilen glikol) veya geçirgen olmayan kriyoprotektanlar (örn. sakaroz, rafinoz veya trehaloz) gibi ana noniyonik ortam bileşenleri tarafından bazı şekillerde hafifletilir (Lovelock., 1953). Ekstrasellüler buzun yokluğunda ve buna bağlı büyük osmotik gradyanların oluşmadığı durumlarda bile, soğutma nedeniyle meydana gelen faz geçişleri plazma membranının yapısını değiştirir (Sieme vd.,2015). Aslında, spermatozoonlardaki kriyohasarlارının çoğu, plazma membranının yapısal stabilitesi ile ilişkilidir ve bu nedenle plazma membranının bileşimi ile bağlantılıdır (De Leeuw vd., 1993). Örneğin, bazı fosfolipitler membran esnekliğini artırırken, kolesterol stabilize sağlar ve spermatozoonun kriyohasarna karşı direncini artırır (Dufourc., 2008). Düşük kolesterol-fosfolipit oranına sahip, asimetric kolesterol dağılımına sahip membranlar daha savunmasız görünmektedir. Ayrıca, membran fosfolipitlerinin yanıt hareketi genellikle 5 °C'nin altındaki sıcaklıklarda kısıtlanır ve bu sonunda akışkan fazdan jel fazına geçişi sağlar. Bu fenomenin bir sonucu olarak, membran lipidleri yeniden yapılandırılır, bazı kolesterol molekülleri salınır ve plazma membranındaki birçok integral protein, örneğin iyon kanalları, işlevsiz hale getirilemez bir şekilde kümelenir (Vadnaisve Althouse., 2011; Yeste., 2016). Tüm bu değişiklikler, membranın istikrarının bozulmasına ve seçici geçirgenliğinin kaybına yol açarak, Ca^{2+} ve bikarbonat gibi iyonların hücre dışı alandan akışını artırarak spermatozoonun kapasitasyonuna sebep olabilen dondurulmuş saklama sırasında meydana gelen membran hasarına neden olur (Watson., 2000).

Spermatozoon, kriyoprezervasyon sırasında büyük miktarda reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminden dolayı lipid peroksidasyonuna yatkın olan çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA) yüksek oranda içerir (Hezavehei vd., 2018). Sperma ve seminal plazmada bulunan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi çeşitli intrinsik antioksidan koruyucu sistemlerle ve metiyonin, C vitamini (askorbik asit) ve E vitamini (α - tokoferol) gibi enzimatik olmayan antioksidanlarla oksidatif strese karşı tepki gösterirler (Amidi vd., 2016). Bununla birlikte, mevcut antioksidan sistemlerin kapasitesi genellikle yeterli değildir ve etkinlikleri, kriyoprezervasyon işlemi sırasında sulandırma veya soğutma ile daha da

azalabilir, bu da endojen antioksidan savunma sistemini zayıflatır. Bu nedenle antioksidanlar kriyoprezervasyon stratejisi olarak, ROS'un spermatozoon üzerindeki zararlı etkisini azaltmak için kullanılırlar (Amidi vd., 2016).

Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayanlar olarak iki ana katagoriye ayrılır, her ikisi de soğuktan koruma sürecini iyileştirmek ve kriyohasarı azaltmak için etkili stratejiler olarak önemlidir (Amidi vd., 2016). Amino asitler, seminal plazmada bulunurlar ve antioksidan özelliklere sahip olmaları nedeniyle enzimatik olmayan süpürücüler olarak sayılırlar. Hipotaurin, glutamin, sistein, taurin, histidin, prolin ve glicin gibi çeşitli amino asitler, koç spermasının DNA hasarını azaltmak ve çeşitli dondurma ve çözündürme sonrası parametrelerini artırmak için kullanılmıştır (Bucak vd., 2009).

Arbutinin farklı kimyasal ve hücre bazlı antioksidan deneylerinde kullanıldığında önemli antioksidan aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Takebayashi vd., 2010). Bitki stres toleransındaki arbutinin olası bir fonksiyonu, kısmen veya tamamen dehidre olmuş, kurutulmuş veya donmuş yapraklardaki membran bozulmasını inhibe etmek olabilir (Aboagla ve Maeda.,2011). Arbutin; aşırı düşük sıcaklıklara veya uzun süreli kuraklığa dayanabilen bitki taksonlarında mevcut olduğundan, arbutinin çevresel strese karşı dirençte önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Lukas vd.,2010).

Arbutinin dondurma çözündürme işlemi sırasında spermatozoonu nasıl bir mekanizmayla koruduğu kesin olarak açıklığa kavuşturulmamıştır. Ancak suni tohumlama için, spermatozoonun donma sırasında büyük bir oranda hücre içi su kaybına dayanabilecek şekilde olması önemlidir. Kriyoprotektanların koruyucu etkilerinin, tuz konsantrasyonlarının azaltılması ve belki de hem donmamış su fraksiyonunun arttırılması hem de su kanallarının boyutunun arttırılması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Mazur ve Rigopoulos., 1983). Bu bilgilerin ışığında ve Aboagla ve Maeda (2011) 'nın keçi sperması üzerinde yaptığı çalışmada ki yararlı etkisine dayanarak arbutinin koç spermasının dondurulması üzerine antioksidan olarak kullanılması bu çalışmanın hipotezini oluşturmuştur. Çalışmamız koç spermasına arbutin katılan ilk çalışmadır. Hipotez çalışmasına dayanarak ilk etapta aynı dozlarda

arbutin ilave etmemize rağmen sperma dondurulamadığı için dozu yeniden düzenleyerek düşürdük ve tekrar denedik.

Koçlar üzerinde yaptığımız bu tez çalışmasında 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM arbutin ilave edilen gruplarda sırasıyla kontrol grubuna kıyasla motilite oranında daha yüksek sonuçlar bulduk. Aboagla ve Maeda (2011), keçiler üzerinde yaptıkları çalışmada 0.1M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M arbutin içeren grupların motilitelerini kontrol grubuna göre daha yüksek bulmuşlardır. Sonuçlar yapmış olduğumuz çalışmayla paralellik gösterse de iki çalışma arasındaki farkın öncelikle kullanılan dozlardan kaynaklandığı ayrıca tür farkının da önemli olduğunu düşünüyoruz. Yeni vd. (2022) koç spermasına 10, 50, 100, 250 ve 500 µg/ml hesperidin ekledikleri çalışmada en yüksek toplam motilite sonuçları 10 µg/ml’de ve 50 µg/ml’de belirlemişlerdir. Buna rağmen sperma sulandırıcısına eklenen hesperidin dozlarının kontrol grubuna kıyasla progresif motilite üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir koruyucu etkisinin olmadığını belirlemişlerdir. Ek olarak, 500 µg/ml dozunun sonucunu motilite üzerinde olumsuz bir etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada ki sonuçlar bizim çalışmamıza göre düşük oranda bulunmuştur. İki çalışma arasındaki farkın kullanılan antioksidan maddeden, antioksidan maddenin miktarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. İnanç vd. (2022) koç spermasına timokinon kattıkları çalışmalarında, 100 µg/ml’lik grubun kontrol ve 10 µg/ml’lik gruba kıyasla daha yüksek progresif motilite ve total motilite değerlerine sahip olduğunu belirlemişlerdir. 10 µg/ml’lik grubun dışında timokinonun, kontrol grubuna kıyasla 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml’lik tedavi gruplarındaki örneklerin motilite özelliklerini iyileştirdiğini belirlemişlerdir. Kontrol grubunun diğer gruplara göre düşük sonuç vermesi çalışmamızla paralellik göstermesine rağmen bulunan sonuçlar çalışmamızda elde edilen sonuçlardan daha düşüktür. İki çalışmanın sonuçlar açısından paralellik göstermemesinin sebebi diğer çalışmalarla benzer şekilde kullanılan antioksidan madde ve antioksidan maddenin dozunun farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Laoung-On vd. (2022), boğalar üzerinde yaptıkları çalışmada *N. nucifera* ekstraktlarında kuersetin, gallik asit, kateşin ve *p* -hidroksibenzoik asit eklemişlerdir. Spermaya *N. nucifera* ekledikleri çalışmada in vitro modelde spermatozoon motilitesini etkili bir şekilde artırdığını tespit etmişlerdir. Hussaini vd. (2017), tertbütil hidrokinon (tBHQ) kullanarak boğalar

üzerinde yaptıkları çalışmada tüm gruplar arasında 5 μ M'lük grupta toplam spermatozoon motilitesini kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olarak bulmuşlardır.

Çözüm sonrası spermatozoon motilitesinde gözlenen farklılığa yetiştirme şartları, yaş, bakım, besleme, sperma alma metodu, ırk, tür, mevsim gibi birçok temel faktörler etki edebileceği gibi dondurma işleminde kullanılan sperma sulandırıcılarına katılan antioksidanların miktar ve içerikleri, spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan tekniklerden çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimlerden ve analizi yapan kişi gibi faktörlerin yanında sperma alma metodunun da rolü olabilir.

CASA motilitesi açısından kontrol grubuna göre arbutin katılmış gruplardaki fark önemli ($p<0,05$) bulundu. VAP değerleri bakımından en düşük değer kontrol grubunda belirlendi fakat sadece 10 mM'lık arbutin içeren grupla arasında anlamlı bir fark ($p<0,05$) belirlenmiştir. VSL değerleri için en düşük değer 2,5 mM'lık grupta bulundu ve 10 mM'lık arbutin içeren grupla arasında anlamlı bir fark ($p<0,05$) belirlenmiştir. VCL değerleri için kontrol grubu diğer arbutin içeren gruplara göre düşük bulunmuştur ancak sadece 10 mM'lık arbutin içeren grupla arasında anlamlı bir fark ($p<0,05$) belirlenmiştir. ALH ve BCF değerlerine bakıldığında en yüksek değer 10 mM'lık grupta bulunmuş ve diğer gruplar ve kontrol grubuyla farkın ($p<0,05$) önemli olduğu görülmüştür. Hussaini vd. (2017), tertbütıl hidrokinon (tBHQ) kullanarak boğalar üzerinde yaptıkları çalışmada VSL değerini kontrol grubuna kıyasla 5 μ M'lık grubu önemli ölçüde daha düşük bulmuşlardır. LIN ve STR değerleri için kontrol grubu ve 2,5 μ M'lık gruplara göre 5 μ M tertbütıl hidrokinon ilave ettikleri grupta daha düşük sonuç elde etmişlerdir. İnanç vd. (2022) koç spermasına farklı dozajlarda timokinon uyguladıkları çalışmada en yüksek VCL ve ALH değerlerinin 100 μ g/ml 'lık grupta olduğunu belirlemişlerdir. Çoyan vd. (2011), Merinos koçlarının spermalarına farklı oranlarda sistein ve ergotiyoninin ekledikleri çalışmada, kontrol grubuna göre 2 ve 4 mM'lık ergotiyonin ilavesinin, VSL ve VCL yüzdelerini arttırdığını tespit etmişlerdir. Üç farklı dozda uygulanan ergotiyonin, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek VAP değeri belirlemişlerdir.

Söz konusu değerlere ilişkin bulgular ile diğer araştırmacıların bildirdiği veriler arasında görülen farklılıklar spermanın sulandırılması ve dondurulmasında kullanılan teknik ve yöntemlerin değişik olmasına, çözüm süresi ve sıcaklığındaki farklılıklara, analizi yapan görevli veya makineye bağlı olarak oluşmuş olabilir. Bu cihazlarda kullanılan yazılımların (SCA, Hamilton Thorne gibi) farklı kinetik parametre değerlerinin bulunması farklı sonuçlar çıkmasındaki en önemli etkenlerden biridir.

Orta kısım anomalilerinde 7,5 ve 10 mM'lık gruplardaki düşüşün diğer gruplar ve kontrol grubuna göre önemli ($p<0,05$) olduğu tespit edildi. Kuyruk anomalilerinde ise en düşük değer 2,5 mM'lık grupta bulunduğu 10 mM'lık grupla arasındaki farkın önemli ($p<0,05$) olduğu ve toplam anomalilere bakıldığında en yüksek değer kontrol grubunda en düşük değerin ise 7,5 mM'lık grupta belirlendiği ve farkın istatistiki olarak önemli ($p<0,05$) olduğu belirlendi.

Gündoğan vd. (2021) koç spermasına farklı dozlarda kafeik asit fenil ester ilave ederek yaptıkları çalışmada orta kısım anomalileri ile toplam anormal spermatozoon oranı bakımından kontrol grubuna göre 100 µg/ml kafeik asit fenil ester içeren gruptaki ve kuyruk kısmındaki anomaliler açısından 50 ve 100 µg/ml kafeik asit fenil ester içeren gruplardaki azalmayı önemli bulmuşlardır. Yaptığımız çalışma kuyruk kısmındaki anomaliler açısından bu çalışmayla paralellik göstermektedir. Santos vd. (2022), tetrafenilfosforyum (TPP+) ile konjugasyon yoluyla hidroksibenzoik asitlerden sentezlenen mitokondri hedefli bir antioksidan (AntiOxBEN2) geliştirip boğa spermasında kullanmışlardır. AntiOxBEN2'nin boğa spermatozoonunda yapısal anormalliklere neden olmadığını belirlemiştir.

Yapılan çalışmalarda elde edilen anormal spermatozoa oranları ile diğer çalışmalarda elde edilen oranlar arasında görülen farklılıklar koçların genotipik ve ırksal farklılıklarından, çalışmanın sezon içi veya sezon dışında gerçekleştirilmesinden, sperma alma metodu gibi faktörler, sperma sulandırıcısının içeriği, sulandırıcıda kullanılan yumurta sarısının oranı, sulandırıcılardaki antioksidanlar, dondurma ve çözündürme prosedürleri, değerlendirmede kullanılan teknikler ve muayeneyi yapan kişiler arasındaki farklılıklar gibi nedenlerden kaynaklanmış olabilir. Bunun yanı sıra türler arasındaki hücre membranlarında bulunan değişik orandaki kolesterol fosfolipit oranının çözüm sonu parametreler üzerine direkt etkisi olduğu düşünülmektedir.

Kolesterol fosfolipit oranındaki değişim doymamış yağ asit oranını etkilediği için soğuk şokuna karşı dirençde değişmektedir.

H+/E- değeri açısından kontrol grubuna göre 7,5 mM'lık grupta gözlenen artış önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. H-/E-, H+/E+ değerleri açısından ise kontrol ve diğer gruplar arasında anlamlı bir fark ($p>0,05$) bulunamamıştır. H+/E+ değerleri açısından ise 7,5 mM'lık grupta ki azalış anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. Aboagla vd. (2011) yaptıkları çalışmada 0,4 M arbutin eklenen grubun membran bütünlüğünü 0,1 ve 0,2 M arbutin eklenen gruba göre daha yüksek bulmuşlardır. Arbutinin bir fosfolipaz inhibitörü olarak işlev görmesi arbutinin bilinen bir fosfolipaz A inhibitörüne yapısal benzerliğine dayalıdır (Oliver vd.,1996). Arbutin, bir antioksidan olarak bilindiğinden ve ayrıca çoğunlukla dehidrate sistemlerde fosfolipaz A2 (PLA2) aktivitesini inhibe ettiği için kuru haldeyken membran bileşenlerinin korunmasına katkıda bulunabilir. Fosfolipaz A2 (PLA2) aktivitesinin inhibe edilmesi önemlidir çünkü PLA2, bir dizi biyolojik süreçte önemli rol oynayan lipid mediatörlerin üretimini kontrol eder. Bu lipid mediatörler arasında prostaglandinler, lökotrienler, pıhtılaşma aktivasyon faktörü (PAF) ve lizofosfolipitler bulunur. Bu nedenle, PLA2 aktivitesinin inhibe edilmesi, inflamasyon kontrolü, nöroproteksiyon, kardiyovasküler sağlık ve immünolojik süreçlerin düzenlenmesi gibi birçok durumda önemlidir. PLA2 inhibitörleri, bu etkileri elde etmek için potansiyel bir terapötik yaklaşım olabilir(Oliver vd., 2001).

Dondurma çözdüirme sonrası spermatozoon DNA hasarı değerlendirildiğinde 2,5; 5; 7,5 mM'lık gruplarda elde edilen değerler kontrol grubuna göre istatistiki olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Tail DNA değerlerine bakıldığında 2,5; 5; 7,5 mM'lık gruplarda elde edilen değerler ile kontrol ve 10 mM'lık grup arasındaki farkın istatistiki olarak önemli ($p<0,05$) olduğu gözlemlenmiştir. Tail moment parametresindeki 2,5; 5; 7,5 mM'lık gruplarla kontrol ve 10mM'lık gruplar arasındaki fark istatistikî olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. İnanç vd. (2022) koç spermasına farklı dozlarda timokinon uyguladıkları çalışmada kontrol grubuna kıyasla 50 µg/ml ve 100 µg/ml'lik gruplarda Tail lenght ve Tail DNA açısından DNA hasarına karşı timokinonun önemli koruma etkilerine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Trivedi vd. (2011) testiküler toksisite modelinde farklı dozajlarda hesperidin uyguladıkları ratlarda Tail lenght, Tail

moment ve Tail DNA üzerinde hesperidinin koruyucu bir etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Çözüm sonrası DNA hasarında gözlenen farklılıklar arasında koçların genotipik ve ırksal farklılıklarından, mevsim ve sperma alma metodu gibi faktörlerin yanı sıra sperma sulandırıcılarına katılan antioksidanların farklı olması, spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan tekniklerin farklılığı çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimler gibi etkenlerin de rolü olabilir.

Oksidatif stres yönünden MDA parametresi için 2,5 ve 5 mM'lık gruplarda belirlenen değerler 10 mM'lık gruba göre istatistiki olarak önemli ($p<0,05$) derecede düşük bulunmuştur. GSH parametresinde ise 10 mM'lık grupta belirlenen değer kontrol ve diğer gruplara göre istatistiki olarak farklı ($p<0,05$) bulunmuştur. En yüksek total antioksidan düzeyi 2,5mM'lık grup ile 7,5 ve 10 mM'lık grup arasındaki fark ($p<0,05$) önemli bulunmuştur. Total oksidan düzeyi ve oksidatif stres indeksi yönünden 10 mM'lık grubun kontrol ve diğer gruplar ile arasındaki farkın istatistiki olarak önemli ($p<0,05$) bulunduğu tespit edildi. Redoks tablosuna göre, yalnızca 10 mM konsantrasyonda arbutin oksidatif stres parametrelerinde değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. Arbutin'in daha düşük konsantrasyonlarında ise redoks dengesinde herhangi bir değişiklik olmamıştır. Arbutinin 10 mM konsantrasyon altında kullanılması, lipid peroksidasyonuna neden olmaması ve genel redoks dengesinin oksidanlar lehine bozulmaması nedeniyle, bu antioksidanın sulandırma ortamında kullanımını engellemektedir. Ancak, in vitro antioksidan özellikleriyle tanınan arbutin, bu çalışmada hücresel düzeyde etkilerini araştırırken metabolik süreçlere dahil olmaması nedeniyle bilinen antioksidan özelliğini kanıtlayamamış olabilir. Gündoğan vd. (2021) koç spermasına 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml kafeik asit fenil ester uyguladıkları çalışmada total antioksidan düzeyleri bakımından kontrol grubuna göre 10 ve 100 µg/ml kafeik asit fenil ester içeren gruplardaki artışın istatistikî olarak önemli olduğunu rapor etmiştir. Santos vd. (2022), tetrafenilfosforyum (TPP+) ile konjugasyon yoluyla hidroksibenzoik asitlerden türetilen mitokondri hedefli bir antioksidan (AntiOxBEN2) geliştirip boğa spermasında kullandıkları çalışmada 1 ve 10 µM konsantrasyonda AntiOxBEN2 ekledikleri boğa spermasında kontrol grubuna kıyasla diğer gruplarda AntiOxBEN2'nin hücre içi

oksidatif stresi azalttığını belirlemişlerdir. He vd. (2020), yaban domuzu spermaları in vitro olarak çeşitli oranlarda rosmarinik asit ilave edilmesinin spermatozoonda MDA oluşumunu önemli ölçüde azalttığını belirlemişlerdir. Kontrol grubundaki MDA düzeyi, 75 ve 100 μ M rosmarinik asit ilave edilmiş deney gruplarına göre daha yüksek olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Luño vd. (2015), domuzlar üzerinde yaptıkları çalışmada dondurma sırasında sulandırıcıya rosmarinik asit eklenmesinin, çözündürme sonrası spermatozoonda MDA oluşumunda önemli bir azalma olduğunu belirlemişlerdir. 105 μ M rosmarinik asit ilave edilmiş deney grubuna kıyasla kontrol grubundaki MDA düzeyini daha yüksek bulmuşlardır. Rasool vd. (2021) ratlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada MDA düzeyleri, 10 mg/ml'de etilen oksit alan grubu kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek olarak rapor etmişlerdir bu da etilen oksit ile tedavi edilen ratlarda hafifletilmiş oksidatif stresi göstermektedir. Bununla birlikte, etilen oksit alan ratlara 200 mg/kg ve 400 mg/kg'lık kızılçık ekstresi verilen gruplarda bulunan MDA sonuçları etilen oksit verilen ratlarda kızılçık ekstresinin iyileştirici etkilerini gösterir. Benzer şekilde, etilen oksit ve 200 mg/kg kızılçık ekstresi verilen grupta enzimatik antioksidanlarda ve intraselüler antioksidan aktivitede düşüş rapor etmişlerdir ve bu, etilen oksit ile tedavi edilen ratlarda değişmiş bir antioksidan yanıtına işaret etmektedir. Yeni vd. (2020) koç spermasına 1 mM Trolox ve 50 mM Taurin ekledikleri çalışmada antioksidan özellikte olan trolox ve taurinin çözüm sonu oksidatif stres düzeyinde anlamlı şekilde etki gösterdiğini, taurinin 50 mM eklendiği grupta en yüksek koruyuculu sağladığı tespit edilmiştir. Martins vd. (2023), yaptıkları çalışmanın Comet testi sonuçlarında metil ve bütıl parabenler ile tedavinin enzimatik antioksidanların aktivitesini artırdığını belirlemişlerdir.

Çözüm sonrası oksidatif stres parametrelerinde literatür bilgileri ile aralarında gözlenen farklılıklar koçların antioksidan kapasitelerinin farklı oluşuna genotipik ve ırksal farklılıklara, sperma sulandırıcısının içeriğinden, sulandırıcıda kullanılan değişik miktarlardaki antioksidan oranlarından, spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan tekniklerdeki farklılıklara, çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimlere, analizin yapıldığı yöntem ve analizi yapan kişi gibi faktörlere bağlı olarak da meydana gelmiş olabilir. Ayrıca, redoks sisteminin genel durumunun değerlendirildiği çalışmamızın, enzimatik sistem elemanlarının analizi daha ileride yapılacak çalışmalarla açıklığa kavuşturulacaktır.

5.SONUÇ

Sonuç olarak daha önce güçlü bir antioksidan olarak tespit edilmiş arbutin bu çalışmada da motiliteyi artırmış, anormal spermatozoon oranını azaltmış, plazma membran bütünlüğünü artırmış, oksidatif stres ve DNA hasarını azalttığı belirlenmiştir. Bu gibi yararlı etkilerinden dolayı sperma kriyoprezervasyonu için arbutinin sperma sulandırıcısına katılabilecek bir antioksidan olduğu kanaatine varılmıştır fakat bu alanda yapılmış yeterli bilgiye olmaması nedeniyle daha kapsamlı araştırmalar yapılmalıdır.



6. KAYNAKLAR

- Abascal, K., Yarnell, E. (2008). Botanical medicine for cystitis. *Alternative & Complementary Therapies*, 14(2): 69-77.
- Aboagla, E. M. E., Maeda, T. (2011). Arbutin's suppression of cryodamage in goat sperm and its mechanism of cryoprotection. *Theriogenology*, 76(3): 538-546.
- Adisa, R.A., Khan, A.A., Oladosu, I., Ajaz, A., Choudhary, M.I., Olorunsogo, O., Rahman A.U., (2011). Purification and characterization of phenolic compounds from the leaves of *Cnestis ferruginea* (De Candolle): investigation of antioxidant property. *Res. J. Phytochem.*, 5: 177-189
- Ahmad, E., Aksoy, M., Serin, İ., Küçük, N., Ceylan, A., Uçan, U. (2013). Cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment of ram spermatozoa protects structural integrity of plasma membrane during osmotic challenge and reduces their ability to undergo acrosome reaction in vitro. *Small ruminant research*, 115(1-3): 77-81.
- Alevra, A. I., Exadactylos, A., Mente, E., Papadopoulos, S. (2022). The Protective Role of Melatonin in Sperm Cryopreservation of Farm Animals and Human: Lessons for Male Fish Cryopreservation. *Animals*, 12(6): 791.
- Amidi, F., Pazhohan, A., Nashtaei, M. S., Khodarahmian, M., Nekoonam, S. (2016). The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and tissue banking*, 17(4): 745- 756.
- Banday, M. N., Lone, F. A., Rasool, F., Rashid, M., Shikari, A. (2017). Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. *Cryobiology*, 74: 25-30.
- Bang, S.H., Han, S.J., Kim, D.H. (2008) Hydrolysis of arbutin to hydroquinone by human skin bacteria and its effect on antioxidant activity. *J Cosmet Dermatol* 7:189–193
- Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Cormier, N., Sirard, M. A. (2002). Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*, 57(3): 1105-1122.
- Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sarıözkan, S., Ulutaş, P. A. (2009). Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research*, 81(1): 13-17.
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., Herráez, M. P. (2010). Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5): 623-635.
- Couteau, C., Coiffard, L. (2016). Overview of Skin Whitening Agents: Drugs and Cosmetic Products. *Cosmetics*, 3(3), 27. DOI:10.3390/cosmetics3030027
- Çoyan, K., Başpınar, N., Bucak, M. N., Akalın, P. P. (2011). Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. *Cryobiology*, 63(1): 1-6.
- De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B., Verkleij, A. J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30(1): 32-44.
- Deisinger, P. J. (1996). Human exposure to naturally occurring hydroquinone. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 47(1): 31-46.

- Dott, H. M., Foster, G. C. A. (1979). The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer. *Reproduction*, 55(1): 161-166.
- Draper, H. H., Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In *Methods in enzymology*, 186: 421-431.
- Dufourc, E. J. (2008). Sterols and membrane dynamics. *Journal of chemical biology*, 1(1-4): 63-77.
- Ekiert, H., Kwiecień, I., Szopa, A., Muszyńska, B. (2012). Possibilities of arbutin production using plant biotechnology methods. *Pol J Cosmetol*, 15: 151-162.
- Enguita, F. J., Leitão, A. L. (2013). Hydroquinone: environmental pollution, toxicity, and microbial answers. *BioMed research international*, DOI: 10.1155/2013/542168
- Ergürhan, O., 2019, Hidrokinon Molekülünün Katkılı Ve Katkısız Fullerenlerle Etkileşiminin Kuantum Mekaniksel Yöntemlerle İncelenmesi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 72s, İzmir.
- Esen, Ç., Alkan, B. A., Kınap, M., Akgül, Ö., Işıkoğlu, S., Erel, Ö. (2012). The effects of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis on serum and gingival crevicular fluid total antioxidant/oxidant status and oxidative stress index. *Journal of periodontology*, 83(6), 773-779.
- Faigl, V., Vass, N., Jávör, A., Kulcsár, M., Solti, L., Amiridis, G., Cseh, S. (2012). Artificial insemination of small ruminants—A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 60(1), 115-129.
- Feng, T. Y., Lv, D. L., Zhang, X., Du, Y. Q., Yuan, Y. T., Chen, M. J., Hu, J. H. (2020). Rosmarinic acid improves boar sperm quality, antioxidant capacity and energy metabolism at 17 C via AMPK activation. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(12), 1714-1724.
- Fuller, B. J., Lane, N., Benson, E. E. (2004). *Life in the frozen state*. CRC press.
- Gatimel, N., Moreau, J., Parinaud, J., Léandri, R. D. (2017). Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology*, 5(5), 845-862.
- Gemot S, Ulrich P, Benno B, Alexander N, Jörg W, Nils K, Ingmar G, Markus V (2002). Urinary excretion and metabolism of arbutin after oral administration of *Arctostaphylos uva-ursi* extract as filmcoated tablets and aqueous solution in healthy humans. *J Clin Pharmacol* 42:920–927
- Gunawan, M., Setiorini, S., Fitri, H. N., Kaiin, E. M. (2020). The effect of siam orange juice (*Citrus nobilis* Lour.) in extender on Garut Ram (*Ovis aries* L.) spermatozoa quality post-cryopreservation. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1442, No. 1, p. 012068).
- Gündoğan M., Yeni, D., Avdatek, F., Hazman, Ö. (2021) Koçlarda spermaya katılan CAPE'in (caffeic acid phenethyl ester) dondurma ve çözündürme sonrası spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkileri. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 270-277.
- Gundogan, M., Avdatek, F., Yeni, D. (2011). Effect of extenders on motility, morphology and osmotic resistance parameters of ram sperm during liquid storage. *Rev. Méd. Vét*, 162, 546-551.

- Hafez E.S.E. Reproduction in Farm Animals. 6th edition, Wiley-Blackwell, Philadelphia, 1993, s. 330-343.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of andrology*, 11(1), 73-88.
- Han RZ, Li JH, Shin HD, Chen RR, Du GC, Liu L, Chen J (2014) Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications. *Biotechnol Adv* 32:415–428
- Hazman, Ö., Sariova, A., Bozkurt, M. F., Cigerci, İ. H. (2021). The anticarcinogen activity of β -arbutin on MCF-7 cells: Stimulation of apoptosis through estrogen receptor- α signal pathway, inflammation and genotoxicity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476(1), 349-360.
- He, Y., Li, D., Zhang, W., Tian, X., Pang, W., Du, R., Yu, T. (2020). Boar sperm quality and oxidative status as affected by rosmarinic acid at 17 C. *Tropical Animal Health and Production*, 52, 2169-2177.
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive biomedicine online*, 37(3), 327-339.
- Hissin, P. J., Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry*, 74(1), 214-226.
- Hoberman, A. M., Schreur, D. K., Leazer, T., Daston, G. P., Carthew, P., Re, T., Mann, P. (2008). Lack of effect of butylparaben and methylparaben on the reproductive system in male rats. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 83(2), 123-133.
- Holt, W. V., North, R. D. (1994). Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 51(3), 414-424.
- Hussaini, S. M. H., Zhandi, M., Shahneh, A. Z., Sharafi, M., Nejati-Javaremi, A., Yousefi, A., Martinez-Pastor, F. (2017). Effect of tert-butyl hydroquinone on bull semen cryopreservation. *CryoLetters*, 38(5), 372-378.
- İnanc, M. E., Gungor, S., Ozturk, C., Korkmaz, F., Bastan, I., Cil, B. (2019). Cholesterol-loaded cyclodextrin plus trehalose improves quality of frozen-thawed ram sperm. *Veterinární medicína*, 64(3), 118-124.
- Ioku, K., Terao, J., Nakatani, N. (1992) Antioxidative activity of arbutin in a solution and liposomal suspension. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 1658–1659
- İnanc, M. E., Güngör, Ş., Avdatek, F., Yeni, D., Gülhan, M. F., Olğaç, K. T., Taşdemir, U. (2022). Thymoquinone improves motility, plasma membrane integrity and DNA integrity of frozen–thawed ram semen. *Andrologia*, 54(10), e14547.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*, 70(1), 219-228.
- Jeyendran, R. S., Van Der Ven, H. H., Kennedy, W., Perez–Pelaez, M. A. R. I. A. N. O., Zaneveld, L. J. (1984). Comparison of Glycerol and a Zwitter Ion Buffer System as Cryoprotective Media for Human Spermatozoa: Effect on Motility, Penetration of Zona-free Hamster Oocytes, and Acrosin/Proacrosin. *Journal of andrology*, 5(1), 1-7.

- Jurica, K., Gobin, I., Kremer, D., Cepo, D.V., Grubescic, R.J., Karaconji, I.B., Kosalec, I. (2017) Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves. *J Herb Med* 8:17–23
- Kaymakçı, M., Taşkın, T. (2001). Batı Anadolu ve Trakyaâ da Melezleme ile Elde Edilen Yeni Koyun Tipleri. *Hayvansal Üretim*, 42(2).
- Kaymakçı, M., Taşkın, T., Koşum, N. (2002). Sönmez Koyunlarında Tip Sabitleştirilmesi Döl Verimi ve Gelişme Özellikleri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 39(2).
- Khan, D. R., Ahmad, N., Anzar, M., Channa, A. A. (2009). Apoptosis in fresh and cryopreserved buffalo sperm. *Theriogenology*, 71(5), 872-876.
- Kruger, T. F., Menkveld, R., Stander, F. S., Lombard, C. J., Van der Merwe, J. P., van Zyl, J. A., Smith, K. (1986). Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 46(6), 1118-1123.
- Krzyzosiak, J., Evenson, D., Pitt, C., Jost, L., Molan, P., Vishwanath, R. (2000). Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. *Reproduction, Fertility and Development*, 12(6), 251-261.
- Lan, Q., Xie, Y., Cao, J., Xue, L., Li, J., Zhao, F., Lin, R., Fang, S., Xiao, T.(2021). Effect of P-coumaric Acid on the Quality of Boar Semen Preserved at Room Temperature. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 48(8): 2928-2936.
- Laoung-On, J., Jaikang, C., Saenphet, K., Sudwan, P. (2022). Effect of Nelumbo nucifera Petals Extract on Antioxidant Activity and Sperm Quality in Charolais Cattle Sperm Induced by Mancozeb. *Plants*, 11(5), 637.
- Lee, H.J., Kim, K.W. (2012) Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Inflamm Res* 61:817–825
- Levitt, J. (2007). The safety of hydroquinone: a dermatologist's response to the 2006 Federal Register. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57(5), 854-872.
- Lovelock, J. E. (1953). The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochimica et biophysica acta*, 10, 414-426.
- Lukas, B., Schmiderer, C., Mitteregger, U., Novak, J. (2010). Arbutin in marjoram and oregano. *Food Chemistry*, 121(1), 185-190.
- Luño, V., Gil, L., Olaciregui, M., Grandía, J., Ansó, T., De Blas, I. (2015). Fertilisation rate obtained with frozen-thawed boar semen supplemented with rosmarinic acid using a single insemination timed according to vulvar skin temperature changes. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63(1), 100-109.
- Lv, C., Wu, G., Hong, Q., Quan, G. (2019). Spermatozoa cryopreservation: state of art and future in small ruminants. *Biopreservation and biobanking*, 17(2), 171-182.
- Malo, A. F., Garde, J. J., Soler, A. J., García, A. J., Gomendio, M., Roldan, E. R. (2005). Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biology of reproduction*, 72(4), 822-829.
- Martins, F. C., Oliveira, M. M., Gaivão, I., A. Videira, R., Peixoto, F. (2023). The administration of methyl and butyl parabens interferes with the enzymatic antioxidant system and induces genotoxicity in rat testis: possible relation to male infertility. *Drug and Chemical Toxicology*, 1-8.

- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology-cell physiology*, 247(3), C125-C142.
- Mazur, P., Rigopoulos, N. (1983). Contributions of unfrozen fraction and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes: influence of warming rate. *Cryobiology*, 20(3), 274-289.
- Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*, 57(1), 327-344.
- Migas, P., Krauze-Baranowska, M. (2015). The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. *Phytochemistry Letters*, 13, 35-40.
- Mocé, E., Blanch, E., Tomás, C., Graham, J. K. (2010). Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 57-66.
- Mov, R. E. B. (2006). Comparative efficacy and safety of deoxyarbutin, a new tyrosinase-inhibiting agent. *J Cosmet Sci*, 57, 291-308.
- Nagle, W. A., Soloff, B. L., Moss Jr, A. J., Henle, K. J. (1990). Cultured Chinese hamster cells undergo apoptosis after exposure to cold but nonfreezing temperatures. *Cryobiology*, 27(4), 439-451.
- Nishi, K., Ramakrishnan, S., Gunasekaran, V. P., Parkash, K., Ramakrishnan, A., Vijayakumar, N., Ganeshan, M. (2018). Protective effects of p-coumaric acid on ethanol induced male reproductive toxicity. *Life sciences*, 209, 1-8.
- Noiles, E. E., Bailey, J. L., Storey, B. T. (1995). The temperature dependence in the hydraulic conductivity, L_p , of the mouse sperm plasma membrane shows a discontinuity between 4 and 0 C. *Cryobiology*, 32(3), 220-238.
- Nordlund, J., Grimes, P., Ortonne, J. (2006). The safety of hydroquinone. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 20(7), 781-787.
- Oehninger, S., Kruger, T. F. (2021). Sperm morphology and its disorders in the context of infertility. *F&S Reviews*, 2(1), 75-92.
- Oishi, S. (2004). Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. *Food and chemical toxicology*, 42(11), 1845-1849.
- Oldenhof, H., Gojowsky, M., Wang, S., Henke, S., Yu, C., Rohn, K., Wolkers W. F., Sieme, H. (2013). Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents. *Biology of reproduction*, 88(3), 68-1.
- Oliver, A. E., Crowe, L. M., de Araujo, P. S., Fisk, E., Crowe, J. H. (1996). Arbutin inhibits PLA2 in partially hydrated model systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1302(1), 69-78.
- Oliver, A. E., Hinch, D. K., Tsvetkova, N. M., Vigh, L., Crowe, J. H. (2001). The effect of arbutin on membrane integrity during drying is mediated by stabilization of the lamellar phase in the presence of nonbilayer-forming lipids. *Chemistry and physics of Lipids*, 111(1), 37-57.
- Öztürk, A. E., Bucak, M. N., Bodu, M., Başpınar, N., Çelik, İ., Shu, Z., Keskin, N., Gao, D. (2019). Cryobiology and cryopreservation of sperm. In *Cryopreservation-Current Advances and Evaluations*. London, UK: IntechOpen.
- Lubsandorzhieva, P.B., Zhigzhitov, B.S., Dargaeva, T.D., Bazarova, Z.G., Nagaslaeva, L.A. (2000). Chromatospectrophotometric determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) *Pharm. Chem. J.*, 34, pp. 261-264

- Palacin-Martinez, C., Alvarez, M., Montes-Garrido, R., Neila-Montero, M., Anel-Lopez, L., de Paz, P., Anel, L., Riesco, M. F. (2022). Frequency of Semen Collection Affects Ram Sperm Cryoresistance. *Animals*, 12(12), 1492.
- Parimelazhagan, T., Thangaraj, P. (2016). In Vivo Antioxidant Assays. *Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products*, 89-98.
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H. S., Cho, C., Hong, M. C., Shin, M. K., Bae, H. (2006). Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(11), 921-934.
- Pavlović, R. D., Lakušić, B., Došlov-Kokoruš, Z., Kovačević, N. (2009). Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64(10), 656-659.
- Peña, F. J., Johannisson, A., Wallgren, M., Rodríguez-Martínez, H. (2003). Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology*, 60(4), 677-689.
- Peris-Frau, P., Martín-Maestro, A., Iniesta-Cuerda, M., Sánchez-Ajofrín, I., Cesari, A., Garde, J. J., Soler, A. J. (2020). Cryopreservation of ram sperm alters the dynamic changes associated with in vitro capacitation. *Theriogenology*, 145, 100-108.
- Peris-Frau, P., Soler, A. J., Iniesta-Cuerda, M., Martín-Maestro, A., Sánchez-Ajofrín, I., Medina-Chávez, D. A., Garde, J. J. (2020). Sperm cryodamage in ruminants: understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2781.
- Pesch, S., Hoffmann, B. (2007). Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie-Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology*, 4(2), 101-105.
- Pool, K. R., Rickard, J. P., De Graaf, S. P. (2021). Melatonin improves the motility and DNA integrity of frozen-thawed ram spermatozoa likely via suppression of mitochondrial superoxide production. *Domestic Animal Endocrinology*, 74, 106516.
- Purdy, P. H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research*, 63(3), 215-225.
- Ramón, M., Pérez-Guzmán, M. D., Jiménez-Rabadán, P., Estes, M. C., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Anel-López, L., Soler, A.J., Fernández-Santos, M.R., Garde, J. J. (2013). Sperm cell population dynamics in ram semen during the cryopreservation process. *PloS one*, 8(3), e59189.
- Ramu, S., Jeyendran, R. S. (2013). The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. *Spermatogenesis: Methods and protocols*, 21-25.
- Rasool, M., Malik, A., Abdul Basit Ashraf, M., Mubbin, R., Ayyaz, U., Waquar, S., Achakzai, N. M. (2021). Phytochemical analysis and protective effects of Vaccinium macrocarpon (cranberry) in rats (*Rattus norvegicus*) following ethylene oxide-induced oxidative insult. *Bioengineered*, 12(1), 4593-4604.
- Riesco, M. F., Alvarez, M., Anel-Lopez, L., Neila-Montero, M., Palacin-Martinez, C., Montes-Garrido, R., Anel, L. (2021). Multiparametric study of antioxidant effect on ram sperm cryopreservation—from field trials to research bench. *Animals*, 11(2), 283.
- Riesco, M. F., Alvarez, M., Anel-Lopez, L., Neila-Montero, M., Palacin-Martinez, C., Montes-Garrido, R., Boixo, J. C., de Paz, P., Anel, L. (2021). Multiparametric study of

- antioxidant effect on ram sperm cryopreservation—from field trials to research bench. *Animals*, 11(2), 283.
- Ros-Santaella, J. L., Pintus, E. (2021). Plant extracts as alternative additives for sperm preservation. *Antioxidants*, 10(5), 772.
- Saeedi, M., Khezri, K., Seyed Zakaryaei, A., Mohammadamini, H. (2021). A comprehensive review of the therapeutic potential of α -arbutin. *Phytotherapy Research*, 35(8), 4136-4154.
- Saha, A., Asaduzzaman, M., Bari, F. Y. (2022). Cryopreservation techniques for ram sperm. *Veterinary Medicine International*, 2022.
- Samali, A., Orrenius, S. (1998). Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell stress & chaperones*, 3(4), 228.
- Santos, J. C., Marques, C. C., Baptista, M. C., Pimenta, J., Teixeira, J., Montezinho, L., Pereira, R. M. (2022). Effect of a Novel Hydroxybenzoic Acid Based Mitochondria Directed Antioxidant Molecule on Bovine Sperm Function and Embryo Production. *Animals*, 12(7), 804.
- Sariözkan, S., Tuncer, P. B., Bucak, M. N., Ulutaş, P. A. (2009). Influence of various antioxidants on microscopic-oxidative stress indicators and fertilizing ability of frozen-thawed bull semen. *Acta Veterinaria Brno*, 78(3), 463-469.
- Seyfizadeh, N., Mahjoub, S., Zabihi, E., Moghadamnia, A., Pouramir, M., Mir, H., Elahimanesh, F. (2012). Cytoprotective effects of arbutin against tert-butyl hydroperoxid induced toxicity in Hep-G2 cell line. *World Appl Sci J*, 19(2), 163-167.
- Sharafi, M., Borghei-Rad, S. M., Hezavehei, M., Shahverdi, A., Benson, J. D. (2022). Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current Challenges, Applications, and Prospective Strategies. *Animals*, 12(23), 3271.
- Sieme, H., Oldenhof, H., Wolkers, W. F. (2015). Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 20-26.
- Silva, S. V., Soares, A. T., Batista, A. M., Almeida, F. C., Nunes, J. F., Peixoto, C. A., Guerra, M. M. P. (2011). In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reproduction in domestic animals*, 46(5), 874-881.
- Simon, L., Carrell, D. T. (2013). Sperm DNA damage measured by comet assay. *Spermatogenesis: Methods and Protocols*, 137-146.
- Singer, S. J., Nicolson, G. L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes: Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids. *Science*, 175(4023), 720-731.
- Sönmez, R., Kaymakçı, M., Eliçin, A., Tuncel, E., Wassmuth, R., Taşkın, T. (2009). Türkiye Koyun Islahı Çalışmaları. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(2), 43-65.
- Taha, M. M. E., Salga, M. S., Ali, H. M., Abdulla, M. A., Abdelwahab, S. I., Hadi, A. H. A. (2012). Gastroprotective activities of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. revisited: Role of arbutin. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(1), 273-281.
- Takebayashi, J., Ishii, R., Chen, J., Matsumoto, T., Ishimi, Y., Tai, A. (2010). Reassessment of antioxidant activity of arbutin: multifaceted evaluation using five antioxidant assay systems. *Free radical research*, 44(4), 473-478.

- Trivedi, P. P., Tripathi, D. N., Jena, G. B. (2011). Hesperetin protects testicular toxicity of doxorubicin in rat: role of NFκB, p38 and caspase-3. *Food and chemical toxicology*, 49(4), 838-847.
- Tuncer, P. B., Bucak, M. N., Sarıözkan, S., Sakin, F., Yeni, D., Çiğerci, İ. H., Ateşşahin, A., Avdatek, F., Gündoğan, M., Büyükleblebici, O. (2010). The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (*Capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. *Cryobiology*, 61(1), 89-93.
- TÜİK, Hayvansal Üretim İstatistikleri. Erişim: <http://www.tuik.gov.tr> 2020, Erişim tarihi: 25.05.2023.
- Uluyol, O. (2018). Kuersetin Merinos Irkı Koç Spermasının Akrozom Reaksiyonu Üzerindeki Etkinliğinin Araştırılması, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 53s, Erzurum.
- Upreti, G. C., Hall, E. L., Koppens, D., Oliver, J. E., Vishwanath, R. (1999). Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. *Animal Reproduction Science*, 56(2), 107-121.
- Vadnais, M. L., Althouse, G. C. (2011). Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology*, 76(8), 1508-1516.
- Vernet, P., Aitken, R. J., Drevet, J. R. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and cellular endocrinology*, 216(1-2), 31-39.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1), 149-179.
- Vozaf, J., Svoradová, A., Baláži, A., Vašíček, J., Olexiková, L., Dujíčková, L., Makarevich, A.V., Jurčík, R., Ďuranová, H., Chrenek, P. (2022). The Cryopreserved Sperm Traits of Various Ram Breeds: Towards Biodiversity Conservation. *Animals*, 12(10), 1311.
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60, 481-492.
- Westerhof, W., Kooyers, T. J. (2005). Hydroquinone and its analogues in dermatology—a potential health risk. *Journal of cosmetic dermatology*, 4(2), 55-59.
- Williams, H., Martins da Silva, S. (2019). Semen analysis and sperm function tests. In *Subfertility, Reproductive Endocrinology and Assisted Reproduction* (pp. 48-54). Cambridge University Press.
- Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., Yeste, M. (2021). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 106904.
- Yavaş, İ. (2008). Koç Spermasının Farklı Oranlarda Sükroz İçeren Sulandırıcılar İle Gliserollüve Gliserolsüz Dondurulması, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 75s, Ankara.
- Yeni, D., Avdatek, F. (2019). The effect of intravaginal sponge treatment on fertility rates in Ewe of sonmez. In *4th International Congress on Advances in Veterinary Science and Technics (ICAVST), Kiev, Ukraine, 10-14 July 2019. Book of Proceedings* (pp. 39-42). Organising Committee, 4th International Congress on Advances in Veterinary Science and Technics (ICAVST) 2019.
- Yeni, D., Güngör, Ş., Avdatek, F., Gülhan, M. F., Olğaç, K. T., İnanç, M. E., Taşdemir, U. (2022). Investigation of changes in spermatozoon characteristics, chromatin structure,

and antioxidant/oxidant parameters after freeze-thawing of hesperidin (Vitamin P) doses added to ram semen. *Life*, 12(11), 1780.

- Yeni, D., Güngör, Ş., Avdatek, F., İnanç, M., Taşdemir, U. (2020). Koç Spermasının Dondurulmasında Oksidatif Stres Üzerine Trolox ve Taurinin Etkisi. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(3), 108-113.
- Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85(1), 47-64.
- Yeung, C. H. (2010). Aquaporins in spermatozoa and testicular germ cells: identification and potential role. *Asian journal of andrology*, 12(4).
- Zhu W, Gao J (2008) The use of botanical extracts as topical skinlightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. *J Investig Dermatol Symp Proc* 13:20–24
- Zhu X, Tian Y, Zhang W, Zhang T, Guang C, Mu W (2018) Recent progress on biological production of α -arbutin. *Appl Microbiol Biotechnol* 102(19):8145–8152.
- Zhu, W., Cheng, X., Ren, C., Chen, J., Zhang, Y., Chen, Y., Jia, X., Wang, S., Sun, Z., Zhang, R., Zhang, Z. (2020). Proteomic characterization and comparison of ram (*Ovis aries*) and buck (*Capra hircus*) spermatozoa proteome using a data independent acquisition mass spectrometry (DIA-MS) approach. *PLoS One*, 15(2), e0228656.