



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOÇ SPERMASININ DONDURULMASINDA SULANDIRICIYA EKLENEN
SAFRANALIN BAZI SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Ali Burak BALKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER DÖLERME ve SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Şükrü GÜNGÖR

BURDUR-2024

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOÇ SPERMASININ DONDURULMASINDA SULANDIRICIYA EKLENEN
SAFRANALIN BAZI SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Ali Burak BALKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER DÖLERME ve SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Şükrü GÜNGÖR

Bu araştırma *Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü* tarafından 0884-YL-23/ 2017K12-41003 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2024

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca yardımlarını her zaman hissettiğim danışman hocam Doç. Dr. Şükrü GÜNGÖR'e, spermatolojik analizlerin yapılmasında önemli katkılar sunan Prof. Dr. Ayhan ATA'ya, Doç. Dr. Muhammed Enes İNANÇ'a ve Dr. Öğr. Üyesi Fırat KORKMAZ'a yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Öğr. Gör. Hasan Ali ÇAY, Öğr. Gör. Durmuş KAHRAMAN, Vet. Hek. Mine HERDOĞAN, Vet. Hek. Feyza Nur MART'a, eşim Doç. Dr. Burcu Menekşe BALKAN'a kızım Beren BALKAN ve oğlum Bertuğ BALKAN'a hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu dönemde de bana her zaman destek olan aileme teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vi
TABLolar	vii
SİMGELELER ve KISALTMALAR	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Koçlarda Spermatogenesis	4
2.2. Koçlarda Sperma Alma Yöntmleri	4
2.2.1. Suni Vajina Yöntemi ile Sperma Alınması	4
2.2.2. Elektro-Ejakülatör Yöntemi ile Spermanın Alınması	5
2.2.3. Normal Aşım Sonrası Vajinada Birikmiş Spermanın Geri Alınması	6
2.2.4. Ampulla Masajı ile Sperma Eldesi	6
2.3. Spermanın Kriyoprezervasyonu	7
2.3.1. Spermanın Sulandırılması	8
2.3.2. Spermanın Soğutulması	10
2.3.3. Spermanın Dondurulması	10
2.3.4. Spermanın Çözdürülmesi	11
2.4. Serbest Radikaller	12
2.4.1. Serbest Radikal Kaynakları	13
2.5. Serbest Radikallerin Spermatozoon Üzerindeki Etkileri	14
2.6. Antioksidanlar	16
2.6.1. Enzimatik Antioksidanlar	17
2.6.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	19
2.7. Safran ve Safranalin Yapısı	20
2.8. Safran'ın Antioksidan Etkileri	23
3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1. Koçların Seçimi	25
3.2. Spermanın Alınması ve Değerlendirilmesi	25
3.3. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması	26
3.3.1. Spermanın Sulandırılması	26
3.3.2. Spermanın Dondurulması	27
3.4. Çözüm Sonu Parametrelerin Analizi	27
3.4.1 Çözüm Sonu Spermatozoa Motilitesi	27
3.4.2. Flow Sitometri Analizleri	28
3.5. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	56

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Safranın başlıca biyolojik olarak aktif bileşenleri

22



TABLÖLAR

Tablo 4.1.	Koçlara ait spermatolojik özellikler	30
Tablo 4.2.	Farklı dozlarda kullanılan safranalın çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkisi	30



SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
ATP	Adenozin Trifosfat
BALF	Bronkoalveolar lavaj sıvısı
C ₄₄ H ₄ O ₂₄	Krosin
CAT	Katalaz
Cd	Kadmiyum
CH ₂	Metilen
cm	Santimetre
Cu	Bakır
DHA	Dokosaheksaenoik asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EC	Ekstraselüler
FSC-A	İleri Saçılma Alanı
FSC-H	İleri Saçılma Yüksekliği
FTS	Fizyolojik tuzlu su
G6PD	Glikoz 6-fosfat dehidrojenaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HMMP	Yüksek mitokondriyal membran potansiyeli
kg	Kilogram
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Mn	Manganez
mOsm	Miliozmol
NADPH	Nikatinamidadenindinükleotid fosfat
nm	Nanometre
NO	Nitrik oksit
O ₂	Süperoksit
OH ⁻	Hidroksil
PBS	Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi
pH	Potansiyel Hidrojen
PI	Propidyum İyodür
PMAI	Plazma membran ve akrozom bütünlüğü
PNA	Peptit Nükleik Asit
PUFA	Çoklu doymamış yağ asiti
RNT	Reaktif Nitrojen türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri

RST	Reaktif sülfür türleri
SH	Sülfidril
SOD	Süperoksit dismutaz
SSC-A	Yan Saçılma Alanı
UV	Ultraviyole
XO	Ksantin oksidaz
Zn	Çinko



ÖZET

Koç spermasının Dondurulmasında Sulandırıcıya Eklenen Safranalin Bazı Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkisinin Araştırılması

Sunulan bu çalışmada koç sperma sulandırıcısına farklı dozlarda eklenen safranalin çözümü sonu bazı spermatolojik özellikler üzerine etkisinin ortaya konulması amaçlandı. Bu amaçla, sezon içerisinde 5 baş koçtan elektroejakülatör yöntemiyle alınan spermalar kullanılarak 5 eşit hacime bölündü. Çalışma grupları sırasıyla kontrol (antioksidansız, K); safranalin 0,25 mM (S0,25); safranalin 0,5 mM (S0,5); safranalin 1 mM (S1) ve safranalin 2 mM (S2) olacak şekilde oluşturulduktan sonra ml'sinde 8×10^8 spermatozoa olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırılmış sperma 0,25ml hacminde payetlere çekildikten sonra $+5^{\circ}\text{C}$ 'de 2,5 saat süresince ekilibrasyona bırakıldı. Sonrasında 12 dakika süresince azot buharında dondurulan payetler analizleri yapılmaya kadar -196°C 'de sıvı azot içerisinde saklandı. Çalışma grupları dondurma-çözdürme sonu; motilite, plazma membran ve akrozom bütünlüğü (Plasma membrane integrity, PMAI), viabilite ve yüksek mitokondriyal membran aktivitesi (High mitochondrial membrane potential, HMMP) bakımından değerlendirildi. Buna göre, çözümü sonu en yüksek motilite değerleri S0,25 ve S0,5 gruplarında elde edildi. Safranalin 2 mM dozu ilave edilen grupta çözümü sonu motilite değeri en düşük olarak belirlendi ($p < 0,05$). PMAI analizinde en yüksek koruma S0,5 grubunda görülürken, istatistiksel olarak kontrol grubuna göre önemli bulunmadı ($p > 0,05$). S2 grubunda ise en düşük PMAI elde edildi ($p < 0,05$). Koç spermasının safranalin farklı dozlarını içeren sulandırıcılar ile dondurulması sonrası çözümü sonu viabilite oranının değerlendirildiği SYBR-14/PI analizi sonucuna göre en yüksek viabilite S0,25 ve S0,5 grubundan elde edildi ve bu sonuç kontrol grubuna karşı önemli bulunmazken, S2 grubuna göre önemli bulundu ($p < 0,05$). HMMP analiz sonuçlarına göre S0,25 ve S0,5 grupları diğer gruplardan daha yüksek HMMP düzeyi gösterdiği belirlendi ($p < 0,05$). Sonuç olarak koç spermasının dondurulmasında sulandırıcıya katılan safranalin düşük dozlarının koç spermasının dondurulmasında kullanılabileceği ancak yüksek doz olarak belirlenen 2mM dozunun olumsuz etki göstermesinden dolayı kullanılmaması gerektiği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kriyoprezervasyon, Koç, Safranalin, Sperma, Spermatolojik Parametreler

ABSTRACT

Investigation of the Effect of Safranal Added to Extender on Some Spermatological Parameters in Freezing Ram Sperm

The aim of this study was to investigate the effect of adding different doses of safranal to ram semen extender on certain spermatological parameters without compromising the overall meaning. For this purpose, ejaculates obtained through electroejaculation from 5 mature rams during the breeding season were divided into five equal volumes. After creating the study groups as follows: control (without antioxidant, K); safranal 0.25 mM (S0.25); safranal 0.5 mM (S0.5); safranal 1 mM (S1); and safranal 2 mM (S2), the semen samples were diluted to a concentration of 8×10^8 spermatozoa per ml. After dilution, the samples were drawn into straws at a volume of 0.25 ml and left to equilibrate for 2.5 hours at $+5^\circ\text{C}$. Subsequently, the straws were frozen in liquid nitrogen at -196°C for 12 minutes and stored until further analyses were conducted. Post-thaw evaluations of the study groups included assessments of motility, plasma membrane and acrosome integrity (PMAI), viability, and high mitochondrial membrane potential (HMMP). According to the results, the highest post-thaw motility values were obtained in the S0.25 and S0.5 groups. The group with safranal 2 mM addition exhibited the lowest post-thaw motility ($p < 0.05$). The highest PMAI was observed in the S0.5 group, although it was not statistically significant compared to the control group ($p > 0.05$). The lowest PMAI was obtained in the S2 group ($p < 0.05$). Post-thaw viability, as evaluated by SYBR-14/PI analysis, showed the highest values in the S0.25 and S0.5 groups, which were significantly different from the S2 group ($p < 0.05$). HMMP analysis revealed that the S0.25 and S0.5 groups had higher levels compared to the other groups ($p < 0.05$). In conclusion, it was determined that low doses of safranal in the semen extender can be used for ram semen cryopreservation, but the high dose of 2 mM should be avoided due to its negative impact on sperm quality.

Key Words: Cryopreservation, Ram, Safranal, Semen, Spermatologic Parameters

1.GİRİŞ

İnsanoğlunun tarih boyunca karşılaştığı en büyük sorunlardan biri, yetersiz ve dengesiz beslenme olmuştur. Yeterli ve dengeli beslenme açısından, hayvansal gıdalara erişim oldukça önemlidir. Türkiye ekonomisi için, koyun-keçi yetiştiriciliği önemli bir kaynaktır, çünkü bu faaliyet et, süt, yün, tiftik, kıl ve deri üretimine katkıda bulunur. Türkiye’de, diğer ülkelerde olduğu gibi, gelişmiş ülkelerle karşılaştırıldığında son zamanlarda gıda üretiminin belirgin bir şekilde azalması nedeniyle, tarımsal ve hayvansal üretimin artırılması stratejik bir gerçeklik halini almıştır. Koyunculuk, genellikle Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde yaşayan insanlar için öncelikli bir geçim kaynağıdır. Ayrıca, süt, et, yün, tiftik, kıl ve deri gibi çok sayıda ürünün üretimi sayesinde koyunculuk, iş olanakları da sağlamaktadır. Bu durum hem ekonomik hem de sosyal açıdan Türkiye için önemli bir katkı sağlamaktadır (Semerci ve Çelik, 2016). Koyunlar, Bovidae familyasına ait olan Ruminantia alt takımındaki hayvanlardır. İnsanlar tarafından binlerce yıl önce evcilleştirilmişlerdir. Et, süt ve yün gibi kaynaklarından çeşitli yararlar elde edilmektedir. Türkiye'deki hayvancılık sektörü için, koyunların sağladığı verim ve besleme avantajları oldukça kritik bir öneme sahiptir (Uluyol, 2018).

Hayvansal verimliliği artırmak için planlı ıslah çalışmaları büyük önem taşır. Bu amaçla, özellikle dondurulmuş spermanın kullanıldığı suni tohumlama uygulamalarından yararlanmak biyoteknolojik yöntemler arasında öne çıkmaktadır. Özellikle büyükbaş hayvanlarda gerçekleştirilen suni tohumlama uygulamaları, dondurulmuş sperma kullanımı sayesinde kanıtlanmış üstün genetik özelliklere sahip damızlık hayvanları ortaya çıkarmış ve bu özellikleri sonraki nesillere aktarabilen bir yöntem olarak geniş bir coğrafyada başarıyla kullanılmaktadır. Ancak, koyunlarda suni tohumlama uygulamalarının saha koşullarında sınırlı kalmasının nedenleri vardır. Bu nedenlerden biri, koyunlarda serviksin vaginal yolla intrauterin tohumlama için bir engel oluşturmasıdır. Diğer bir faktör ise, henüz koç spermasının dondurulmasında istenen başarıya ulaşılamamış olmasıdır. Bu durum, tohumlama sonrası gebelik oranlarının düşük olmasına ve uygulamanın genel etkinliğinin kısıtlı kalmasına yol

açmaktadır. Bu sorunların aşılması için daha ileri biyoteknolojik çalışmalar ve teknik gelişmeler gerekmektedir (Ak ve ark., 2010; Marco-Jimenez ve ark., 2005).

Koç spermatozoonlarının membran yapısı, oransal olarak doymamış yağ asitlerinden zengin olup, kolesterol açısından oldukça düşüktür. Bu özellik, koç spermasının donma ve çözünme işlemlerine karşı daha hassas olmasına sebep olmaktadır (Ak ve ark., 2010; Bacınoğlu ve ark., 2007). Bunun yanında, membran çoklu doymamış yağ asitlerinin reaktif oksijen türleri (ROS, Reaktif Oksijen Türleri) saldırılarına karşı birincil hedef olması, özellikle donma ve çözünme süreçlerinde lipit peroksidasyonunu artırmaktadır. Bu durum, spermada motilite kaybına, akrozom ve membran hasarlarına yol açarak fertilizasyon oranlarını düşürmektedir (Dowling ve Simmons, 2009; Ömür, 2011).

Sperma dondurma işlemlerinde kullanılan yöntemler ve sulandırıcı içerikleri, çözündürme sonrası başarı üzerinde belirleyici olan en önemli faktörlerdir (Salamon ve Maxwell, 2000). Günümüze kadar, çeşitli sulandırma, soğutma, dondurma ve çözündürme yöntemleri geliştirilmiş ve farklı sulandırıcı türleri kullanılmıştır. Ayrıca, genellikle sulandırıcıya eklenen katkı maddelerinin etkinlikleri üzerine araştırmalar yapılmıştır (Al-Mutary ve ark., 2020).

Sunulan bu çalışmada çeşitli sistemler üzerine antioksidan etkinliği ortaya konulmuş olan safranalin koç sperma sulandırıcısına eklenerek çözüm sonu bazı spermatolojik parametreler üzerine etkisinin olup olmadığının ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Canlıların çevresel şartlara, genetik yapılarına, fizyolojik özelliklerine, hormon düzenlerine, davranışsal durumlarına ve psikolojik etkenlere bağlı olarak üreme faaliyetleri düzenlenir. Hayvanlar, üreme döngülerine göre poliöstrik hayvanlar, mevsimsel poliöstrik hayvanlar ve monoöstrik hayvanlar olarak üç gruba ayrılabilirler. Örneğin, inek, manda ve domuzlar, gebe olmadıkları dönem boyunca cinsel aktivitelerini devam ettiren poliöstrik hayvanlardır. Diğer yandan, gebe olmadıkları süre içinde üreme mevsiminde cinsel aktivite gösteren hayvanlar mevsimsel poliöstrik hayvanlar olarak adlandırılır. Türkiye kuzey yarım kürede bulunduğu için, kısıraklar, dişi hamsterlar ve kediler, günlerin uzamasıyla (baharın başlangıcı) cinsel aktivitelere başlar; ancak koyun ve keçilerde gün ışığının kısaltmaya başlamasıyla (sonbahar ayları) üreme faaliyetleri aktifleşir. İki östrus dönemi arasında belirgin bir anöstrus dönemi bulunan hayvanlar ise monoöstrik hayvanlar olarak sınıflandırılır. Bu kategoriye köpekler ve yabani karnivorlar örnek olarak verilebilir (Hafez, 2000; McDonald ve Pineda 1989).

Koyunlar gibi fotoperiyodik hayvan türlerinde, üreme aktivitesini düzenleyen temel çevresel faktör gün uzunluğudur. Günlerin kısaltması, yani gün ışığı süresinin 14 saatin altına düşmesi, hormonal aktiviteyi tetikler. Bu durum, Türkiye gibi kuzey yarımkürede bulunan ülkelerde, östrus siklusunun günlerin kısaltmaya başladığı (sonbahar ayları) dönemde başlamasına ve kışın son aylarına doğru sona ermesine neden olur. Kış mevsiminin sonlarına doğru başlayan ve yaz mevsiminin ortalarına kadar devam eden bir anöstrus dönemi mevcuttur (Kacar ve ark., 2016).

Koyunların ortalama östrus siklusu süresi 16-17 gündür ve bir sezonda gebe kalmazlarsa, genellikle 6 ila 9 kez östrus siklusu gösterebilirler. Yani, üreme mevsiminde düzenli olarak östrus döngülerini yaşayabilirler. Ancak, her döngüde gebelik gerçekleşmeyebilir (Kalkan ve Horoz, 1999; Ward 1986). Laktasyon dönemi, ırk özellikleri, çevresel sıcaklık değişimleri, yaş, ortamda koç varlığı, beslenme düzeni ve stres gibi etkenler, üreme aktivitesini önemli ölçüde etkilemektedir (Canoğlu ve Sarıbay, 2015; Dogan ve Nur, 2006; Jainudeen ve ark., 2008).

2.1. Koçlarda Spermatogenesis

Seminifer tübüllerdeki bölünmeler ve farklılaşmaların testislerde gerçekleşmesi sonucunda tamamlanan bir süreç olarak adlandırılan spermatogenezis, spermatozoon üretimini içerir (Castrillejo ve ark., 1995). Koçlarda, spermatogenezis süreci ırklar arasında değişiklik gösterir. Bu süreç, doğumdan sonra 60-70. günler arasında başlar ve 180-216. (pubertas) günlerde tam bir spermatogenezise ulaşır. Koçlarda bu süreç ise 46-49 gündür. Spermatozoa tübüllerden ayrılır ve seminifer tübülün boşluğuna hareket eder, sonunda rete testis yoluyla epididimise ulaşır. Bu süreç, "epididimal göç" olarak adlandırılır ve genellikle 12-14 gün içinde tamamlanır. Spermatozoa, epididimal göç sırasında motilite kabiliyeti kazanır ve olgunlaşır (Çoyan ve ark., 2002). Koçlarda, spermatogenezis olarak bilinen spermatozoon gelişim sürecinin yaş, genetik geçmiş, sıcaklık, nem, bakım-beslenme uygulamaları ve gün ışığı süresi gibi çeşitli çevresel faktörlerden etkilendiği bildirilmektedir. Bu unsurların spermatolojik parametrelerde değişikliklere yol açtığı belirtilmektedir (Saleh, 1997).

2.2. Koçlarda Sperma Alma Yöntmleri

Koçlardan sperm alma işlemi için çeşitli yöntemler bulunmakla birlikte, ancak genellikle dört farklı teknik yapılmaktadır (Ak, 2005).

2.2.1. Suni Vajina Yöntemi ile Sperma Alınması

Suni vajina, sert bir kauçuk dış tüp, iç kılıf, bağlantı hunisi ve sperma toplamak için dereceli bir hazne gibi bileşenlerden oluşur. Suni vajinanın boyutlarının yaklaşık 19-20 cm uzunluğunda ve yaklaşık 5 cm iç çapındadır. Sperma alımı öncesinde suni vajinanın sıcaklığı, koçların duyarlı olduğu bir faktördür ve bu nedenle iç sıcaklık 41-44°C arasında olmalıdır. Hava verilerek gerekli basınç ayarlanmalı ve suni vajina ile penis arasında yumuşak bir temas sağlamak için kayganlaştırıcı (vazelin gibi) sürülmelidir. Tüm hazırlıklar tamamlandıktan sonra, koçun libidosunu artırmak ve belirlenen ortamda sperma toplanmasını kolaylaştırmak için östrus dönemindeki bir koyunun yardımı gereklidir. Bunu takiben koyun güvenli bir şekilde tutulmalı, koçun ise serbestçe hareket etmesine ve tipik çiftleşme davranışlarını gerçekleştirmesine izin

verilmelidir. Koç koyuna atladığında, sperma toplayan kişi spermanın toplanması için penisi prepusyumdan suni vajinaya dikkatlice yönlendirmelidir. Daha sonra koçun koyundan inmesine izin verilmelidir. Bu aşamada, suni vajinanın penise mümkün olduğunca paralel tutulması ve koçun üreme organına zarar gelmesinin önlenmesi çok önemlidir. Suni vajina kullanma tekniği, koçlardan sperma toplamak için en uygun ve fizyolojiye en yakın teknik olarak kabul edilmektedir. Yapılan araştırmalarda, bu yöntemin kullanılmasıyla elde edilen spermanın suni tohumlama için başarı oranlarının, diğer yöntemlere göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, bu yöntemin koçların süreç için eğitilmesi gerekliliği ve sperma toplama sırasında kızgın bir dişinin bulundurulması gibi bazı zorlukları olduğunu belirtmek gerekir. (Gordon, 1999; İleri ve ark., 1996; Sönmez, 2013).

2.2.2. Elektro-Ejakülatör Yöntemi ile Spermanın Alınması

Elektro-ejakülatör yardımıyla sperma alma işlemi, özel bir mekanik donanım ihtiyacı duyan bir prosedürdür. Bu mekanik donanım, birkaç bölümden oluşur. İlk olarak, rektal bir prob olan içi dolu, ucu yuvarlatılmış ve uygun boyutta sert plastikten yapılmış bir cihaz bulunmaktadır. Bu prob, elektrik akımını iletmek için tasarlanmış bipolar metal plakalarla donatılmıştır. Ayrıca, prob elektro-ejakülatörün diğer bölümü olan kontrol ünitesine bağlanmaktadır. Kontrol ünitesi, elektriği kontrol ederek uyarıları sağlayan ve bu amaçla pil veya şehir elektriği kullanabilen bir ünedir. Elektro-ejakülatörler, istenilen sürelerde değişen akım değerlerinde (0-12 V) elektrik uyarımı üretebilir. Bu uyarım ile, belirli oranlarda ve sürelerde hayvanın bel ve sağrı bölgelerinden köken alan sinirleri uyarılır. Sonuç olarak, ampulla ve ductus deferens uyarılarak, ereksiyon sağlanır ve ejakülat alınır (İleri ve ark., 1996; Marco-Jimenez ve ark., 2008). Mukozaya yüksek seviyelerde elektrik akımı uygulanmasının, hayvanda güçlü reaksiyonlara neden olabileceğinin bilinmesi önemlidir. Bu nedenle, sperması alınması planlanan hayvanın zapturaptı son derece önemlidir. Zapturapta alma işlemi tamamlandıktan sonra rektal prob, vazelin veya tuzlu su gibi kayganlaştırıcı bir madde ile kaplanır ve ardından rektuma yerleştirilir. Elektrik akımı uygulaması, aşamalı olarak düşük bir değerden başlayarak (2-12 V arası), 1-2 saniyelik sürelerle artırılır. Uygulanan elektrik akımının frekansı ve hayvanlar arasındaki bireysel farklılıklar dikkate alındığında, ejakülat genellikle yaklaşık 5-7 uyarımdan sonra elde edilebilir.

(İleri ve ark., 1996; Sönmez, 2013; Varışlı ve ark., 2009). Suni vajina yöntemiyle karşılaştırıldığında, elektro ejakülasyon tekniğinin fantom gerektirmemesi ve bir eğitim döneminin olmaması gibi avantajları, bu yöntemi diğerlerinden ayıran öne çıkan yönlerini oluşturmaktadır. Ancak, bu yöntemin dezavantajları arasında, suni vajina yöntemine kıyasla daha düşük kalitede spermanın elde edilmesi ve hayvana rahatsızlık verebileceğinden dolayı, zaptı zaptı için insan gücüne ihtiyaç duyulması bulunmaktadır (İleri ve ark., 1996; McDonald ve Pineda, 1989; Sönmez, 2013).

2.2.3. Normal Aşım Sonrası Vajinada Birikmiş Spermanın Geri Alınması

Geçmişte kullanılan bu yöntem, vajinadan kaynaklanan potansiyel kontaminasyon riskleri nedeniyle güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmemektedir. Ayrıca, koçun verdiği spermanın önemli bir kısmı vajinada kaldığından, tüm spermayı almak mümkün değildir. Bu yolla sperma elde etmek için, koyunun kızgın olmaması tercih edilmelidir. Çünkü kuru bir vajinada vajinal salgıların spermayla karışma riski daha düşüktür. Ancak, kızgın dönemde olmayan koyuna ulaşmak ve spermayı iletmek koçlar için zor olabilir. Bu nedenle, koçların önce kızgın dönemindeki koyunları birkaç kez aşmalarına izin vermek ve ardından spermanın alınacağı koyuna yönlendirmek daha uygun olacaktır. Kızgınlık döneminde olup olmadığına bakılmaksızın, vajinanın temizlenmesi önemlidir. Özel pipetler aracılığıyla vajinadan spermanın alındığı bu yöntem, üreme koçlarından yeterli verimi elde etmek için uygun bir seçenek değildir (Ak, 2005).

2.2.4. Ampulla Masajı ile Sperma Eldesi

Hayvanlardan sperma alma süresi seksüel reflekslerin uyarımından ejakülasyona kadar, nörolojik, vasküler ve hormonal olaylar zinciri aracılığıyla gerçekleşir. Ampulla masaj yönteminde, rektal mukoza üzerinden gerçekleşen uyarımlar ile ejakülasyon başlatılabilir. Transrektal dijital masaj (TRDM) olarak da adlandırılan bu yöntem ile aksesuar bezlerin manipülasyonundan sonra, S2-S4 omurga segmentlerinden gelen parasempatik çıktı, refleksojenik ereksiyonu başlatır ve ejakülasyon sırasında spermanın pulsatil olarak dışarı atılmasını sağlar; aynı zamanda spermanın innervasyonunu pudental sinir ve penisin dorsal siniri aracılığıyla

başlatılmaktadır. TRDM yöntemi, libido düşüklüğü, topallık gibi durumların yanı sıra, ereksiyon hemodinamiğinde sorun yaşayan tekelerde tercih edilmektedir. Uygulama öncesi, prepusyal alanın temizliği gerçekleştirildikten sonra ilk olarak gaita boşaltılır. Rektal mukoza yoluyla veziküler bezler ve ampullalar üzerinde güçlü bir ileri-geri hareket uygulanarak ejakülasyon izlenir. Ejakülasyonun başladığı gözlenmesinin ardından, ampulladan pelvik üretraya uyarımın devam etmesi amacıyla masaja devam edilmektedir. Masajın rektal mukozanın travmatizasyonunu önlemek için maksimum 5 dakika ile sınırlandırıldığı unutulmamalıdır (Tekin ve ark., 2020).

2.3. Spermanın Kriyoprezervasyonu

Kriyoprezervasyon, hücrelerin, dokuların veya diğer canlı organizmaların (bakteri, fungus, bitki vb.) biyolojik aktivitelerini sıfırın altındaki sıcaklıklarda durdurarak, gelecekteki kullanım için geri dönüştürülebilir bir şekilde koruma işlemidir. Spermanın kriyoprezervasyonu, soğutma, ekilibrasyon ve dondurma aşamalarını kapsayan bir yöntemdir (Medeiros ve ark., 2002). Spermatozoa, organik bir materyal olmasından dolayı düşük sıcaklıklara adapte olmada zorluk yaşasa da uygun şekilde uygulanan kriyoprezervasyon yöntemleri sayesinde canlılıklarını ve diğer fonksiyonlarını başarıyla yeniden kazanabilmektedir (Medeiros ve ark., 2002). Kriyoprezervasyonun, spermatozoanın uzun süreli saklanması için avantajlı bulunsa da, bu süreç aynı zamanda spermanın çeşitli bölümlerine zarar verebilecek aşamalar içermektedir. Spermanın dondurulma ve çözülme süreçleri, sıcaklık değişimlerinin yanı sıra, sulandırıcı, kriyoprotektan ve membranlar arası sıvı taşınımı üzerinde önemli etkiler yaratmaktadır. Örnekler, dondurmanın birinci aşamasında hızla düşük sıcaklıklara maruz kaldıkları için, hücrelerdeki su moleküllerinde yoğunlaşmalara yol açarak ardışık reaksiyonlar başlar. Hücreler, hızlı soğutma işlemi sonucunda donma sıcaklığına ulaşır. Bu sıcaklığın altında, rastgele oluşan farklı boyutlardaki buz kristalleri meydana gelir. Buz kristali oluşumu ekzotermik bir reaksiyondur ve kristalleşmenin başlamasından hemen önce ortamda bir sıcaklık artışına yol açar. Bu nedenle, hücrelerin içindeki ve arasındaki sıcaklıklar, dondurma işlemi tamamlanmadan sadece birkaç dakika önce dengeye ulaşır. Bu fizyodinamik sıcaklık değişiklikleri, sperma dondurma işlemi sırasında azot buharı üzerindeyken gerçekleşir. Bu nedenle, bu işlem sırasında hücre içi ve hücreler arası

sıcaklık değışikliklerinin tolere edilebilir sınırlar içinde olması çok önemlidir. Aksi takdirde, hücre üzerinde fazla zararlı etkiler olabilir. Buz kristallerinin oluşumuyla birlikte, hücreler arası ortamdaki su miktarının azalması sonucunda ortam hipertonic hale gelir. Hücreler, donmamış konsantre içeriklerle ozmotik etkileşime girer ve bu süreçte hücre membranından su çıkışı gerçekleşir. Sonuç olarak, hücrede dehidrasyon meydana gelir ve hücre büzüşür.

Sperma dondurma işlemi iki etkileşimli yan etkiye neden olur:

- Yavaş bir soğutma hızında, ROS'da bir artış olur ve hipertonic içerikli hücrelerin uzun süre bir arada bulunması nedeniyle yağ ve protein ekstraksiyonu gibi zararlı etkilere yol açar.
- Soğutma hızı aşırı (hızlıysa), hücreden su çıkışı yeterli miktarda gerçekleşmediğinden ölümcül hücre içi buz kristali oluşumuna neden olur.

Kriyoprezervasyon işlemi sırasında sperma hem buz kristalleri hem de konsantre, donmamış içerik ile etkileşime girer. Sonuç olarak, kriyoprezervasyonda kullanılan çözeltinin içeriğı ve donma hızı, spermanın istenen şekilde dondurulmasını sağlamak için çok önemli faktörlerdir (Holt ve Linda, 2014).

2.3.1. Spermanın Sulandırılması

Sulandırma oranı, spermanın dondurma işlemine etki eden unsurlardan biridir. Genellikle koç sperması, tohumlama dozu göz önüne alınarak hacim/hacim (v/v) oranında veya daha düşük bir oranda sulandırılmaktadır (Colas, 1975; Fiser ve ark., 1987). Azaltılmış sulandırma işlemi yeterli fertilite oranlarına ulaşmada etkili olsa da, dondurma işlemi sırasında spermatozoaya zarar verdiği ve dondurma çözündürme işleminden sonra sperma kalitesini düşürdüğü gözlemlenmiştir (Gil ve ark., 2000; Gil ve ark., 2002). Buna ek olarak, yüksek sulandırma oranının akrozom hasarı oranını artırdığı bildirilmiştir (Prathalingan ve ark., 2006). Başka bir çalışmada, koç spermasının sulandırılmasında 100-200/mL milyon spermatozoa konsantrasyonuna ulaşacak şekilde hesaplanması gerektiğı, konsantrasyonu artırmanın çözündürme

sonrasında kalitenin azalmasına neden olabileceği belirtilmektedir (Alvarez ve ark., 2012).

Araştırmalarda, dondurulan koç spermasıyla ilgili karşılaşılan sorunların bir kısmının çözümü konusunda bazı olumlu sonuçlara ulaşılmıştır (El-Alamy ve Foote 2002; Morrier ve ark., 2003). Ancak bu araştırmalarda tercih edilen sulandırma miktarları intraservikal tohumlama için çok yüksektir (D'Allessandro ve ark., 2001; Gil ve ark., 2003). İntraservikal tohumlamada payette ideal oran 200×10^6 spermatozoon olarak belirlenmiştir. Bu miktara ulaşmak için yaklaşık 1+3'lük bir nihai sulandırma oranı kullanılmalıdır. Bununla birlikte, bu düşük sulandırma oranının spermatozoayı dondurma işleminin olumsuz etkilerinden yeterince korumadığı bildirilmiştir (D'Allessandro ve ark., 2001; Salamon ve Maxwell, 2000).

Koç spermasının donma ve çözölmeye karşı hassasiyeti, araştırmacıları çeşitli sulandırıcı maddeleri keşfetmeye, çeşitli kriyoprotektanları ve antioksidanları değerlendirmeye sevk etmiştir (Chen ve ark., 1993; Gökçen ve ark., 1985). Koç ve teke spermasını sulandırmak için genellikle hafif hipertonic özellikteki çözeltiler sıklıkla kullanılmaktadır (Barbas ve Mascarenhas, 2009).

Sulandırıcıların geliştirilmesine yönelik başlatılan çalışmalarda organik malzemeler sulandırıcı geliştirmede önem kazandıkça, araştırmacılar Tris (hidroksimetil aminometan) sulandırıcısını oluşturmuşlardır (Visser ve Salamon, 1973). Araştırmalar, Tris sulandırıcısının tamponlama kapasitesinin fosfat ve sitrat sulandırıcılarına kıyasla daha verimli olduğunu ve ayrıca daha düşük toksisite seviyelerine neden olduğunu göstermiştir (Mesaros ve Gamcık, 1992; Salamon ve Visser, 1972). Tris, spermatozoaya nüfuz etme kapasitesi ve pH değişikliklerine karşı hücre içi tampon olarak etkinliği nedeniyle boğa, koç ve hatta insanlardan alınan spermanın korunmasında kullanılmıştır (Kerpiçi, 2015). Çalışmalar, 10-50 mM arasında değişen çeşitli Tris konsantrasyonlarının spermatozoon metabolizması ve hareketliliği üzerinde zararlı etkiler göstermediğini ve hatta 250-400 mM'ye kadar olan konsantrasyonları tolere edebildiğini bildirmiştir (Salamon ve Maxwell, 2000; Visser ve Salamon, 1973). Son yıllarda boğa spermasını dondurma amacıyla kullanılan ticari sulandırıcıların bazılarının aynı zamanda koç spermasının dondurulma işlemlerinde de

etkili olabileceği bildirilmiştir (Kulaksız ve Daşkın, 2007). Ancak, bazı araştırmacılar yumurta sarısı gibi bireysel, ırksal ve türsel farklılıklar içeren maddelerle hazırlanan sperma sulandırıcılarının mikrobiyal kontaminasyon riski taşıyabileceğine dair endişelerini dile getirerek, ticari sentetik sperma sulandırıcılarının kullanılması daha sağlıklı bir alternatif olarak düşünülebileceğini belirtmişlerdir (Aires ve ark., 2003; Bousseau ve ark., 1998; Gavin- Plagne ve ark., 2018; Lopez-Saez ve ark., 2000; Smith ve ark., 1993).

2.3.2. Spermanın Soğutulması

Spermanın soğutulma işleminin temel amacı, spermatozoon metabolizma hızını yavaşlatmak ve hücreleri donma sürecine hazırlamaktır. Böylece, spermatozoonlar enerji kaynaklarını daha uzun süre koruyabilir ve daha az metabolit oluşumu sağlanabilir (Salamon ve Maxwell, 2000). Sulandırmanın ardından, sperma 1,5-4 saat arasında bir sürede 5°C'ye soğutulmalı ve ardından sıvı nitrojen buharında dondurulmadan önce payetlere çekilmelidir (Cseh ve ark., 2012). Sperma, 30°C'den 4°C'ye hızla soğutulduğunda soğuk şokuna maruz kalabilir ve bu durum spermatozoa üzerinde yapısal hasarlara neden olabilir (Gilmore ve ark., 1998; Watson, 2000). Yapılan bir çalışmada, dakikada 0,3 °C'yi aşan soğutma hızlarının koç spermasında spermatolojik özellikler üzerinde zararlı bir etkisi olduğu kaydedilmiştir. Dahası, soğutma hızının dakikada 0,6 ve 0,9 °C'ye yükseltilmesi, çözülme sonrasında total ve progresif motilite üzerinde giderek daha olumsuz etkilere yol açmıştır (Demir ve ark. 2015).

2.3.3. Spermanın Dondurulması

Bu amaçla çeşitli yöntemler kullanılmakta olup, en yaygın olanlarından biri payet yöntemidir. Bu yöntemde 0,25-0,50 ml hacminde, bir ucunda sıvı ile temas ettiğinde sızdırmazlık sağlayan bir kapatma yapısı bulunan payetler kullanılır. Sperma payetin içine çekildikten sonra, açık uç ya ezilir ya da polivinil alkol ile kapatılır. 5°C'de ekilibrasyona alınır ve ardından sıvı azotla dolu bir dondurma kabini içinde sıvı azot buharında dondurma işlemi gerçekleştirilir. Dondurulduktan sonra payetler gobletlere yerleştirilir ve -196°C'de sıvı azot içinde saklanır (İleri ve ark., 2000).

Spermatozoanın metabolik aktivitesinin +5 °C'de azaltılması, hücrelerin canlılığını uzun süre korumasını sağlar. Bununla birlikte, spermatozoa hücrelerinin sınırlı olsa aktivitesi nedeniyle, doğal olarak katabolik yolla yaşlanmaya uğrayacak ve sonunda öleceklerdir. Bunu önlemek için spermatozoa -110 ila -130 °C sıcaklık aralığında dondurulmalıdır (Medeiros ve ark., 2002). Dondurma ve çözme aşamaları sırasında, hücre içinde büyük hacimlerde buz kristallerinin veya sıvı yoğunlaşmasının bulunması nedeniyle hasar meydana gelebileceği kaydedilmiştir. Dondurma işlemi sırasında hücrelerdeki dehidrasyon zararlı olarak kabul edilmektedir. Çok hızlı dondurma işleminin termal şok ve hücre içi buz oluşumuna neden olduğu, yavaş uygulamanın ise büyük buz kristallerinin oluşumunu engellemekle birlikte bu dondurma hızında kullanılan çözeltiler nedeniyle hasara yol açabileceği bildirilmiştir. Bu etki, yavaş dondurma tekniğinin öncelikle suyu dondurmaya ve böylece hücre içindeki tuz konsantrasyonunu artırması ile ilişkilidir. Sonuç olarak, uzun dondurma süresi boyunca ozmotik basınçtaki yükselme, hücre ve akrozomdaki protein ve lipoproteinlerin zarar görmesine neden olabilir (Hafez, 1993). Dondurma sırasındaki en önemli olay kristalleşmedir. Bu süreç donma hızı, kristal boyutu, viskozite, membran geçirgenliği, hücre içindeki veya dışındaki süspansiyonlar ve oluşan ilk kristallerin özellikleri gibi faktörlerden etkilenir. İdeal olarak, çok sayıda küçük hacimli kristal oluşmalıdır (Ak ve ark., 2010).

Spermatozoadaki membran hasarının öncelikle -15°C ile -60°C sıcaklık aralığında donma ve çözme işlemleri sırasında meydana geldiği rapor edilmiştir. Depolama sıcaklığının (-196°C) ise önemli bir zarara neden olmadığı bildirilmiştir (Mazur, 1965; Mazur, 1984).

2.3.4. Spermanın Çözdürülmesi

Çözdürme teknikleri, spermatozoanın canlılığını ve morfolojik bütünlüğünü korumada kritik bir rol oynar. Spermatozoa, -196 °C depolama sıcaklığından 37°C'ye ulaşmak için -60 °C ve -15 °C olmak üzere iki kritik sıcaklık bölgesinden geçer. Bu aşamalar sırasında, belirgin sıcaklık değişiklikleri, motilitede, morfolojik bütünlükte ve biyokimyasal ve işlevsel olaylarda değişikliklere ve hasara yol açar. Çözülme sırasında, hücre dışı çözeltinin yoğunluğu azaldıkça ve hücre içindeki su hacmi

dengeye ulaştıkça, spermatozoon membranı geniş çaplı büzülme veya şişmeye maruz kalabilmektedir (Salamon ve Maxwell, 1995).

Spermanın zdrlmesi sürecinde, hücre içinde tekrar kristal oluşumları meydana gelir. Donma aşamasına benzer şekilde, bu tekrar oluşan kristal yapılar hücrelere zarar verebilir. Rekrystalizasyon kaynaklı potansiyel hasarları önlemek için spermanın hızlı bir şekilde zdrlmesi gerekmektedir (Holt ve North, 1994; Salamon ve Maxwell, 2000). Ek olarak, hızlı zdrme yöntemi uygulandığında hücre içi ve dışındaki ortam arasındaki denge daha hızlı sağlanır, bu da spermatozoonların hücre dışındaki hiperozmotik ortama maruz kalma sürelerinin kısalmasına neden olmaktadır (Salamon ve Maxwell, 2000).

İntraservikal tohumlama sonrasında 50°C'de çözdürülen ko sperması ile 35°C'de çözdürülen sperma arasında gebelik oranları açısından önemli bir fark gözlenmemiştir (Paulenz ve ark., 2004).

2.4. Serbest Radikaller

Bir atom, zıt spinlere sahip iki elektronla çevrelenmiş proton ve nötronlardan oluşan bir çekirdekten oluşur. Yörünge boşluğu içinde hareket eden bu elektronlara "eşleştirilmiş elektronlar" veya "ortaklanmış elektronlar" adı verilir (Dikici, 1999). Yapılarında eşleştirilmiş elektronlar içeren atomlar veya moleküller kararlı yapılar sergilerler (Fırat, 1997; Halliwell, 1987). Elektron eşleşmesi bozulursa molekül veya atom kararsız hale gelir, reaktif hale gelerek serbest radikal haline dönüşür. Başka bir deyişle; dış yörünge boşluğunda tek sayıda elektron bulunan veya eşit olmayan sayıda proton ve elektrona sahip olan atom veya moleküllere "serbest radikaller" adı verilir (Akkuş, 1995; Halliwell ve Chirico, 1993). Serbest radikaller, reaksiyona girdikleri molekülleri başka serbest radikallere dönüştürerek hücredeki hasarın yayılmasına sebep olabilirler (Crawford, 2015). Serbest radikaller genelde, ROS, reaktif nitrojen türleri (RNT) ve reaktif sülfür türleri (RST) olarak sınıflandırılır (Fehrenbach ve Northoff, 2001; L ve ark., 2010). Oksijen kaynaklı reaktif oksijen türleri, canlı organizmalarda hem fizyolojik hem de patolojik etkilere neden olan temel serbest radikallerdir. Süperoksit (O_2^-), hidroksil ($OH^\cdot$), hidrojen peroksit (H_2O_2) bu reaktif

oksijen türleri arasında öne çıkar. Ayrıca, peroksil radikali, alkoksil radikali gibi oksijen kaynaklı olmayan diğer radikaller de serbest radikallerin reaksiyonları sonucunda meydana gelen diğer radikalleri içerir (Cheseseman ve Slater, 1993; Erenel ve ark., 1993; Fehrenbach ve Northoff, 2001).

Serbest radikaller temelde üç farklı şekilde meydana gelir: Kovalent bağların homolitik kırılması, bağ yapısındaki iki elektronun, kovalent bağın kırılması sırasında atomlar üzerinde ayrı şekilde kalabilmesi anlamına gelir. Bir molekülde tek bir elektronun transferi durumunda, radikal olmayan molekül elektron kaybettiğinde, orbitalin dışında eşleşmemiş bir elektron kalması radikal oluşumuna neden olur. Ayrıca, radikal olmayan normal bir molekül, bir elektron transferiyle orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşumu gerçekleştirdiğinde, radikal oluşumu meydana gelebilir (Halliwell, 1997).

2.4.1. Serbest Radikal Kaynakları

Canlı organizmalarda serbest radikaller, endojen ve eksojen kaynaklardan kaynaklanabilir. Hücre içinde ve çevresinde sürekli olarak üretilme eğilimindedirler (Sarma ve ark., 2010; Sen ve ark., 2010).

2.4.1.1. Endojen Kaynaklar

Mitokondride aerobik solunum sırasında oksijenler, serbest radikallerin yan ürünü olarak katalize edilirler. Herhangi bir inflamasyon oluştuğunda, sitokinler serbest kalır ve bu durumda nötrofiller ve makrofajlar serbest radikaller üretir. Lipit peroksidasyonu, mitokondriyal oksidaz ve ksantin oksidaz gibi, çeşitli kaynaklardan da serbest radikaller oluşabilir. Aynı zamanda, araşidonik asit metabolizması ve düz kaslar da serbest radikal üretebilirler. Endoplazmik retikulumda sitokrom p450 sisteminde meydana gelen elektron kaçakları, ksantin oksidaz (XO) enzim reaksiyonu sırasında ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) gibi, oto-oksidasyon reaksiyonu gerçekleşirken serbest radikaller ortaya çıkabilir. Vücutta yaşanan yorgunluk ve stres durumlarında da toksik bir yan ürün olarak serbest radikaller üretilir. Ayrıca, vücutta stresi tetikleyen kortizol ve kateşolamin gibi hormonlar da

kendileri serbest radikallere dönüşebilirler. Patojenlere karşı immün sistem hücreleri, ROS ve oksijen radikalleri üreterek yanıt verirler (Sarma ve ark., 2010).

2.4.1.2. Eksojen Kaynaklar

Ultraviyole (UV) ışınları, gama ışınları, X ışınları, mikrodalga ışınları, yangınlar, karbon monoksit, volkanik aktivite, asbest, benzen, formaldehit, ozon, toluen ve benzeri hava kirleticiler, temizlik ürünleri, yapıştırıcı, boya, tiner, parfümler, böcek ilaçları ve diğer kimyasallar gibi etkenler, kloroform, trihalometanlar gibi su kirletici olarak kabul edilen maddeler, alkol, sigara, sigara dumanı ve egzoz dumanı serbest radikallerin oluşumuna katkıda bulunabilirler (Sen ve ark., 2010).

2.5. Serbest Radikallerin Spermatozoon Üzerindeki Etkileri

Spermatozoonlarının normal faaliyetleri için düşük düzeylerde ROS'a ihtiyaç duyulsa da bu düzeyler antioksidan sistemlerin başa çıkamayacağı seviyelere ulaştığında, patolojik etkilere neden olabilir. Maruz kalınan ROS'un etkisi, süresi ve şiddeti, patolojik etkinin değişmesine neden olabilmektedir (Kothari ve ark., 2010). Spermatozoonlarda ROS kaynaklı hasarların öncelikle meydana geldiği bölge, hücre membranını oluşturan lipit yapı birimleridir. Spermatozoonların membran yapısı, somatik hücrelere kıyasla önemli ölçüde farklıdır. Plazma membranı, içinde yoğun miktarda fosfolipit, sterol, doymuş ve doymamış yağ asidi bulunduran çift tabakalı bir yapıya sahiptir (Türk, 2015). Spermatozoon membranının yaklaşık yarısı, her bir molekülünde 6 adet doymamış çift karbon bağı içeren dokosaheksaenoik asit (DHA) tarafından oluşturulur. Hücre membranındaki bu yüksek orandaki doymamış yağ asidi, spermatozoon-oosit füzyonunu sağlamak için kritik bir rol oynayan membranın akışkanlığını destekler. Ayrıca, spermatogenezis, epididimal olgunlaşma, dişi genital kanal içindeki kapasitasyon süreci ve akrozom reaksiyonu gibi olaylar sırasında, membran lipitlerinin kompozisyonunda bir dizi değişiklik meydana gelir (Sanocka ve Kurpisz, 2004; Surai ve ark., 2001; Wathes ve ark., 2007). Çoklu doymamış asitler, diğer membran lipitlerine kıyasla membran fonksiyonları açısından daha etkili olabilmektedirler (Ogbuewu ve ark., 2010).

Oksijen canlı organizmalar için gereklidir. Bununla birlikte, metabolik faaliyetler sırasında fizyolojik olarak üretilen bazı ROS canlı organizmalar için potansiyel bir tehdit oluşturabilir. Bu nedenle oksidatif stres, lipid peroksidasyonundan kaynaklanan serbest radikal oksijen türlerindeki artışın neden olduğu hücresel hasardaki artış olarak tanımlanabilir (Bucak ve ark., 2015). Lipid peroksidasyon, içerdikleri doymamış moleküllerinin oksijenle reaksiyona girerek ketonlar, keto asitler, hidroksi asitler, alkoller, aldehitler ve benzeri bileşikler gibi daha küçük moleküllere dönüştüğü oksidasyon nedeniyle yağların bozulması olarak tanımlanabilir (Türk, 2015). Reaktif oksijen türleri, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) metilen (CH_2) grubundan ($\text{CH}_2 \rightarrow \text{CH}^\cdot$) bir hidrojen atomu soyutlayarak lipid peroksidasyonunu başlatır. Bu işlem, yağ asidi yan zincirindeki çift bağ sayısının artmasına neden olur. Sonuç olarak, alkoller, ketonlar, aldehitler ve eterler daha kolay ayrışarak malondialdehit (MDA) gibi son ürünlerin oluşmasına yol açar (Türk, 2015). Ortamdaki MDA seviyesindeki artış, yüksek lipid peroksidasyon seviyelerinin ve tüm bu reaksiyonlardan kaynaklanan yetersiz antioksidan mekanizmanın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Üstüner ve ark., 2016). Açıklanan mekanizmada açıkça görüldüğü üzere, ROS öncelikle PUFA'ları hedef almaktadır. Bu hassasiyet, PUFA'ların peroksidasyona oldukça yatkın olmasından kaynaklanmaktadır. Spermatozoanın membran yapısının yüksek düzeyde PUFA içerdiği göz önüne alındığında, spermatozoa oksidatif strese ve ardından gelen (oluşan fazla miktardaki) ROS'a karşı oldukça hassas hale gelmektedir (Bucak ve ark., 2015). Bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren kısa ömürlü, kararsız ve düşük molekül ağırlıklı kimyasal maddeler olan serbest radikaller, diğer atom ve moleküllerle elektron alışverişi yapma ve böylece kimyasal yapılarını değiştirme eğilimindedir. Bu sürecin bir sonucu olarak, serbest radikaller kararsız moleküler yapılar oluşturabilirler (Türk, 2015). Fizyolojik koşullar altında, hücrelerin antioksidan sistemi ile ROS arasında gözlenen bir denge vardır. Bu denge korunduğunda, ROS'un kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, spermatozoa motilitesi ve fertilizasyon üzerinde olumlu bir etkisi olduğu bilinmektedir (Agarwal ve ark., 2005). Bununla birlikte, bu denge bozulursa, ROS spermatozoanın canlılığı ve işlevi üzerinde zararlı etkilere sahip olabilir (Lenzi ve ark., 1996). Kriyoprezervasyon işlemi sırasında soğuk şok ve ozmotik basınç değişiklikleri spermatozoonun membran yapısını bozar ve mekanik stres oluşturmaktadır (Noiles ve

ark., 1995). Bu mekanik stres, antioksidan mekanizma-ROS dengesini ROS lehine değiştirir. Spermatozoon yapısındaki birincil hedef, PUFA içeriği göz önüne alındığında hücre membranıdır. Bu durum spermatozoon membran geçirgenliğinde ve fonksiyonel bütünlüğünde hasara yol açmaktadır (Toker ve ark., 2016). ROS'un spermatozoa üzerindeki bir diğer etkisi de mitokondriye yöneliktir. Mitokondriye ulaşan bu kararsız ajanlar, oksijen indirgeme sürecini bozarak ATP sentezine engel olmaktadır (Tremellen, 2008). Oksidatif stres ve artan lipit peroksidasyonu kontrolsüz kalırsa, sitokrom C proteininin salınması yoluyla spermatozoonun apoptozuna yol açmaktadır (Wang ve ark., 2003). Spermatozoon DNA'sının yoğun yapısı nedeniyle ROS karşı plazma-akrozom membranı ve mitokondri kadar hassas olmadığı bilinmektedir. Bununla birlikte, aşırı ROS seviyelerinin spermatozoon DNA'sı üzerinde de olumsuz etkilere neden olduğu gözlemlenmektedir (Henkel ve ark., 2005).

2.6. Antioksidanlar

Antioksidanlar, ROS üretiminin ve miktarının artmasını engelleyen, ROS'un neden olduğu zararları önleyen ve uzak tutan savunma sistemleri olarak tanımlanmaktadır (Şener ve Yeğen, 2009). Bu koruyucu etki, belirli mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir (Bucak ve ark., 2015).

Bunlar;

- Antioksidanların hücre zarlarındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu önleyerek ve zar yapısını koruyarak serbest oksijen radikalleri ile enzimatik reaksiyonları önlemesi,
 - ROS'ları etkisiz hale getirerek, bunların toksik etkilerini azaltması,
 - Metal iyonlarını kontrol ederek hücredeki potansiyel oksidatif etkileşimleri sınırlaması,
 - Oksidatif hasara uğramış hücreleri onarılması olarak sıralanabilir.

Antioksidanların ayrıca zincir kırıcı özellikleri de vardır. Yani, serbest radikallerin neden olduğu zincir oluşumlarına karşı koyarak yağ asidi zincirlerinin sürekli olarak

hidrojen iyonu salınımını önleyebilirler. Zincir kırıcı antioksidanlar arasında en yaygın olarak α - tokoferol, fenoller ve aromatik aminler yer almaktadır (Kulaksız, 2009).

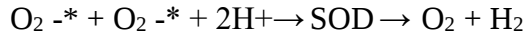
Antioksidanlar, yapılarına ve gösterdikleri etkilere göre enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki ana kategoriye ayrılırlar.

2.6.1. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPx), Glutasyon redüktaz (GR) ve gibi enzimler antioksidanlar arasında yer almaktadır (Lanzafame ve ark., 2009).

2.6.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, antioksidan savunma mekanizması içinde ROS ve süperoksit anyonlarına karşı kilit bir sistemdir. SOD, $O_2^{\cdot -}$ 'nin H_2O_2 ve O_2 'ye indirgenmesini katalizler (Young ve Woodside, 2001).

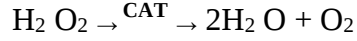


Süperoksit dismutaz (SOD) üç farklı formda bulunur. Bu formlar sitozolde bulunan bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren süperoksit dismutaz (Cu/Zn SOD); mitokondride bulunan manganez (Mn) içeren süperoksit dismutaz (MnSOD) ve hücre dışı sıvılarda bulunan hücre dışı süperoksit dismutazdır (EC SOD) (Sen ve ark., 2010; Young ve Woodside, 2001).

2.6.1.2. Katalaz (CAT)

Katalazın temel görevi hidrojen peroksiti suya katalize etmektir. Bu işlevi sayesinde, oksidatif stresin neden olduğu hasarın ilerlemesini durdurarak hücreyi oksidatif strese karşı korur. CAT, reaktif oksijen türlerine karşı birincil koruma sağlayan bileşenlerden biridir. Bu görevini, Glutasyon peroksidaz (GPx) ile paylaşır. Her iki enzim de süper oksitten türetilmiş hidrojen peroksitin yapısını katalizleyerek

reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunu gerçekleştirir. Düşük yoğunluklu hidrojen peroksit varlığında, organik peroksitler öncelikle GPx tarafından katalize edilir. Yüksek konsantrasyonlarda ise CAT tarafından metabolize edilir. Hepatositlerde, mikrozomlarda ve sitosolde yüksek CAT etkinliği görülse de, en yüksek CAT aktivitesini peroksizomlar sergilemektedir (Ighodaro ve ark., 2018).



CAT'ın, H₂O₂'nin miktarını kontrol altında tutma mekanizması önemlidir. Çünkü H₂O₂'nin düşük miktarları, hücre sinyal iletimi, hücre ölümü, mitokondri aktivitesi, karbonhidrat metabolizması gibi süreçlere katkıda bulunurken, yüksek düzeylerinin oldukça zararlı olduğu bilinmektedir (Dröge, 2002; Ighodaro, 2018). CAT, üzerinde en çok durulan ve çalışılan enzim türlerinden biridir ve çoğu antioksidan çalışmasında temel bir rol oynamaktadır (Chelikani ve ark., 2004).

2.6.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Hem mitokondride hem de sitoplazmada bulunan GPx, hidrojen peroksitin suya ayrışmasında görev alır (Fattman ve ark., 2003). GPx'nin aktivitesi genellikle selenyum ile ilişkilidir. En önemli görevi hücreyi oksidatif strese karşı korumaktır (Cnubben ve ark., 2001). GPx'in mitokondriyal izoformu spermanın olgunlaşma sürecinde bağımsız bir yapısal rol üstlenmektedir (Sanyal ve ark., 2009).

Yapılan araştırmalarda düşük GPx seviyelerinde antioksidan savunma sisteminin bozulduğu tespit edilmiştir. Bu durum, membrandaki yağ asitleri ve proteinlerde oksidatif hasarın oluşmasıyla birlikte kalıcı hasarların meydana geldiği sonucunu doğurmuştur (Chabory ve ark., 2009). Başka bir çalışmada ise testis dokusu elektriksel bir alanla uyarılmış ve buna bağlı olarak GPx seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Bu durumda sperm DNA hasarı meydana gelmiş, ayrıca sperm yoğunluğu ve motilitesinde de azalma gözlenmiştir (Gandhi, 2012).

2.6.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlara örnek olarak, glutatyon, sistein, vitamin-E, ürik asit, karotenler, taurin, albumin, selenyum, hipotaurin, vitamin-C, pirüvat sayılabilir. Spermatozoon içinde yer alan antioksidanlardır. Spermatozoonu oksidatif stresin etkilerinden koruma görevine sahiptirler (Lanzafame, 2009).

2.6.2.1. Vitamin C (Askorbik Asit)

Suda çözünen bir antioksidandır ve ROS'u temizleme özelliklerine sahiptir. En önemli özelliği, okside olan vitamin E'nin antioksidan özelliklerini tekrar kazandırabilmesidir. Lipit peroksidasyonuna karşı savunmada, diğer suda çözünen antioksidanlara göre daha etkilidir (Deichsel ve ark., 2008).

2.6.2.2. İndirgenmiş Glutatyon (GSH)

Hücre içinde bulunan endojen ve eksojen bileşenlerin temizlenmesinde görev alır. Hücrelerin oksidatif stresle mücadele etmek için kullandığı doğal bir kaynaktır. Bu koruyucu etkisi, yapısındaki sülfidril (-SH) grubundan gelmektedir (Luberda, 2005).

2.6.2.3. Sistein

Sülfidril (-SH) içeren bir antioksidandır. Sistein, GSH sentezinde hız belirleyici bir rol oynar. Bu özelliğini, taurin ve GSH sentezlerinde hız belirleyen enzim olan gama glutamat sistein ligaz enzimini onarmasından almaktadır (Luberda, 2005).

2.6.2.4. Vitamin E (α -tokoferol)

Doğada en yaygın bulunan antioksidandır. ROS'a karşı lipit membrandaki doymamış yağ asitlerini korumak en temel görevidir. Yağda çözünür ve kilit bir zincir kırıcı antioksidandır. Peroksil radikaline bir hidrojen vererek reaksiyona girerler. Bu

reaksiyon sonucunda kendileri oksitlenir ve vücutta önemli olan lipit, enzim, protein moleküllerinin oksitlenmesinin önüne geçerler (Deichsel ve ark., 2008).

2.6.2.5. Karotenler

Karotenler, hücre korumasında görev alan ve doğada yaygın olarak bulunan bileşenlerdir. En yaygın olanı beta-karoten'dir. Beta-karoten, vitamin A'nın metabolik olarak öncülüdür (Deichsel ve ark., 2008).

Karotenoidler, uzun süredir antioksidan olarak kabul edilmektedir. Çünkü serbest radikalleri temizleme kapasitelerine sahiptirler. Karotenoidler, serbest radikalleri, diğer reaktif oksijen türlerini, özellikle de singlet oksijeni baskılayarak lipitlerin peroksidasyona karşı korunmasına yardımcı olurlar. Beta karoten, özellikle ksantin oksidaz sistemi tarafından teşvik edilen lipit peroksidasyonu engellenmesi yoluyla güçlü bir antioksidan etkinlik sergiler (Sharoni ve ark., 2004).

Beta karotenler ve vitamin C, hem antioksidan hem de belirli koşullar altında pro-oksidan özellik gösterir. Düşük kısmi oksijen basıncı altında, beta karoten çok yüksek seviyede radikal yakalama etkinliği sergilerken, yüksek kısmi oksijen basıncı altında serbest radikal yakalama kapasitesi, antioksidan etkinliğin kaybıyla birlikte pro-oksidan etkinliğe dönebilir (Sönmez ve ark., 2007).

2.7. Safran ve Safranalin Yapısı

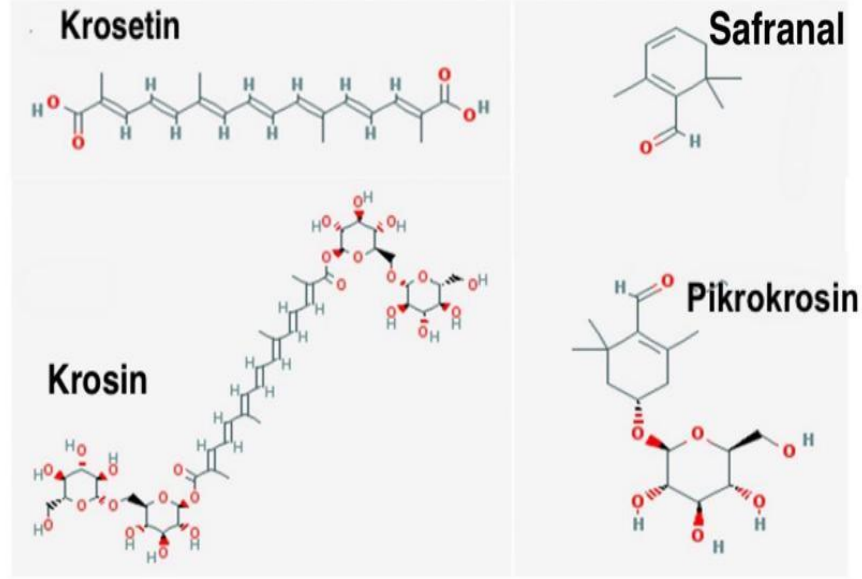
Safran (*Crocus sativus*), süsengiller (Iridaceae) familyasından (Predieri ve ark., 2021). sonbaharda çiçek açan ve 20-30 cm yüksekliğe ulaşan soğanlı bir kültür bitkisidir. Özellikle İran, Türkiye, Fas, Yunanistan, Hindistan ve İspanya'da yetiştirilmektedir. Tepecik kısmı, 2,5-3,5 cm uzunluğunda, ipliksi görünümlü ve filament olarak da adlandırılan üç parçaya ayrılır. Tepecik (stigma), koyu kırmızı renkte bir yapıya sahiptir. Bitkinin kullanılan organı, bu üç parçalı tepecik kısmıdır. Safran, lezzeti ve rengi nedeniyle yemeklerde yaygın olarak kullanılan çok eski bir kültür bitkisidir (Winterhalter ve Straubinger, 2000).

Safranın kimyasal yapısı karmaşıktır. Genel olarak, doğada yaygın olarak bulunan temel metabolitlere sahiptir. Bunlar arasında karbonhidratlar, mineraller, yağlar, vitaminler, amino asitler ve proteinler bulunmaktadır. Farklı sınıflara ait birçok bileşik, sekonder metabolitlerin bir parçasıdır. Bu metabolitler, organizmanın gelişimi veya üremesi için yaygın olmayan ancak önemli olan ürünleridir. Bunlar arasında karotenoidler, monoterpentler ve özellikle antosiyaninleri içeren flavonoidler bulunmaktadır (Hou ve ark., 2013).

Karotenoidler, baharatın rengini aldığı en önemli bileşenlerdir. Bunlar arasında yağda çözünenler α - ve β -karoten, likopen ve zeaksantin ile suda çözünenler, apokarotenoid krositin ($C_{20}H_{24}O_4$) ve krosininler bulunmaktadır. Krosinler, mono- ve di-glikozit krositin polien esterleridir. Krosinler, genellikle tüm diğer karotenoidlerden farklı olarak, dikarboksilik asit krositin mono- ve di-glikozile esterleri olduklarından, suda çok iyi çözünönen bir karotenoid ailesidir (Satomi, 2017). Bitkinin stigma ağırlığının %3.5'ini oluştururlar. Safranın glikozid karotenoidleri, tıpkı diğer glikozitler gibi, genellikle çözeltilerde özellikle termal olarak labil ve foto-kimyasal olarak duyarlıdır (Simkin, 2021).

Karotenoidlerin oksidasyon ürünleri arasında iki bileşen pikrokrosin (monoterpene glikozit) ve safranaldit (siklik monoterpene aldehit). (Maggi ve ark., 2020). Bu bileşikler zeaksantin adı verilen bir karotenoidin oksidatif fraksiyonlanmasının türevidir. Zeaksantin, enzim CsZCD (*Crocus sativus* zeaksantin bölme dioksijenaz) tarafından her iki ucundan kırılarak krosetindialdehit'i üretir (Mostofian ve ark., 2020). Bu krosetindialdehit, farklı glukoziltransferazlar tarafından oksitlenip esterleştirilebilir (Simkin ve ark., 2004). Krosinler ile pikrokrosin'i üretebilir. Pikrokrosin ($C_{16}H_{26}O_7$), stigma ağırlığının %3.7'sini oluşturan ve yalnızca *Crocus* cinsinde tanımlanan bir bileşiktir. Bu cinsin tek yenilebilir baharatı *Crocus sativus* L. olduğu için, safranın moleküler belirteci olarak kabul edilir. Kuruma sürecinde, β -glukozidaz enzimi pikrokrosin üzerinde etki eder ve 4-hidroksi-2,6,6-trimetil-1-sikloheksen-1-karboksaldehit ($C_{10}H_{16}O_2$) serbest bırakılır (Simkin, 2021). Dehidrasyon sırasında bu, safranaldit'e ($C_{10}H_{14}O$) dönüşür. Bu, stigma içinde %0.02'lik bir oranla bulunur ve safranın uçucu fraksiyonunun ana bileşenidir (Maggi ve ark., 2020).

Kısaca, safranın başlıca biyolojik olarak aktif bileşenleri (Şekil 2.1), safranin rengini veren krosetin ve glikosidik formu olan krosin, safranın tipik aromasından sorumlu olan safranal (baharatlı aroma) ve keskin tadını veren pikrokrosindir (Milajerdi ve ark., 2016). Aslında safranın çeşitli organoleptik özellikleri ve nihai değeri, bu üç ana bileşenin göreceli yüzdesine atfedilmektedir.



Şekil 2.1. Safranin başlıca biyolojik olarak aktif bileşenleri (Mashmoul ve ark., (2013).

Krosin ($C_{44}H_{40}O_{24}$), disakkarit gentiyobiyoz ve dikarboksilik asit krosetinden oluşan bir di-esterdir. Doğal olarak oluşan birkaç karotenoidden biri olan krosin, suda kolaylıkla çözünebilen bir bileşiktir. Krosinin tıbbi alandaki çeşitli farmakolojik aktiviteleri arasında antioksidan, anti-kanser, öğrenme ve hafıza arttırıcı özellikler bulunmaktadır (Bathaie ve Mousavi, 2010). Çeşitli çalışmalar, safranin güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve bu özelliğin çoğunlukla benzersiz bir karotenoid olan krosinin varlığından kaynaklandığını göstermiştir (Akhondzadeh ve ark., 2008). Krosin, özellikle süperoksit anyonları gibi serbest radikalleri temizleyerek hücreleri oksidatif strese karşı koruma yeteneğine sahiptir. Yapılan araştırmalar, krosinin spermanın dondurularak saklanması konusunda faydalı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle, sahip olduğu büyük antioksidan aktivite sayesinde nörodejeneratif bozuklukların tedavisinde potansiyel bir yarar sağlayabilir (Xi ve ark., 2007).

İn vitro koşullarda, krosin, optimal ROS seviyesi aracılığıyla geyik spermasının çözüm sonu motilitesi üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu bildirilmelidir (Domínguez-Rebolledo ve ark., 2010). Krosin geyiklerde, serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonuna ve DNA hasarına karşı koruyucu bir etki göstermektedir (Domínguez-Rebolledo ve ark., 2010). Ayrıca, koç spermasını da (Mata-Campuzano ve ark., 2015) etkileyerek koruyucu bir rol oynar. Sapanidou ve ark. (2015), sığır spermasının krosin varlığında inkübasyonunun motiliteyi, canlılığı, membran bütünlüğünü ve blastosist oranını iyileştirdiğini bildirmiştir.

Antioksidan özelliklere sahip doğal bir madde olan krosin tarafından desteklenen deneysel bir sulandırıcı kullanarak dondurularak saklanan teke spermasının kalitesini iyileştirmeye yönelik stratejilerin geliştirilmesine odaklanılarak yapılan çalışmada, krosinin sperm motilitesi ve DNA bütünlüğü üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, farklı ırklarda dondurulup çözülmüş teke spermasının oksidatif stresini azalttığı tespit edilmiştir (Sultana ve ark., 2013).

Safranal ($C_{10}H_{14}O$) (2,6,6-trimetil-1,3-sikloheksadien-1-karboksaldehit), safranın karakteristik aromasından sorumlu, molekül ağırlığı 150.22 g/mol olan bir bileşiktir ve depolama sürecinde, baharata karakteristik acı tadı kazandıran pikrokrosin'in dehidrasyonu ile oluşur (Predieri ve ark., 2021).

2.8. Safranal'ın Antioksidan Etkileri

Safranal, bilinen bir antioksidan olarak antikonvülsan, antidepresan, antitissüf, sitotoksik, antihipertansif, gastroprotektif ve antikarsinogenik etkilere sahip olduğu farklı araştırmalarla ortaya konmuştur. Bu umut verici özellikleri nedeniyle, klinik çalışmalarda tedavi edici ve koruyucu ajan olarak kullanılmaktadır (Bamdad Riahi-Zanjani ve ark., 2015).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, safranalin karaciğerde lipid peroksidasyonunda yaşa bağlı artışa ve antioksidan enzim aktivitelerindeki azalmaya karşı koruyucu bir etki sergilediği gözlemlenmiştir (Farahmand ve ark., 2013). Ayrıca, yaşlı sıçanların beyinlerindeki oksidatif hasara karşı da etkili olduğu gösterilmiştir (Samarghandian ve ark., 2015). Safranalin, serebral iskemi ile indüklenen sıçan

hipokampusündeki yüksek MDA seviyelerini etkili bir şekilde düşürdüğünü gösteren araştırmalar bulunmaktadır (Hosseinzadeh ve Sadeghnia, 2005). Yapılan bir in vitro çalışmada safranalin deride oluşan serbest radikalleri inhibe ettiği ve dermal enzimlerin inhibisyonunu sağladığı bildirilmiştir (Madan ve Nanda, 2018). Astımlı fareler üzerinde gerçekleştirilen bir araştırmada, safranalin antioksidan özelliklerinin gözlemlendiği bildirilmiştir (Bukhari ve ark., 2015). Diyabetik sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada safranalin, bronkoalveolar lavaj sıvısı (BALF) ve akciğer dokusunda malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) seviyelerindeki artışı engellediği gözlemlenmiştir (Samarghandian ve ark., 2014). Ayrıca, safranalin diyabetik sıçanların testis dokusunda antioksidatif etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Ataei ve Rahbarian, 2020).

Safranalin çeşitli sistemler üzerine antioksidan etkinliği ortaya konulmuştur. Ancak koç sperma sulandırıcısına eklenerek etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu amaçla çalışmamızda koç sperma sulandırıcısına farklı oranlarda eklenen safranalin çözüm sonu bazı spermatolojik parametreler üzerine etkisinin olup olmadığının ortaya konması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Koçların Seçimi

Araştırmada sağlıklı ve fertil özelliği bilinen ergin (2-5 yaşlı) 5 baş Konya Merinosu Melezi ırkı koçlara ait ejakülatlar kullanıldı. Koçların bakım ve beslemesi Burdur İli'nde bulunan özel bir işletmede yapıldı. Çalışma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 14.09.2022 tarih ve 946 sayılı kararı ile çalışılmıştır. Ayrıca, çalışma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından **0884-YL-23/ 2017K12-41003** nolu yüksek lisans projesi ile desteklenmiştir.

3.2. Spermanın Alınması ve Değerlendirilmesi

Ejakülatlar, yetiştirme mevsiminde olacak şekilde haftada bir kez olmak üzere elektroejakülatör (MiniTube, Ref:11900/0000, Almanya) yardımıyla toplamda her koştan 6 ejakülat olacak şekilde alındı. Sperma alma işlemi öncesi koç, elektroejakülasyon yöntemi için zapturapt altına alındı. Prepusyal bölgedeki uzun kıllar, sperma almak amacıyla makas yardımıyla kesildi. Daha sonra, koğun prepusyal bölgesi, fizyolojik tuzlu su (FTS) ile nemlendirilmiş pamukla temizlendi ve ardından pamukla kurulandı. Elektroejakülatörün probuna kayganlaştırıcı jel uygulandıktan sonra, prob rektuma yerleştirildi. Penis, el manüplasyonu ile prepusyumdan dışarı çıkarıldı ve sperma toplama kadehine penisin prosessus uretra bölümüne yönlendirildi. Elektroejakülatörün probu ile koğun ampulla bölgesine 4-12 V'luk arasında uyarım yapılarak, ejakülasyon uyarıldı. Ejakülasyon tamamlanmasının ardından, ejakülat dereceli sperma toplama kadehine (32-35°C sıcaklıkta) aktarıldı. Elektroejakülatör ile sperma işlemleri sırasında koçların yanında ya da bulunduğu bölümde östrusta koyun olmamasına dikkat edildi. Elde edilen ejakülatlar Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Laboratuvarında değerlendirilerek, ejakülatlardan; $\geq 1\text{ml}$ hacim, $\geq 80\%$ motilite, $\geq 1 \times 10^9$ spermatozoa/ml'nin yoğunluğa sahip olan koç spermaları deney tüplerine aktarılıp birleştirildikten (pooling) sonra 5 eşit hacme ayrılmıştır.

3.3. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması

3.3.1. Spermanın Sulandırılması

Spermaların sulandırılmasında temel sulandırıcı olarak Tris sulandırıcısı kullanıldı ve aşağıda belirtilen formüle göre hazırlandı.

Hazırlanan temel Tris sulandırıcısı içerisine Safranal (W338907-100G-K, 150.22 g/mol, Sigma-Aldrich, Amerika) antioksidanın 4 farklı dozu ilave edildi ve 1 antioksidan içermeyen grup (kontrol) olmak üzere toplamda 5 sulandırıcı grubu oluşturuldu. Çalışmada kullanılan temel sulandırıcı:

Tris sulandırıcısı (temel sulandırıcı)

Tris (Hidroksimetilaminometan)	297,58 mM
Sitrik asit	96,32 mM
Fruktoz	82,66 mM

Temel sulandırıcının osmotik basıncı 317 mOsm ve pH'sı 7,01 olarak ölçüldü. Bunun üzerine (sperma alınacağı gün) %15 taze yumurta sarısı eklenerek 15 dakika 6000 devirde santrifüj işlemi uygulanarak debris kısmı uzaklaştırıldıktan sonra %6 oranında gliserol eklenerek hazır hale getirildi. Yumurta sarılı sulandırıcılara safranalin moleküler ağırlığı esas alınarak çalışmada kullanılacak molaraiteler 20 ml hacminde olacak şekilde hesaplanarak eklendi. Çalışmanın başlangıcında tez önerisinde verilen 0,5, 1, 2 ve 4mM safranal dozları kullanıldı. Ancak bu aşamada elde edilen sonuçlar incelendiğinde 4 mM doz için toksik etkili olduğu ekilibasyon sonunda dahi spermatozoa motilitesinin %50 ve altında kaldığı ve dondurulamayacağı ortaya konuldu bu sebeple 4mM dozun çalışmadan çıkarılmasına karar verildi ve onun yerine en düşük doz olan 0,25 mM safranal dozunun çalışmaya dahil edilmesi kararlaştırıldı.

Grup 1 Kontrol (Antioksidan içermeyen)

Grup 2 0,25 mM Safranal (S0,25)

Grup 3 0,5 mM Safranal (S0,5)

Grup 4 1 mM Safranal (S1)

Grup 5 2 mM Safranal, (S2)

olacak şekilde sulandırıcı grupları oluşturuldu.

3.3.2. Spermanın Dondurulması

Sulandırma işlemi ml’de yaklaşık 800×10^6 spermatozoa olacak şekilde yapıldı. Sulandırılan sperma örnekleri 20 dakika oda ısısında tutulduktan sonra 0,25 ml’lik payetlere çekilerek yaklaşık 2,5 saat $+5^\circ\text{C}$ ’ta ekilibrasyona bırakılarak ve ekilibrasyon sonrasında sıvı azot buharında ($\sim -110^\circ\text{C}$) 12 dakika tutularak donduruldu ve ($\sim -196^\circ\text{C}$) sıvı azotta saklandı.

3.4. Çözüm Sonu Parametrelerin Analizi

Safranalin spermatozoa üzerindeki etkinliğinin belirlenmesinde çözündürme sonrası subjektif motilite faz kontrast mikroskopta; Plazma membran akrozom bütünlüğü (PMAI, FITC-PNA/PI), mitokondrial aktivasyon (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine, iodide, JC-1) ve viabilite oranı (SYBR/PI) flow sitometri cihazı (Beckmen Coulter CytoFLEX) ile analizleri gerçekleştirildi.

3.4.1 Çözüm Sonu Spermatozoa Motilitesi

Payetler, $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 'lik su banyosunda 25-30 saniye süre içerisinde çözündürüldü. Spermatozoa motilitesi 37°C 'ta ısıtma tablalı faz kontrast mikroskobun 40x objektifte lam-lamel arasına alınan bir damla sperma numunesinde en az 5 mikroskop sahasında

motilite analizleri konusunda uzman kişi tarafından gerçekleştirildi elde edilen değerlerinin aritmetik ortalaması % subjektif motilite oranı olarak kaydedildi (Güngör ve ark., 2019a).

3.4.2. Flow Sitometri Analizleri

Flow sitometri analizleri, Cytoflex Flow sitometri (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Sperma örnekleri, 488 nm (50 mW lazer çıkışı) tek lazer ve üç renkli 525 ± 40, 585 ± 42, 610 ± 20 nm filtrelerle değerlendirildi. Cihazın okuma hızı saniyede 30 µL olarak ayarlanarak, her bir örnek için 10.000 hücre analiz edildi. Popölasyon seçimi (Gate) için hücre büyüklüğüne dayalı Forward Scatter Area (FSC-A) ve hücre granülerliğine dayalı Side Scatter Area (SSC-A) kullanılarak tüm hücreler okundu ve sperm popölasyonu belirlendi. Daha sonra FSC-A ve Forward Scatter Height (FSC-H) kapıları ile hedef popölasyon seçimi yapıldı. Çalışma solölasyonları, 100 µg/mL fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) [L7381, Sigma, Emisyon: 521 nm], 2.99 mM propidium iodide (Emisyon: 629 nm), 1:10 SYBR [L7011, Emisyon: 520 nm], 0.153 mM JC-1 [T 3168, Emisyon: 595 nm] moleküler probes, Invitrogen DMSO ile hazırlanarak 30 µL'lik porsiyonlara ayrıldı ve -20°C'de saklandı.

3.4.2.1. Plazma membran ve Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi (PMAI, FITC-PNA/PI)

Çift boyama yönteminin kullanıldığı FITC-PNA/PI boyamada spermada akrozom ve plazma membrane bütünlüğü değerlendirildi. 5 µL FITC-PNA ve 3 µL PI 492 µL PBS eklenerek, daha sonra 10 µL sperma PBS solölüsyonuna eklenerek finalde 5x10⁶ sperm/mL konsantrasyonunda olacak şekilde sulandırıldı. Sperma örnekleri 37 C°'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Debris (sperma olmayan alanlar) kapı alınarak uzaklaştırılarak CytExpert 2.3 software (Beckman Coulter) analiz gerçekleştirildi (Güngör ve ark., 2019a). FITC negatif, PI negatif alan akrzomu sağlam ve membran bütünlüğü sağlam şeklinde kaydedildi.

3.4.2.2. Spermatazoa Viabilite Oranının Belirlenmesi (SYBR-14/PI)

Sybr 14 ve PI boya ları, sperm viabilite oranının değerlendirilmesinde kullanıldı. 5 µL Sybr 14 ve 3 µL PI (2.99 mM), 492 µL tampon çözeltilisine eklenerek, daha sonra 10 µL sperma süspansiyonu fosfat tampon solüsyonuna eklenerek spermatozoon konsantrasyonu 5×10^6 sperm/mL olacak şekilde sulandırıldı. Numuneler 37°C'de 15 dakika boyunca karanlık ortamda inkübe edildi. Debris (sperma olmayan alanlar) kapı alınarak uzaklaştırıldı ve CytExpert 2.3 yazılımı (Beckman Coulter) kullanılarak analiz gerçekleştirildi. Analiz, SYBR 14 boyasını alan ve PI boyasını almayan popülasyonun (%) canlı olan popülasyon değerlendirildi. (İnanç ve ark., 2021).

3.4.2.3. Yüksek Mitokondrial Aktivasyonunun Belirlenmesi (HMMP)

Mitokondrial aktivasyonun değerlendirilmesinde JC-1 boyası kullanıldı. 5 µL JC-1 (0.153 mM), 495 µL tampon solüsyonuna eklenerek, daha sonra 10 µL sperma süspansiyonu fosfat tampon solüsyonuna eklenerek spermatozoon konsantrasyonu 5×10^6 sperm/mL olacak şekilde sulandırıldı. Sperma örnekleri 37°C'de 15 dakika boyunca karanlık ortamda inkübe edildi. Debris (sperma olmayan alanlar) kapı alınarak uzaklaştırıldı ve CytExpert 2.3 yazılımı (Beckman Coulter) kullanılarak analiz gerçekleştirildi. Analiz, yüksek mitokondrial aktivasyon (HMMP) olarak değerlendirildi (İnanç ve ark., 2021).

3.5. İstatistiksel Analiz

Tüm analizlerden elde edilecek ham değerler grup ortalaması $\pm$ standart hata şeklinde sunuldu. Elde edilen veriler SPSS paket programı kullanılarak öncelikle normallik analizi yapıldı. Normal dağılım gösteren verilerin kontrol ve deney gruplarının arasındaki farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü tek yönlü varyans analiz (One-Way ANOVA) yöntemi kullanılarak yapıldı. Gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testi'nden yararlanıldı. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelendi ve SPSS 22 paket programı kullanıldı.

4. BULGULAR

Tablo 4.1. Koçlara ait spermatolojik özellikler ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:6)

Koç No	Motilite (%)	Ejakülat miktarı (ml)	Yoğunluk ($\times 10^9/\text{ml}$)
1	82,50 $\pm$ 1,11	2,16 $\pm$ 0,47	1,85 $\pm$ 0,15
2	85,83 $\pm$ 1,53	1,81 $\pm$ 0,12	2,73 $\pm$ 0,58
3	84,16 $\pm$ 1,53	3,00 $\pm$ 0,36	2,74 $\pm$ 0,25
4	85,00 $\pm$ 1,29	2,05 $\pm$ 0,20	1,78 $\pm$ 0,20
5	85,00 $\pm$ 1,82	1,70 $\pm$ 0,07	1,93 $\pm$ 0,14
Ort(n:30)	84,50 $\pm$ 0,64	2,14 $\pm$ 0,14	2,20 $\pm$ 0,15

Çalışma süresince kullanılan beş baş koçtan 6'şar defa sperma toplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Buna göre koçların nativ spermatozoa motilite oranı en yüksek %85,83 $\pm$ 1,53, en düşük %82,50 $\pm$ 1,11 olarak tespit edildi. Ejakülat miktarı en düşük 1,70 $\pm$ 0,07 ml, en yüksek 3,00 $\pm$ 0,36 ml olarak bulundu. Spermatozoa konsantrasyon sonuçları incelendiğinde en düşük yoğunluk 1,78 $\pm$ 0,20 $\times 10^9/\text{ml}$ olarak tespit edilirken en yüksek spermatozoa konsantrasyonu 2,74 $\pm$ 0,25 $\times 10^9/\text{ml}$ olarak tespit edildi (Tablo 4.1).

Tablo 4.2. Farklı dozlarda kullanılan safranalin çözümü sonu spermatolojik parametreler üzerine etkisi ($\bar{X} \pm \text{SEM}$)

Grup	Motilite %	PMAI %	Viabilite %	HMMP %
K	46,20 $\pm$ 2,13 ^b	23,42 $\pm$ 2,62 ^{ab}	47,78 $\pm$ 1,56 ^{ab}	10,66 $\pm$ 0,99 ^b
S0,25	54,34 $\pm$ 1,27 ^a	23,58 $\pm$ 2,46 ^{ab}	54,04 $\pm$ 2,32 ^a	16,27 $\pm$ 0,55 ^a
S0,5	54,80 $\pm$ 2,17 ^a	24,51 $\pm$ 0,94 ^a	51,16 $\pm$ 1,94 ^a	14,56 $\pm$ 1,32 ^a
S1	43,04 $\pm$ 2,45 ^b	18,24 $\pm$ 2,04 ^{bc}	49,31 $\pm$ 1,89 ^{ab}	7,82 $\pm$ 0,62 ^b
S2	26,83 $\pm$ 3,25 ^c	16,58 $\pm$ 1,00 ^c	43,57 $\pm$ 2,80 ^b	7,98 $\pm$ 1,41 ^b
P	*	*	*	*

K: Kontrol, S0,25: 0,25 mM Safranalin, S0,5: 0,5 mM Safranalin, S1: 1 mM Safranalin, S2: 2 mM Safranalin, PMAI: Plazma membran akrozom bütünlüğü, HMMP: Yüksek mitokondriyal aktivasyon

^{a,b,c}Aynı sütunda bulunan gruplar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0,05)

Elde edilen sonuçlara göre en yüksek çözüm sonu motilite değerleri S0,25 ve S0,5 gruplarında elde edilmiştir, ayrıca safranal 2 mM dozu ilave edilen grupta çözüm sonu motilite değeri en düşük olarak belirlendi ($p<0,05$). PMAI analizinde en yüksek koruma S0,5 grubunda görülürken istatistiksel olarak kontrol grubuna göre önemli bulunmadı ($p>0,05$). S2 grubunda ise en düşük akrozom bütünlüğü oranı elde edildi ($p<0,05$). Koç spermasının safranalın farklı dozlarını içeren sulandırıcılar ile dondurulması sonrası çözüm sonu viabilite oranının değerlendirildiği SYBR-14/PI analizi sonucuna göre en yüksek canlılık S0,25 ve S0,5 grubundan elde edilirken bu sonuç kontrol grubuna karşı önemli bulunmazken S2 grubuna göre önemli bulundu ($p<0,05$). Yüksek mitokondriyal aktivite analizinin gerçekleştirildiği HMMP analiz sonuçlarına göre S0,25 ve S0,5 grupları diğer gruplardan yüksek elde edildi ($p<0,05$, Tablo 4.2).

5. TARTIŞMA

Sunulan tez çalışmasında koç spermasının sulandırılmasında farklı dozlarda kullanılan safranal içeren sperma sulandırıcıları ile ilgili yapılmış araştırmaların bulunmaması nedeniyle elde edilen veriler farklı tür memelilerde yapılmış olan sperma sulandırıcılarıyla elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Bunun yanı sıra, çalışmamızda kullanılan safranalın genellikle herhangi bir türde oluşturulan hasara karşı oral olarak verilip etkinliklerinin araştırıldığı, ROS ve antioksidan kapasite parametrelerine etkisini incelemek şeklinde olduğu görülmüştür. Bu nedenle araştırmada kullandığımız yöntem ve elde edilen veriler, aynı antioksidan maddelerin farklı kullanım yolları ve farklı türler üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

Beş baş Merinos ırkı koçtan elektro-ejakülatör kullanılarak alınan spermaların ejakülat miktarı en düşük $1,70 \pm 0,07$ ml, en yüksek $3,00 \pm 0,36$ ml olarak bulundu. Çalışma ortalaması ise $2,14 \pm 0,14$ ml olarak belirlendi. Bu değerin Aral ve Aral'ın (2004), $1,2 \text{ ml} \pm 0,04$; Gökçen ve ark.'ın (1991), $0,7-1$ ml; Arrebola ve ark.'ın (2022), $1,32 \pm 0,06$ ml; Rathore'un (1970), $1,06$ ml, İnanç (2016), $1,74 \pm 0,23$ 'e göre yüksek Akalın ve ark.'ın (2015), $1,99 \pm 0,05$ ml, Yeni ve ark. (2010), $1,9$ ml sperma hacmine göre benzer olduğu belirlenmiştir. Bu durumun, hayvanın yaşı, ırkı, mevsim, beslenme ve sperma alma yönteminin farklı olması gibi etkenlere bağlı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada 5 baş Merinos koçtan elde edilen nativ motilite değerleri en yüksek $\%85,83 \pm 1,53$, en düşük $\%82,50 \pm 1,11$, ortalama $\%84,50 \pm 0,64$ olarak belirlendi. Öztürk ve ark. (2021), $\%77,50 \pm 2,89$, Arrebola ve ark.'ın (2022), $\%76,2 \pm 1,7$, Uysal ve ark.'nın (2003), $\%80$, Alçay ve ark.'ın (2016), $\%77,0 \pm 2,0$, Akalın ve ark.'ın (2015), $\%81,54 \pm 0,41$, Yeni ve Avdatek (2019) Ramlıç koçlarda yaptıkları çalışmada ise $\%80,00 \pm 1,29$ olarak tespit edildiğini belirtmektedirler. İncelenen bu sonuçlar ile sunulan tez çalışma motilite ortalamaları kıyaslandığında anılan motilite ortalamalarından yüksek, Aral ve Aral'ın (2004) $\%82,69 \pm 0,91$, Avdatek ve ark. (2018), $\%83,3 \pm 2,10$, Güngör ve ark.'ın (2019b), $\%85$, Yeni ve ark.'ın (2019), $\%82,0 \pm 2,00$; Akalın ve ark.'ın (2016), $\%84,1 \pm 0,8$; İnanç (2016), $\%86,21 \pm 2,7$ ile benzer olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde görülen farklılıkların sperma

alma yöntemi, kullanılan koçların ırk farklılıkları, mevsimsel değişimler ve çevresel koşullardan oluşabileceği kanısına varılmıştır.

Sunulan tez çalışmasında nativ spermatozoa konsantrasyonu en düşük $1,78 \pm 0,20 \times 10^9/\text{ml}$ olarak tespit edilirken en yüksek spermatozoa konsantrasyonu $2,74 \pm 0,25 \times 10^9/\text{ml}$, ortalama konsantrasyon ise $2,20 \pm 0,15 \times 10^9/\text{ml}$ olarak tespit edildi. Saptanan bu değer Aral ve Ark.'ın (2004), $2,78 \pm 0,06 \times 10^9/\text{ml}$, Gökçen ve Ark.'ın (1991), $2,48 \times 10^9/\text{ml}$, Günay ve Ark.'nın (2003), $2,52 \times 10^9/\text{ml}$ ve $3,29 \times 10^9/\text{ml}$, İnanç'ın (2016), $2,95 \pm 0,2/\text{ml}$ 'den düşük bulunurken, Akalın ve Ark.'ın (2015), $2,10 \pm 0,53 \times 10^9/\text{ml}$, İnce ve Karaca'nın (2009), $1,86 \times 10^9/\text{ml}$, Yılmaz'ın (2004), $1,78 \times 10^9/\text{ml}$, olarak saptadığı yoğunluk miktarlarına benzer olduğu saptanmıştır. Spermanın yoğunluğu da diğer spermatolojik özellikler gibi spermanın alınma yöntemine, seksüel uyarımın derecesine, sperma alma sıklığına, yaşa, mevsime ve beslenmeye bağlıdır (Hafez, 2000; Sönmez, 2013). Koçlarda sperma yoğunluğu $\text{ml}'de$ $1-6 \times 10^9$ spermatozoa/ml olacak şekilde geniş bir aralığa sahip olduğu bildirilmektedir (Ata, 2023).

Sunulan tez çalışmasında Konya Merinos melezi koçlarının mix ejakülatlarının çözüm sonumotilite oranı kontrol grubu motilite değeri $\%46,20 \pm 2,13$ olarak tespit edildi. İnanç (2016), Akkaraman koçlarında $\%33 \pm 0,09$, İnanç ve Ark. (2019), Merinos koçlarda $\%25,0 \pm 4,2$, İnanç ve Ark. (2023), Sönmez koçlarda $\%56,04 \pm 2,42$, Yeni ve Ark. (2022), $\%51,92 \pm 3,68$, Güngör ve Ark. (2019c), Merinos koçlarda $\%29,2 \pm 1,31$, Berk (2023), Sönmez ırkı koçlarda $\%65,41 \pm 1,64$, Soylu (2023), Sönmez ırkı koçlarda $\%58,23 \pm 3,28$, Koca (2022), Akkaraman koçlarında çözüm sonu motilite değerlerini $\%30$ ve $\%35$ olarak tespit ettiklerini bildirmiştir. Elde edilen sonuçlar yapılan benzer çalışmalar ile kıyaslandığında benzer, yüksek ya da düşük olarak değerlendirilebilir. Bu durum koçların ırk, yaş, çevresel faktörler, sperma dondurma süreçleri, sulandırıcı farklılıkları, zaman gibi farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda kontrol grubuna ait çözüm sonu akrozom ve plazma membran bütünlüğü, viabilite ve yüksek mitokondriyal membran potansiyeli oranları sırasıyla, $\%23,42 \pm 2,62$; $\%47,78 \pm 1,56$ ve $\%10,66 \pm 0,99$ olarak tespit edildi. İnanç ve Ark. (2019), Merinos koçlarında yapmış olduğu çalışmasında kontrol grubu akrozom ve plazma

membran bütünlüğü ve yüksek mitokondriyal membran potansiyeli oranlarını sırasıyla %10,3 ve %10,4, Koca (2022), Akkaraman koçlarında akrazom bütünlüğü oranını %30,20±2,54 ve %22,91±3,13; viabilite oranlarını %25 ve %23, yüksek membran aktivasyon oranları %22 olarak tespit etmiştir. İnanç (2016), ise Akkaraman ırkı koçlarda çözüm sonu ölü spermatozoa oranını %68,23±9,29, akrazom bütünlüğü oranını %57,49±10,8 ve toplam mitokondriyal membran aktivasyonu oranını %61,9±21,08, Öztürk ve ark. (2020), Merinos koçlarda çözüm sonu viabilite oranını %45,08±2,98, İnanç ve ark. (2016), Sönmez ırkı koçlarda çözüm sonu akrozom ve plazma membran bütünlüğü oranını %21,70±1,46, yüksek mitokondriyal membran aktivasyon oranını %15,63±3,10, Güngör ve ark. (2019c), Merinos koçlarda %11,5±1,46, yüksek mitokondriyal membran aktivasyon oranını %11,4 yüksek mitokondriyal membran aktivasyon oranını 3,64, Yeni ve ark. (2022), Akrazom bütünlüğü oranını %26,20±2,36, viabilite ve mitokondriyal membran aktivasyon oranını sırasıyla, %62,50±3,07 ve %30,11±2,88, Berk (2023), Sönmez ırkı koçlarda ölü-canlı spermatozoon oranını ve membran bütünlüğünü kombine olarak HE test ile belirlemiş ve sonucunu H+/E- oranını bildirdikleri çalışmasında %39,83±2,26, Soylu (2023), Sönmez ırkı koçlarda aynı yöntemle analiz ettikleri çözüm sonu viabilite ve membran bütünlüğü değerlendirmesinde (H+/E-) %35,00±3,15, İnanç ve ark. (2022), Sönmez ırkı koçlarda çözüm sonu PMAI oranını %47,77±1,02 olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde çalışmamız sonuçları ile benzerlik ve farklılıkların olduğu görüldü. Oluşan farklılıkların hayvan materyali, sperma eldeetme yöntemleri, çalışma dönemi, mevsimsel ve bölgesel farklılıklar, analiz yöntemleri, dondurma teknikleri gibi sebeplerden kaynaklanabileceği kanatine varıldı.

Oksidatif stres kaynaklı hasarları azaltmak ve ROS üretimini dengelemek amacıyla sulandırıcı içerisine antioksidan katılarak yapılan çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır (Peris-Frau ve ark., 2020). Sunulan çalışma ile antioksidan özelliği olan safranalin farklı dozlarda sulandırıcı içerisine katılmasıyla koç spermasının dondurulmasındaki etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Koç spermasının dondurulmasında farklı oranlarda safranalin içeren sulandırıcıların çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmamızda, koç spermasının çözüm sonu değerlendirilmelerinden motilite (%),

flow sitometrik analizlerden; plazma membran ve akrozom bütünlüğü (PMAI %), spermatozoa canlılığı analizi (SYBR-14/PI, %) ve yüksek mitokondriyal aktivite oranı tayini (HMMP, %) analizleri gerçekleştirildi. Buna göre çözüm sonu en yüksek motilite oranları S0,25 ve S0,5 gruplarından elde edildi ($p<0,05$). Ayrıca yapılan motilite analizinde S2 grubunda en düşük motilite tespit edildi ($p<0,05$). Yapılan çalışmada motilite sonuçları değerlendirildiğinde safranalin düşük dozlarının çözüm sonu motilite değerlerinde olumlu etkinliği bulunacağı tespit edilirken çalışmadaki yüksek dozlarının çözüm sonu motilite değerlerine karşı olumsuz etkinliği olduğu kanısına varıldı.

İnsan spermasının donudurulması üzerine yapılan çalışmada sulandırıcıya eklenen 50mg/ml oranında safran ekstratı eklenen grupta çözüm sonu motilite oranı kontrol grubuna karşı istatistiksel olarak yüksek bulunduğuna belirtilmiştir (Khazaei ve Moghbelinejad, 2017). Safranalin oral olarak (100mg/kg) dozda 9 hafta boyunca tavşanlara uygulanması sonucu yapılan araştırmada safranalin sayısal olarak kontrol grubuna göre spermatozoa konsantrasyonu, motilite oranını artırdığı ancak istatistiksel olarak üstünlük sağlamadığı belirtilmiştir (Etyemez ve Gülay, 2022). Asadi ve ark. (2014), ratlarda kadmiyum toksisitesine karşı oral olarak 16 gün süresince gün aşırı 100mg/kg dozda uyguladıkları safran ekstraktının motilite üzerine koruyucu etkinliklerini tespit etmişlerdir aynı zamanda kontrol grubu üzerinde de istatistiksel olarak farklılık gözlenmesinde sayısal olarak yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

İdiopatik infertilite teşhisi konmuş insanlarda haftada 3 kez olacak şekilde 3 ay boyunca 50mg/kg dozda oral yolla safran uygulaması sonucu yapılan spermatolojik analizde safran tüketilmesi sonucu elde edilen motilite oranının (%55,04) çalışma başlangıcında yapılan motilite oranından (%35,2) daha yüksek olduğunu ifade etmektedirler (Heidary ve ark., 2008). Buna karşın başka bir çalışmada idiyopatik infertilite teşhisi konulmuş 260 insanda yapılan çalışmada 2 grup oluşturulmuş tedavi grubuna (n=130) 60mg/kg/gün safran kapsül şeklinde oral yolla verilmiş, kontrol grubuna (n=130) plasebo kapsül verilerek 26 haftalık bir uygulama gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak safran tüketen grupta kontrol grubuna karşı spermatozoa motilite oranı bakımından bir üstünlük elde edilemediği sonucuna ulaşılmıştır (Safarinejad ve ark., 2011).

Ratlarda spermatolojik parametreler üzerine safran ekstraktının etkinliğinin araştırıldığı çalışmada 60 gün süresince ratlara oral yolla 100mg/kg/gün olacak şekilde safran verilmiş deney sonunda yapılan motilite değerlendirilmesinde safran ekstraktı verilen grubun spermatozoa motilitesi kontrol grubuna karşı yüksek bulunmuştur ($p<0,001$, Vaez ve ark., 2014).

Safranın bir diğer bileşiği olan krosin ile yapılan çalışmada boğa sperma sulandırıcılarına 0,5, 1 ve 2 mM dozlarda eklenerek çözüm sonu motilite analizine göre 0,5 ve 1 mM dozlarının kontrol grubuna göre üstünlük sağladığı ancak 2mM dozda krosin içeren sulandırıcı grubunda motilite oranının kontrol grubuna karşı üstünlük sağlamadığı belirtilmektedirler (Sapanidou ve ark., 2015). Mata-Campuzano ve ark. (2015), koç spermasının dondurulmasında sulandırıcıya 1 mM dozunda krosin ekledikleri çalışmada çözüm sonu motilite oranının %46 olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir.

Köpek spermasının sulandırıcıya eklenen safran ekstraktında bulunan krosinin 0,5;1 ve 2 mM dozlarının 72 saat süresince $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanması sonucu motilite analiz sonuçlarına göre 0,5 ve 1 mM gruplarından elde edilen motilite oranlarının kontrol ve 2 mM grubuna göre daha yüksek olduğu özellikle 2 mM dozun motiliteyi koruyamadığı araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Calabria ve ark., 2023). Benzer olarak Longobardi ve ark. (2020), yapmış oldukları çalışmada teke sperma sulandırıcılarına farklı dozlarda safran içeriğinde bulunan krosini ekleyerek çözüm sonu motilite değerlendirilmesinde en yüksek motilite oranına 1 mM dozda ulaştıklarını buna karşın 2 mM doz dondurma çözündürme sonrası en düşük motilite değerini verdiğini belirtmişlerdir.

Yukarıda verilen literatür bilgileri ışığında safran madesinin bileşiğinde bulunan safranalin sperma sulandırıcısına eklenerek incelenen motilite bulguları ile çalışmamızın sonuçları karşılaştırıldığında 0,25, 0,5 ve 1mM dozlarının motilite üzerine yaptıkları koruyucu etkinliğe benzer olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra safran ve içeriğinde bulunan safranalin oral olarak kullanımında genel olarak hayvanlarda oluşturulan hasara karşı koruyucu etkinlikler araştırılmış olup motilite

üzerine olumlu etki gösterdiği tek başına kullanılan gruplarda ise kontrol olarak oluşturulan gruplar ile benzer motilite değerlerine ulaşıldığı belirtilmektedir.

Sunulan tez çalışmasında ise koç spermasının dondurulmasında sulandırıcıya eklenen 0,25 ve 0,5 mM safranal dozlarının çözüm sonu motilite oranları kontrol grubundan yüksek bulunurken 1mM safran içeren grupta benzer, 2mM safran içeren grupta ise kontrol grubundan düşük bulundu. Ayrıca literatür taramalarında spermatolojik parametreler üzere etkinliğinin araştırılması amacıyla safranalin tek başına kullanıldığı çalışmaların çok kısıtlı olması sebebiyle safran bileşiğinde bulunan krosin maddesi ile yapılmış olan çalışmaların motilite üzerine etkinlikleri yapılan tez çalışma sonuçları ile karşılaştırılmış olup, sonucunda krosinin sperma sulandırıcılarına çalışmamız ile benzer dozlarda eklenmesi sonucu yüksek dozların motilite üzerine koruyucu etkisinin olmadığı aksine çalışmamız ile benzer şekilde toksik etki gösterdiği belirtilmektedir.

Sunulan tez çalışmasında koç spermasının çözüm sonu PMAI değerlendirmesine göre 0,25 ve 0,5 mM safranal içeren gruplarda kontrol grubuna göre sayısal olarak üstünlük gözlenmedi istatistiksel olarak bir fark elde edilemedi. Buna karşın 1mM ve 2mM safranal içeren gruplarda PMAI düzeyi kontrol grubundan düşük olarak elde edildi ($p<0,05$). Koç spermasının membranında yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidi içermesi nedeniyle spermanın dondurulma süreçlerinde en çok hasar gören spermatozoa türlerindendir. Bu hasar düzeyi spermatozoanın fertilite potansiyelini de olumsuz olarak etkilemektedir. Bu aşamada sulandırıcıya eklenecek olan katkı maddelerinin bu hasarı azaltması hedeflenmektedir. Ayrıca sunulan çalışmada çözüm sonu spermatozoa canlılığı ve mitokondriyal membran potansiyeli üzerine 0,25 ve 0,5 mM safranal eklenen sulandırıcı gruplarının koruyuculuğu kontrol grubuna kıyasla önemli bulundu. Ancak safranalin yüksek dozların ilave edildiği gruplarda özellikle 2 mM grubunda motilite sonuçları ile benzer şekilde antioksidan etkinlik yerine oksidan etkinlik göstererek olumlu etki göstermediği tespit edildi.

Yapılan literatür taramalarında sperma sulandırıcısına safranal eklenerek plazma membran ve akrozom bütünlüğü ve mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkinliği araştırılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Khazaei ve

Moghbelinejad (2017), insan spermasının dondurulması amacıyla sulandırıcıya 50mg/ml dozunda safran ekstraktını ekledikleri çalışmada çözüm sonu spermatozoa canlılık oranını safran eklenen grupta ($72\pm0,99$) kontrol grubuna ($46,6\pm1,1$) kıyasla yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Safran maddesinin kadmiyum (Cd) toksistesine karşı koruyucu etkinliğinin araştırıldığı çalışmada ratlara oral olarak 100 mg/kg/gün dozda 16 gün süresince verilen safranin Cd ile ve tek başına uygulandığı gruplarda rat epididimal spermatozoa canlılığı üzerine koruyucu etkinlik göstermediği ve sonuçların kontrol grubu ile benzer bulunduğu ancak tek başına Cd uygulanan gruptan yüksek canlılık oranına ulaşıldığını ifade edilmişlerdir (Asadi ve ark., 2014). Vaez ve ark. (2014), rat epididimal sperması üzerine safranin etkisini araştırdıkları çalışmalarında 60 gün süresince oral gavaj ile safranı 100mg/kg/gün olacak şekilde uyguladıkları gruptaki plazma membran sağlamlık test sonucuna göre kontrol grubuna karşı yüksek oranda koruyucu etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Boğa sperma sulandırıcısına 0,5;1 ve 2 mM dozlarda eklenen safranın bir diğer bileşiği olan krosin ile yapılan çalışmada çözüm sonu spermatozoa canlılık ve membran bütünlüğü oranı en yüksek 1 mM dozda elde edildiğini buna karşın 2 mM krosin eklenen gruptaki canlılık oranının antioksidan eklenen diğer gruplardan düşük olduğunu tespit etmişlerdir (Sapanidou ve ark., 2015).

Beş farklı teke ırkı kullanılarak sperma sulandırıcısına 0,5;1; ve 2mM dozunda krosin ilavesinin çözüm sonu teke spermatozoa canlılığı ve membran bütünlüğü üzerine etkinliğinin araştırıldığı çalışmada, sayısal olarak en yüksek canlılık ve membran sağlamlığı değerleri 1mM krosin ilave edilen grupta elde edildiğini ancak istatistiksel olarak üstünlük sağlamadığı belirtmiştir (Longoberdi ve ark., 2020). Horoz spermasına farklı dozlarda (0,5;1 ve 1,5 mM) eklenen krosinin çözüm sonu spermatolojik değerlendirilmesinde en yüksek canlılık ve membranı sağlam spermatozoa oranı ile mitokondriyal membran potansiyelinin en yüksek 1mM krosin içeren grupta elde edildiğini bildirmişlerdir. Elde edilen bu sonuçların 1mM dozunda horoz sperma sulandırıcısına eklenen krosinin pro-apoptotik (CASPASE3) geni azaltarak ve anti-apoptotik (Bcl-2) geni artırarak sağladığını ifade etmişlerdir (Mehdipour ve ark., 2020). Mata-Campuzano ve ark. (2015), koç spermasının dondurulmasında sulandırıcıya 1 mM dozunda krosin, glutatyon, trolox ve sisteamin

ekleyerek çözüm sonu spermatozoa canlılığı, membran ve akrozom bütünlüğü ve mitokondriyal aktivite üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, krosin eklenen sulandırıcı grubunun çözüm sonu canlılık oranını %33, akrozom ve membran bütünlüğü oranını %33 ve mitokondriyal membran bütünlüğü oranını %27 olarak tespit etmişlerdir.

Sperma sulandırıcılarına safran, safranal ve krosin gibi safranin önemli bileşenlerinin eklenmesi, spermatozoa canlılığı, akrozom ve membran bütünlüğü ile mitokondriyal membran potansiyeli üzerinde olumlu etkiler sağladığı belirlenmiştir. Bu düşük dozların spermatozoa saklama sürecine karşı koruyucu bir etki gösterdiği ve benzer sonuçlara, sunulan tez çalışması sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Sulandırıcıya eklenen antioksidan etkili maddelerin spermanın dondurma sürecindeki temel işlevi spermatozoanın dondurma-çözdürme sonrası minimum hasar alarak korumaktır. Serbest radikaller, kromatin yoğunlaşması, motilite, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve kemotaksis gibi süreçleri aktive etmeye yol açan hücre içi yolları aktive ederek spermatozoa yapısında değişiklikler meydana getirmektedir. Buna karşın, aşırı miktarda ROS üretiminin spermatozoa üzerinde motilite kaybına ve fertilite potansiyelinin azalmasına kadar değişen patolojik etkileri bulunduğu belirtilmektedir. ROS, bu nedenle çift taraflı bir etki göstermektedir (Du Plessis ve ark., 2015). Spermatozoa yapısında doğal bir antioksidan sisteme sahip olsada, aktiviteleri lipid peroksidasyonunun yoğunluğunu artıran dondurma sürecinden etkilenir. Bu nedenle, yapısında bulunan doğal antioksidanlar dondurma-çözdürme işlemi sırasında spermatozoa lipid peroksidasyonunu önlemede yetersiz kalabilir. Sperma sulandırıcılarına antioksidan özellikleri bilinen maddelerin eklenmesinin olumlu etkileri olabileceği bu sebeple antioksidan uygulaması yapılırken bazı noktalar göz önünde bulundurulması gerektiği ifade edilmektedir (Güngör ve ark., 2018). En önemli nokta, her ROS türünün belirli bir antioksidan sistem tarafından devre dışı bırakılmasıdır (Agarwal ve ark., 2014). Bu nedenle, antioksidan uygulaması rastgele seçilirse, istenilen etkinlik görülemeyerek oksidatif hasarı doğrudan azaltılamaz (Aitken ve ark., 2012). Sunulan çalışmada, yüksek dozda sulandırıcıya eklenen safranalin çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerinde olumlu etkiler göstermesine karşın, motilite ve canlılık üzerinde olumsuz etki gösterdiği

belirlenmiştir. Bu sonuç, antioksidanların muhtemelen fizyolojik seviyelerini değiştirerek serbest radikallerin miktarı artışı sonucu oksidan etki göstermesi nedeniyle gerçekleşen olumsuz etkilerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Karotenoidler, süper oksit anyonu ile etkileşime girerek spermatozoanın üzerinde stabilize edici etki gösterir (Heidary ve ark., 2008). Ayrıca, safranal belirli hücre içi detoksifiye edici enzimlerin aktivitesini artırarak veya membranın akışkanlığını etkileyerek, spermatozoa yapısının oksijen ve diğer moleküllere karşı geçirgenliğini etkilediği düşünülmektedir. Yapılan literatür taramasında safranin yapısal bileşiminde bulunan krosinde de benzer mekanizmanın etkin olduğu belirtilmektedir (Assimopoulou ve ark., 2005). Çalışma verilerimiz incelendiğinde safranal 0,25 ve 0,5 mM dozlarının mitokondriyal membran potansiyeli diğer gruplardan yüksek bulunmuştur. Spermatozoa membran potansiyeli hasar gördüğünde mitokondriyal ROS üretiminin arttığı belirtilmektedir (Koppers ve ark., 2008). Karotenoidlerin mitokondride bilinen bir koruyucu etkisi olduğu ve safranalin düşük dozlarının da bu etkiyi gösterdiği çalışmamızda tespit edildi. Benzer mitokondriyal koruyucu etkinlik krosin maddesinde de belirtilmektedir (Venkatraman ve ark., 2008). Bu nedenle, S0,25 ve S0,5 gruplarında dondurma-çözülme sonrasında mitokondriyal aktiviteyi artırdığı düşünülmektedir. Spermatozoonun merkezi kısmıyla ilişkili aksonom ve fibriller, spermatozoa motilitesinde rol oynayan ATP'den enerji üreten organlar olan mitokondri ile kaplıdır (Garner ve Hafez, 2000). Kriyoprezervasyonun spermatozoa motilitesi, membran bütünlüğü ve mitokondriyal membran potansiyelinde bir azalmaya sebep olduğu bilinmektedir (Güngör ve ark., 2019b). Araştırmacılar, spermatozoa motilitesi gibi spermatozoa kalite parametrelerindeki azalmanın, dondurulmuş-çözülmüş spermatozoa antioksidan potansiyelindeki azalma ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (Najafi ve ark., 2019). Spermatozoa motilesi mitokondriyal aktivite arasında belirgin bir korelasyon olduğu doğrulanmıştır (Mehdipour ve ark., 2020). Bu nedenle, sunulan çalışmada kriyoprezervasyondan önce sperma sulandırıcısına 0,25 ve 0,5 mM safranal ilavesinin membran işlevselliğini ve mitokondriyal aktiviteyi artırarak sperm motilitesi üzerine koruyucu etkinlik gösterdiği düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sunulan çalışmada koç sperma sulandırıcısına eklenen safranalın düşük dozları olarak belirlenen 0,25 ve 0,5mM dozlarının çözüm sonu spermatozoa motilitesi, canlılığı ve mitokondriyal membran potansiyeli üzerine olumlu etkinliklerinin olduğu ve koç spermasının dondurulmasında kullanılmasının yararlı olacağı ortaya konulmuştur. Sunulan çalışmada antioksidan olarak kullanılan safranalın daha önce koç sperma sulandırıcısında kullanılmadığı göz önünde bulundurulursa bu anlamdaki literatür açıklığını gidermeye katkı yapıldığı düşünülmektedir. Ayrıca yapılacak olan koç sperması dondurma-çözdürme çalışmalarına da katkı sunacağı düşünülmektedir. Elde edilen sonuçların daha ileri düzey analizler kullanılarak desteklenmesinin ayrıca in-vivo ya da in-vitro fertilite denemelerinin yapılmasının safranalın spermatozoanın kısa ya da uzun süreli saklanması üzerine etkinliğinin daha iyi anlaşılması açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM (2005).** Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl* **26(6)**:654-60.
- Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E (2003).** In Vitro and In Vivo Comparison of Egg Yolk-Based and Soybean Lecithin-Based Extenders for Cryopreservation of Bovine Semen. *Theriogenology*, **60**:269-279
- Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA (2012).** Reactive Oxygen Species and Sperm Function—In Sickness and in Health. *Journal of Andrology*, **33(6)**, 1096-1106.
- Ak K (2005).** Koyunlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İçinde Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama, İ.K. İleri, K. Ak, S. Pabuccuoğlu, S. Birler, İstanbul: *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Ders Notu* No: **138**, 189-204.
- Ak K, Cirit Ü, Nur Z, Bacınoğlu S, Pabuccuoğlu S, Özdaş ÖB, Birler S (2010).** Effects of extender osmolarity, cooling rate, dilution rate and glycerol addition time on post-thaw ram semen characteristics and fertilization. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **36 (2)**, 33-46.
- Akalın PP, Bülbül B, Cayan K, Başpınar N, Kırbaş M, Bucak MN, Öztürk C (2015).** Relationship of Blood and Seminal Plasma Ceruloplasmin, Copper, Iron, and Cadmium Concentrations with Sperm Quality in Merino Rams. *Small Ruminant Research*, **133**, 135-139.
- Akalın PP, Bucak MN, Güngör Ş, Başpınar N, Cayan K, Dursun Ş, Deniz YENİ (2016).** Influence of Lycopene and Cysteamine on Sperm and Oxidative Stress Parameters During Liquid Storage of Ram Semen at 5 C. *Small Ruminant Research*, **137**, 117-123.
- Akhondzadeh BA, Ghoreishi SA, Noorbala AA, Akhondzadeh SH, Rezazadeh SH (2008).** Petal and stigma of *Crocus sativus* L. in the treatment of depression: A pilot double-blind randomized trial. *J. Med. Plants*, **7**, 29–36.)
- Akkuş İ (1995).** Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları*, Konya, **1**, 57-63.
- Alçay S, Ustuner B, Nur Z (2016).** Effects of Low Molecular Weight Cryoprotectants on the Post-thaw Ram Sperm Quality and Fertilizing Ability. *Small Ruminant Research*, **136**, 59-64.
- Al-Mutary MG, Al-Ghadi MQ, Ammari AA, Al-Himadi AR, Al-Jolimeed AH, Arafah MW, Swelum AAA (2020).** Effect of different concentrations of resveratrol on the quality and in vitro fertilizing ability of ram semen stored at 5° C for up to 168 h. *Theriogenology*, **152**, 139-146.

Alvarez M, Tamayo-Canul J, Anel E, Boixo JC, Mata- Campuzano M, Martinez-Pastor F, Anel L, De Paz P (2012). Sperm Concentration at Freezing Affects Post-Thaw Quality and Fertility of Ram Semen. *Theriogenology*, **77**: 1111-1118.

Aral F, Aral S (2004). Merinos Koçlarda Sperma Alma Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **28**, 47-53.

Arrebola F, Castillejo-Lacalle E, Borjas-Muñoz F, Querino-Santiago FJ, Redondo-Cardador FC, Abecia JA (2022). Comparison of Four Strategies of Ram Management in a Semen Collection Centre. *Reproduction in Domestic Animals*, **57**, 103-105.

Asadi MH, Zafari F, Sarveazad A, Abbasi M, Safa M, Koruji M, Miran RA (2014). Saffron Improves Epididymal Sperm Parameters in Rats Exposed to Cadmium. *Nephro-urology Monthly*, **6(1)**.

Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP (2005). Radical Scavenging Activity of Crocus sativus L. Extract and Its Bioactive Constituents. *Phytotherapy Research*, **19**, 997–1000.

Ata A (2023). *Spermanın Değerlendirilmesi ve Genel Kategorizasyonu*. In M.K. Soylu (Ed.), *Hayvanlarda Reprodüksiyon, Androloji ve Yardımcı Üreme Teknikleri* Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, s: 175-176.

Ataei G, Rahbarian R (2020). Investigating the effect of safranal on Bax and Bcl2 and oxidative stress levels in testis tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *KAUMS Journal (FEYZ)*, **24(1)**, 10-20.

Avdatek F, Yeni D, Gundogan M (2018). Merinos Koçlarda Spermaya Katılan Antioksidanların Kısa Süreli Saklama Sırasında Spermatolojik Parametreler ve DNA Hasarı Üzerine Etkileri. *Kocatepe Vet J*, **11(2)**, 126-133.

Bacinoğlu S, Cirit Ü, Zakeriya NUR, Kemal AK (2007). Eritilmiş Koç Spermasında Farklı Gliserol Katma Tekniklerinin ve Soğutma Hızının Spermatolojik Özelliklere Etkisi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **33(1)**, 11-21.

Bamdad Riahi-Zanjani, Mahdi Balali-Mood, Elaheh Mohammadi, Hassan BadieBostan, Bahram Memar, Gholamreza Karimi (2015). Safranal as a safe compound to mice immune system. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, **5(5)**, 441–449.

Barbas JP, Mascarenhas RD (2009). Cryopreservation of Domestic Animal Sperm Cells. *Cell Tissue Bank*, **10**, 49-62.

Bathaie SZ, Mousavi SZ (2010). New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **50**, 761–786.

Berk SB (2023). *Koç Spermasının Dondurulabilirliği Üzerine Proantosiyanidinin Etkileri Dölerme ve Suni Tohumlama Doktora Tezi.* Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Afyonkarahisar

Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le Guenne B, Guerin B, Camus A, Lechat M (1998). Comparison of Bacteriological Qualities of Various Egg Yolk Sources and the In Vitro and In Vivo Fertilizing Potential of Bovine Semen Frozen in Egg Yolk or Lecithin Based Diluents. *Theriogenology*, **50**, 699-706.

Bucak MN, Güngör Ş, Sariözkan S, Bilgili A (2015). Spermanın dondurulmasında antioksidanların etkisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Reproductive Medicine-Special Topics*, **1(3)**, 39-47.

Bukhari SI, Pattnaik B, Rayees S, Kaul S, Dhar MK (2015). Safranal of *Crocus sativus* L. inhibits inducible nitric oxide synthase and attenuates asthma in a mouse model of asthma. *Phytotherapy Research*, **29(4)**, 617-627.

Calabria A, Del Prete C, Roberto C, Longobardi V, Spada S, Alfano MT, Cocchia N (2023). Effect of Crocin Supplementation in the Extender on the Quality of Chilled Canine Semen. *Animal Reproduction Science*, **259**, 107374.

Canoğlu E, Sarıbay K (2015). *Çiftlik hayvanlarında doğum ve jinekoloji.* In: Semacan A, Kaymaz M, Fındık Murat, Rışvanlı A, Köker A (Eds): Üreme Kanallarının Morfolojisi ve Üreme Fizyolojisi. 2. baskı, Medipres Yayınları, Malatya, 467-490.

Castrillejo A, Morana A, Bielli A, Gastel T, Molina JR, Forsberg M (1995). Onset of spermatogenesis in corriedale ram lambs under extensive rearing conditions in Uruguay. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **36**, 161-173.

Chabory E, Damon C, Lenoir A, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B (2009). Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *Journal of Clinical Investigation*, **119(7)**, 2074-2085.

Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, **49(3)**, 481-493.

Chelikani P, Fita I, Loewen PC (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**, 192-208.

Chen Y, Foote RH, Brockett CC (1993). Effect of Sucrose, Trehalose, Hypotaurine, Taurine and Blood Serum on Survival of Frozen Bull Sperm. *Cryobiology*, **30(4)**, 423-431.

Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, Van Zanden J, Van Bladeren PJ (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **10**, 141-152.

Colas G (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol, and dilution on the survival and fertilizing ability of deep frozen ram semen. *Journal of Reproduction & Infertility*, **42**, 277-285.

Crawford JM (2015). *Cell Injury, Cell Death, and Adaptations*. In V. Kumar, R.S. Cotran, & S.L. Robbins (Eds.), *Robbins Basic Pathology* (9th ed., pp. 1-28). Elsevier Saunders.

Cseh S, Faigl V, Amiridis GS (2012). Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, **130**, 187-192.

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

D'Allessandro AGD, Martemucci G, Collanna MA, Bellini A (2001). Post-thaw survival of ram spermatozoon and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*, **55**, 1159-1170.

Deichsel K, Palm F, Kobischke P, Budik S, Aurich C (2008). Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. *Theriogenology*, **69**, 940-945.

Demir K, Bakırer G, Öztürk, G, Cirit Ü, Bozkurt HH, Aktaş A (2015). Effects of cooling rate on membrane integrity and motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **21**, 61-67.

Dikici İ (1999). *Akut viral hepatitlilerde interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlilerde oksidatif stresin araştırılması*. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya.

Dogan I, Nur Z (2006). Different estrous induction methods during the non-breeding season in Kivircik ewes. *Veterinary Medicine*, **51(4)**, 133-138.

Domínguez-Rebolledo AE, Fernández-Santos MR, Bisbal A, Ros-Santaella JL, Ramón M, Carmona M (2010). Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reproduction, Fertility and Development*, **22**, 856-870.

Dowling DK, Simmons LW (2009). Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **276(1663)**, 1737-1745.

Dröge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, **82**, 47-95.

Du Plessis SS, Agarwal A, Halabi J, Tvrda E (2015). Contemporary Evidence on the Physiological Role of Reactive Oxygen Species in Human Sperm Function. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **32**, 509-520.

El-Alamy MA, Foote RH (2001). Freezability of spermatozoon from finn and dorset rams in multiple extenders. *Animal Reproduction Science*, **65**, 245-254.

Erenel G, Erbaş D, Arıcıoğlu A (1993). Free radicals and antioxidants systems. *Mat. Med. Pol., Fasc. 1* (85).

Etyemez M, Gülay MŞ (2022). The Effects of Safranal Against Bisphenol AF on Some Reproductive Parameters in Male New Zealand Rabbits. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, **7(3)**, 207-217.

Farahmand SK, Samini F, Samini M, Samarghandian S (2013). Safranal ameliorates antioxidant enzymes and suppresses lipid peroxidation and nitric oxide formation in aged male rat liver. *Biogerontology*, **14(1)**, 63-71.

Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD (2003). Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine*, **35(3)**, 236-256.

Fehrenbach E, Northoff H (2001). Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exercise Immunology Review*, **7**, 66-89.

Fırat S (1997). *Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi.* Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 95s.

Fiser PS, Ainsworth L, Fairfull RW (1987). Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, **28**, 599-607.

Gandhi S, Abramov AY (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **42**, 8010.

Garner DL, Hafez ESE (2000). Spermatozoa and Seminal Plasma. *Reproduction in Farm Animals*, 96-109.

Gavin-Plagne L, Commin L, Bruyere P, Buff S, Joly T (2018). Comparison Between an Animal-Derived Product Medium and a Chemically Defined Medium for Ram Sperm Cryopreservation. *Biopreservation and Biobanking*, **17(1)**, 2. DOI: 10.1089/bio.2018.0067

Gil J, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H (2000). Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*, **54**, 93-108.

Gil J, Rodriguez-Irazaqui M, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H (2002). Influence of centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of ram semen after cervical insemination. *Theriogenology*, **57**, 1781-1792.

Gil J, Rodriguez-Iraozqui M, Lundeheim N, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H (2003). Fertility of ram semen frozen in bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, **59**, 1157-1170.

Gilmore JA, Liu J, Peter AT, Critser JK (1998). Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biology of Reproduction*, **58**, 28-36.

Gordon I (1999). *Controlled reproduction in sheep and goats* (2nd ed.). CABI Publishing, pp. 351-359.

Gökçen H, Aşti RN, Çekgöl E, Şener E (1985). Prostaglandin F2 Alfa ve Vit. E Katılarak Dondurulan Koç Spermalarında Akrozom Morfolojisi ve Döl Verimi Üzerinde Araştırmalar. *U.Ü. Vet. Fak. Derg.*, **4**(1-2-3).

Gökçen H, Soylu KM, Tümen H, Doğan I (1991). Koçlarda Ejakülasyon Sıklığının Kimi Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkisi. *Hayv. Araş. Derg.*, **1**, 35-37.

Güngör Ş, Ata A, İnanç ME (2018). Effects of Trehalose and Catalase on the Viability and Kinetic Parameters of Cryopreserved Ram Sperm. *Acta Scientiae Veterinariae*, **46**, 7-7.

Güngör Ş, Ata A, İnanç ME, Kastelic JP (2019a). Effect of Various Antioxidants and Their Combinations on Bull Semen Cryopreservation. *Türk J Vet Anim Sci*, **43**, 590-595.

Güngör Ş, İnanç ME, Ata A (2019b). Koç Spermalarının+ 4 C°'de Saklanması Gallik Asitin Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkisi. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, **35**(2).

Güngör Ş, İnanç ME, Öztürk C, Korkmaz F, Bastan I, Cil B, Kastelic JP (2019c). Gallic and carnosic acids improve quality of frozen-thawed ram spermatozoa. *Andrologia*, **51**(10), e13393. <https://doi.org/10.1111/and.13393>

Guthrie HD, Welch GR (2012). Effects of Reactive Oxygen Species on Sperm Function. *Theriogenology*, **78**, 1700-08.

Günay Ü, Nur Z, Doğan İ, Başpınar B, Soylu MK (2003). Sıfat Sezonuna Geçiş Döneminde ve Sıfat Sezonunda Koç Spermalarının Dondurulabilirliğinin Araştırılması. *Uludağ Üniversitesi Journal Faculty Veterinary Medicine*, **22**, 81-85

Hafez E (2000). Reproduction in Farm Animals, 7th ed., *Philadelphia*, pp. 111, 330-343, 385, 405-423.

Hafez, ESE (1993). Reproduction in farm animals (6th ed.). *Philadelphia*, pp. 503-525.

Halliwell B (1987). Free radicals and metal ions in health and disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, **46**(1), 13-26.

Halliwell B, Chirico S (1993). Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **57(5)**, 715S-725S.

Heidary M, Nejadi JR, Delfan B, Birjandi M, Kaviani H, Givrad S (2008). Effect of saffron on semen parameters of infertile men. *Urology Journal*, **5**, 55–59.

Henkel R, Kierspel E, Stalf T (2005). Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertility and Sterility*, **83(3)**, 635-642.

Holt WV, Linda MP (2014). *Fundamental and practical aspects of semen cryopreservation*. In P. J. C., Steven P. L. (Eds.), *Andrology Theories and Applications* (pp. 76-100). CAB International, UK.

Holt WV, North RD (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.

Hou L.-l., Gao C., Chen L., Hu G.-q., Xie S (2013).-q. Essential role of autophagy in fucoxanthin-induced cytotoxicity to human epithelial cervical cancer HeLa cells. *Acta Pharmacol. Sin.*; **34**:1403–1410. doi: 10.1038/aps.2013.90.

Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR (2005). Safranal, a constituent of *Crocus sativus* (saffron), attenuated cerebral ischemia induced oxidative damage in rat hippocampus. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **8(3)**, 394-399.

Ighodaro OM, Akinloye OA (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, **54**, 287–293.

İnanç (2016). *Akkraman Koçlarda Spermanın Kolesterol ve 7-Dehidrokolesterol ile Dondurulması ve Değerlendirilmesi* Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.

İnanç ME, Güngör Ş, Öztürk C, Korkmaz F, Baştan İ, Çil B (2019). Cholesterol-loaded cyclodextrin plus trehalose improves quality of frozen-thawed ram sperm. *Veterinární Medicína*. **64**. 118-124. 10.17221/146/2018-VETMED.

İnanç ME, Güngör Ş, Gül E, Uslu BA, Ata A (2021). Gallic acid improves the viability and mitochondrial membrane potential of post-thawed goat buck semen. *Acta Veterinaria Hungarica*, **69(3)**, 291-297.

İnanç ME, Güngör Ş, Avdatek F, Yeni D, Gülhan MF, Olğaç KT, Denk B, Taşdemir U (2022). Thymoquinone improves motility, plasma membrane integrity and DNA integrity of frozen-thawed ram semen. *Andrologia*, **54(10)**, e14547. <https://doi.org/10.1111/and.14547>

İnanç ME, Avdatek F, Güngör Ş, Gülhan MF, Olğaç KT, Denk B, Yeni D, Taşdemir U (2023). Cryopreservation of Ram Semen Using Capsaicin Supplemented

Tris Extender. *Kocatepe Veterinary Journal*. Haziran; **16(2)**:166-173. doi:10.30607/kvj.1257228

İleri İK, Ak K, Pabuçcuoğlu S, Birler S (1996). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama, Ders notu 59, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, İstanbul, s:75-90.

İleri İK, Ak K, Pabuçcuoğlu S, Birler S (2000). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını*, Ders Notu No: 112, İstanbul.

İnce D, Karaca (2009). Çine Çaparı ve Karya Koçlarında Testis ve Sperma Özelliklerinin Mevsimsel Değişimi., *Hayvansal Üretim*, **50**, 9-15,

Jainudeen MR, Wahid H, Hafez E (2008). *Reproduction in farm animals*. In: Hafez B., & Hafez E. (Eds), *Sheep and Goat* (7th ed., pp. 172-181). USA.

Kaçar C, Kaya S, Kuru M (2016). Koyun ve keçilerde üremenin denetlenmesinde güncel yöntemler. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences and Obstetrics-Special Topics*, **2**, 29-37.

Kalkan C, Horoz H (1999). *Pubertas ve seksüel sikluslar*. In: Alaçam E (Ed), *Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite* (pp. 25-42). Medisan Yayınevi, Ankara.

Kerpiççi A (2015). *Erkek İnfertilitesinde Farklı Antioksidan Maddelerin Sperm Kriyopreservasyon Yöntemleri Üzerine Etkisi*. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ağustos.

Khazaei Y, Moghbelinejad S (2017). Increasing Viability, Numbers, and Motility of Sperm in Men with Normal Spermatogenesis Exposed to Saffron Extract After Freezing-Thawing Process. *J Qazvin Univ Med Sci*, **21(1)**, 12-20.

Koca RH (2022). *Koçlarda Spermanın Saklanabilirliği Üzerine Mitotempo ve Serisinin Etkisi*. Dölerme ve Suni Tohumlama Doktora Tezi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Elazığ

Koppers AJ, De Iuliis G.N, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ (2008). Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **93(8)**, 3199-3207.

Kothari S, Thompson A, Agarwal A, DuPlessis SS (2010). Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*, **48(5)**, 424-435.

Kulaksız R (2009). *Farklı Antioksidanlar Eklenmiş Sulandırıcılarla Dondurulmuş Saanen Tekesi Spermasının İn Vitro Değerlendirilmesi*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Kulaksız R, Daşkın A (2007). Teke Spermasının Kısa ve Uzun Süreli Saklanması. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, **78(4)**, 51-56.

Lanzafame FM, La Vignera S, Vicari E, Calogero AE (2009). Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male fertility. *Reproductive Biomedicine Online*, **19(5)**, 638-659.

Longobardi V, Zullo G, Cotticelli A, Salzano A, Albero G, Navas L, Neglia G (2020). Crocin Improves the Quality of Cryopreserved Goat Semen in Different Breeds. *Animals*, **10(6)**, 1101.

Lopez-Saez A, Ortiz N, Gallego L, Gadre JJ (2000). Liquid Storage (5°C) of Ram Semen In Different Diluents. *Archives of Andrology*, **44**, 155-164.

Luberda Z (2005). The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive Biology*, **5(1)**, 5-17.

Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **14(4)**, 840-860.

Madan K, Nanda S (2018). In-vitro evaluation of antioxidant, anti-elastase, anticollagenase, anti-hyaluronidase activities of safranal and determination of its sun protection factor in skin photoaging. *Bioorganic Chemistry*, **77**, 159-167.

Maggi MA, Bisti S, Picco C (2020). Saffron: Chemical Composition and Neuroprotective Activity. *Molecules*. **29**;25(23):5618. doi:10.3390/molecules25235618 PMID: 33260389; PMCID: PMC7731018.

Marco-Jimenez F, Puchades S, Gadea J, Vicente JS, Viudes-de-Castro MP (2005). Effect of semen collection method on pre-and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*, **64(8)**, 1756-1765.

Marco-Jimenez F, Vicente JS, Viudes-De-Castro MP (2008). Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra Ram. *Reproduction in Domestic Animals*, **43(4)**, 403-408. doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00923.x.

Mashmoul M, Azlan A, Khazaai H, Yusuf BNM, Noor SM (2013). Saffron: A Natural Potent Antioxidant as a Promising Anti-obesity Drug, *Antioxidants*, **2**, 293–308.

Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Tamayo-Canul J, Anel L, de Paz P, Martínez-Pastor F (2015). Post-thawing Quality and Incubation Resilience of Cryopreserved Ram Spermatozoa Are Affected by Antioxidant Supplementation and Choice of Extender, *Theriogenology*, **83(4)**, 520-528.

Mazur P (1965). Causes Of Injury In Frozen and Thawed Cells. *Journal of General Physiology*, **47**, 347-369.

Mazur P (1984). Freezing Of Living Cells: Mechanisms and Implications. *American Journal of Physiology*, **247**, 125-142.

McDonald LE, Pineda MH (1989). *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Lea & Febiger, Philadelphia, London, 428-447.

Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD (2002). Current status of sperm cryopreservation: Why isn't better. *Theriogenology*, **57**, 327-344.

Mehdipour M, Daghigh Kia H, Najafi A, Mohammadi H, Álvarez-Rodriguez M (2020). Effect of Crocin and Naringenin Supplementation in Cryopreservation Medium on Post-thaw Rooster Sperm Quality and Expression of Apoptosis Associated Genes, *Plos one*, **15(10)**, e0241105.

Mesaros P, Gamcik P (1992). The Possibility of Freezing Ram Semen In a Diluent without Glycerol. *Animal Breed. Abst.*, **60(10)**, Abst. No: 6159, 787.

Milajerdi A, Djafarian K, Hosseini B (2016). The toxicity of saffron (*Crocus sativus* L.) and its constituents against normal and cancer cells. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, **3**, 23-32.

Morrier A, Castonguay F, Bailey JL (2003). Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram semen. *Canadian Journal of Animal Science*, **22**, 1227.

Mostofian B, Johnson QR, Smith JC, Cheng X (2020). Carotenoids promote lateral packing and condensation of lipid membranes. *Phys. Chem. Chem. Phys.*; **22**:12281–12293. doi: 10.1039/D0CP01031F.

Najafi A, Kia HD, Mehdipour M, Shamsollahi M, Miller DJ (2019). Does Fennel Extract Ameliorate Oxidative Stress Frozen-thawed Ram Sperm?, *Cryobiology*, **87**, 47-51.

Noiles EE, Bailey J, Storey BT (1995). The temperature dependence in the hydraulic conductivity, L_p , of the mouse sperm plasma membrane shows a discontinuity between 4 and 0 degrees C. *Cryobiology*, **32(3)**, 220-238.

Ogbuewu IP, Aladi NO, Etuk IF, Opara MN, Uchegbu MC, Okoli IC, Illoeje MU (2010). Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm. *Res. J. Vet. Sci*, **3**, 138-164.

Ömür AD (2011). *Sezon içi ve sezon dışında koç spermasının dondurulmasında antioksidanların etkisi*. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya.

Öztürk C, Güngör Ş, Aksoy NH, İnanç M (2020). Effects of Carnosic and Gallic Acid on Ram Sperm Parameters and Seminal Plasma Homocysteine-Nesfatin Levels after Thawing. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **13(2)**, 104-107. <https://doi.org/10.47027/duvetfd.753033>

Öztürk C, Dursun Ş, Bulut G, Karaşahin T (2021). Effect of Additives on Short-term Storage of Ram Semen., *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, **6(1)**, 22-28. <https://doi.org/10.31797/vetbio.833211>

Paulenz H, Söderquist L, Adnoy T, Nordstoga A, Gulbrandsen B, Berg KA (2004). Fertility Results after Different Thawing Procedures for Ram Semen Frozen In Minitubes and Mini Straws. *Theriogenology*, **61**, 1719-1727.

Peris-Frau P, Soler AJ, Iniesta-Cuerda M, Martín-Maestro A, Sánchez-Ajofrín I, Medina-Chávez DA, Garde JJ (2020). Sperm Cryodamage in Ruminants: Understanding the Molecular Changes Induced by the Cryopreservation Process to Optimize Sperm Quality., *Int J Mol Sci*, **21(8)**, 2781.

Prathalingan NS, Holt WV, Revell SG, Jones S, Watson PF (2006). Dilution of spermatozoon results in improved viability following a 24 hours storage period but decreased acrosome integrity following cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, **91**, 11-22.

Predieri S, Magli M, Gatti E, Camilli F, Vignolini P, Romani A (2021). Chemical Composition and Sensory Evaluation of Saffron. *Foods*. Oct 27;**10(11)**:2604.

Rathore AK (1970). A Comparative Study of Semen Collection in Merino Rams by Electro-ejaculation and Artificial Vagina., *Indian Veterinary Journal*, **47**, 668-671.

Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S (2011). A Prospective Double-blind Randomized Placebo-controlled Study of the Effect of Saffron (*Crocus sativus* Linn.) on Semen Parameters and Seminal Plasma Antioxidant Capacity in Infertile Men with Idiopathic Oligoasthenoteratozoospermia., *Phytotherapy Research*, **25**, 508–516.

Salamon S, Maxwell WMC (1995). Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and method of improvement. *Animal Reproduction Science*, **38**, 1-36.

Salamon S, Maxwell WMC (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, **62**, 77-111.

Salamon S, Visser D (1972). Effect of Composition of Tris-Based Diluent of Thawing Solution on Survival of Ram Spermatozoa Frozen by the Pellet Method. *Aust. J. Biol. Sci.*, **25**, 605-618.

Saleh AI (1997). Seasonal variation in semen quality of local and crossbred rams raised in the United Arab Emirates. *Animal Reproduction Science*, **49**, 161-167.

Samarghandian S, Afshari R, Sadati A (2014). Evaluation of lung and bronchoalveolar lavage fluid oxidative stress indices for assessing the preventing effects of safranal on respiratory distress in diabetic rats. *Sci. World J*, vol. 2014, Article ID 251378, 6.

Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Samini F (2015). Preventive effect of safranal against oxidative damage in aged male rat brain. *Exp. Anim.*, **64(1)**, 65-71.

Sanocka D, Kurpisz M (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol*, **2**(1), 1-7.

Sanyal J, Bandyopadhyay SK, Banerjee TK, Mukherjee SC, Chakraborty DP, Ray BC, Rao VR (2009). Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *Eur Rev Med Pharmacol*, **13**(2), 129-132.

Sapanidou V, Taitzoglou I, Tsakmakidis I, Kourtzelis I, Fletouris D, Theodoridis A, Zervos I, Tsantarliotou M (2015). Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. *Theriogenology*, **84**, 1273–1282.

Sarma AD, Mallick AR, Ghosh AK (2010). Free radicals and their role in different clinical conditions: An overview. *Int J Pharm Sci Res*, **1**(3), 185-192.

Satomi Y (2017). Antitumor and Cancer-preventative Function of Fucoxanthin: A Marine Carotenoid. *Anticancer Res.*; **37**:15571562. doi: 10.21873/anticancer.11484.

Semerci A, Çelik AD (2016). Türkiye’de Küçükbaş Hayvan Yetiştiriciliğinin Genel Durumu. *MKU Tarım ve Bilim*, **21**(2), 182-196.

Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *Int J Pharm Sci Res*, **3**(1), 91-100.

Sharoni Y, Danilenko M, Dubi N, Ben-Dor A, Levy J (2004). Carotenoids and transcription. *Arch. Biochem. Biophys*, **430**, 89–96.

Simkin AJ, Laizet Y, Kuntz M (2004). *Plastid lipid associated proteins of the fibrillin family: Structure, localisation, functions and gene expression.* In: Pandalai S.G., editor. *Recent Research Developments in Biochemistry*. Volume 5. Research Signpost; Trivandrum, India. pp. 307–316.

Simkin AJ (2021). *Carotenoids and Apocarotenoids in Planta: Their Role in Plant Development, Contribution to the Flavour and Aroma of Fruits and Flowers, and Their Nutraceutical Benefits.* Plants (Basel). **28**;10(11):2321. doi: 10.3390/plants10112321. PMID: 34834683; PMCID: PMC8624010.

Smith JF, Asher GW, Briggs RM, Morrow CJ, Murray GR, Oliver JE, Parr J, Veldhuizen FA, Upreti GC (1993). Effect of Diluent and Storage Time on Pregnancy Rate in Ewes After Intrauterine Insemination. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, **53**, 295-298.

Soylu BY (2023). *Koç Spermasının Dondurulması Üzerine Arbutin'in Etkisi Dölerme ve Suni Tohumlama Doktora Tezi.* Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Afyonkarahisar

Sönmez M (2013). Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları., *Fırat Üniv Vet Fak Yayın*, 237-287.

Sönmez M, Yüce A, Türk G (2007). The protective effects of melatonin and Vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. *Reprod Toxic*, **23(2)**, 226-231.

Sultana F, Husain SS, Khatun A, Apu AS, Khandoker M.A (2013). Study on buck evaluation based on semen quality and fertility. *Bang. J. Anim. Sci.*, **42**, 101–108.

Şener G, Yeğen BÇ (2009). İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi*, **22**, 5-13.

Tekin K, Cil B, Alemdar H, Olgac KT, Tirpan MB, Daskin A, Stelletta C (2020). Semen collection by trans-rectal digital stimulation and insemination campaign in goat. *Andrologia*, **52(2)**, e13458. <https://doi.org/10.1111/and.13458>

Toker MB, Alcay S, Gokce E (2016). Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. *Cryobiology*, **72(3)**, 205-209.

Tremellen K (2008). Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. *Hum Reprod Update*, **14(3)**, 243-258.

Türk G (2015). Reaktif oksijen türlerinin spermatozoon fonksiyonları üzerindeki fizyolojik ve patolojik etkileri. *Türkiye Klinikleri JReprodArtifInsemin-Special Topics*, **1(3)**, 26-34.

Uluyol O (2018). *Kuersetin Merinos Irkı Koç Spermasının Akrozom Reaksiyonu Üzerindeki Etkiliğinin Araştırılması*. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 53s, Erzurum.

Ustuner B, Alcay S, Toker MB (2016). Effect of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plasma on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based or egg yolk-based extender. *Anim Reprod Sci*, **164**, 97-104.

Uysal O, Taşdemir U, Kinet H, Özcan İ (2003). Akkaraman Irkı Koçlarda Başlıca Spermatozojik Özellikler., *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **43**: 23-28,

Vaez A, Mardani M, Razavi S (2014). Impact of Saffron on Rat Sperm Membrane Integrity and Spermatogenesis Status., *Advanced Biomedical Research*, **3**.

Varişlı O, Uguz C, Agca C (2009). Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Animal Reproduction Science*, **110(3-4)**, 256-268.

Venkatraman M, Konga D, Peramaiyan R, Ganapathy E, Dhanapal S (2008). Reduction of Mitochondrial Oxidative Damage and Improved Mitochondrial Efficiency by Administration of Crocetin Against Benzo [a] Pyrene-induced Experimental Animals., *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **31(9)**, 1639-1645.

Visser D, Salamon S (1973). Fertility of Ram Semen Frozen in Tris-Based Diluent. *Austr. J. Biol. Sci.*, **26**, 513-516.

Wang X, Sharma RK, Gupta A (2003). Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril*, **80(2)**, 844-850.

Ward WR (1986). *Current therapy in theriogenology*. In: Morrow DA (Ed): The Breeding Season and The Estrous Cycle. *WB Saunders Co, Philadelphia, p. 846-847.

Wathes DC, Abayasekara DRE, Aitken RJ (2007). Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod*, **77(2)**, 190-201.

Watson PF (2000). The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen., *Anim Reprod Sci*, **60**, 481-92.

Winterhalter P, Straubinger M (2000). Saffron—renewed interest in an ancient spice. *Food Rev Int*, **16**, 39–59.

Xi L, Qian Z, Du P, Fu J (2007). Pharmacokinetic properties of crocin (crocin digentiobiose ester) following oral administration in rats. *Phytomedicine*, **14**, 633–636.

Yeni D, Avdatek F, Gündoğan M (2010). An Investigation on Certain Andrological and Biochemical Parameters in Rams under Afyonkarahisar Conditions. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, **3**:1-6.

Yeni D, Avdatek F, Gündoğan M (2019). The Effect of Different Doses of Bovine Serum Albumin (BSA) Added to Short-term Stored Ram Semen on Sperm Quality and DNA Damage. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, **14(3)**, 299-306.

Yeni D, Güngör Ş, Avdatek F, Gülhan MF, Olğaç KT, İnanç ME, Denk B, 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 (Basel, Switzerland)*, **12(11)**, 1780. <https://doi.org/10.3390/life12111780>

Yılmaz O (2004). *Investigation on Seasonal Changes in Sperm Quality of Chios and Karya Breed Rams*. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Yüksek Lisans Tezi, Aydın,

Young IS, Woodside JV (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, **54(3)**, 176-186.

