



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA (VETERİNER) ANA BİLİM DALI**

**KÖPEK SPERMASININ DONDURULMASINDA FARKLI
SELENYUM FORMLARININ KRİYOPROTEKTİF
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI: NANOPARTİKÜL
SELENYUM VE SODYUM SELENİT KARŞILAŞTIRMASI**

Doktora Tezi

Burcu ESİN

Danışman
Prof. Dr. Mesut ÇEVİK

SAMSUN
2023

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA (VETERİNER) ANA BİLİM DALI



**KÖPEK SPERMASININ DONDURULMASINDA FARKLI
SELENYUM FORMLARININ KRİYOPROTEKTİF
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI: NANOPARTİKÜL
SELENYUM VE SODYUM SELENİT KARŞILAŞTIRMASI**

Doktora Tezi

Burcu ESİN

Danışman

Prof. Dr. Mesut ÇEVİK

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.20.010 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

05 /12 / 2022

Burcu ESİN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : KÖPEK SPERMASININ DONDURULMASINDA FARKLI SELENYUM FORMLARININ KRİYOPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI: NANOPARTİKÜL SELENYUM VE SODYUM SELENİT KARŞILAŞTIRMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 05.12.2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 12

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

05 /12 / 2022

Prof. Dr. Mesut ÇEVİK

ÖZET

KÖPEK SPERMASININ DONDURULMASINDA FARKLI SELENYUM FORMLARININ KRİYOPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI: NANOPARTİKÜL SELENYUM VE SODYUM SELENİT KARŞILAŞTIRMASI

Burcu ESİN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Dölerme ve Suni Tohumlama (Veteriner) Ana Bilim Dalı

Doktora, Aralık/2022

Danışman: Prof. Dr. Mesut ÇEVİK

Sunulan tez çalışmasında, spermanın dondurulma işlemi sırasında oluşan oksidatif stresin engellenmesi üzerine nanopartikül selenyum (SeNP) ve sodyum selenitin (SS) protektif etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada toplam 6 köpek kullanıldı. Köpeklerden masaj yöntemi ile farklı zaman aralıklarında 3'er kez ejakülat toplandı. Toplam 18 ejakülatın her birinden 5 farklı çalışma grubu oluşturuldu. Çalışma grupları, Tris sulandırıcısına herhangi bir antioksidan ilave edilmeyen kontrol, 1 µg/ml (SeNP1), 2 µg/ml (SeNP2) nanopartikül selenyum ve 1 µg/ml (SS1), 2 µg/ml (SS2) sodyum selenit ilave edilerek oluşturuldu. Sulandırılmış spermalar 4°C'de 1 saat ekilibrasyonu takiben sıvı azot buharında dondurularak, sıvı azotta (~-196°C) saklandı. Spermalar çözüm sonrası CASA motilite ve hareketlilik parametreleri, spermatozoa plazma membran bütünlüğü ve canlılığı (HE Test), spermatozoa morfolojisi (SpermBlue), DNA fragmentasyonu (GoldCyto) ve antioksidan profili yönünden değerlendirildi.

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde progresif motilite, VCL ve VAP kinematik parametreleri SeNP1 grubunda kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulundu ($P<0,05$). Çözüm sonrası plazma membran bütünlüğü ve canlı spermatozoa oranına en yüksek SeNP1 grubunda ulaşılmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel fark bulunmadı ($P>0,05$). Toplam morfolojik bozukluk oranı farklı selenyum formlarının eklendiği tüm gruplarda kontrol grubuna göre daha düşük bulunsada istatistiksel fark bulunmadı. Kuyruk morfoloji bozukluğu ise SeNP1 grubunda kontrol grubu ve SS2 grubuna göre önemli derecede düşük bulundu ($P<0,05$). Çözüm sonrası fragmente DNA oranı en düşük SeNP1 grubunda bulunsada gruplar arasında istatistiksel fark önemli bulunmadı ($P>0,05$). Spermatozoa antioksidan profilin değerlendirilmesinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmamasına rağmen en yüksek GPX, SOD ve CAT değeri ve en düşük lipid peroksidasyon değeri SeNP1 grubunda elde edildi.

Sonuç olarak, köpek spermasında tris bazlı sulandırıcıya 1 µg/ml dozda SeNP ilave edildiğinde, spermatolojik parametrelerde genel bir iyileşme gözlemlendiği ve köpek spermasının dondurulması işlemlerinde nanoteknoloji ürünü olan nanopartikül selenyumun önemli katkı sağladığı sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Sözcükler: Kriyoprezervasyon, Köpek, Nanopartikül Selenyum, Sodyum Selenit, Sperma

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CRYOPROTECTIVE EFFECTS OF DIFFERENT FORMS OF SELENIUM IN CRYOPRESERVED DOG SPERM: A COMPARISON OF NANOPARTICLE SELENIUM AND SODIUM SELENITE

Burcu ESİN

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Veterinary Reproduction and Artificial Insemination

Ph.D., December/2022

Supervisor: Prof. Dr. Mesut ÇEVİK

This thesis aimed to investigate the protective effects of nanoparticle selenium (SeNP) and sodium selenite (SS) on preventing oxidative stress during the freezing process of dog semen.

A total of six dogs were used in the study. The ejaculate was collected from dogs three times at different times by massage method. A total of 18 ejaculates were used and each ejaculate was divided in five experimental groups. The experimental groups were designed to tris extender containing no antioxidants control, 1 µg/ml (SeNP1), 2 µg/ml (SeNP2) nanoparticle selenium, and 1 µg/ml (SS1), 2 µg/ml (SS2) sodium selenite. Extended semen samples were equilibrated for 1 h at 4 °C then frozen in liquid nitrogen vapour and stored in liquid nitrogen (~-196°C). After thawing, semen samples were evaluated in terms of CASA motility and kinematic parameters, spermatozoa plasma membrane integrity and viability (HE Test), spermatozoa morphology (SpermBlue), DNA fragmentation (GoldCyto) and antioxidant profile.

When the results were evaluated statistically, the progressive motility, VCL, and VAP kinematic parameters in the SeNP1 group were significantly higher than the control group after thawing ($P<0.05$). The highest ratio of plasma membrane integrity and viable spermatozoa was observed in the SeNP1 group, but there was no statistical difference was found between the groups ($P>0.05$). Although the ratio of total morphological disorder was observed to be lower in all groups to which different selenium forms were added, compared to the control group, no statistical difference was found. Spermatozoa tail abnormality was significantly lower in the SeNP1 group than in the control and SS2 group ($P<0.05$). The lowest ratio of fragmented DNA was observed in the SeNP1 group, but there was no statistical difference was found between the groups ($P>0.05$). Although there was no statistical difference between the groups in the evaluation of sperm antioxidant profile, the highest GPX, SOD and CAT values and the lowest lipid peroxidation values were obtained in the SeNP1 group.

As a result, it was determined that 1 µg/ml dose of SeNP added to the tris-based extender in dog semen was beneficial on spermatological parameters and nanoparticle selenium, which is a nanotechnology product, contributed significantly to the freezing of dog semen.

Keywords: Cryopreservation, Dog, Nanoparticle Selenium, Semen, Sodium Selenite

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

“Köpek Spermasının Dondurulmasında Farklı Selenyum Formlarının Kriyoprotektif Etkilerinin Araştırılması: Nanopartikül Selenyum ve Sodyum Selenit Karşılaştırması” adlı doktora tez çalışmamda spermanın kriyoprezervasyon işlemi sırasında oluşan oksidatif stresi engelleyebilmek amacıyla selenyumun farklı formlarının protektif etkinliği araştırılmıştır.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve birikimleri ile destek olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Mesut ÇEVİK olmak üzere, her daim desteklerini esirgmeden yol gösterici olan Doktora tez izleme komitemde yer alan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Eser AKAL’a, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalındaki değerli hocalarım Doç. Dr. Murat SELÇUK ve Doç. Dr. Alper KOÇYİĞİT’e teşekkürlerimi sunuyorum. Doktora tez izleme komitemde bulunan ve değerli katkılarını sunan Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalındaki Prof. Dr. Oktay GENÇ hocama ve tezimin istatistik çalışmalarımı yürüten Veterinerlik Biyometrisi Anabilim Dalındaki değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Serhat ARSLAN’a teşekkür ederim. Tez çalışmamda yer alan ELISA yöntemi uygulamalarında yardımları bulunan Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalındaki sevgili hocam Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ ve arkadaşım Araş. Gör. Merve Gizem SEZENER’e teşekkür ederim. Ayrıca Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Ofisi ve Hayvan Hastanesi yönetimine tez çalışmama vermiş oldukları desteklerden dolayı çok teşekkür ederim. Bu süreçte klinik ve laboratuvarındaki tüm çalışmalarında olduğu gibi akademik hayatımda da her yardıma ihtiyacım olduğunda fedakârlık ve samimiyet ile yanımda olan değerli asistan arkadaşlarım Araş. Gör. Cumali KAYA ve Vet. Hek. Melih AKAR’a ayrıca çok teşekkür ederim. Doktora sürecim boyunca Anabilim Dalımızda aramıza katılmış olan, tezlerini bitiren veya sürdüren tüm meslektaşlarıma da ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak tüm hayatım boyunca arkamda duran, yol gösteren, etik ve ahlak kavramlarını hayatıma ilk kazandıran, maddi ve manevi desteklerini her daim hissettiren başta sevgili annem ve babam Nurhayat&Fehmi YALÇIN’a ve canım aile üyelerim Onur&Saniye YALÇIN, Elif YALÇIN ve neşe kaynaklarım Uras&Asya YALÇIN’a minnettarım. Beraber başladığımız bu akademik hayatta ve hayatımda tüm varlığı ile beni motive edip güçlendiren sevgili eşim Çağatay ESİN’e ayrıca çok teşekkür ederim. Bu akademik çalışmam ailem ile birlikte anlam kazanmıştır.

Burcu ESİN

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KÖPEK SPERMASININ ÖZELLİKLERİ	3
2.1. Spermanın Rengi	3
2.2. Spermanın pH Değeri.....	3
2.3. Spermanın Hacmi.....	3
2.4. Motilite	4
2.5. Spermatozoa Morfolojisi.....	4
3. SPERMANIN SULANDIRILMASI VE DONDURULMASI.....	5
4. KRİYOPREZERVASYONA BAĞLI MEYDANA GELEN HASARLAR.....	8
4.1. Soğuk Şoku	8
4.2. Ozmotik Stres	8
4.3. Kristalizasyon.....	9
4.4. Oksidatif Stres	9
4.5. DNA Hasarı.....	11
5. SPERMATOZOADA ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ.....	14
6. GÜNCEL ANTİOKSİDAN MADDELER VE SINIFLANDIRILMASI.....	16
6.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	16
6.1.1. Glutasyon Peroksidaz (GPX).....	16
6.1.2. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	16
6.1.3. Katalaz (CAT)	17
6.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	17
6.2.1. Karnitinler	17
6.2.2. E Vitamini	17
6.2.3. C Vitamini.....	17
6.2.4. L- sistein	18
6.2.5. Ergotiyonin.....	18
6.2.6. Melatonin	18
6.2.7. Çinko	19
6.2.8. Selenyum.....	19
7. NANOTEKNOLOJİ VE ÜRÜNLERİNİN SPERMATOLOJİK FONKSİYONLARDAKİ ROLÜ	21
8. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
8.1. Materyal	24
8.2. Yöntem	24
8.2.1. Spermanın Alınması ve Değerlendirilmesi	24
8.2.2. Spermanın Sulandırılması	25
8.2.3. Spermaya Ekilibrasyon Uygulaması	25
8.3. Spermanın Dondurulması ve Saklanması	26
8.4. Spermanın Değerlendirilmesi.....	27
8.4.1. Spermatozoa Motilitesi ve Yoğunluğunun Değerlendirilmesi	27
8.4.2. Hipo-Ozmotik Eosin Boyama Testi	27

8.4.3. Morfolojik Muayene.....	29
8.4.4. Spermanın pH Değeri	30
8.4.5. Sperm Kromatin Dispersiyon Testi (SCD)	30
8.5. Antioksidan Profilin Değerlendirilmesi	31
8.5.1. Glutasyon Peroksidaz (GPX) Aktivitesi	32
8.5.2. Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesi.....	32
8.5.3. Katalaz (CAT) Aktivitesi	32
8.5.4. Lipit Peroksidasyonun Değerlendirilmesi.....	33
8.6. İstatistiksel Analiz	33
9. BULGULAR VE TARTIŞMA	35
9.1. Taze Spermanın Spermatolojik Parametreleri.....	36
9.2. Çalışma Gruplarının Çözüm Sonrası Spermatolojik Parametreleri	37
9.2.1. Motilite, Progresif Motilite ve Kinematik Parametrelerin Değerlendirilmesi.....	38
9.2.2. Spermatozoon Plazma Membran Bütünlüğü ve Ölü-Canlı Spermatozoon Oranının Değerlendirilmesi	45
9.2.3. Spermatozoa Morfolojisinin Değerlendirilmesi	48
9.2.4. Spermatozoa DNA Bütünlüğünün Değerlendirilmesi	51
9.2.5. Antioksidan Profilin Değerlendirilmesi.....	53
10. SONUÇ	55
KAYNAKÇA	57
Etik Kurul Kararı	69
ÖZ GEÇMİŞ.....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALH	: Lateral kafa değiştirme
BCF	: Çapraz geçiş frekans ritmi
CASA	: Bilgisayar destekli sperma analiz cihazı
CAT	: Katalaz
Cu	: Bakır
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsDNA	: Çift zincirli DNA
GPX	: Glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
L-Cys	: L-sistein
LPO	: Lipid peroksidasyon
MDA	: Malondialdehit
Mn	: Manganez
Na ₂ SeO ₃	: Sodyum Selenit
NP	: Nanopartikül
O ₂	: Oksijen
PBS	: Fosfat buffer solüsyonu
PVC	: Polivinilklorid
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SCD	: Sperm kromatin dispersiyon
SeNP	: Selenyum nano partikülü
SOD	: Süperoksit dismutaz
ssDNA	: Tek zincirli DNA
VAP	: Ortalama yol hızı
VCL	: Eğrisel hız
VSL	: Düz izgisel hız
Zn	: Çinko
ZnNP	: Çinko nano partikülü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Spermatozoada Oksidatif Stres	10
Şekil 4.2. Spermatozoon DNA hasarının sebep ve sonuçlarının şematize görünümü	12
Şekil 5.1. Spermada kriyoprezervasyon sırasında meydana gelen hasarlar ve antioksidan eklenen spermada hasara karşı oluşan savunma sistemi.....	15
Şekil 7.1. Nanopartiküllerin temel avantajları	21
Şekil 7.2. Nanopartiküllerin, sperma kriyoprezervasyonu sonrasında oluşabilecek muhtemel hasarları azaltmadaki genel etkisi	22
Şekil 8.1. Spermanın sulandırılması ve gruplandırılması	26
Şekil 8.2. HE-testinin hazırlama aşaması.....	28
Şekil 8.3. Spermatozoonlarda HE-test ile spermatozoon membran bütünlüğünün ve ölü- canlı oranının belirlenmesi.....	29
Şekil 8.4. Spermblue kiti ile spermatozoonlarda morfolojik muayene	30
Şekil 8.5. Sperm Kromatin Dispersiyon testi için GoldCyto Sperm Kiti ile yapılan işlemlerin diyagramı	31
Şekil 8.6. DNA fragmentasyonu	31
Şekil 9.1. Taze spermanın toplanması ve değerlendirilmesi diyagramı.....	36
Şekil 9.2. Çalışma basamaklarının diyagramı	38
Şekil 9.3. Çözüm sonrası gruplar arası motilite değerinin karşılaştırması.....	39
Şekil 9.4. Çözüm sonrası gruplar arası progresif motilite değerinin karşılaştırması	41
Şekil 9.5. Çözüm sonrası gruplar arası VCL değerinin karşılaştırması	43
Şekil 9.6. Çözüm sonrası gruplar arası VAP değerinin karşılaştırması	44
Şekil 9.7. Çözüm sonrası gruplar arası canlı spermatozoon oranlarının karşılaştırması.....	47

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 7.1. Spermatolojik parametreler üzerine çeşitli nanopartiküllerin kullanıldığı çalışmalar	23
Tablo 8.1. Tris bazlı sulandırıcının çalışma gruplarına göre formülasyonu	25
Tablo 9.1. Çalışma gruplarını oluşturan taze spermaların miktar, sulandırma oranı, yoğunluk, motilite ve progresif motilite değerleri	37
Tablo 9.2. Çalışma gruplarındaki, çözüm sonrası spermatozoa motilite, progresif motilite ve kinematik parametrelerin ortalama değerleri	38
Tablo 9.3. Çalışma gruplarındaki, çözüm sonrası spermatozoon plazma membran bütünlüğü değerlendirildiği HOS testi ve ölü spermatozoon ortalama değerleri ...	46
Tablo 9.4. Çalışma gruplarındaki, çözüm sonrası anormal spermatozoa oranları	48
Tablo 9.5. Çalışma gruplarındaki, çözüm sonrası DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi	51
Tablo 9.6. Çalışma gruplarındaki çözüm sonrası antioksidan profil bulguları	54

1. GİRİŞ

Hayvanlarda üreme biyoteknolojisi ile hayvan türlerinin soyunun korunması ve ıslahı büyük önem taşımaktadır. Reprodüktif biyoteknoloji alanında yer alan spermanın kriyoprezervasyon işlemi klinik ve saha uygulamalarında geniş bir kullanım alanına sahiptir (Pesch and Hoffmann, 2007). Spermanın fertil kabiliyetini koruyabilecek şekilde dondurulması, suni tohumlama uygulamalarının daha ekonomik ve hızlı şekilde yapılmasını sağlamakla birlikte, pedigree kayıtlarının da daha doğru ve güvenilir şekilde tutulmasını sağlayacaktır. Ayrıca genetik kapasitesi yüksek olan hayvanların geniş popülasyonlarda kullanımını olanaklı hale gelecektir. Spermanın dondurulabilir olması sayesinde genetik materyal ulusal ve uluslararası alanlarda taşınabilir özelliğe kavuşmuştur. Dolayısı ile birçok damızlık için aynı gün, farklı yerlerde spermasının kullanımı sağlanmaktadır. Bununla birlikte damızlık olarak kullanılan hayvanların kayıp, ölüm veya infertilite riskine karşı spermasının dondurularak saklanması soyun korunmasını da sağlamaktadır (Pena et al., 2006).

Köpek sperması da diğer evcil hayvanlarda olduğu gibi dondurularak saklanabilmektedir (Pesch and Hoffmann, 2007). Ulusal ve uluslararası yapılan çalışmalarda köpek spermasının başarılı bir şekilde saklanması ve dondurulması konusunda çok sayıda çalışma olmasına rağmen, araştırmacıların çoğu diğer hayvan türleri için tasarlanmış metodolojileri benimsemiş ve araştırmalar genellikle sperma saklama işleminde kullanılan sulandırıcılar ve katkı maddeleri arasındaki karşılaştırmalar üzerine odaklanmıştır. Spermanın dondurulması sırasında oluşan ve geriye dönüşümsüz olarak hücre ölümüne neden olan fiziksel ve biyokimyasal değişimler, ilgili araştırmacıları optimum koşulları tespit ettikten sonra standart bir dondurma protokolünün oluşturulmasına yöneltmiştir. Spermatozoayı saklama sırasında oluşan hasarlardan koruyabilen, özellikle reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşturduğu hasarı ya da ROS oluşumunu tamamen engelleyebilen antioksidatif maddeler ve kimyasal yönden tanımlanmış bileşikler henüz net olarak bildirilmemiştir (Rodenias et al., 2014; Stănescu and Birtiou, 2010; Urbano et al., 2017). Selenyum, spermatozoanın oksidasyonunu önlemede doğal ve etkili bir antioksidan maddedir. Birçok fizyolojik etkiye sahip olan selenyum, vücudun temel iz elementlerinden birisidir. Selenyum güçlü bir kofaktör olarak en güçlü antioksidanlardan biri olan glutatyon peroksidaz enzimini aktive eder (Hill et al., 1996). Tüm bu avantajlarının yanında selenyum kullanımını sınırlayan faktörler biyoyararlanım ve toksisitedir

(Tarze et al., 2007). Bu nedenle daha az toksik ve biyoyararlanımı daha yüksek olan formlarının kullanılması gerektiği bildirilmektedir. Nanoteknoloji ürünü olarak selenyum nanopartikülleri, vücuttaki selenoproteinlerin üretimini büyük ölçüde arttıran, düşük toksisiteli bileşikler olarak tanımlanmaktadır (Peng et al., 2007). Nanopartikül selenyumun yüksek biyoyararlanım ve oksidatif hasarı azaltmadaki özellikleri göz önüne alındığında, antioksidan madde olarak sperma sulandırıcısına ilave edilmesinin dondurma ve çözüm sonrasında köpek spermasının kalitatif özelliklerini koruyabileceği düşüncesi şekillenmiştir.

Bu tez çalışması ile köpek spermasının dondurulma işlemi sırasında oluşan ve spermatozoon DNA (Deoksiribo nükleik asit) hasarına sebep olan oksidatif stresin engellenmesi üzerine Nanopartikül Selenyum (SeNP) ve Sodyum Selenitin (SS) protektif etkilerinin araştırılması amaçlamıştır. Bu tez çalışmasının verileri paylaşılması sonrasında köpek spermasında protektif etkili güncel antioksidan kullanımı ulusal ve uluslararası düzeyde araştırmalara ışık tutabilme potansiyeli ile özgün bir değer taşımaktadır. Ayrıca, mevcut sonuçlara göre yapılan değerlendirmelerde sperma sulandırıcısına ilave edilen özellikle nanopartikül selenyumun yüksek antioksidatif etkisi ve düşük toksisite özelliğinden dolayı diğer hayvan türlerinin spermalarının dondurulma protokollerinde de yer bulabilme niteliği taşımaktadır.

2. KÖPEK SPERMASININ ÖZELLİKLERİ

Spermanın temel özellikleri olan motilite, kinematik parametreler, hacim ve morfolojik yapısı spermatozoonların lokalizasyonu (testis, epididimis) (Varesi et al., 2014), çiftleşme durumu (Soler et al., 2017a), hayvanın yaşı (Bhanmeechao et al., 2018), mevsim (Strzezek et al., 2015), geçirilmekte olan veya geçirilmiş olan hastalıklar (Bhanmeechao et al., 2018) gibi çeşitli koşullar ile bağlantılıdır.

Spermatozoa, dişi gameti olan oositi döllerme üzere üretilen, erkek genomunu taşıyan üreme hücresidir. Yapısının karmaşık olması nedeniyle basit bir test ile bir numunenin fertilite potansiyeli hakkında bilgi verilememesi dolayısıyla kapsamlı testler gerekmektedir (Haşegan et al., 2012). Söz konusu değerlendirme parametrelerinin her biri kendi çapında büyük önem arz etmekte olup titizlikle değerlendirilmelidir. Bu parametreler aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

2.1. Spermanın Rengi

Sperma rengi hayvan türüne göre veya bireye göre değişim göstermekle birlikte, bulutlu, krema veya süt rengine olup, tamamıyla kendine özel bir renge sahiptir. Normalden sapma durumlarında ise olayın kaynağına göre sperma rengine değişimler oluşmaktadır. Spermatozoadaki sarı renk, idrar kontaminasyonunu gösterirken (ürospermi), yeşil renk irin varlığını (pyospermi) gösterir. Kırmızı veya kahverengi renk ise spermada taze veya hemolizli kanın (hemospermi) varlığını gösterir (Johnston et al., 2001).

2.2. Spermanın pH Değeri

Köpek spermasının normal pH değeri 6,3 ile 7,0 arasında değişebilmektedir. pH değerlendirmesi, toplama işleminden hemen sonra ve doğru ekipman kullanılarak yapılmalıdır (Threlfall, 2003). Prostatik sıvının normal değeri ise ortalama 6,5 ile 6,8 arasındadır. (Feldman and Nelson, 1996; Johnston, 1989). pH değerindeki farklılıklar genellikle enfeksiyon durumlarında oluşmaktadır ve uygun antibiyotik seçimine yardımcı olmaktadır (Robert et al., 2016). Spermanın pH'sı pH metre ya da özel dizayn edilmiş pH kağıtları ile ölçülebilmektedir.

2.3. Spermanın Hacmi

Köpeklerde sperma alma işleminde alınan ejakülat üç fraksiyondan oluşmaktadır. Ön sekret fraksiyonu olarak da adlandırılan ilk fraksiyon, üretra ve prostat bezinden köken almaktadır. Normalde açık veya hafif bulutlu vemi miktar olarak 0,5-20 mililitre arasında değişiklik göstermektedir. İkinci fraksiyon, spermatozoon

açısından zengin olup normalde opak, süt beyazı renkli ve 0,5-2,0 ml'dir. Birinci ve ikinci fraksiyonlar genellikle bir arada toplanmaktadır. Üçüncü fraksiyon olan son sekret ise prostat bezinden köken alan daha açık renkli fraksiyondur (Feldman and Nelson, 1996; Freshman, 2001). Spermanın hacmi, köpeklerde sperma kalitesini belirlemek için kullanılan bir belirteç değildir. Ancak sperma numunesindeki toplam spermatozoon sayısının ve sperma tohumlamada kullanılacak ise tohumlama dozunun hesaplanmasında kullanılan önemli bir parametredir. Toplanan üç fraksiyonun hacmi, özellikle ikinci fraksiyonun hacmi oldukça değişkendir ve numuneyi toplayan veteriner hekim tarafından dikkatlice kontrol edilmelidir (Robert et al., 2016). Spermanın hacmi bu iş için özel yapılmış dereceli sperma toplama kadehleri ya da kaplarından doğrudan okunarak mililitre (ml) olarak değerlendirilmektedir.

2.4. Motilite

Motilite, hızlı ve ileri yönde aktif ilerleyen spermatozoonların ölü ya da diğer hareket biçimi gösteren tüm spermatozoonlara oranı olarak tanımlanmaktadır. Dairesel hareket eden spermatozoonlar motil olarak kabul edilmezler. Köpek spermasında hareketli spermatozoa yüzdesi %70 ile 90 arasında bildirilmektedir (Johnston et al., 2001; Iguer-Ouada and Verstegen, 2001). Spermatozoa motilitesi sperma toplandıktan hemen sonra ve özellikle de ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskobu kullanılarak değerlendirilmelidir. Fertil köpeklerin toplam spermatozoa hareketliliğinin en az %70 olması gerektiği bildirilmiştir (Larsen, 1980).

2.5. Spermatozoa Morfolojisi

Spermatozoa morfolojisi, sperma örneğinin kalite ve fertilizasyon kabiliyetinin önemli bir göstergesidir (Verstegen et al., 2002). Morfolojik bozukluklar birincil (spermatogenez sırasında meydana gelen) veya ikincil (olgunlaşma veya in-vitro manipülasyonlar sırasında ortaya çıkan) olarak sınıflandırılabilir (Oettlé, 1990). Normal sperma numunelerinde <%10 birincil morfolojik bozukluklar ve <%20 ikincil morfolojik bozukluklar olması kabul edilebilir sınırlardır. Toplam morfolojik bozukluklar ise <%10-20 olabilmektedir (Martínez, 2004). Sperma morfolojisi, çeşitli boyalar kullanarak (Eozin/nigrosin, Diff-Quick, Papanicolaou, Spermbly ve benzeri), ışık mikroskobu veya bilgisayar destekli sperma analiz cihazı (CASA) ile belirlenmektedir.

3. SPERMANIN SULANDIRILMASI VE DONDURULMASI

Tarihteki birçok bilimsel gelişme kriyoprezervasyon teknolojisinin gelişmesine ve ilerlemesine katkı sağlamıştır. Alman fizikçi Gabriel Fahrenheit tarafından 1714 yılında ilk hassas termometrelerin icadı, kriyoprezervasyon için doğruluk ve hassasiyet sağlamıştır. Bununla birlikte, temel keşifler tek başına dondurma işleminin aksine, spermanın dondurulmadan önce nasıl ve hangi manipölasyonlara tabi tutulduğu ile ilgilidir. 1940 yılında ise Phillips ve Lardy, sperma sulandırıcısında yumurta sarısı ilavesinin sperma motilitesi ve fertilite oranını arttırdığını bildirmişlerdir (Leibo, 2004). Genel olarak spermanın dondurulması, ortam sıcaklığının düşürülerek spermatozoon metabolik aktivitelerinin azaltılması prensibine dayanmaktadır (Farstad, 2009). Daha sonra 1949'da Polge, Smith ve Parkes gliserolün spermatozoayı düşük sıcaklıkların etkilerine karşı korumada etkili olduğunu keşfetmişlerdir (Polge et al., 1949). Bu gelişmeden itibaren gliserol, kriyoprezervasyon işleminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Spermanın dondurulmasına ait çalışmalar gliserolün kriyoprotektan madde olarak ortaya konmasıyla başlamıştır (Holt, 2000).

Suni tohumlama teknolojisinin ilk olarak uygulandığı hayvan türü köpek olmasına rağmen, erkeklerin genetik potansiyelinden istifade etmek için köpek spermasının korunması, saklanması ve dondurulması konusunda diğer türlere nazaran daha az çalışma yapılmıştır. Köpek spermasının dondurularak saklanabilmesi ile farklı ırklara ait genetik materyaller ulusal ve uluslararası düzeyde taşınabilmektedir ve bu yönüyle gittikçe yaygınlaşmaktadır (Srivastava et al., 2011).

Köpek spermasının saklanması ve dondurulması konusunda tarihsel sürecin gelişimi aşağıdaki şekilde gerçekleşmiştir. Abbe Lazaro Spallanzani 1776 yılında, sıcaklıktaki düşüşün spermatozoa metabolik aktivitesini geri dönüşümlü bir şekilde azalttığını gözlemleyen ilk kişidir. Köpeklerde ilk suni tohumlama çalışmaları 1780 yılında yine Abbe Lazaro Spallanzani tarafından yapılmıştır. Bununla birlikte, dünyanın her yerindeki araştırmacıların sperma kriyoprezervasyonu hakkındaki ilgi çeken ve sperma dondurmada gliserolün kriyoprotektif kapasitesi hakkındaki keşif 1949 yılında Polge tarafından yapılmıştır. Köpeklerde dondurulmuş-çözülmüş sperma kullanılarak elde edilen ilk gebelik Seager tarafından 1969 yılında bildirilmiştir. Dondurulmuş spermanın suni tohumlamada kullanımı ise ilk olarak 1981'de American Kennel Club tarafından onaylanarak devreye sokulmuştur (Seager, 1969; Fahrig,

2003; Srivastava et al., 2011). Dondurulmuş-çözölmüş köpek spermalarından doğan ilk yavru­lardan günümüze kadar köpek yetiştiricileri üreme biyoteknolojisindeki ilerlemelerden daha iyi yararlanabilmek için bilim dünyasına giderek artan bir baskı uygulamışlardır (Farstad, 1996). Spermanın dondurulması ve istenilen uzaklığa kolaylıkla transferi ile özellikle damızlık değeri yüksek olan köpek ırklarının spermasının nakliyle farklı ölkelerdeki dişi köpeklerin tohumlanması yapılmaktadır. Bu yöntem ile Amerika ve birçok Avrupa ölkesinde köpek sperma bankaları oluşturularak üstün damızlık nitelikli pedigrilere sahip köpek ırklarından yararlanılmaktadır.

Spermanın dondurularak saklanması temel olarak dört aşamada gerçekleşmektedir. Bu aşamalar; sıcaklık düşürme, hücre­sel dehidrasyon, dondurma ve çöz­dürmedir (Medeiros et al., 2002). Bu işlemler boyunca, spermatozoa soğuk şoku, ozmotik stres, oksidatif stres ve kristalizasyon gibi çeşitli streslere maruz kalmaktadır (Yoon et al., 2015). Hücre­sel hasar, tüm kriyoprezervasyon aşamalarında oluşmakta ve dondurulmuş-çözölmüş spermanın fonksiyonel durumu, tüm süreç boyunca meydana gelen hasarların sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Ultra­strüktürel olarak, donma hasarı en belirgin spermatozoonun plazma ve akrozomal membranlarındaki bozulmayla ortaya çıkmaktadır (Medeiros et al., 2002).

Köpek spermasının dondurulmasında, spermatozoonların canlılığını sağlamak için seminal plazmaya benzer bir ozmolarite ve pH'ya sahip olan bir sulandırıcı kullanılmalıdır. Sperma sulandırıcısına soğuk şokuna karşı yarım yağlı süt, hindistan cevizi sütü ve yumurta sarısı eklenmektedir. Özellikle yumurta sarısı, köpek suni tohumlama merkezlerinde yoğun olarak kullanılan katkı maddesidir (Bencharif and Dordas-Perpinya, 2020). Yumurta sarısının spermatozoayı soğuk şoku hasarına karşı koruma özelliği, içerdiği düşük yoğunluklu lipoproteinlerden (LDL) kaynaklanmaktadır (Quinn et al., 1980; Moussa et al., 2002). Yumurta sarısının ortamın donma ısını düşüren ve hücre dışı buz kristali oluşumunu azaltan kriyoprotektan etkisine rağmen, bileşim­lerindeki değışkenlik ve hayvan patojenleri ile kontaminasyon potansiyeli nedeniyle kullanımına ilişkin tartışmalar ve alternatif arayışlar olmuştur (Bousseau et al., 1998). Bitkisel bazlı katkı maddelerinin sulandırıcılarda kullanımının yumurta sarısına mükemmel bir alternatif olabileceği ve son yıllarda soya lesitini bazlı sulandırıcılara doğru bir yönelim vardır (Layek et al., 2016). Hem yumurta sarısı hem de soya lesitini, ana bileşenin fosfatidilkolin ile birlikte fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin olan fosfolipidler içerir. Soya fosfolipidleri

bitkisel doğası gereği doymamış yağ asitleri bakımından yumurta sarısı fosfolipidlerinden veya spermatozoon membran fosfolipidlerinden daha zengindir. Bu nedenle lesitin membran akışkanlığını ve soğuk şoka karşı direnci artırabilir (Parks et al., 1992). Ancak, soya bazlı sulandırıcıların spermatozoa kriyoprezervasyonunda yumurta sarısı kadar güçlü kriyoprotektif etkisi halen daha kanıtlanamamıştır. Yumurta sarısının kriyoprotektif özelliği tam olarak açıklanamamakla birlikte özellikle fosfolipidlerdeki bileşimine bağlanmaktadır (Sánchez-Calabuig et al., 2017). Yumurta sarısı, köpek sperma sulandırıcısı olarak Tris, gliserol, glutatyon, sitrik asit gibi bileşenler ile birlikte kullanılmaktadır (Bencharif and Dordas-Perpinya, 2020). Bu yönüyle sperma sulandırıcılarının konvansiyonel ve ticari olarak birçok alternatif seçeneği konvansiyonel ve ticari olarak bulunmaktadır.

4. KRİYOPREZERVASYONA BAĞLI MEYDANA GELEN HASARLAR

Spermanın kriyoprezervasyonunda meydana gelen donma hasarlarının oluşumundaki mekanizma soğuk şoku, ozmotik stres, kristalizasyon, serbest radikallerin oluşumu (Chatterjee and Gagnon, 2001; Wang et al., 1997), antioksidan savunma sistemlerinde değişiklik (Bilodeau et al., 2001; Lasso et al., 1994) ve bu koşulların farklı kombinasyonlarıdır.

4.1. Soğuk Şoku

Membran stabilitesi ve soğuk şokuna karşı direncin, hücre membranındaki fosfolipid içeriği ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Spermatozoon membranındaki fosfolipide bağlı doymuş yağ asitlerinin düşük konsantrasyonda olması soğuk şokuna karşı daha dirençli olması ile ilişkilendirilmiştir. Köpek, insan, kümes hayvanı ve tavşan spermatozoonları, büyük evcil hayvanlara göre soğuk şokuna karşı daha dirençlidir (Bucak ve Tekin, 2007). Spermatozoonların soğuk şokuna uğraması sonucu meydana gelen etkiler spermatozoonun fertilizasyon kabiliyetinde düşmeye sebep olur. Bu etkiler; intrasellüler dehidrasyon, membran lipit ve proteinlerinde destabilizasyon ve denatürasyon, hücre ve endoplazmik retikulumunda ozmotik şişme, plazma membranında intramembranöz kümeleşme ve akrozomal enzimlerin salınımı olarak ifade edilebilir (Curry and Watson, 1994). Soğuk şoku ayrıca oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile de doğrudan ilişkilidir (Gadea et al., 2011).

4.2. Ozmotik Stres

Ozmotik stres hücre içi ve hücre dışı (intra/ekstrasellüler) ortamın ozmotik farkından meydana gelmektedir. Hücresel dehidrasyondaki artış, pH değişimi, hücre membranındaki protein-lipit yapısının zayıflaması hiperozmotik ortamın oluşumuna neden olmaktadır (Holt, 2000). Ayrıca, spermanın dondurma işlemi sırasında uygulanan soğutma hızı hücre zarının geçirgenliğini ve hücre canlılığını etkilemektedir. Çok yavaş veya çok hızlı soğuma hızı hücre içi buz kristalizasyonu oluşumuna neden olur ve bu durum tolere edilemez seviyeye ulaştığında hücre ölümüyle sonuçlanır (Thirumala et al., 2003).

Spermanın dondurulmasında hiperozmotik ortam oluşmaktayken çözüm sırasında kristalizasyonun ortadan kalkması ile hiperozmotik ortam azalmaktadır. (Holt, 2000). Farklı hücre tiplerinde membran geçirgenliğindeki farklılıklar nedeniyle optimum soğutma hızları değişmektedir. Bu nedenle aynı ırktan bile olsa, bireysel

farklılıklara bağılı olarak değişik düzeylerde hücresele değişimler meydana gelebilmektedir (Thirumala et al., 2003).

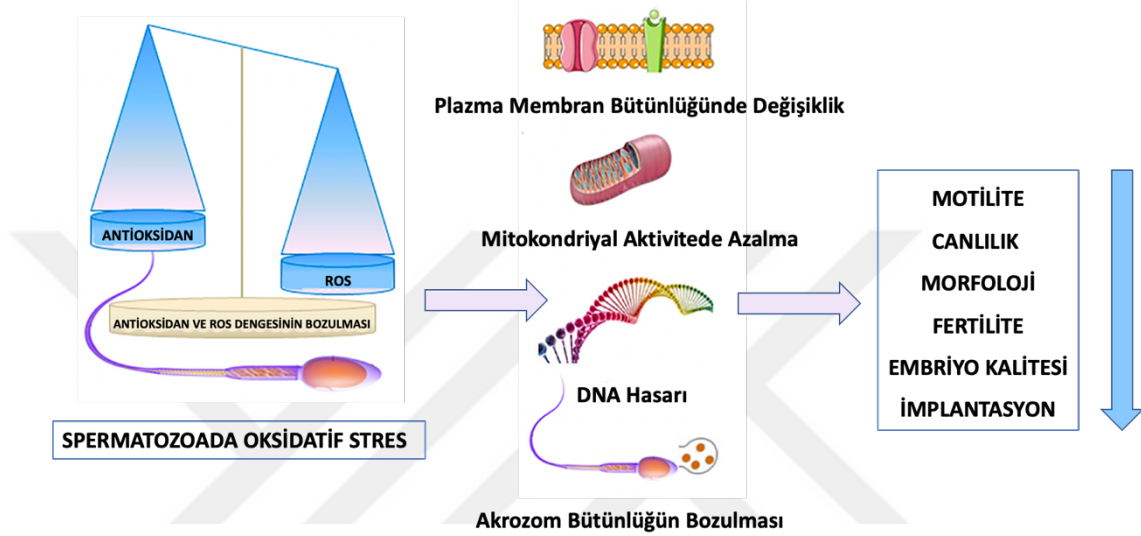
4.3. Kristalizasyon

Sıcaklığın donma derecelerinin altına düşmesiyle hücre içi ve hücre dışı buz kristalleri oluşmaktadır. Su, hücrenin önemli bir bileşeni olup, donma işlemi meydana geldiğinde, hücresele sıvı tamamen yok olana kadar aşamalı olarak azalır ve ozmotik dengede bir bozulmaya neden olur (Mazur, 2004). Soğutma hızının "çok yavaş" veya "çok hızlı" olmasına bağılı olarak, hücre içi su hücre zarından geçer ve hücre dışı buz fazına katılır veya donarak hücrenin içinde kristalizasyon (buz) oluşturur (Thirumala et al., 2003). Sıvılardaki kristalleşme sonucunda donmamış fraksiyondaki fiziksel özellikler değişmekte, kristalleşmenin etkileri ile ortam vizkozitesinde ve pH'sında önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Kristalizasyon hücrede ozmotik büzüşmeye ve membranın lipit fazında değişime neden olmaktadır (Gilmore et al., 2000).

4.4. Oksidatif Stres

Spermanın soğutulması ve dondurulması işlemleri sırasında spermatozoada oksidatif stres oluşmakta ve bu durum spermatozoanın fertil kapasitesinde azalmaya neden olmaktadır (Khalil et al., 2019). Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri olarak bilinen oksijen ve oksijenden türemiş olan oksidan oranının artarak hücresele hasarlara neden olma durumu olarak tanımlanmaktadır (Sikka et al., 1995). Spermatozoa antioksidan sistemi ile serbest radikaller arasında bir denge bulunmaktadır. Çoğu hücre, çeşitli reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerini nötralize eden maddeler ve enzimler içerir, ancak spermatozoada antioksidan miktarı diğer hücrelerden daha düşüktür ve oksidatif strese karşı daha savunmasızdır (Nair et al., 2006). Memeli spermatozoon plazma membranları doymamış yağ asitleri ve fosfolipitlerle kaplıdır. Çoklu bağlara sahip doymamış yağ asitleri spermatozoonun lipid peroksidasyona (LPO) karşı oldukça duyarlı hale getirir ve bu durum infertilite sebebi olarak karşımıza çıkar (Surai et al., 1998). Yağ asitlerinin oksidasyonu, ROS üretimine yol açar. Bu radikaller, bazı metabolik aktiviteler ve spermatozoanın fizyolojik süreçleri için gereklidir. Ancak spermatozoada aşırı bir serbest radikal oluşumu spermatozoon membran bütünlüğüne zarar verebilir, DNA ve protein hasarına neden olabilir. Ortamdaki ROS'lara karşı devreye giren antioksidan sistemi artık süreci tolere edemeyecek aşamaya geldiğinde olay ROS lehine ilerlemeye devam eder ve hücre artık bu durumu kontrol edemediğinden apoptoza doğru gidiş şekillenir. Sonuç olarak

da apoptozisten kaynaklanan hücre ölümü ve kaybının artışına bağlı olarak spermatozoa motilitesi ve dolayısıyla fertilitiyi azaltabilir (Peris et al., 2007). Reaktif oksijen türlerinin üretimi ile antioksidan sistem arasındaki dengenin korunması, spermatozoanın depolanması ve dondurulmasıyla dengelenen spermatozoanın canlılığının devamını sağlamak için gereklidir (Bréque et al., 2003). Hücrenin antioksidan sistemi ile ROS dengesinin bozulması sonucunda spermatozoada oluşan oksidatif stres Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



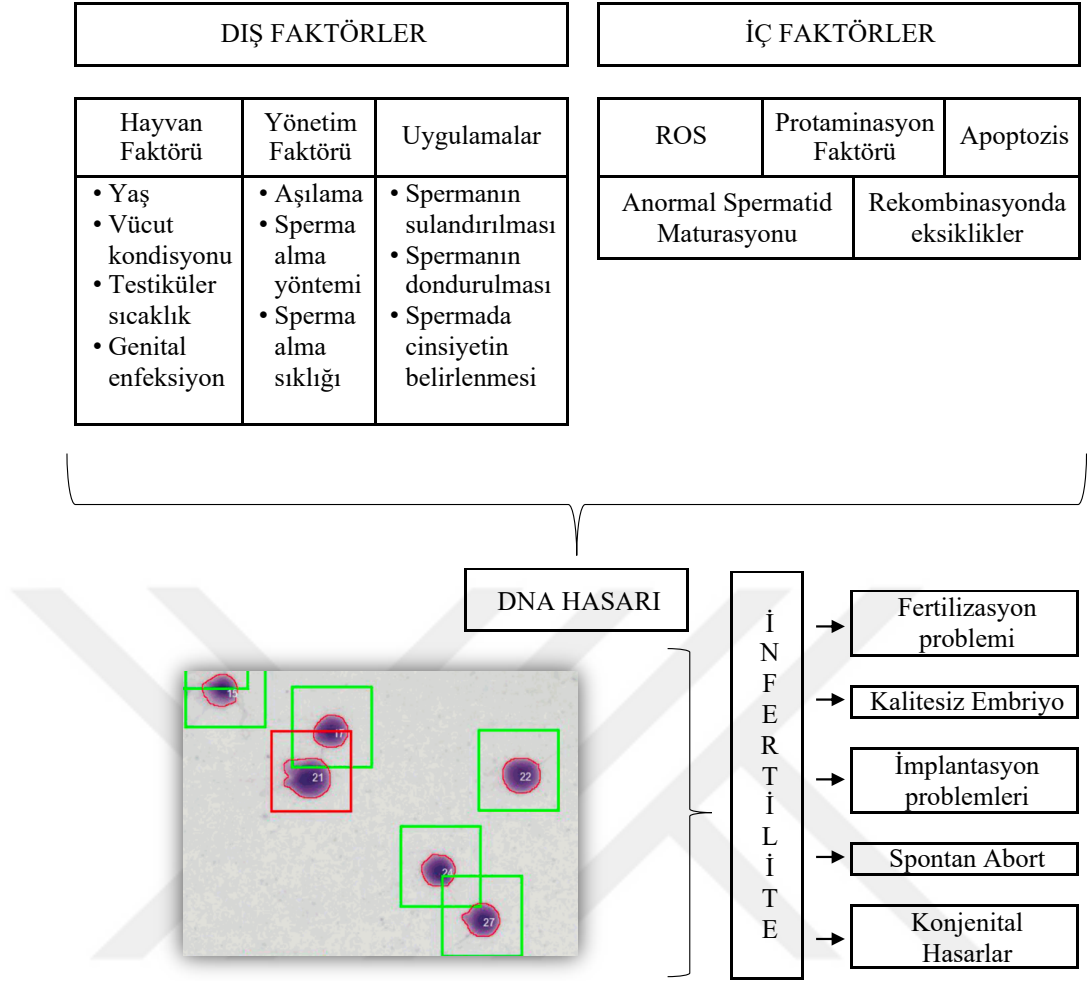
Şekil 4.1. Spermatozoada Oksidatif Stres (Al-Mutary, 2020’den uyarlanmıştır)

Spermatozoon membran yapısı akıcı mozaik tarzında düzenlenmiş protein, glikoprotein ve glikolipitlerle bezeli iki sıralı fosfolipid katmandan oluşmaktadır. Ancak, bu yapıların termodinamik özellik göstermesi ve %65-70 oranında doymamış fosfolipitlerden meydana gelmesi, membranların soğutulmalarının sonucu olarak geri dönüşümsüz faz değişimine, sıvı fazdan jel fazına geçmesine neden olmaktadır. Faz değişimi membran içi enzimlerinin kinetiğinde değişime yol açarak, çözüm sonu hücre canlılığını azaltmaktadır. Bu değişimler sonrası gelişen stabilizasyonun bozulmasıyla da hücrede soğuk şoku ve oksidatif stres kökenli hücresel hasarlar gelişmektedir. Ayrıca serbest radikal ürünlerinin detoksifikasyonunda görevli olan ve spermada bulunan doğal antioksidan sistemleri (glutasyon peroksidaz, glutasyon, süperoksit dismutaz, vitamin C, taurin ve benzeri) spermatozoonun korunmasında yeterli olmamakta, spermanın dondurulması/çözdürülmesi sırasında motilite ve canlılık azalmakta, sonuç olarak spermatolojik parametreler ve fertilité olumsuz etkilenmektedir. Bu olumsuz etkilerin temel nedeni, spermanın soğutulması, dondurulması ve çözdürülmesi esnasında gelişen ısı şoku, ozmotik basınç değişimi ve bunların sonucu olarak şekillenen lipid peroksidasyonudur ve bu olay “soğutma

zararı/hasarı” (cryoinjury) olarak tanımlanmaktadır (Eilts, 2005). Oksidatif stres spermatozoada motilite, morfoloji, fertilizasyon yeteneği ve DNA yapısında çoğu zaman geri dönüşümsüz olabilen birçok hasara neden olmaktadır (Tremellen, 2008).

4.5. DNA Hasarı

Hasarsız ya da bozulmaya uğramamış DNA, tek veya çift iplikli çentiklerin, kırılmaların veya yapısında herhangi bir kimyasal modifikasyonun olmaması yani bozulmaya ya da hasara uğramamış olarak tanımlanmaktadır. Genellikle, hasarlı DNA'nın şekillenmesi gibi olası durumlarda etkilenen spermatozoonların çoğu sertoli hücreleri tarafından fagositoza uğrar veya herhangi bir zararlı madde salınımı olmadan apoptoz yolu ile programlanmış hücre ölümüne maruz kalır. Vücudun bu savunma mekanizmasına rağmen, spermatozoonda birçok farklı etkenden kaynaklanabilecek DNA hasarı meydana gelebilmektedir (Morris et al., 2002; Shamsi et al., 2010). Spermatozoon DNA'sı, genetik materyali taşıyan ve fertilizasyonda sürece mutlaka dahil olan erkek kalıtsal materyaldir. DNA hasarlı spermatozoonun fertilizasyon sürecine katılması sonucunda fertilizasyonun başarılı bir sonuçla şekillenememesine, başarılı fertilizasyon gelişse bile oluşan embriyonun gelişiminin olumsuz yönde etkilenmesine ya da implantasyonun olması gerektiği gibi devam etmemesine sebep olabilmektedir (Morris et al., 2002). Spermatozoon DNA hasarının nedenleri ve sonuçları şematik olarak Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Spermatozoon DNA hasarının sebep ve sonuçlarının şematize görünümü

Oksidatif stres, spermatozoonda DNA hasarının en önemli oluşum nedeni olarak belirtilmektedir. Reaktif oksijen türleri, hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve fonksiyonunda önemli ve olumlu bir rol oynamakla birlikte aynı zamanda negatif etkilere de sebep olabilmektedir. Reaktif oksijen türleri oldukça duyarlı ve tepkili bir yapıya sahip oldukları için hücrenin DNA molekülü de dahil birçok yapısına zarar verebilmektedir (Badouard et al., 2008). Reaktif oksijen türlerinin yoğun bir biçimde üretimi ya da bu bileşiklere maruz kalınması spermatozoon fonksiyonlarında bozulmalara neden olmakta ya da DNA hasarına yol açmaktadır (Agarwal and Said, 2005).

Reaktif oksijen türlerinin patojenik etkileri, erkek üreme sisteminin veya seminal plazmanın antioksidan seviyesini aştığında ortaya çıkmaktadır. Spermatozoon DNA'sı üzerindeki tek zincir (ssDNA) kırığı oksidatif stresin direkt bir sonucudur. DNA çift zincir (dsDNA) kırıkları ise lipid peroksidasyon sonucunda ortaya çıkmaktadır. DNA

hasarı öncelikle oksidatif stres kaynaklı apoptotik mekanizma veya antioksidan savunma sistemin yetersizliği sonucunda olarak ortaya çıkmaktadır (Bennetts et al., 2008). Spermatozoon DNA'sında tek zincir kırılmaları sonucunda fertilizasyon kapasitesinde azalmalar, çift zincir kırılmaları sonucunda ise embriyonik gelişim ve implantasyon bozuklukları şekillenebilmektedir (Lewis and Aitken, 2005; Agarwal and Said, 2005).

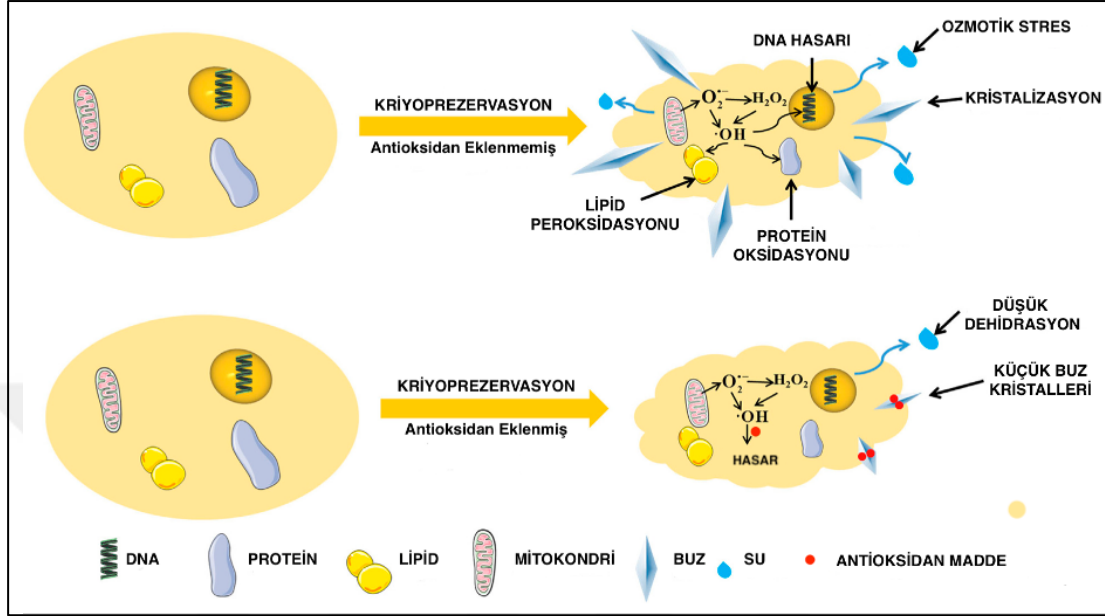
Spermatozoon DNA'sına depolama sıcaklığının ve kriyoprezervasyonun etkisi çeşitli türlerde incelenmiştir. 5-15°C arasındaki sıcaklıkların, 20-37°C gibi daha yüksek sıcaklıklara kıyasla DNA'yı daha uzun süre koruduğu bilinmektedir ve sıcaklık arttıkça aygır, tavşan, köpek ve boğalarda spermatozoon DNA hasarının arttığı gözlemlenmektedir (Love et al., 2002). Spermanın kriyoprezervasyonu; insanlardaki malign hastalıklar, vazektomi veya cerrahi kısırlık tedavileri için terapiden önce erkek fertilesini korumak için ve aynı zamanda hayvan türlerinde de genetik iyileştirme için suni tohumlama programlarında kullanımına katkı sağlasa da bu teknik ile spermatozoon yapısının ve işlevinin olumsuz şekilde etkileneceği kaçınılmazdır (Jackson et al., 2010). Kriyoprezervasyon aşamasından önce ve sonra spermatozoon DNA hasarı üzerine yapılan farklı çalışmalarda, spermada kriyoprezervasyon uygulamasının DNA hasarına sebep olduğu ortaya konmuş olup önemle incelenmesi gereken bir konudur. Yapılan çalışmalarda memeli türlerinde spermatozoon DNA kalitesinin diferansiyel ve türe özgü dinamik kaybının reproduktif özellikleri olumsuz etkileyebileceği ortaya konulmuştur (Jackson et al., 2010; Gosálvez et al., 2011).

5. SPERMATOZOADA ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ

Canlı organizmayı oluşturan her bir hücre hem fizyolojik olaylar sırasında hem de tüm dış etkenler sonucu oluşabilecek reaktif oksijen türlerini inhibe edebilen, olası hasarı giderebilecek savunma mekanizmalarına sahiptirler. Savunma sistemlerinde bulunan ve serbest radikallerle oldukça çabuk reaksiyonlara girerek peroksidasyon ve otooksidasyonu önleyebilen maddeler “Antioksidan” olarak tanımlanmaktadır. Ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin bileşenlerinin üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin ortamdan uzaklaştırılması, olası hücre defektlerinin onarılması, yeniden radikal üreten reaksiyonların durdurulması ve endojen antioksidan savunma kapasitesinin artırılması olarak tanımlanan savunma mekanizmaları ise “Antioksidan Savunma Sistemi” şeklinde tanımlanmaktadır (Gutteridge, 1995; Dündar ve Arslan, 1999; Ghorbani et al., 2016).

Sperma sulandırıcılarına katılan kriyoprotektif ve antioksidatif özellikli maddeler oksidatif stresi ve soğuk şoku sebebiyle oluşan hasarları azaltabilmektedir (Bucak vd., 2010). Spermada kriyoprezervasyon sırasında meydana gelen hasarlar ve antioksidan ilave edilen spermada hasara karşı oluşan savunma sistemi Şekil 5.1’de görülmektedir. Antioksidan maddeler, serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırmayı sağlayan enzimatik ve enzimatik olmayan (non-enzimatik) ajanlardır. Antioksidan maddelerin sperma sulandırıcılarına eklenmesi, spermatozoada oluşacak oksidatif hasarın önlenmesi ve suni tohumlama uygulamalarında beklenen fertilite sonuçlarını maksimuma çıkarmak için oldukça önemli katkılar sağlamaktadır (Ghorbani et al., 2016). Soğutma veya dondurma protokollerinde sperma sulandırıcılarına eklenen antioksidan maddelerin etkinlikleri birçok bilim insanı tarafından araştırılmaktadır. Köpek spermasının soğutulması ve dondurulmasına ilişkin çeşitli antioksidan maddelerin kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur (Michael et al., 2009; Martins-Bessa et al., 2007; Bencharif et al., 2012). Çeşitli canlı türlerinde spermanın dondurulmasına ilişkin sulandırıcıya koruyucu olarak glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz gibi enzimatik antioksidanlar (Ghorbani et al., 2016), askorbik asit, alfa-tokoferol, beta-karoten gibi vitaminler (Giaretta et al., 2015), çinko ve selenyum gibi mineraller katılmıştır (Rezaeian et al., 2016). Ancak bu bileşiklerin çoğu hidrofobiktir ve sperma sulandırıcısında tam olarak çözünmeleri ve homojenize olmaları zor olup sperma üzerinde negatif etkileri olabilen etanol ve dimetil sülfoksit gibi çözücülere

ihtiyaç duyarlar. Yukarıda bahsedilen nedenlerden ötürü, geleneksel olarak kullanılan antioksidan maddeler, yoğun miktarlarda serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engellemede veya spermanın çözüm sonrası spermatolojik parametrelerini iyileştirmede her zaman başarılı olamamışlardır (Benhenia et al., 2018).



Şekil 5.1. Spermada kriyoprezervasyon sırasında meydana gelen hasarlar ve antioksidan eklenen spermada hasara karşı oluşan savunma sistemi (Liu et al., 2021'den uyarlanmıştır)

Memelilerde spermanın kendisi de önemli bir antioksidan kaynağıdır, seminal kompozisyonda var olan antioksidan bileşikler spermatozoonların oksidatif strese karşı korunmasında yardımcı olurlar (Jeulin et al., 1989; Gagnon et al., 1991; Zini et al., 1993). Spermatozoonlarda endojen antioksidan enzim aktivitesi de olduğu bildirilmiştir. Bu enzimler; glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalazdır (Zini et al., 1993; Sanocka et al., 1997). Ayrıca sperma içerisinde bazı enzimatik olmayan antioksidanların da (E vitamini, taurin, hipotaurin, L-karnitin, likopen) bulunduğu ve bunların total antioksidan kapasite tespitinde önemli olduğu bildirilmiştir (Holmes et al., 1992, Zini et al., 1993).

6. GÜNCEL ANTİOKSİDAN MADDELER VE SINIFLANDIRILMASI

Antioksidan maddeler, serbest radikalleri temizleyerek diğer moleküllerde oksidatif süreci inhibe etme veya azaltma yeteneğine sahip moleküllerdir (Kalthur et al., 2008). Antioksidanlar; enzimatik ve enzimatik olmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılır.

6.1. Enzimatik Antioksidanlar

Glutasyon peroksidaz (GPX), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) lipit peroksidasyonu engelleyen, hücrelerin savunma aracı olarak çalışan enzimatik antioksidanlardır (Guemouri et al., 1991; Bansal and Bilaspuri, 2010).

6.1.1. Glutasyon Peroksidaz (GPX)

Glutasyon peroksidaz, mitokondri ve sitozolde şekillenen ve biriken hidrojen peroksidi suya dönüştüren önemli bir enzimatik antioksidandır (Fattman et al., 2003). Glutasyon peroksidaz enzimi, aktivasyonu için selenyuma ihtiyaç duyanlar ve duymayanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bu özelliğinden dolayı selenyuma bağlı olan GPX ve selenyuma bağlı olmayan GPX olarak gruplandırılmaktadır. Glutasyon peroksidazın asıl önemli rolü oksidatif strese karşı hücreyi korumasıdır (Cnubben et al., 2001). Selenyuma bağımlı glutasyon peroksidaz, özellikle hidrojen peroksit ve organik hiperoksitlere karşı etki etmektedir. Selenyuma bağlı olmayan glutasyon peroksidaz ise daha çok organik hidroperoksitlerin metabolize edilmesinde faaliyet göstermekte ve bu özelliği sayesinde hücreyi oksidatif strese karşı korumaktadır (Reiter et al., 1995; Cnubben et al., 2001).

6.1.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, süperoksit anyon radikallerine ve reaktif oksijen türlerine karşı en önemli antioksidan savunma sistemidir. SOD, süperoksit radikalini oksijen (O_2) molekülüne yükseltgeyerek ve diğer bir süperoksit radikalini ise daha az reaktif bir molekül olan hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenmesini katalize ederek etki göstermektedir. Süperoksit dismutazın üç farklı izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlar içeriğine bağlı olarak; bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren Cu-Zn SOD, mangan (Mn) içeren Mn-SOD ve ekstrasellüler süperoksit dismutazdır (Yu, 1994).

6.1.3. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT), farklı doku ve hücre tiplerinde olmakla birlikte, aynı hücre içinde de değişkenlik gösteren, dört tane “hem grubu” içeren bir hemoproteindir. Katalaz, hidrojen peroksidi yıkımlamayıp hücre içinde sınırlayabilmekte ve fizyolojik süreçlerde birinci basamak antioksidan savunma enzimi olarak görev almaktadır (Yu, 1994).

6.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında; karnitinler, vitaminler, mineraller, karotenoidler, sisteinler, taurin, albümin, trehaloz, glutatyon bulunmaktadır (Bansal ve Bilaspuri, 2010). Enzimatik olmayan bu antioksidanlar, sentetik antioksidan ya da gıda takviyesi olarak alınan maddeler olarak da bilinmektedir (Bansal and Bilaspuri, 2011). Ayrıca görev aldıkları yerlere göre de intrasellüler (SOD, CAT, GPX, Sitokrom oksidaz), ekstrasellüler (Albümin, askorbik asit, ürat ve benzeri) ve membran antioksidanları (E vitamini, koenzim Q, β -Karoten ve benzeri) olarak da sınıflandırılmaktadırlar (Gutteridge, 1995).

6.2.1. Karnitinler

Epididimis, köpek seminal sıvısındaki ana karnitin kaynağıdır (Olson et al., 1987). Karnitin, yağ asitlerinin mitokondriyal zarlardan taşınmasında önemli rol oynar. Ayrıca, L karnitin ve asetilkarnitin, spermatozoaya enerji sağlanmada rol oynar. L-karnitin, mitokondriyal zarı stabilize eder, organellere enerji sağlar ve hücreleri apoptotik hücre ölümünden korur (Pillich et al., 2005).

6.2.2. E Vitamini

Vitamin E, hücre zarında bulunmaktadır. Hücre zarı lipidlerindeki yağ asitleri arasında reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu kovalent bağları kırabilen, lipofilik bir antioksidandır (Jeong et al., 2009). Alfa-tokoferol, E vitamininin lipidde çözünen ve lipid radikallerini nötralize eden antioksidan bileşiğidir. Ayrıca, reaktif oksijen türlerine ve lipid peroksidasyonuna karşı hücre membranlarını in vivo ve in vitro olarak oksidatif hasardan korumaktadır (Jeong et al., 2009; Sharma and Agarwal, 1996, Wu et al., 1990). E vitamini, memeli hayvanların (tavşan, at, sığır, yaban domuzu ve koç) sperma kalitesinin iyileştirilmesini sağlamak amacıyla sulandırıcılara eklenebilmektedir (Hatamoto et al., 2006).

6.2.3. C Vitamini

C Vitamini (Askorbik asit), oksijen radikallerini temizleme kapasitesi ve düşük toksisitesi ile yüksek potansiyele sahip suda çözünebilen bir antioksidandır (Niki,

1987). Söz konusu vitamin, DNA üzerindeki H₂O₂'nin meydana getirdiği hasarları nötralize ederek, aktif olmayan E vitaminini geri dönüştürmekte ve dolayısıyla lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır (Sierens et al., 2002). Sulandırıcıya askorbik asit ilave edilmesi ile çoğu memeli hayvan spermasında motilitenin indüklendiği, akrozom ve membran bütünlüğünün stabilizasyonu ve glutatyon artışına karşı GPX'in enzim seviyelerinde azalma sağlandığı bildirilmiştir (Hu et al., 2010).

6.2.4. L- sistein

L-sistein (L-Cys), yan zincirinde tiyol grubu içeren, düşük moleküler ağırlığa sahip, esansiyel olmayan bir amino asittir (Uysal ve Bucak, 2007). Hem in vitro hem de in vivo olarak hücre içi glutatyon biyosentezine katılmak için hücre zarına kolayca nüfuz ettiği bildirilmiştir. Serbest radikalleri uzaklaştırarak membran lipidlerini ve proteinleri korumakta; ayrıca bir membran stabilizatörü ve spermatozoon kapasitasyonu inhibitörü olarak görev yapmaktadır (Çoyan vd., 2011).

6.2.5. Ergotiyonin

Ergotiyonin, tekli oksijen gruplarının (Dahl et al., 1988) hidroksil ve peroksil radikallerini uzaklaştıran (Asmus et al., 1996), düşük molekül ağırlıklı önemli bir antioksidandır. Ergotiyoninin güçlü bir koruyucu özelliği bulunmakta ve diğer tiyol grubu bileşenlerine göre tekli oksijen molekülünü daha yüksek oranda deaktive ettiği bildirilmektedir (Heath et al., 1951; Han, 1992) Ayrıca kriyoprezervasyonda hidrojen peroksit oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Dahl et al., 1988; Hartman et al., 1990).

6.2.6. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5 metoksitriptamin), triptofanın bir türevidir. Işık seviyelerindeki değişikliklere tepki olarak gece boyunca epifiz bezi tarafından sentezlenmekte ve salgılanmaktadır (Panke et al., 1979). Melatonin, in vivo ve in vitro olarak çeşitli reaktif oksijen ve nitrojen türlerini uzaklaştırabilen güçlü bir enzimatik olmayan güçlü bir antioksidandır (Jang et al., 2010). Melatonin, serbest radikallerin hücrede meydana getirdiği zararlı etkileri azaltır. Hücre içi tüm bölümlerde makromolekülleri oksidatif hasardan korur. Melatonin, protein ve lipidlerin yanı sıra çekirdek DNA'sını ve mitokondriyel DNA'yı korumaktadır. Melatonin, hem bir serbest radikal önleyicisi olması hem de dolaylı bir antioksidan olarak her yerde faaliyet gösterebilmesi sayesinde çok geniş çaplı bir hücre koruyucusudur. Yapılan çalışma bulgularına göre melatonin; teke (Ramadan et al., 2009), sıçan (Sönmez et al., 2007), yaban domuzu (Jang et al., 2010), koç (Ashrafi et al., 2011) gibi türlerin sperma kalitelerini bahsedilen mekanizmalarda devreye girerek arttırmıştır.

6.2.7. Çinko

Çinko, enzimatik olmayan antioksidan özelliğe sahip önemli bir mineral maddedir. Antioksidan özelliği iki mekanizma ile açıklanmaktadır. İlk mekanizma, oksidasyona karşı sülfhidril gruplarının korunmasını sağlamasıdır. Sülfhidril durumu ile enzim aktivitesi arasında güçlü bir ilişki vardır. Çinkonun oksijen varlığında ve tiyol gruplarının yokluğunda enzim aktivitesini koruduğu bildirilmiştir. Ayrıca çinkonun koruyucu etkisinin, temel bir sülfhidril grubunu muhafaza etme özelliğine bağlı olduğu ve böylece molekül içi disülfür oluşumunu önlediği bildirilmiştir. Diğer mekanizması ise geçiş metalleri tarafından OH^- ve O_2 üretiminin önlenmesi ile ilgilidir (Bray and Bettger, 1990; Searle et al., 1982).

6.2.8. Selenyum

Selenyum, hücre iç yapılarını serbest radikallere karşı koruyan ve özellikle membran lipidleri için bir antioksidan olan glutatyon peroksidaz enziminin ayrılmaz bir parçasıdır. İnsanlar ve hayvanlar için temel iz elementtir. Doğal kaynaklarla alınan selenyum genellikle organik formda (selenometiyonin, metilselenosistein ya da γ -glutamilmetselenosistein) bulunmaktadır. Bununla birlikte, gıda takviyelerinde ve sperma sulandırıcısı olarak inorganik formdaki sodyum selenit (Na_2SeO_3) kullanılmaktadır (Davis et al., 2017; Zhang et al., 2006).

Selenyum, genellikle bir ko-faktör olarak görev yapan ve in vivo selenoproteinler adı verilen bazı enzimatik yapılarda bulunan temel bir mikro besindir (Sarkar et al., 2015; Zeliha vd., 2015). Selenyumun vücuttaki işlevlerini sağlayan selenoproteinler, antioksidanlar ve hücre membranlarının korunması dahil olmak üzere vücudun fizyolojik fonksiyonlarına katılır ve bu fonksiyonları düzenlerler (Muller et al., 2007). Selenyum, her ikisi de önemli biyolojik rollere sahip olan glutatyon peroksidaz ve tioredoksin redüktaz (TrxR) içindeki selenoprotein bileşenleri olarak görev yapmaktadır (Hill et al., 1996). Fizyolojik olarak glutatyon peroksidaz enziminin aktivasyonu ile serbest radikallerin detoksifiye edilmesini sağlayarak oksidatif strese karşı enzim görevi görmektedir. Glutatyon sentetazın kofaktörü olarak işlev sağlamaktadır (Ursini et al., 1999; Eid et al., 2006; Amidi et al., 2016; Sánchez-Gutiérrez et al., 2008). Selenyum, hayvanlarda üreme sisteminde görev alan temel bir antioksidandır (Leonhard-Marek, 2000; Surai et al., 2000; Barber et al., 2005; Dimitrov et al., 2007). Selenyum erkek fertilitasını doğrudan etkileyen oksidatif stresin etkilerinden spermatozoayı koruyan önemli bir mineral maddedir (Hill et al., 1996).

Selenyumun antioksidan madde olarak sperma sulandırıcısına ilave edilmesi ile

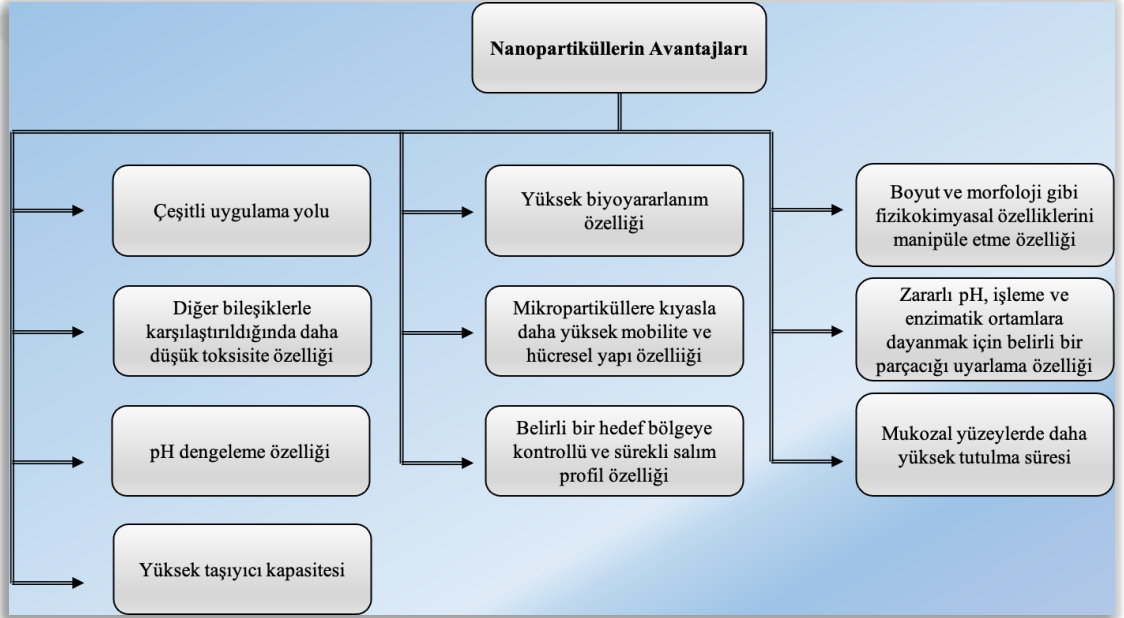
spermatozoada oksidatif stresin azaldığı, sperma kalitesinin ve fertilitenin arttığı bildirilmiştir. Ayrıca, anormal spermatozoa oranındaki artışın temel sebeplerinden bir tanesinin selenyum eksikliği olduğu bildirilmektedir (Horky et al., 2012; Li-Guang et al., 2010; Tareq et al., 2010). Köpek, koç, boğa, teke ve insan sperma sulandırıcısına selenyum ilavesi ile glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir (Li, 1975; Brown and Senger, 1977). Bu çalışmalarda elde edilen veriler ve sonuçlardan yola çıkılarak, selenyumun sperma sulandırıcısına katılmasının önemi bir kez daha anlaşılabilmektedir.

Selenyum eksikliği infertilite ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda eksikliğinde sıçan, fare, horoz, koç ve sığırlarda sperma kalitesinde düşme, takviyesinde ise üreme performansının artmasını sağladığı tespit edilmiştir (Segerson and Johnson, 1981; Kaur and Kaur, 2000; Marai et al., 2009; Edens and Sefton, 2009; Ahsan et al., 2014).

Selenyumun kullanımını sınırlayan faktörlerden biri biyoyararlanım seviyesi (kan dolaşımına ve dokulara giriş oranı) ve toksisitedir. Selenyumun aktivitesi ve toksisitesi arasında çok dar bir sınır vardır (Tarze et al., 2007; Lanctôt et al., 2017). Sperma sulandırıcısına yüksek miktarda selenyum ilavesi, toksikasyona sebep olarak sperma kalitesinde azalmayla ilişkilendirilmiştir (Combs and Combs, 1986; Baiomy et al., 2009; Chiachun et al., 1991; Sanders, 1984). Selenyumun yararlanımını kısıtlayıcı sebep olan toksisitesi nedeniyle daha az toksik ve daha faydalı olan diğer selenyum formlarının kullanılması daha uygun görülmüştür. Bu sebeple selenyum nanopartiküllerinin vücuttaki selenoproteinlerin üretimini arttırma potansiyeli, daha düşük toksisiteli bileşikler oluşu ve yüksek biyoyararlanım özellikleri nedeniyle kullanımı daha uygun bulunmuştur (Peng et al., 2007). Bu nedenle tez çalışmasında köpek sperma sulandırıcısına selenyumun daha etkili ve daha az toksik özellikte olan nanopartikül formunun ilavesi ile spermatolojik ve antioksidatif özelliğinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

7. NANOTEKNOLOJİ VE ÜRÜNLERİNİN SPERMATOLOJİK FONKSİYONLARDAKİ ROLÜ

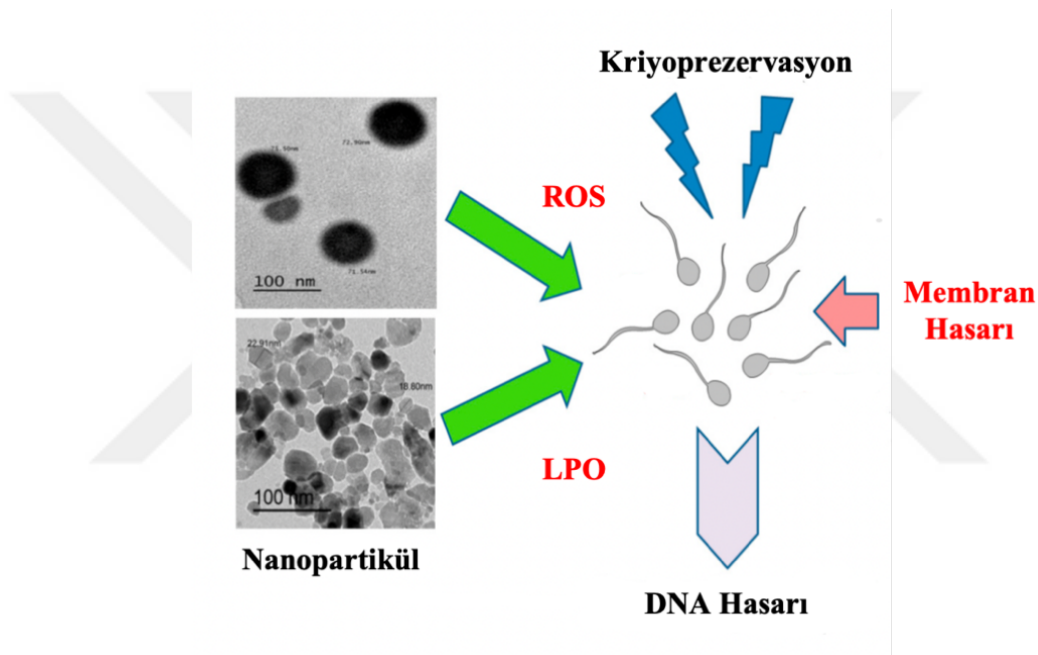
Nano; bir birimin milyarda birini gösteren ölçü değeridir. Nanoteknoloji ise nano ölçek üzerine herhangi bir teknolojiye uygulamlardır. Nanopartiküller (NP), nanometre ölçeklerinde son derece küçük boyutlarda sentezlenen, esnek fabrikasyon ve yüksek yüzey alanı oranına sahip olan partiküllerdir. Nanopartiküller, metaller, polisakkaritler ve proteinler gibi çeşitli malzemelerden yapılabilir. Nanoteknolojideki son gelişmeler ile tıp dahil olmak üzere birçok bilim dalında uygulama oranları büyük ölçüde genişlemiştir (Albanese et al., 2012). Nanopartiküllerin birçok farklı alan ile ilişkilendirilebilen temel avantajları Şekil 7.1’de gösterilmiştir.



Şekil 7.1. Nanopartiküllerin temel avantajları (Hosnedlova et al., 2018’den uyarlanmıştır)

Günümüz koşullarında hayvancılığın birçok alanında nanoteknolojiden yararlanılmaktadır. Nanoteknolojilerden sperm saflaştırma ve ayırma işlemlerinde, nanopartiküller ile işlevselleştirilmiş maddelerin sperm ile beraber taşınabilmesinde, nanopartiküllerin antimikrobiyel özelliği sayesinde genital enfeksiyonların tedavisinde, fertilité için biyomarker belirlenmesi gibi çok önemli alanlarda yararlanılmaktadır (Falchi et al., 2018b). Ayrıca yüksek antioksidan özellikleri sayesinde nanopartiküller kriyoprezervasyon protokollerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Nel et al., 2006). Nanopartiküller, çoğunlukla karşılık gelen metaller veya bitki özleri ile karşılaştırıldığında önemli etkilere sahip antioksidan madde olarak rol oynamaktadır (Saadeldin et al., 2020). Nanopartikül

teknolojilerindeki son gelişmeler, güçlü antioksidan, antiinflamatuvar ve antimikrobiyel özelliklere sahip birkaç nanopartikül formülasyonunun gelişmesiyle hız kazanmıştır (Kim et al., 2017; Stevanović et al., 2014). Bu geniş etki yelpazesi üreme fonksiyonlarının in vitro veya in vivo olarak iyileştirilmesi alanında da rol oynayabileceği fikrini ön plana çıkarmıştır (Barkalina et al., 2014). Nanopartiküllerin antioksidatif özelliklerine dayalı uygulamaları, sperm fonksiyonları ve özellikle erkek fertilitesi için oldukça önemlidir. Nanopartiküllerin, sperma kriyoprezervasyonu sonrasında oluşabilecek muhtemel hasarları azaltmadaki genel etkisi Şekil 7.2’de gösterilmiştir.



Şekil 7.2. Nanopartiküllerin, sperma kriyoprezervasyonu sonrasında oluşabilecek muhtemel hasarları azaltmadaki genel etkisi (Saadeldin et al., 2020’den uyarlanmıştır)

Nanopartiküllerin, spermanın kısa süreli saklanması ve kriyoprezervasyonu sırasında spermada meydana gelen oksidatif stresi azaltarak, spermatolojik parametreleri olumlu etkilediği ve fertilizasyon kapasitelerinde önemli bir artma sağladığı bildirilmiştir (Khalil et al., 2018). Erkek fertilitesi ve sperm fonksiyonları ile ilişkili olarak nano seryumdioksit partikülü (Falchi et al., 2018a), nano selenyum partikülü (SeNP) (Safa et al., 2016; Khalil et al., 2019; Shahin et al., 2020; Nateq et al., 2020), nano çinko partikülü (ZnNP) (Jahanbin et al., 2015; Shahin et al., 2020), nano lesitin (Nadri et al., 2019; Mousavi et al., 2019), nano altın partikülü (Ismail et al., 2020b), nano kurkumin (Abdelnour et al., 2020) ve kompleks nanopartiküller (Ismail et al., 2020a) çalışmalarda kullanılmıştır. Çeşitli nanopartiküllerin kullanıldığı

ve spermatolojik parametrelere etkilerinin yer verildiği güncel çalışmaların özeti Tablo 7.1’de sunulmuştur.

Tablo 7.1. Spermatolojik parametreler üzerine çeşitli nanopartiküllerin kullanıldığı çalışmalar

<i>Hayvan Türü</i>	<i>Nanopartikül Formu</i>	<i>Etkileri</i>	<i>Kaynakça</i>
Boğa	Nano Lesitin	Spermatozoon plazma membran bütünlüğünün korunması ve azalan Malondialdehit konsantrasyonu	(Mousavi et al., 2019)
Boğa	Nanopartikül Selenyum	Artan kinematik parametre değerleri, antioksidatif etki ve düşük apoptozis	(Khalil et al., 2019)
Boğa	Nanopartikül Çinko	Spermatozoon plazma membran bütünlüğünün korunması ve yüksek mitokondriyal fonksiyonlar	(Jahanbin et al., 2015)
Teke	Nano Lesitin	Artan motilite, canlılık ve hipo-ozmotik şişme testi pozitif oranı ve düşük apoptozis	(Nadri et al., 2019)
Teke	Nano Nane, Kekik ve Kurkumin Formülasyonları	Artan spermatozoon fonksiyonları (motilite, canlılık, plazma membran bütünlüğü), düşük apoptozis, antioksidatif etki	(Ismail et al., 2020a)
Teke	Nanopartikül Altın	Artan motilite, canlılık, plazma membran ve akrozom bütünlüğü, antioksidatif etki	(Ismail et al., 2020b)
Deve	Nanopartikül Selenyum Nanopartikül Çinko	Artan spermatozoon fonksiyonları (motilite, canlılık, plazma membran bütünlüğü), düşük anormal spermatozoon oranı, düşük apoptozis, antioksidatif etki	(Shahin et al., 2020)
Tavşan	Nanopartikül Kurkumin	Artan motilite, düşük apoptozis ve antioksidatif etki	(Abdelnour et al., 2020)
Koç	Nanopartikül Selenyum	Artan spermatozoon fonksiyonları (motilite, canlılık, plazma membran bütünlüğü), düşük anormal spermatozoon oranı, antioksidatif etki	(Nateq et al., 2020)
Koç	Nanopartikül Seryumdioksit	Artan motilite ve plazma membran bütünlüğü	(Falchi et al., 2018a)
Horoz	Nanopartikül Selenyum	Artan spermatozoon fonksiyonları (motilite, canlılık, plazma membran bütünlüğü), antioksidatif etki	(Safa et al., 2016)

8. MATERYAL VE YÖNTEM

8.1. Materyal

Sunulan doktora tez çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yürütüldü. Bu çalışmadaki hayvanlar Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Kliniğine suni tohumlama amacıyla getirilen genel muayenesi ve androlojik muayenesi yapıldıktan sonra herhangi bir sağlık sorunu bulunmayan, farklı ırklardan, 2-5 yaş arasındaki erkek köpekler sahiplerinin onayı alınarak kullanılmıştır.

Bu çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 10/06/2019 tarihli ve 68489742-604.01.03-E.12335 sayılı kararı ile HADYEK'in yönetmeliği gereği "Sahipli Hayvan Onayı" ile çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik açıdan bir sorun olmayacağı yönündeki kurul kararının tarafımıza bildirilmesinden sonra gerçekleştirilmiştir.

8.2. Yöntem

8.2.1. Spermanın Alınması ve Değerlendirilmesi

Sperma alınmasından önce erkek damızlığın herhangi dikkat dağıtıcı veya endişe oluşturacak etkenlerden etkilenmemesi için olumsuzluklar minimum hale getirilmiştir. Çünkü korku veya merak durumunda, dikkat ve konsantrasyon dağılımına bağlı olarak peniste tam bir ereksiyon oluşmayacağı için sperma alma işlemi gerçekleşmeyebilmektedir. Çalışmada köpeklerden sperma alma işlemi en sık olarak kullanılan ve ağrı, acı durumu yaratmayan "elle (digital) masaj" yöntemiyle yapıldı. Sağ tarafından yaklaşılan köpeğin prepusyumunu üzerinden penise ve özellikle bulbus glandise masaj yapılarak bulbus glandis şişmeye başladığında prepusyum geri çekilmiştir. Penis, prepusyumdan çıkarıldıktan sonra bulbus glandis köküne masaja devam edilerek, penis arka bacaklar arasından geriye çevrilerek steril sperma toplama kadehi içerisine sperma alındı. Köpeklerde sperma 3 fraksiyondan oluşmaktadır (ön sekret, sperma ve son sekret) ve sadece ikinci fraksiyon (sperma fraksiyonu) toplama kadehine alınmıştır. Birinci ve üçüncü fraksiyonlar köpeklerde eklenti bezleri salgısından ibarettir ve çoğunlukla spermatozoon ihtiva etmez. Spermatozoon bakımından zengin fraksiyon olarak da adlandırılan ikinci fraksiyon ise epididimisten köken alır ve spermatozoonları içermektedir. Çalışmada toplam altı erkek köpek kullanıldı. Herbir köpekten farklı zaman aralıklarında, haftada 1 kez olacak şekilde 3

ejakülat toplandı. Alınan ejakülatlar bilgisayar destekli sperma analiz cihazı (CASA) ile değerlendirilerek uygun özellik (*sperma yoğunluğu* $\geq 300 \times 10^6$ *spermatozoa/ml*; *motilite* $\geq \%80$; *canlılık* $\geq \%80$; *normal morfoloji* $\geq \%80$) gösterenler spermanın sulandırılması ve dondurulması işleminde kullanıldı. Toplamda altı erkek köpekten toplanan 18 ejakülat çalışma gruplarını tasarlamak için 5 eşit parçaya bölündü.

8.2.2. Spermanın Sulandırılması

Köpek spermasının dondurulmasında, en yaygın olarak yumurta sarısı ve gliserol ile takviye edilmiş Tris bazlı sulandırıcı kullanılmaktadır. Yapılan doktora tez çalışmasında da spermaların sulandırılması amacıyla Tris bazlı sulandırıcı kullanılmıştır (Ponglowhapan et al., 2004; Forsberg, 2014). Bu sulandırıcı sperma alma işlemi yapılan günlerde, sperma alma işlemleri başlamadan önce taze olarak hazırlandı ve kullanım zamanına kadar 37°C derecelik su banyosunda tutuldu. Köpeklerden alınan ejakülatlar 37°C derecede bulunan su banyosuna alınarak yoğunluğu ml'de yaklaşık 300×10^6 olacak şekilde Tris bazlı sulandırıcı ile sulandırılma işlemi yapıldı. Tris bazlı sulandırıcının çalışma gruplarına göre formülasyonu Tablo 8.1'de sunulmuştur. Bu işlemten sonra sulandırılmış spermanın ekilibrasyon işlemine geçilmiştir.

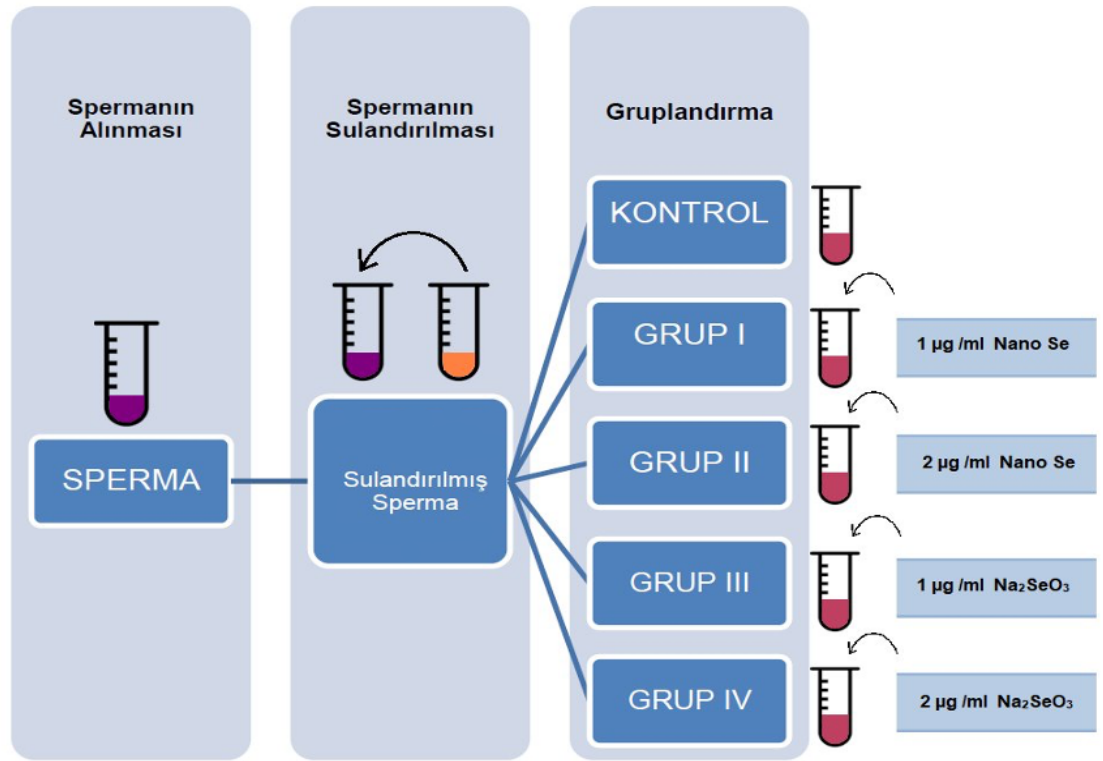
Tablo 8.1. Tris bazlı sulandırıcının çalışma gruplarına göre formülasyonu (Ponglowhapan et al., 2004; Forsberg, 2014)

İçindekiler	Kontrol Grubu	Grup I (SeNP1)	Grup II (SeNP2)	Grup III (SS1)	Grup IV (SS2)
Tris	3,025 g	3,025 g	3,025 g	3,025 g	3,025 g
Sitrik Asit	1,7 g	1,7 g	1,7 g	1,7 g	1,7 g
D-Fruktoz	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g
Gentamisin	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Yumurta Sarısı	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml
Gliserol	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Nanopartikül Selenyum	-	100 µg	200 µg	-	-
Sodyum Selenit	-	-	-	100 µg	200 µg
Distile Su	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

8.2.3. Spermaya Ekilibrasyon Uygulaması

Çalışmamızın temelini oluşturan antioksidan madde olarak Nanopartikül Selenyum, (Nanocs®) (1 µg/ml sulandırıcı, 2 µg/ml sulandırıcı) ve Sodyum Selenit

(Sigma®) (1 µg/ml sulandırıcı, 2 µg/ml sulandırıcı) belirtilen miktarlarda temel Tris bazlı sulandırıcıya eklenerek çalışma grupları oluşturulmuştur. Çalışma gruplarını oluşturan selenyum formlarında yapılan dozlamaların seçimi köpek spermasında yapılmış bir çalışma bulunmadığı için farklı türlerde yapılmış önceki çalışmalarda kullanılan ve etkili doz olarak bildirilen doz aralıklarından yola çıkılarak kararlaştırılmıştır (Seremak et al., 1999; Dorostkar et al., 2012; Khalil et al., 2019; Nateq et al., 2020). Ayrıca tez çalışması öncesinde yapılan ön çalışmalarda belirlenen dozların spermatolojik parametrelere etkisi değerlendirilerek köpek sperması üzerine olumsuz etkisi gözlenmemiş olan dozlar çalışmaya dahil edilmiştir. Spermanın sulandırılması ve gruplandırılması Şekil 8.1’de sunulmuştur. Sulandırma işlemi yapılmış olan sperma numuneleri, en az 1 saat süre +4°’de ekilibrasyona bırakılmıştır.



Şekil 8.1. Spermanın sulandırılması ve gruplandırılması

8.3. Spermanın Dondurulması ve Saklanması

Ekilibrasyon işlemi tamamlanmış olan sulandırılmış spermalar payet yöntemine göre sıvı azot buharında dondurulmuştur. Dondurma işlemine başlamadan önce strafor bir kutunun içine sıvı azot doldurulmuş ve sıvı azot yüzeyinin yaklaşık 5-6 cm üzerine payet dondurma rafı yerleştirildikten sonra strafor üzeri bir kapakla kapatıldı. Daha sonra işleme hazır sperma numuneleri 0,25 ml’lik polivinilklorid (PVC) payetlerin açık olan uçlarına bir enjektör yardımıyla 0,25 ml sperma çekildi ve daha sonra açık

olan payet uçları da payet kapama cihazı ile kapatıldı. Ardından, önceden hazırlanan sıvı azot seviyesinin 5-6 cm üzerinde bulunan özel payet dondurma rafları üzerine payetler bir pens aracılığı ile üst üste gelmeyecek şekilde (payet iç ısını korumak ve sıvı azot etkili ısıdan maksimum düzeyde faydalanmak için) aralıklı olarak dizildi. Payetler yaklaşık olarak -90 ile -110°C aralığında bulunan sıvı azot buharında 7 dakika süre ile bekletilerek donduruldu. Bu süre sonunda payetler bir pensle strafor içinde bulunan -196°C’de sıvı azotun içine daldırılarak 30 dakika bekletildi. Daha sonra payetler pensle alınarak sıvı azot tankında bulunan ve her köpek için ayrı ayrı numaralandırılan kanisterlerdeki gobletlerin içerisine konularak -196°C derecede muhafazaya alındı.

8.4. Spermanın Değerlendirilmesi

Çalışmada 6 köpekten 3’er kez toplanan ejakülatların her biri 5 farklı çalışma grubuna ayrılarak toplam 90 sperma numunesi dondurma ve çözündürme sonrası spermanın motilite, yoğunluk, canlılık, plazma membran bütünlüğü, morfoloji, pH değeri, antioksidan profili ve DNA fragmentasyonu değerlendirilmiştir. Bu işlemler en az 24 saat sıvı azotta bekletilen 0,25 ml’lik payetlerin, 37°C derecedeki su banyosunda 30 saniyede çözündürülmesiyle gerçekleştirilmiştir.

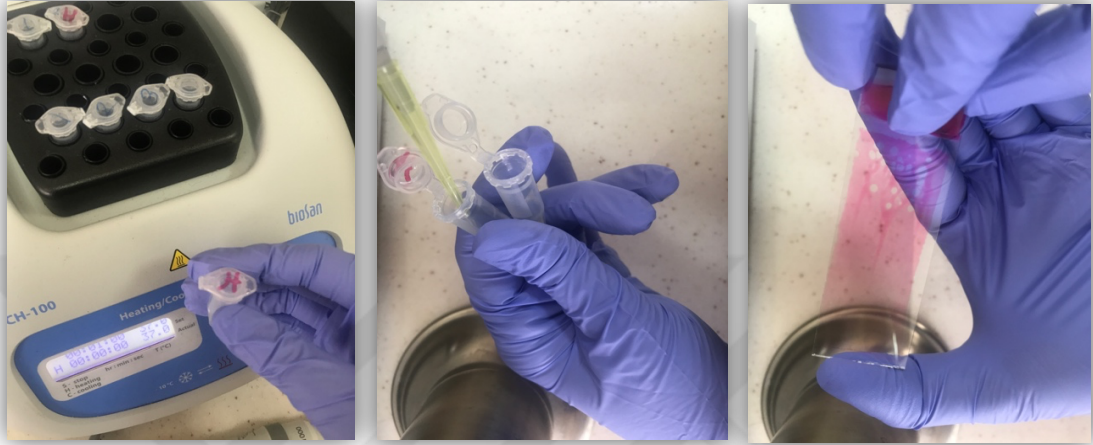
8.4.1. Spermatozoa Motilitesi ve Yoğunluğunun Değerlendirilmesi

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

8.4.2. Hipo-Ozmotik Eosin Boyama Testi

Spermatozoon plazma membran bütünlüğünün ve ölü-canlı spermatozoon oranının tespiti için Hipo-Ozmotik Eosin boyama testi olarak adlandırılan “HE-test” kullanılmıştır. 37°C derecede bulunan HOST (Hypo-Osmotic Swelling Test) solüsyonundan 1 ml alınarak eppendorf tüp içerisine konuldu. HOST solüsyonunun

üzerine ise sperma numunesinden 100 µl eklendikten sonra Eosin boyası ilave edilerek karışım 37°C derecede bulunan su banyosunda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından lam üzerine karışımdan 1 damla damlatılarak froti çekildi. Lam 45 derecelik bir açıda kurumaya bırakıldı ve ardından 40x objektifte 400 spermatozoon sayıldı. Doktora tez çalışmasında kullanmış olduğumuz HE-testinin hazırlama aşaması Şekil 8.2’de gösterilmiştir.



Şekil 8.2. HE-testinin hazırlama aşaması

HE-testinde, spermatozoonlar baş kısmının tamamının ya da bir bölümünün boya alıp almayışına ve kuyruktaki kıvrılma (coiling) veya spermatozoon baş kısmında şişme olup olmayışına (swelling) göre dört tipte sınıflandırılmıştır. Çalışmada HE-test ile spermatozoon membran bütünlüğünün ve ölü-canlı oranının değerlendirilmiş olduğu görseller Şekil 8.3’de sunulmuştur.

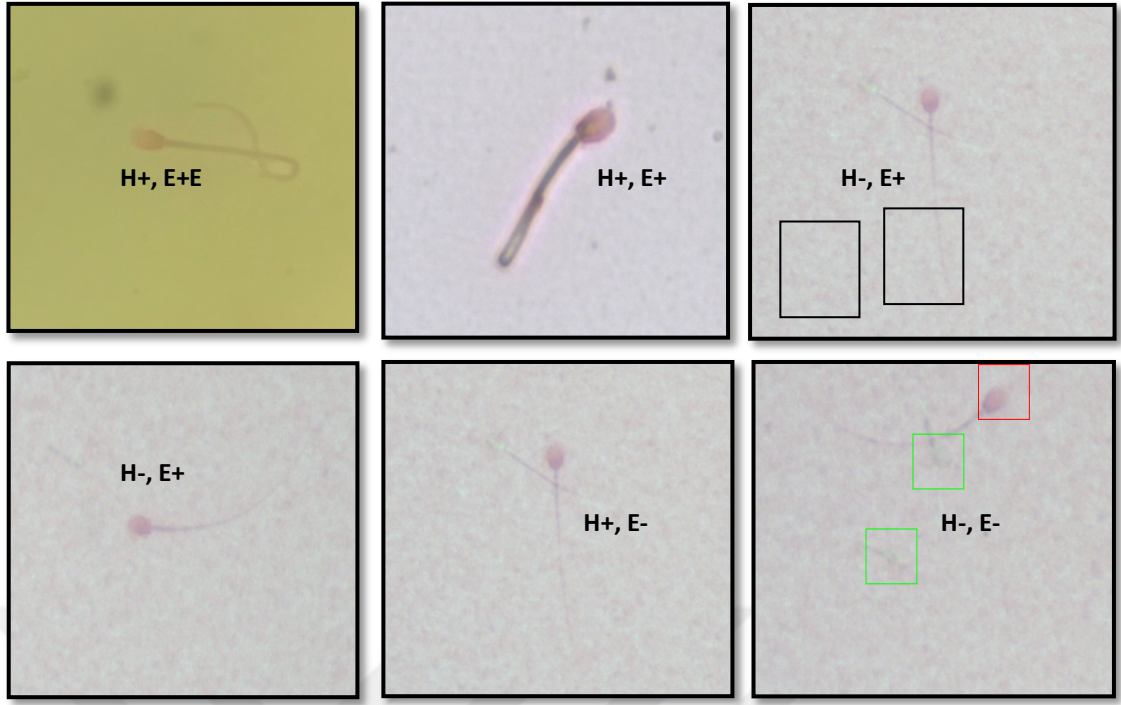
HE-testinde spermatozoonların sınıflandırılması;

Tip I. *kuyruk şişmiş, spermatozoon baş kısmı boya almamış (H+/E-),*

Tip II. *kuyruk şişmemiş, spermatozoon baş kısmı boya almamış (H-/E-),*

Tip III. *kuyruk şişmiş, spermatozoon baş kısmı boya almış (H+/E+) ve*

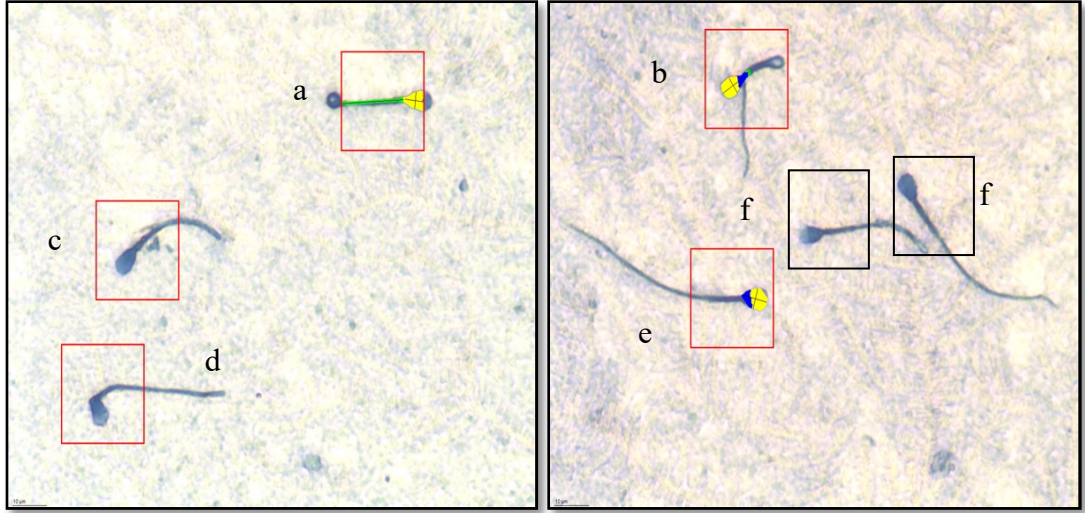
Tip IV. *kuyruk şişmemiş, spermatozoon baş kısmı boya almış (H-/E+) şeklinde yapılmıştır.*



Şekil 8.3. Spermatozoonlarda HE-test ile spermatozoon membran bütünlüğünün ve ölü-canlı oranının belirlenmesi

8.4.3. Morfolojik Muayene

Spermatozoonların morfolojisi bilgisayar destekli sperma analiz cihazı (SCA[®], Microptic, Barcelona, Spain) kullanılarak değerlendirilmiştir. CASA sisteminde 40x objektifte, mavi filtrede bulundurulmuş mikroskop (Nikon, Eclipse, Tokyo, Japan) ve SpermBlue[®] kiti (Microptic, Spain) ile morfolojik değerlendirme yapıldı (Van der Horst and Maree, 2010). Sperma numunesinden 10 µl alınarak özel lam üzerine froti çekildi ve 45 derecelik bir açıda kurutmaya bırakıldı. Kuruma meydana geldikten sonra lam içerisinde SpermBlue boyası bulunan jara daldırıldı. Lam 2 dakika süresince boya içerisinde tutuldu. Daha sonra lam 60-80 derece diklikte kurumaya bırakıldı. Kurutma işlemi sonrasında içerisinde distile su bulunan jarda yavaşça 2 kez batırılıp çıkarıldı ve lamın kuruması beklendi. Boyama işlemi sonrası CASA sisteminin yazılımında morfoloji modülü seçilerek en az 100 spermatozoon üzerinde değerlendirmeler yapıldı. Sistemde akrozom, baş, orta kısım ve kuyruk anormallikleri yüzde (%) olarak değerlendirildi ve kaydedildi. Tez çalışmasında Spermblue[®] kiti le CASA sisteminde değerlendirmeleri yapılan spermatozoon görselleri Şekil 8.4’de sunulmuştur.



Şekil 8.4. Spermblyue® kiti ile spermatozoonlarda morfolojik muayene
a, b: kıvrık kuyruk c: kopuk kuyruk d: boyun kırığı e: yuvarlak baş f: normal spermatozoon

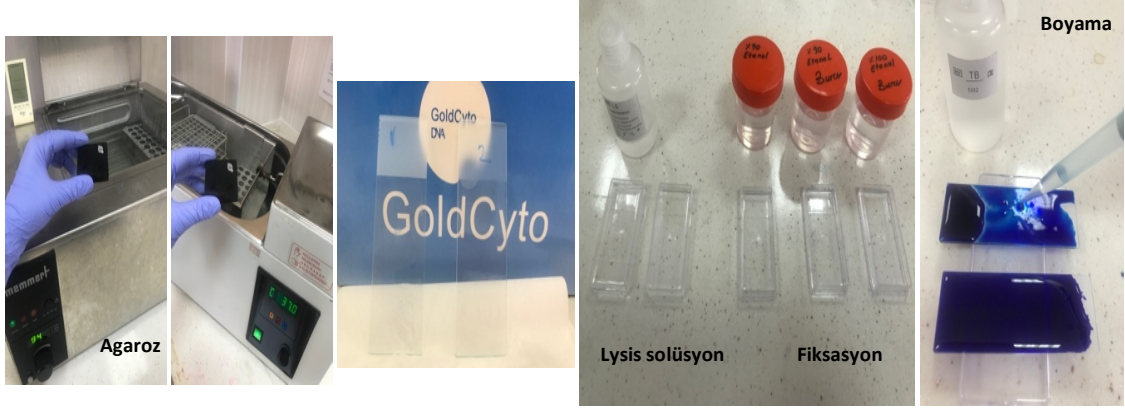
8.4.4. Spermanın pH Değeri

Spermanın pH değeri ölçümü için pH metre cihazı kullanıldı. Öncesinde kalibrasyonu yapılmış olan cihazın probu numune içerisine daldırıldı ve cihazda okunan değer kaydedildi.

8.4.5. Sperm Kromatin Dispersiyon Testi (SCD)

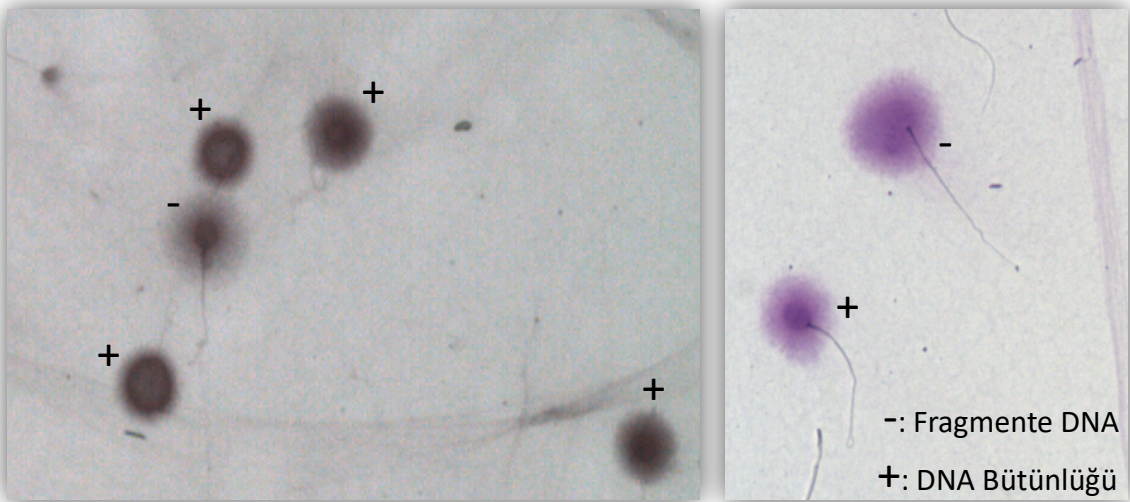
DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi “Sperm Kromatin Dispersiyon Testi” (SCD) uygulaması için GoldCyto Sperm Kit® (Microptic, Spain) kullanılmıştır. Sperma numunesi kitin çalışma prosedürüne uygun olarak işlenmiştir. Buna göre; değerlendirilen sperma numunesi mililitresinde 5-10 milyon yoğunlukta spermatozoon olacak şekilde fosfat buffer solüsyon (PBS) içerisinde seyreltilti. Kit içeriğinde bulunan agaroz 5-10 dakika 90-100°C derecede erimeye bırakıldı. Agaroz bulunan eppendorf tüpler yüzdürme ile 37°C derecede tutulan su banyosunda 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Tüp içerisine 30 µl sperma bırakılarak karıştırıldı. Daha sonra özel lamlara 20 µl agarozla işlem görmüş sperma bırakılarak lamelle kapatıldı. Lamalar 5 dakika 4°C derecedeki buzdolabına konuldu. İşlem bittikten sonra lam üzerindeki lamel yavaşça alınarak yatay bir konumda 10 ml lizis çözeltisi içeren bir jara daldırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Sonraki aşamada fikzasyon için lam sırasıyla %70 etanol (2 dakika), ardından %90 etanol (2 dakika) ve son olarak %100 etanolden (2 dakika) geçirildi. Daha sonra oda sıcaklığında lamın kuruması beklenerek son aşamada boyama solüsyonları ile lam önce Fluorochrome ve Diff Quick boyamalar yapılarak kurumaya bırakıldı. Doktora tez çalışmasında sperm kromatin dispersiyon testi için kullanılan GoldCyto Sperm Kiti® ile yapılan işlemlerin

diyagramı Şekil 8.5’de gösterilmiştir. Lam, bilgisayar destekli sperma analiz cihazında (SCA®, Microptic, Barcelona, Spain) DNA fragmentasyonu modülü seçildikten sonra, 20x objektifte, yeşil filtre altında değerlendirildi.



Şekil 8.5. Sperm Kromatin Dispersiyon testi için GoldCyto Sperm Kiti® ile yapılan işlemlerin diyagramı

Değerlendirmeler spermatozoonların baş bölgesinin etrafında bulunan “*halo görüntüsü*” oluşumlarına göre yapıldı. Spermatozoonlarda halo görüntüsünün oluşumu DNA fragmentasyonu, halo oluşmaması veya çok küçük halo görüntüsü oluşması DNA bütünlüğü olarak değerlendirildi. Doktora tez çalışmamızda elde ettiğimiz DNA fragmentasyonuna ait görseller Şekil 8.6’da sunulmuştur.



Şekil 8.6. DNA fragmentasyonu

8.5. Antioksidan Profilin Değerlendirilmesi

Glutasyon peroksidaz (GPX), Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Lipid Peroksidasyon (LPO) kitleri kullanılarak spermaların antioksidan profilindeki değişimleri ölçüldü ve değerlendirildi. Bu işlem için sperma payetleri 37°C’de

(Streptavidin-HRP) konjugatın uygun dilüsyonundan pleytin çukurlarına konarak inkübasyonu sağlandı. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış Streptavidin-HRP konjugatının yıkama solusyonu ile uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama sonrasında immüno-komplekse bağlı konjugattaki HRP için substrat solusyonu ilave edilerek reaksiyonun gelişimi sağlandı, bu esnada SOD miktarı ile orantılı olarak renk gelişimi gözlemlendi. Reaksiyon, asidik durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sona erdirildi ve absorbans, 450 nm'de ölçüldü. Sonuçlar 0,5-200 ng/ml standart aralığında ($R^2 > 0,90$ olacak şekilde) belirlenerek değerlendirildi.

8.5.3. Katalaz (CAT) Aktivitesi

Katalaz kiti (Bioassay Technology Laboratory®) ile sandviç ELISA yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Kullanılan kitin prensibine göre aşağıda açıklanan aşamalar sırasıyla gerçekleştirildi. Kullanılan kitte, pleyt primer köpek CAT antikoru ile önceden kaplıdır. Bu işlemde, CAT tespiti yapılacak numune (analit), kuyucuklara 1-300 ng/ml konsantrasyonunda ilave edilerek analitin kaplanmış primer antikorlara bağlanması sağlandı. Ardından biyotin ile işaretli köpek CAT sekonder antikoru ilave edilerek antikorun CAT'a bağlanması sağlandı. Oluşan immüno-kompleksin tespiti için biyotine affinitesi olan streptavidin ile konjuge (Streptavidin-HRP) konjugatın uygun dilüsyonundan pleytin çukurlarına konarak inkübasyonu sağlandı. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış Streptavidin-HRP konjugatının yıkama solusyonu ile uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama sonrasında immüno-komplekse bağlı konjugattaki HRP için substrat solusyonu ilave edilerek reaksiyonun gelişimi sağlandı, bu esnada CAT miktarı ile orantılı olarak renk gelişimi gözlemlendi. Reaksiyon, asidik durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sona erdirildi ve absorbans, 450 nm'de ölçüldü. Sonuçlar 1-300 ng/ml standart aralığında ($R^2 > 0,90$ olacak şekilde) belirlenerek değerlendirildi.

8.5.4. Lipit Peroksidasyonun Değerlendirilmesi

Malondialdehit (MDA) ELISA kiti (Bioassay Technology Laboratory®) ile sandviç ELISA yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Kullanılan kitin prensibine göre aşağıda açıklanan aşamalar sırasıyla gerçekleştirildi. Kullanılan kitte, pleyt primer köpek MDA antikoru ile önceden kaplıdır. Bu işlemde, MDA tespiti yapılacak numune (analit), kuyucuklara 0,1-38 nmol/ml konsantrasyonunda ilave edilerek analitin kaplanmış primer antikorlara bağlanması sağlandı. Ardından biyotin ile işaretli köpek MDA sekonder antikoru ilave edilerek MDA'a bağlanması sağlandı. Oluşan immüno-kompleksin tespiti için biyotine affinitesi olan streptavidin ile konjuge (Streptavidin-HRP) konjugatın uygun dilüsyonundan pleytin çukurlarına konarak

inkübasyonu sağlandı. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış Streptavidin-HRP konjugatının yıkama solusyonu ile uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama sonrasında immükomplekse bağlı konjugattaki HRP için substrat solusyonu ilave edilerek reaksiyonun gelişimi sağlandı, bu esnada MDA miktarı ile orantılı olarak renk gelişimi gözlemlendi. Reaksiyon, asidik durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sona erdirildi ve absorbans, 450 nm'de ölçüldü. Sonuçlar 0,1-38 nmol/ml standart aralığında ($R^2 > 0,90$ olacak şekilde) belirlendi. MDA değerleri nmol/ml olarak kaydedildi.

8.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmada biri kontrol grubu olmak üzere, 2 farklı dozlarda uygulanacak olan Nanopartikül Selenyum ve Sodyum Selenitin köpek sperma sulandırıcısına etkisinin araştırıldığı 5 çalışma grubu yer almıştır. Bu amaçla grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi ve Kolmogorov Smirnov non-parametrik yöntemlerden yararlanılmıştır. Ayrıca çalışmada ölçülen parametrelerin grup içi ve gruplararası değerlerin özetlenmesi amacıyla tanıtıcı istatistikleri hesaplanmıştır. Çalışmada uygulanan istatistiksel testler, karşılaştırmalar ve tüm hesaplamalar için SAS (2014) istatistik paket programından yararlanıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda, istatistiksel analizde P değerinin < 0.05 düzeyde olması önemli kabul edildi.

9. BULGULAR VE TARTIŞMA

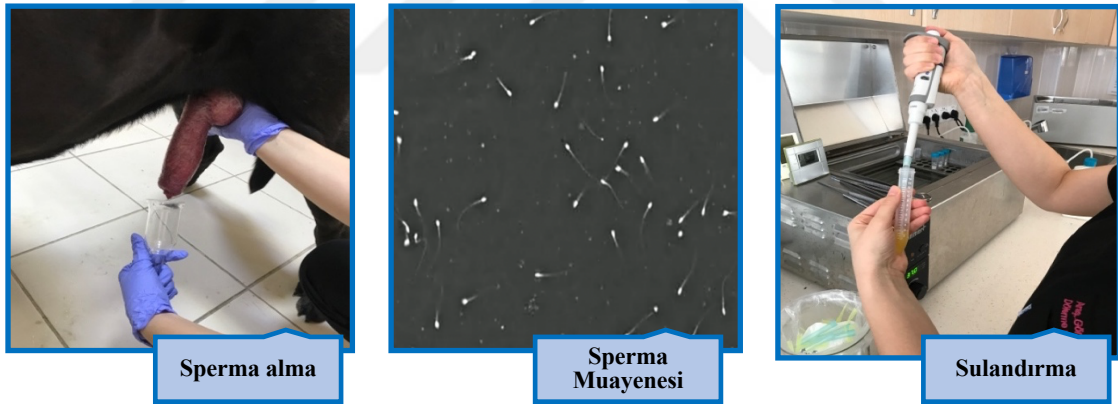
Reprodüktif biyoteknoloji yöntemlerinin en yaygın olarak kullanılan teknolojilerinden biri olan suni tohumlama programlarındaki yüksek başarıya ulaşma, özellikle kriyoprezervasyon işleminden olumsuz etkilenen spermatozoa motilitesi ve fertilitésinin korunmasıyla sağlanabilir. Spermanın fertil kabiliyetini koruyabilecek şekilde en az hasarla dondurulması, suni tohumlama uygulamalarının daha ekonomik ve hızlı şekilde yapılmasını sağlayacaktır. Spermanın dondurulması işlemi spermatozoada fiziksel ve biyokimyasal birçok değişikliğe sebep olmaktadır (Chatterjee and Gagnon, 2001). Soğutma ve dondurulma işlemleri sırasında spermatozoada soğuk şoku, oksidatif stres gibi birçok hasar oluşmakta ve bu hasarlar spermatozoanın fertilité potansiyelinde azalmaya neden olmaktadır (Bilodeau et al., 2001; Khalil et al., 2019). Spermanın dondurulması sırasında oluşan ve geriye dönüşümsüz olarak hücre hasarına neden olan fiziksel ve biyokimyasal değişimler, ilgili araştırmacıları optimum koşulları oluşturmaya yöneltmiştir. Kriyoprezervasyon sonrası spermanın kalite özelliklerinin korunması doğrudan fertilitenin korunması ile ilişkilidir ve sperma sulandırıcısına ekzojen olarak antioksidan maddeler eklenerek bu parametreye katkı sağlanabilir (Neild et al., 2005; Partyka et al., 2012).

Sunulan bu doktora tez çalışmasında, köpek spermasının dondurulma işlemi sırasında oluşan ve spermatozoon DNA hasarına sebep olan oksidatif stresin engellenmesi üzerine antioksidan etkileri bildirilmiş ve güncel bir teknoloji ürünü olan nanopartikül selenyum ve sodyum selenitin köpek sperması üzerine protektif etkilerinin araştırılmasını amaçlamıştır. Çalışmamızda, 6 farklı köpekten farklı zamanlarda elde edilen 3'er ejakülat şeklinde toplanan 18 sperma numunesi spermatolojik muayeneden geçirildi ve daha sonra biri kontrol olmak üzere, 1 ve 2 µg/ml SeNP, 1 ve 2 µg/ml SS eklenerek hazırlanmış olan Tris bazlı temel sulandırıcı ile 5 farklı çalışma grubu oluşturularak sulandırıldı ve donduruldu. Toplam 90 sperma numunesinin çözüm sonrasında total spermatozoa motilitesi ve progresif motilité (%), yoğunluk, kinematik parametreler, canlılık (%), plazma membran bütünlüğü (%), anormal akrozom oranı (%), morfoloji, DNA fragmentasyonu (%) ve antioksidan profili yönlerinden değerlendirildi. Daha önce yapılan araştırmalarda, özellikle köpek sperması üzerine SeNP ve SS'in etkileri ortaya konulmamıştır. Bu nedenle çalışmamızın bulguları bu antioksidan maddelerin farklı hayvan türlerinin spermaları üzerine elde edilen güncel verileri ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızın başlangıç aşamasında, laboratuvar şartlarının kontrolü, deney protokollerinin optimizasyonu ve el becerisinin kazanılması amacıyla köpeklerden sperma alınması, spermanın CASA ve subjektif metotlarla değerlendirmesi, SeNP ve SS'nin etkin dozlarının belirlenmesi, sulandırma ve dondurma prosedürlerinin optimizasyonu aşamalarını içeren ön çalışmalar yapılmıştır. Bu konuda çalışma yapan tüm laboratuvarlarda olduğu gibi bizim laboratuvarımızda da şartlara en uygun sulandırma oranları ve dondurma sisteminin belirlenmesi tez çalışmasının ilk dönemini oluşturmuştur. Bu dönemde aynı zamanda konuyla ilgili olarak tecrübe eksikliği de giderilmiştir.

9.1. Taze Spermanın Spermatolojik Parametreleri

Çalışmada yer alan köpeklerden sperma alma işlemi “elle (digital) masaj” yöntemiyle yapıldı. Toplam 6 köpekten 3'er kez ejakülat alındı. Alınan ejakülatlar CASA ile değerlendirilerek uygun özellik (*sperma yoğunluğu* $\geq 300 \times 10^6$ *spermatozoa/ml*; *motilite* $\geq \%80$; *canlılık* $\geq \%80$; *normal morfoloji* $\geq \%80$) gösterenler spermanın sulandırma işleminde kullanıldı. Taze spermanın toplanması ve değerlendirilmesini gösteren diyagram Şekil 9.1'de gösterilmiştir.



Şekil 9.1. Taze spermanın toplanması ve değerlendirilmesi diyagramı

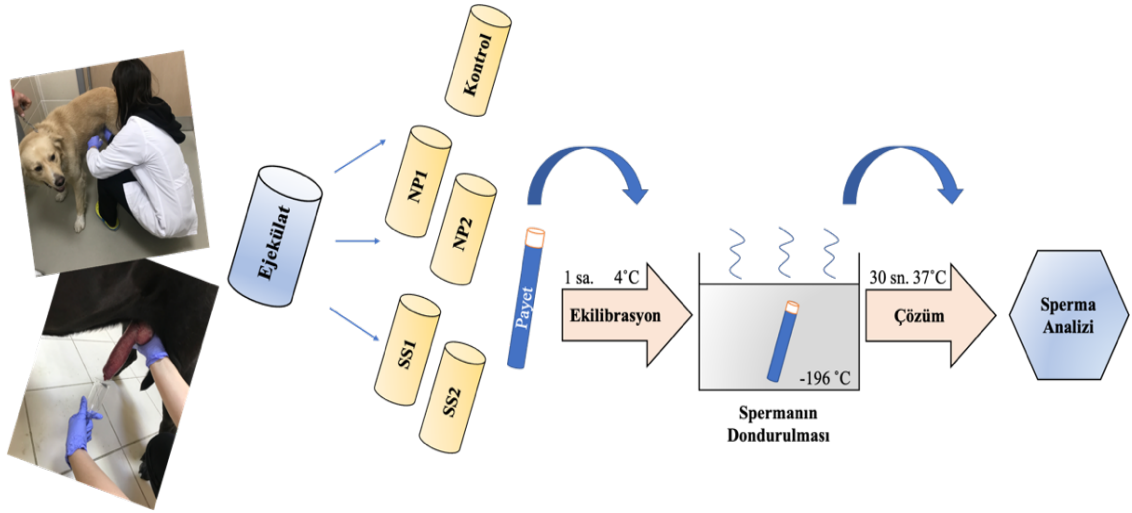
Sahipli 6 köpekten 3'er kez toplanan taze spermaların miktar, sulandırma oranı, yoğunluk, motilite ve progresif motilite değerleri Tablo 9.1'de sunulmuştur. Taze spermalara ait ortalama canlılık $\geq \%80$, normal morfoloji $\geq \%80$ ve pH değeri ise 6,7 olarak bulunmuştur.

Tablo 9.1. Çalışma gruplarını oluşturan taze spermaların miktar, sulandırma oranı, yoğunluk, motilite ve progresif motilite değerleri

Köpek	Ejekülat	Miktar (ml)	Sulandırma Oranı	Yoğunluk (x10 ⁶ spp/ml)	Motilite (%)	Progresif Motilite (%)
1	1	2,5	1:3	160,43	97,61	82,71
	2	1,5	1:3	129,35	93,85	84,19
	3	1,5	1:3	107,46	97,51	91,28
2	1	1,5	1:4	272,76	96,63	74,12
	2	1	1:4	187,40	94,96	81,46
	3	1	1:3	302,69	98,89	85,04
3	1	2,5	1:3	258,99	98,43	72,33
	2	3,5	1:3	146,20	92,72	86,38
	3	3	1:3	198,51	94,92	78,20
4	1	1	1:3	171,93	90,73	73,83
	2	1,5	1:2	175,64	80,39	55,56
	3	1,5	1:5	275,44	95,50	87,34
5	1	1,5	1:3	167,21	95,33	78,25
	2	1,5	1:3	129,57	96,20	86,02
	3	1,5	1:3	139,20	86,112	67,99
6	1	1,5	1:5	254,43	93,27	73,21
	2	1	1:3	151,46	90,44	52,56
	3	1	1:4	171,14	96,12	85,25

9.2. Çalışma Gruplarının Çözüm Sonrası Spermatolojik Parametreleri

Çalışmada, 6 köpeğin 3 farklı zamanda elde edilen ejakülatları toplanarak dondurulan ve 5 farklı çalışma grubu için toplamda 90 sperma payeti, 37°C'lik su banyosunda 30 saniyede çözdürüldükten sonra, tüm gruplarda spermatolojik parametrelerden; total spermatozoa motilitesi ve progresif motilite (%), kinematik parametreler, canlılık (%), plazma membran bütünlüğü (%), anormal akrozom oranı (%), morfoloji, DNA fragmentasyonu (%) ve antioksidan profili yönünden değerlendirildi. Çalışma basamaklarının diyagramı Şekil 9.2'de gösterilmiştir.



Şekil 9.2. Çalışma basamaklarının diyagramı

9.2.1. Motilite, Progresif Motilite ve Kinematik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Çalışma gruplarındaki çözüm sonrası total spermatozoa motilitesi, progresif motilite ve kinematik değerlerin ortalama değerleri Tablo 9.2’de sunulmuştur.

Tablo 9.2. Çalışma gruplarındaki, çözüm sonrası spermatozoa motilite, progresif motilite ve kinematik parametrelerin ortalama değerleri

Parametre	Kontrol	Nanopartikül Selenyum (1 µg/ml)	Nanopartikül Selenyum (2 µg/ml)	Sodyum Selenit (1 µg/ml)	Sodyum Selenit (2 µg/ml)
Motilite (%)	51,43±3,98*	57,71±3,98*	55,42±4,38*	52,54±3,89*	48,16±3,76*
Progresif Motilite (%)	24,57±1,97 ^{b**}	32,73±2,63 ^{a**}	28,85±2,55 ^{ab**}	26,93±2,31 ^{ab**}	24,85±2,10 ^{b**}
VCL (µm/s)	62,84±2,47 ^{b**}	71,02±2,19 ^{a**}	70,87±2,57 ^{a**}	69,30±2,15 ^{ab**}	66,08±2,67 ^{ab**}
VAP (µm/s)	48,70±2,49 ^{b**}	56,87±2,44 ^{a**}	56,77±2,78 ^{a**}	54,56±2,40 ^{ab**}	53,50±2,53 ^{ab**}
VSL (µm/s)	43,95±2,28*	51,26±2,41*	51,00±2,86*	48,73±2,57*	48,89±2,60*
STR (%)	72,37±1,41*	75,35±1,50*	73,82±1,58*	74,33±1,69*	75,03±1,65*
LIN (%)	55,01±1,77*	58,53±2,04*	57,45±2,21*	57,23±2,17*	58,26±2,21*
WOB (µm/s)	70,13±1,40*	72,14±1,57*	71,73±1,69*	71,46±1,54*	71,65±1,72*
ALH (µm)	1,21±0,08*	1,12±0,07*	1,19±0,06*	1,14±0,08*	1,12±0,06*
BCF (Hz)	7,01±0,22*	7,75±0,23*	7,58±0,25*	7,51±0,27*	7,47±0,33*

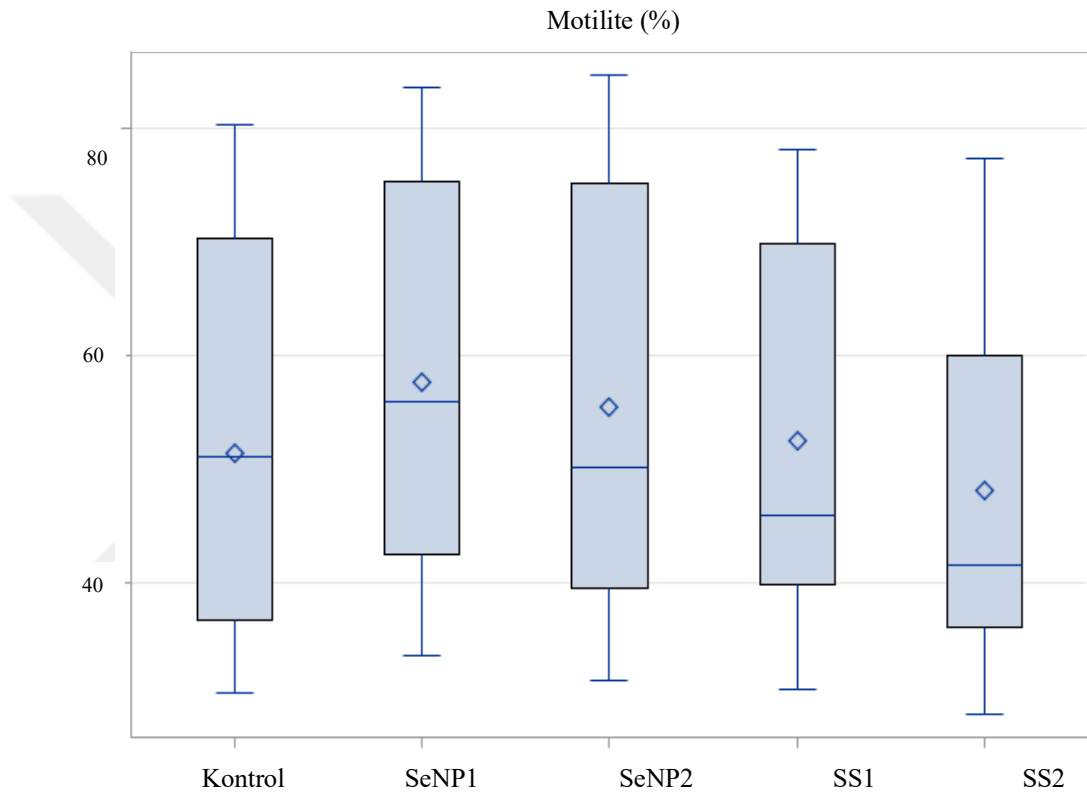
a,b: Aynı satırdaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir

*: (P> 0,05)

**.: (P< 0,05)

Çözüm sonrası spermatozoa motilitesinin ortalama değerleri, Grup 1 (Kontrol), Grup 2 (SeNP1), Grup 3 (SeNP2), Grup 4 (SS1), Grup 5 (SS2) için sırasıyla %51,43±3,98, %57,71±3,9, %55,42±4,38, %52,54±3,89, %48,16±3,76 olarak saptanmıştır. Köpek sperma sulandırıcısına katılan antioksidanlar arasında çözüm sonu spermatozoa motilitesi bakımından, farklı miktarlarda nanopartikül selenyum ve

sodyum selenit ilave edilen gruplar ile kontrol grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenirken ($p>0,05$), gruplar arası ortalama dağılımların verilmiş olduğu Şekil 9.3 incelendiğinde, nanopartikül selenyumun ($1 \mu\text{g/ml}$ sulandırıcı) eklenmiş olduğu SeNP1 grubunun, popülasyon içerisinde daha az örnek ile daha güvenilir sonuçlar vermiş olduğu gözlemlendi. Oluşan bu farklılığın net olarak ortaya çıkmaması ve istatistiksel olarak önem arz etmemesi verilerin non-parametrik dağılımıyla ilgili olabileceğini düşündürmektedir.



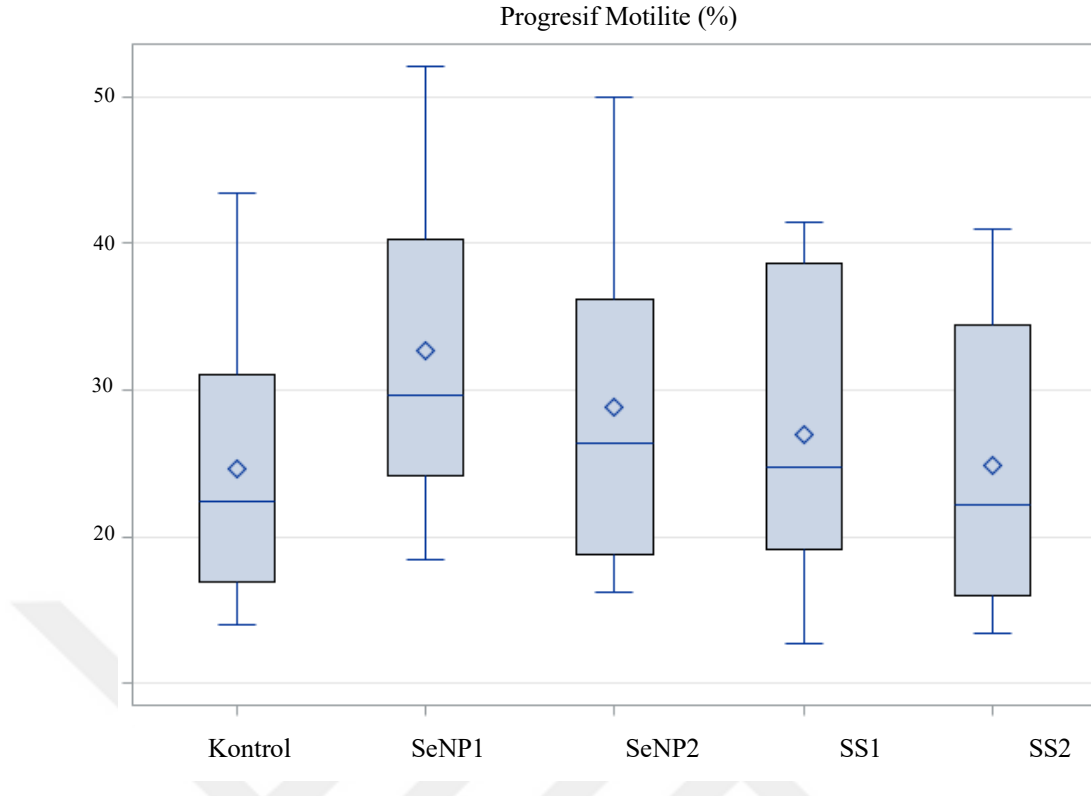
Şekil 9.3. Çözüm sonrası gruplar arası motilite değerinin karşılaştırması ($P>0,05$)

Çalışmada çözüm sonrası, $1 \mu\text{g/ml}$ SeNP, $2 \mu\text{g/ml}$ SeNP, $1 \mu\text{g/ml}$ SS ve $2 \mu\text{g/ml}$ SS olmak üzere antioksidan madde olarak selenyumun farklı formlarının eklendiği çalışma gruplarında total spermatozoa motilite değerleri kontrol grubuna kıyasla daha yüksek gözlemlendi. $1 \mu\text{g/ml}$ SeNP eklenmiş olan çalışma grubunda elde edilen ortalama total spermatozoa motilitesi en yüksek değer olan $57,71 \pm 3,9$ olarak tespit edildi.

Yapılan tez çalışmasında gruplardan elde edilen total motilite değerleri, Khalil vd. (2019)'nın boğa spermasını dondurmak amacıyla $0,5$ ve $1,0 \mu\text{g/ml}$ oranında nanopartikül selenyum ekledikleri sulandırıcı gruplarında sundukları değerler ile benzerlik göstermiştir. Dondurulmuş koç sperma sulandırıcısına farklı dozlarda nanopartikül selenyum etkisinin araştırıldığı diğer bir çalışmada ise, $1 \mu\text{g/ml}$ SeNP

eklenen grupta, kontrol ve 2 µg/ml SeNP eklenen gruba kıyasla daha yüksek motilite yüzdesi elde edilmiştir (Nateq et al., 2020). Bu veriler tür farklılığı söz konusu olsa da tez çalışmasındaki bulgularımız ile uyumlu bulunmuştur. Daha önceki bilgilendirmede de değinildiği üzere köpek spermasında SeNP ve SS'in ilavesi yönünden benzer çalışmalar bulunmadığı için doğrudan köpek sperması ile karşılaştırma yapmak mümkün olmamıştır.

Çözüm sonrası spermatozoa progresif motilitesinin ortalama değerleri Grup 1 (Kontrol), Grup 2 (SeNP1), Grup 3 (SeNP2), Grup 4 (SS1), Grup 5 (SS2) için sırasıyla %24,57±1,97, %32,73±2,63, %28,85±2,55, %26,93±2,31, %24,85±2,10 olarak saptandı ve gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($P<0,05$). 1 ve 2 µg/ml nanopartikül selenyum içeren sulandırıcı grupları (SeNP1 ve SeNP2) ile 1 ve 2 µg/ml sodyum selenit içeren sulandırıcı gruplarının (SS1 ve SS2) dondurma ve çözündürme sonrası spermatozoa progresif motilitesi kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptandı. Çözüm sonrası ortalama progresif motilite değerlerine göre, nanopartikül selenyum (1 µg/ml sulandırıcı) eklenmiş olan SeNP1 grubunun ortalama progresif motilitesi en yüksek değere sahip olduğu belirlendi. Ayrıca SeNP1 grubunun progresif motilitesinin ortalama değerinin, kontrol grubu ve sodyum selenit (2 µg/ml sulandırıcı) eklenmiş olan SS2 grubu değerleri ile farklı olduğu belirlendi ($P<0,05$) (Tablo 9.2). Gruplararası ortalama progresif motilite değerlerinin dağılım grafiği verilen Şekil 9.4'e göre, SS2 grubundaki ortalama değer ve güven aralığına bakıldığında istatistiksel verilerin daha az numune kullanarak daha güvenilir sonuçlar verdiği gözlemlenmektedir.



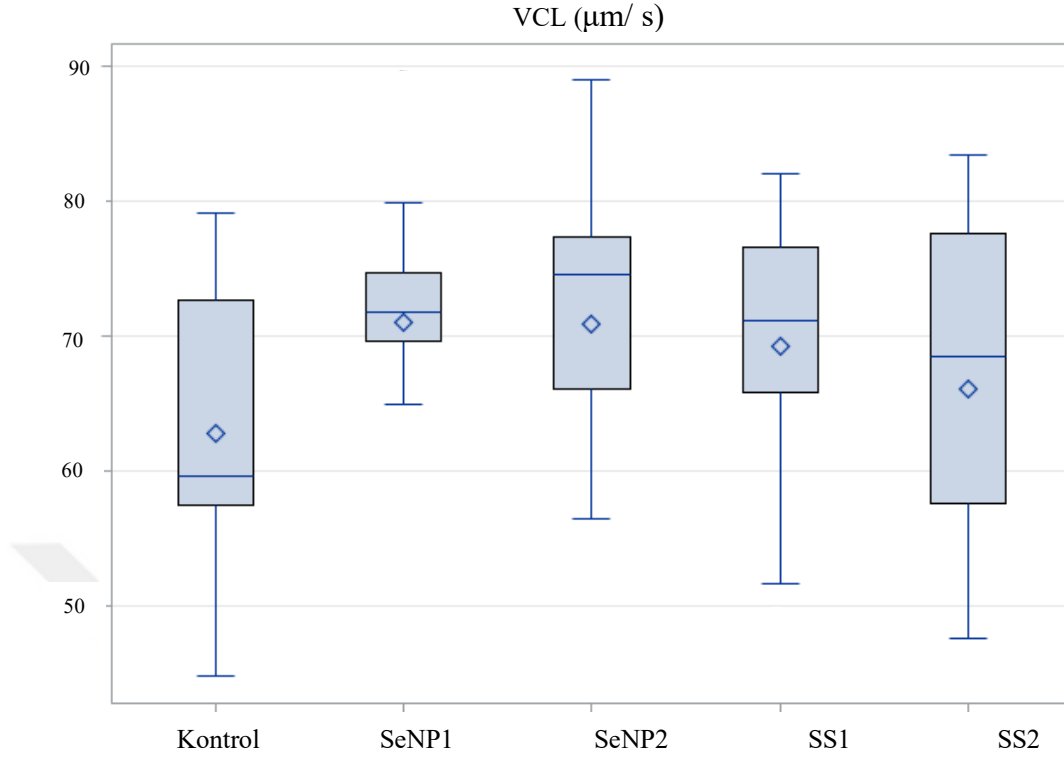
Şekil 9.4. Çözüm sonrası gruplar arası progresif motilite değerinin karşılaştırması ($P<0,05$)

Progresif motilite için elde edilen bulgular, farklı türlerde; teke (Shi et al., 2010), sıçan (Talebi et al., 2014), horoz (Safa et al., 2016), boğa (Khalil et al., 2019) ve koç (Hozyen et al., 2019; Nateq et al., 2020) nanopartikül selenyum ilave edilen sperma sulandırıcılarının çözüm sonrası spermatozoa progresif motilitesini arttırmış olduğu gözlemlenen önceki çalışmalar ile uyumlu bulundu. Çözüm sonrası 1 ve 2 $\mu\text{g/ml}$ SS eklenmiş olan gruplardaki progresif motilite değerleri antioksidan madde eklenmemiş olan kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur ($P<0,05$). Muhtemelen SeNP ilavesi ile GPX aktivitesinin uyarımı sağlanmış ve bu sayede spermatozoa hareket sistemi daha güçlü uyarımlar ile kendini ortaya koymuş olabilir. Çünkü, GPX genellikle selenyum ve bileşikleri tarafından uyarılmakta ve etkisini bu sayede daha güçlü göstermektedir.

Sperma sulandırıcısına sodyum selenit ilave eden, Seremak vd. (1999)'da yaptıkları çalışmada koç sperma sulandırıcısına SS ilave edilen gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında sperma sulandırıcısına 1 $\mu\text{g/ml}$ miktarda SS ekleyerek dondurma-çözdürme sonrası daha yüksek progresif motilite sağlandığını bildirmişlerdir. Bu çalışmadaki veriler, SS eklenmiş olan gruplardaki bulgularımız ile benzer bulunmuştur.

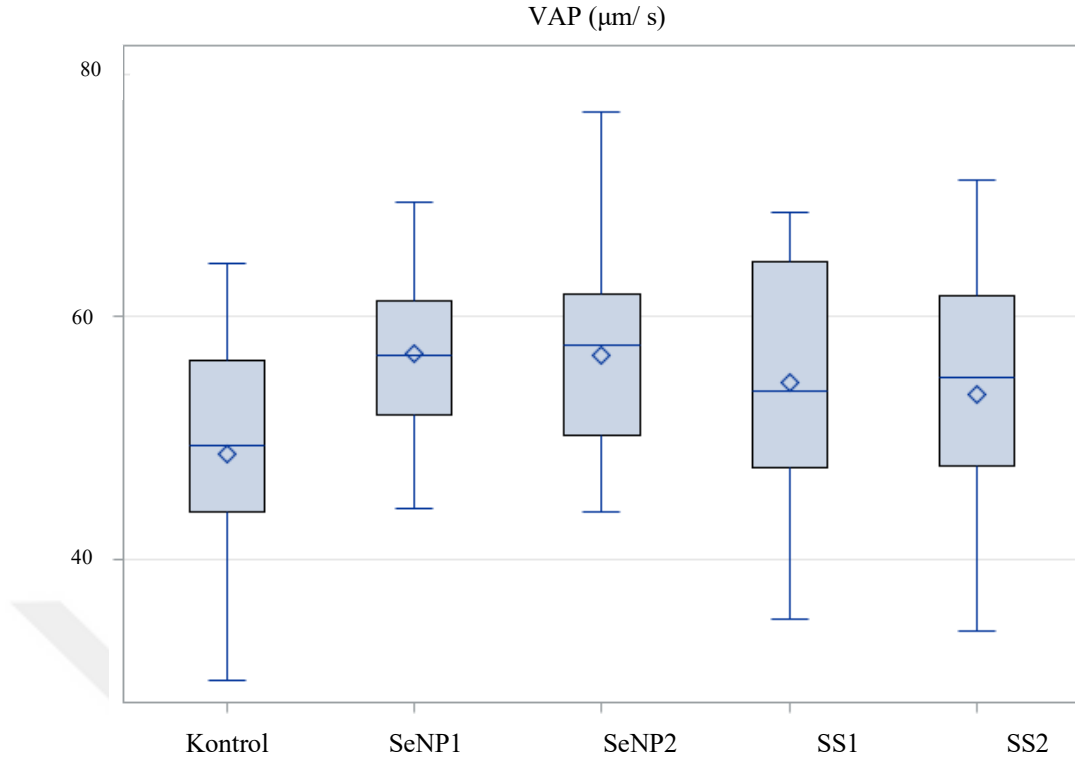
Dorostkar vd. (2012)'nin mandalarda yaptıkları çalışmada sperma sulandırıcısına çeşitli dozlarda selenyum eklenmiş ve 1 ve 2 µg/ml miktarda SS ilave edilmesinin dondurulmuş-çözdürülmüş manda spermasında spermatozoa motilite ve progresif motilite üzerine pozitif etki yaptığı bildirilmiştir. Bu bulgular araştırma bulgularımız ile tür farklılığı bulunmakla birlikte uyumludur. Maidin vd. (2014)'de teke sperma sulandırıcısına çeşitli antioksidan maddeler ilave ederek belirli aralıklarla motilite ve progresif motilite karşılaştırmaları yapmışlardır. Teke sperma sulandırıcısına 1 ppm SS ilave edilmesi ile 3 saatlik inkübasyon sonunda bile motilite gözlemlendiği bildirilmiştir. Yapılan araştırmalarda sulandırıcıya selenyumun ilavesiyle çözüm sonrası spermatolojik parametrelerde iyileşme selenyumun protektif etkisini ortaya koymaktadır (Kadirvel et al., 2009; Dorostkar et al., 2012; Ghafarizadeh et al., 2018). Ayrıca Pratt, vd. (1980), yaptıkları çalışmada boğa sperma sulandırıcısına selenyum ilavesinin, spermatozoa hareketliliği ve oksijen tüketimi ile değerlendirilen ATP kullanılan enzimlerin konsantrasyonunu ve spermatozoanın canlılığını artırarak, spermatozoa progresif hareketliliğinde iyileşmeye yol açtığını bildirmişlerdir. Araştırmada, yüksek progresif hareketlilik gösteren SeNP1 grubu değerleri bu durum ile açıklanabilmektedir.

Çözüm sonrası kinematik parametrelerden VCL (eğrisel hız, µm/ s) değeri, Grup 1 (Kontrol), Grup 2 (SeNP1), Grup 3 (SeNP2), Grup 4 (SS1), Grup 5 (SS2) için sırasıyla 62,84±2,47, 71,02±2,19, 70,87±2,57, 69,30±2,15 ve 66,08±2,67 olarak ölçüldü. Sonuçlar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (P<0,05). Sulandırıcıya eklenen 1 µg/ml nanopartikül selenyum grubunda en yüksek VCL değeri tespit edildi (Tablo 9.2). Ayrıca Şekil 9.5'de görüldüğü gibi SeNP1 grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında daha doğru ve güvenilir tahminler vermesi de dikkat çekicidir.



Şekil 9.5. Çözüm sonrası gruplar arası VCL değerinin karşılaştırması ($P<0,05$)

Çözüm sonrası kinematik parametrelerde VAP (ortalama yol hızı, $\mu\text{m/s}$) değeri, Grup 1 (Kontrol), Grup 2 (SeNP1), Grup 3 (SeNP2), Grup 4 (SS1), Grup 5 (SS2) için sırasıyla $48,70 \pm 2,49$, $56,87 \pm 2,44$, $56,77 \pm 2,78$, $54,56 \pm 2,40$ ve $53,50 \pm 2,53$ olarak ölçüldü. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). Öncelikle kontrol grubu ile selenyum formlarını içeren çalışma grupları arasındaki fark çok belirgindir. Bu durum selenyumun spermatozoonun bireysel hızı ve zamanlaması üzerinde önemli derecede etkili olduğunu ortaya koymaktadır. En yüksek VAP değeri SeNP1 grubunda tespit edilmiştir (Tablo 9.2). Gruplar arası VAP değerlerinin karşılaştırmasında SeNP1 grubunda daha doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 9.6).



Şekil 9.6. Çözüm sonrası gruplar arası VAP değerinin karşılaştırması ($P<0,05$)

Çözüm sonrası Tablo 9.2’de sunulmuş olan diğer kinematik parametrelerden VSL ($\mu\text{m/s}$), STR (%), LIN (%), WOB ($\mu\text{m/s}$) ve BCF (Hz)’de değerler SeNP1 grubunda daha yüksek olmasına rağmen gruplar arası farklılık elde edilen verilerdeki parametrik olmayan dağılımdan kaynaklı olarak istatistiksel önem arz etmemiştir ($P>0,05$).

Çözüm sonrası kinematik parametreler değerlendirildiğinde kontrol grubunda, VCL, VAP, VSL, STR, LIN, WOB ve BCF değerleri 1 ve 2 $\mu\text{g/ml}$ SeNP ile 1 ve 2 $\mu\text{g/ml}$ SS içeren gruplara kıyasla daha düşük bulundu. Bilindiği üzere, temel spermatolojik değerlendirme sisteminde azalan spermatozoa hareketliliği daha düşük fertilité oranları ile ilişkilendirilmektedir (Yániz et al., 2018). Çalışma bulgularımıza bakıldığında farklı dozlarda SeNP ve SS içeren gruplarda daha yüksek spermatozoa hareketliliği elde edilmiştir. Bilgisayar destekli sperma değerlendirme sistemlerinde spermatozoanın hareket hızı, temel olarak VCL, VAP, VSL ile değerlendirilmektedir (Soler et al., 2017b). Çalışmamızda VCL, VAP ve VSL bulguları gruplar arasında en yüksek 1 $\mu\text{g/ml}$ SeNP grubunda tespit edildi. Bu veriler doğrultusunda, köpek sperma dondurma çalışmalarında spermatozoa hareket fonksiyonlarının korunması açısından, sulandırıcıya 1 $\mu\text{g/ml}$ dozda SeNP ilavesi yerinde olacaktır. Spermatozoa kinematiğinin değerlendirilmesi, spermatozoanın enerji durumu hakkında önemli

bilgiler sağlamaktadır (Quintero-Moreno et al., 2004). Daha fazla enerjiye sahip olan spermatozoada kinematik parametrelerin yüksek olması beklenmektedir. Çalışma bulgularımızda yüksek kinematik parametre değerleri elde edilen grupların daha yüksek motilite ve progresif motilite değeri göstermesi de bu durumu destekler niteliktedir.

Çalışmada spermatozoa hareketlilik parametreleri olarak değerlendirilen total motilite, progresif motilite ve kinematik parametrelere bakıldığında antioksidan madde olarak selenyum nanopartikül ve sodyum selenitin 1 ve 2 µg/ml dozlarda sulandırıcıya eklenmesinin çözüm sonrası spermatozoanın hareketliliğini uyardığını ve önemli ölçüde arttırdığını ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalarda azalan spermatozoa hareketliliği daha düşük fertilite oranları ile ilişkilendirilmiştir (Flowers, 2009; Yániz et al., 2018). Tez çalışmamızdaki en yüksek motilite, progresif motilite ve kinematik parametre değerleri 1 µg/ml SeNP içeren grupta tespit edilmiştir. Çalışma bulguları, köpek sperma sulandırıcısına 1 µg/ml dozda SeNP'nin eklenmesi ile dondurulmuş köpek sperması ile en yüksek fertilitenin sağlanacağı ortaya konulmuştur.

9.2.2. Spermatozoon Plazma Membran Bütünlüğü ve Ölü-Canlı Spermatozoon Oranının Değerlendirilmesi

Kriyoprezervasyon işleminde, spermatozoa şiddetli bir şekilde ozmotik strese maruz kalmakta ve sonuç olarak spermatozoonların fertilizasyon kapasitesini etkileyen plazma membran hasarı şekillenmektedir (Hozyen et al., 2019). Mevcut tez çalışmasında selenyumun özellikle plazma membranını tahrip eden ROS üretiminin zararlı etkisini inhibe edebilme özelliği göz önüne alınarak, spermatozoanın membran bütünlüğünü koruması beklendi. Çalışma gruplarındaki çözüm sonrası spermatozoon plazma membran bütünlüğü ortalama değerleri Tablo 9.3'de sunulmuştur. Buna göre spermatozoon plazma membran bütünlüğü değerlendirildiğinde, Tris sulandırıcısına farklı selenyum formlarının eklendiği sulandırıcı gruplarının HOS testine verdikleri yanıt bakımından çalışma grupları ile kontrol grubu arasındaki farkın önemli olmadığı belirlendi ($P>0,05$) (Tablo 9.3). Tez çalışmasında spermatozoon plazma membran bütünlüğü üzerine elde edilen bulgular istatistiksel açıdan önemli bulunmasa da SeNP gruplarından elde edilen değerler, kontrol ve SS grupları ile karşılaştırıldığında SeNP ilavesiyle plazma membran bütünlüğünün daha iyi korunduğu görülmüştür.

Tablo 9.3. Çalışma gruplarındaki, çözüm sonrası spermatozoon plazma membran bütünlüğü değerlendirildiği HOS testi ve ölü spermatozoon ortalama değerleri

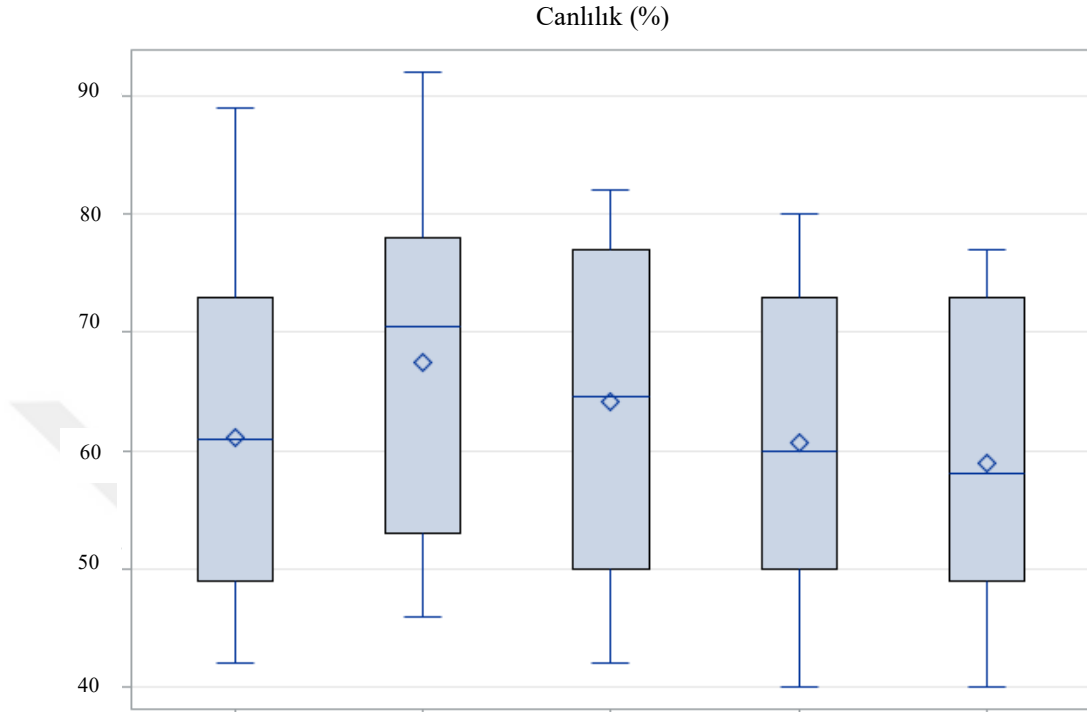
Parametre	Kontrol	Nanopartikül Selenyum (1 µg/ml)	Nanopartikül Selenyum (2 µg/ml)	Sodyum Selenit (1 µg/ml)	Sodyum Selenit (2 µg/ml)
Plazma Membran Bütünlüğü (%)	61,72±3,56*	66,27±3,68*	63,16±3,60*	60,88±3,51*	58,5±3,23*
Canlılık (%)	61,05±3,24*	67,44±3,37*	64,05±3,27*	60,66±3,03*	58,88±2,97*

*: (P> 0,05)

Dorostkar vd. (2012) tarafından, manda spermasına farklı konsantrasyonlarda sodyum selenit ilavesinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 0,5 µg/ml sodyum selenit ilavesinin dondurma sonrasında manda spermasının plazma membran bütünlüğüne etki etmediği bildirilmiştir. Benzer olarak boğa sperma sulandırıcısına selenyum ilavesinin dondurma sonrası sperma parametreleri üzerine etkisinin araştırıldığı diğer bir çalışmada ise selenyumun plazma membran bütünlüğünü etkilemediği bulunmuştur (Fouad and Ashour, 2021). Epididimal deve spermasının dondurulması üzerine mineral, vitamin ve nanopartiküller olmak üzere çeşitli antioksidan maddelerin etkisinin araştırıldığı güncel bir çalışmada, çözüm sonrası plazma membran bütünlüğü üzerine SeNP ve SS ilavesinin etkisinin görülmediği bildirilmiştir (Shahin et al., 2020). İncelenen literatür verileri ile çalışmamız aynı parametre yönünden karşılaştırıldığında tür farklılığı bulunmasına rağmen, köpek spermasından elde edilen bulgular ile farklı türlerden elde edilen plazma membran bütünlüğü değerleri arasında uyumluluk tespit edilmiştir. Bu verilere göre farklı selenyum formlarının memeli spermasının dondurulmasında özellikle plazma membranı üzerine pozitif bir etki oluşturmada sonucuna varabiliriz.

Ölü-canlı spermatozoa oranının değerlendirilmesinde, ölü spermatozoon ortalama değerleri, çözüm sonrası Grup 1 (Kontrol), Grup 2 (SeNP1), Grup 3 (SeNP2), Grup 4 (SS1), Grup 5 (SS2) için sırasıyla 38,38±3,28, 33,66±3,28, 37,05±3,5, 40,44±3,26, 42,22±1,87 olarak ölçüldü. Tris sulandırıcısına farklı selenyum formlarının eklendiği sulandırıcı gruplarının ölü spermatozoon oranları bakımından herhangi bir antioksidan eklenmemiş olan kontrol grubu arasında farkın önemli olmadığı belirlendi (P>0,05) (Tablo 9.2). İstatistiksel olarak farklılık önemsiz bulunmuş olmasına rağmen, gruplar arasındaki canlı spermatozoon ortalama değerlerine ilişkin Şekil 9.7'ye bakıldığında SeNP eklenen gruplar diğer gruplarla karşılaştırıldığında daha başarılı olduğu ve daha isabetli tahminler verdiği söylenebilir. Dolayısı ile SeNP uygun dozlarda sperma sulandırıcısına eklenmesi özellikle

spermatozoa canlılığı (viabilite) üzerine olumlu etkiler ortaya koymaktadır. Sonraki çalışmalarda bu durumu daha da netleştirebilmek için SeNP'nin daha yüksek ya da düşük dozlarının etkileri incelenebilir.



Şekil 9.7. Çözüm sonrası gruplar arası canlı spermatozoon oranlarının karşılaştırması ($P>0,05$)

Tez çalışmasındaki canlılık değerleri, Shahin vd. (2020)'nin deve spermasını dondurmak amacıyla nanopartikül selenyum ve sodyum selenit ilave edilen sulandırıcı gruplarında ekilibrasyon sonrası sundukları değerler ile benzer sonuçlar göstermiştir.

Khalil vd. (2019) tarafından, nanopartikül selenyumun farklı dozlarının dondurulmuş boğa sperması üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SeNP'un spermatozoa canlılığı üzerine istatistiksel bir fark oluşmasa da protektif etkisi olduğu bildirilmiştir.

Asthenozoospermi özelliği gösteren insan spermasına in vitro selenyum ilave edilmesi ile farklı zamanlarda inkübasyona bırakılmasındaki etkinliğinin incelendiği bir çalışmada, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ selenyumun spermatozoa ile 2 saat inkübasyondan sonra eozin/nigrosin boyaması ile değerlendirilen sperm canlılığı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmasa da selenyum ilave edilen grupta sperm canlılığının arttırmış olduğu tespit edilmiştir (Ghafari-zadeh et al., 2018).

Mandalarda yapılan bir çalışmada ise sperma sulandırıcısına 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda sodyum selenit ilavesinin spermatozoa canlılığı üzerine dondurma

öncesi ve dondurma sonrası istatistiksel olarak anlamlı etkisi bulunmamıştır (Dorostkar et al., 2012). Tez çalışmasındaki bulgularımız bu yapılan araştırma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Bu tez çalışmasında, istatistiksel bir önem taşımamakla birlikte, köpek sperma sulandırıcısına SeNP (1 ve 2 µg/ml) ilavesinin kontrol grubuna göre canlılık ve plazma membran bütünlüğü açısından koruyucu etkileri gözlemlenmiştir. Selenyumun diğer formu olan ve iki çalışmanın iki grubunu oluşturan SS ilavesinin ise spermatozoa canlılığı üzerine bir etkisi görülmemiştir. Bu çalışma verilerinden elde edilen sonuçlar, SeNP'nin biyolojik bir antioksidan olarak kullanılmasının köpek sperması üzerinde kriyoprotektif bir etkiye sahip olduğunu ve spermatozoa kalitesini artırdığını göstermiştir. Tez çalışmasının sonuçları, selenyumun spermatozoa canlılığını etkilemeden motilitesini desteklediğini göstermektedir. Bunun aksi bir görüş olarak bazı araştırmacıların (Pratt et al., 1980; Nair et al., 2006) bildirdiği gibi motilite kaybı oluşturabilme durumu da söz konusu olabilmektedir.

9.2.3. Spermatozoa Morfolojisinin Değerlendirilmesi

Spermatozoa morfolojisinin belirlenmesinde, toplam morfolojik bozukluk ve spermatozoonun akrozom, baş, orta, kuyruk kısmında meydana gelen her bir anormallik yüzde (%) olarak değerlendirildi. Çözüm sonrasında toplam ve spermatozoanın farklı bölgelerinde meydana gelen morfolojik bozukluk oranları Tablo 9.4'de sunulmuştur.

Tablo 9.4. Çalışma gruplarındaki, çözüm sonrası anormal spermatozoa oranları

Anormal Spermatozoa Oranı (%)	Kontrol	Nanopartikül Selenyum (1 µg/ml)	Nanopartikül Selenyum (2 µg/ml)	Sodyum Selenit (1 µg/ml)	Sodyum Selenit (2 µg/ml)
Akrozom	0,83 ±0,16*	0,33±0,11*	0,83±0,12*	0,77±0,12*	0,94±0,15*
Baş	2,27±0,13*	1,44±0,14*	2±0,21*	2±0,21*	2,16±0,20*
Gövde	2,55±0,18*	1,88±0,22*	2,33±0,25*	2,50±0,18*	2,44±0,23*
Kuyruk	4,77±0,20**	4,05±0,20**	4,22±0,19**	4,38±0,21**	4,72±0,23**
Toplam	10,44±0,37*	7,72±0,36*	9,38±0,45*	9,66±0,45*	10,27±49*

a,b: Aynı satırdaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir

*: (P> 0,05)

** : (P< 0,05)

Yapılan değerlendirmeler sonrasında spermanın çözüm sonrası toplam anormal spermatozoa oranında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenememiştir. Ancak, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ortalama anormal spermatozoa oranları selenyum formlarının ilave edildiği çalışma gruplarında daha düşük bulunmuştur (p>0,05). Spermanın morfolojik olarak değerlendirilmesinde, veri girişinin 1 ve katları (var/yok) şeklinde olması sebebiyle istatistiksel analizde gruplar

arası önemin ve farklılığın belirlenmesinde engel oluşturabilme potansiyeli istatistik uzmanı tarafından bildirilmiştir.

Çözüm sonrası spermatozoanın akrozom, baş ve gövde kısmında meydana gelen morfolojik bozukluklar istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($P>0,05$). İstatistiksel olarak önemli bir fark bulunmasa da kontrol grubuna kıyasla baş ve gövde kısmında meydana gelen bozukluklar sperma sulandırıcısına farklı dozlarda ve farklı formlarda selenyumun ilave edildiği çalışma gruplarında daha düşük çıkmıştır. Muhtemelen veri dağılımındaki aralığın geniş ve değişken olmasına bağlı olarak önem durumu ortaya konulamamıştır.

Spermatozoonun kuyruk kısmına ait değerlendirmede, en düşük morfolojik bozukluk $1 \mu\text{g/ml}$ nanopartikül selenyum içeren sulandırıcı grubunda tespit edilmiştir. SeNP1 grubunda kuyruğa bağlı bozukluklar kontrol ve SS2 grubuna göre önemli ölçüde düşük olduğu gözlenmiştir ($P<0,05$). Ayrıca selenyum formlarının ilave edilmiş olduğu tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna kıyasla spermatozoada daha düşük kuyruk anormalliği tespit edilmiştir ($P<0,05$). Bu durum, özellikle NP ilavesi olmak üzere selenyumun tüm formlarının kuyruk bölgesi ve dolayısıyla da spermatozoon hareket sistemi üzerine olumlu etkiler yaptığının bir sonucu olarak değerlendirilebilir.

Fouad ve Ashour, (2021)'de boğa spermasının kriyoprezervasyonu üzerine selenyum ve çinkonun etkilerini araştırdıkları bir çalışmada ve dondurma ve çözündürme sonrası anormal spermatozoa oranının CASA sistemi ile değerlendirildiğinde baş, gövde ve toplam anormal spermatozoa oranları çalışma verilerimizle uyumlu bulunmuştur. Buna göre çinkonun ($0,3\text{mg}/100\text{ml}$) ve sodyum selenitin ($0,2\text{mg}/100\text{ml}$) kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak etkili bulunmadığı ortaya konmuştur.

Khalil vd. (2019)'nin yaptıkları çalışmada, boğa sperma sulandırıcısına $0,5$ ve $1,5 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda SeNP ilavesinin, dondurma sonrasında anormal spermatozoa oranında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturmadığını, $1 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda SeNP eklenmesinin ise anormal spermatozoa oranına olumlu etki ettiğini bildirmişlerdir.

Deve spermasını dondurmak amacıyla farklı antioksidan kullanılan bir çalışmada nanopartikül selenyum ve sodyum selenit eklenilen sulandırıcı gruplarında akrozom bütünlüğü verileri ile çalışmamız benzer sonuçlar göstermiştir (Shahin et al., 2020). Çalışmada deve sperma sulandırıcısına selenyum nanopartikül ilave edilen grupta ve sodyum selenit eklenen grupta çözüm sonrası akrozom bütünlüğü

bakımından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel bir farklılık oluşmadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmanın anormal spermatozoa oranları ise kontrol grubuna göre SS ve SeNP gruplarında anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Shahin vd. (2020)'de deve sperma sulandırıcısına eklenen SeNP ve SS'in spermatozoayı kriyoprezervasyon sırasında meydana gelen ve spermatozoaya zarar veren oksidatif stresten koruduğunu bildirmiştir.

Horoz sperması üzerine yapılan bir araştırmada %1 ve %2 oranlarında SeNP'un anormal spermatozoa üzerine olumlu/olumsuz bir etkisi bildirilmemiştir. Bu tez çalışmasındaki bulgulara paralel olarak her ne kadar kontrol grubuna kıyasla SeNP ilave edilmiş spermaların çözüm sonrası anormal spermatozoa oranı düşük bulunsa da istatistik bir fark olmadığı bildirilmiştir ($P>0,05$). Ayrıca, horoz sperma sulandırıcısına in vitro olarak E vitamini ve SeNP kombinasyonu ilavesinin, tek başına E vitamini veya SeNP takviyesine kıyasla sperma kalitesini ve morfolojisini korumada daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (Safa et al., 2016).

Sperma sulandırıcısına SeNP ilavesinin koçlarda (Nateq et al., 2020), oral olarak verilen SeNP'nin ise ratlarda (Rezvanfar et al., 2013) ve tekelerde (Shi et al., 2010) anormal spermatozoa oranını azalttığı bildirilmiştir.

Spermatozoada kuyruğa bağlı anormalliklerin nedeni büyük ölçüde bilinmemektedir (Hellander et al., 1991; Rota et al., 2008). Testis veya epididimis kaynaklı olabileceği gibi mitokondriyal kılıfın yanlış hizalanması veya aksonem liflerinin kırılması da kuyruk anormalliğine neden olabilmektedir (Molnár et al., 2001). Araştırmalara göre kıvrımlı ve kıvrık kuyruklu spermatozoa varlığı, ejakülatın motilitesini önemli ölçüde düşürür ve erkeğin fertilite potansiyelini azaltabilir (Hellander et al., 1991; Molnár et al., 2001). Yapılan tez çalışmasında spermatozoada kuyruk anormalliği selenyum eklenmiş olan tüm gruplarda anlamlı olarak daha düşük çıkmıştır ($P<0,05$). Bu veriler 1 ve 2 $\mu\text{g/ml}$ dozlarda sodyum selenit ve nanopartikül selenyumun köpek sperma sulandırıcısında eklenmesinin kuyruk anormalliğini önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur. Buna paralel olarak gruplar arasında en yüksek motilite, progresif motilite ve kinematik değerler, anormal kuyruk morfolojisi en düşük olan SeNP1 grubunda tespit edilmiştir. Aynı şekilde özellikle spermatozoanın progresif motilitesinin en yüksek değerleri ve en düşük anormallik kuyruk oranları da sırasıyla SeNP1, SeNP2, SS, SS2 ve kontrol gruplarında bulunmuştur ($P<0,05$). Çalışmada, köpek sperma sulandırıcısına katılan farklı selenyum formlarının spermatozoada kuyruk anormalliğini azaltarak, motilitenin artmasını sağladığını

ortaya koymaktadır.

9.2.4. Spermatozoa DNA Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Spermatozoada DNA bütünlüğü, “Sperm Kromatin Dispersiyon Testi” (SCD), GoldCyto Sperm Kit® (Microptic, Spain) kullanılarak tespit edildi. Değerlendirmeler spermatozoonların baş bölgesi etrafında şekillenen “Halo Görüntüsü” oluşumuna göre yapıldı. Sonuçlar spermatozoonlarda halo görüntüsünün oluşumu DNA fragmentasyonu varlığı, halo oluşmaması veya çok küçük halo görüntüsü oluşması DNA bütünlüğünün korunduğu şeklinde değerlendirilerek yüzde (%) olarak değerlendirildi. Çözüm sonrasında her bir grup için spermatozoa DNA fragmentasyon bulguları Tablo 9.5’de sunulmuştur.

Tablo 9.5. Çalışma gruplarındaki, çözüm sonrası DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi

SCD Test	Kontrol	Nanopartikül Selenyum (1 µg/ml)	Nanopartikül Selenyum (2 µg/ml)	Sodyum Selenit (1 µg/ml)	Sodyum Selenit (2 µg/ml)
Fragmente DNA (%)	9,3±0,68*	7,09±0,62*	8,55±0,73*	8,91±0,71*	9,78±0,63*

*: (P> 0,05)

Tez çalışmasında tüm gruplarda fragmente DNA oranlarının, Evenson vd. (2002) tarafından belirtilen eşik değer kategorilerinden düşük seviyede olduğu gözlemlendi. Ayrıca test kitinin analiz prosedürüne göre de tüm gruplardaki veriler <15% oranı ile düşük seviyede fragmente DNA içerdiği belirlendi.

Spermanın dondurulması sırasında spermatozoon DNA bütünlüğünü etkileyen faktörler tam olarak bilinmemekle birlikte, bu özelliğin daha çok türe özgü bir durum olduğu bildirilmiştir (Gosálvez et al., 2011). Onbir farklı memeli türü üzerinde yapılan bir araştırmada, spermatozoonlarda bulunan Protamin 1 ve 2'nin varlığı ile spermanın çözüm sonrası DNA durumu arasında bir korelasyon bulunmuştur. Yapılan çalışmada Protamin 2 içermeyen spermatozoonların, dondurma ve çözündürme sırasında parçalanmaya, her iki Protamini içeren türlerden daha etkili bir şekilde direndiği bildirilmiştir. Köpek sperması bu 11 farklı memeli türünün yer aldığı çalışmaya dahil edilmemiştir, ancak köpek spermatozoonunda Protamin 2 eksikliği (Lee and Cho, 1999), DNA'sının dondurma ve çözündürme prosedürüne karşı daha dayanıklı olduğunu açıklayabilir. DNA bütünlüğünün korunmasını etkileyen bir başka faktör de köpek spermasında seminal plazmanın varlığıdır. Köpek spermasının dondurulmasında seminal plazmasının çıkarılması önerilmez çünkü seminal plazma içerisindeki prostat sıvısı ile dondurulan spermaların daha yüksek DNA bütünlüğü gösterdiği bildirilmiştir. Bu nedenle köpeklerde seminal plazmadaki yüksek antioksidan içerik

köpek spermasının dondurulmasında DNA bütünlüğünün korunması ile ilişkilendirilebilir (Koderle et al., 2009). Bu tez çalışmasında oluşabilecek antioksidan eksikliğini giderilmesi için farklı selenyum formlarının sulandırıcıya eklenmiştir. Ancak, tez çalışması bulgularına göre köpek spermasının dondurulması ve çözündürülmesi sonrasında çalışma gruplarında DNA fragmentasyonu saptanmamıştır. Kontrol grubunu oluşturan spermada fragmente DNA ($9,3\pm0,68$) değeri ile iyileştirilmeye gerek olmayan normal değer aralığında tespit edilmiştir. Bu nedenle, sulandırıcıya sodyum selenit ve nanopartikül selenyum ilave edilmesi ile köpek spermatozoon DNA'sı üzerindeki potansiyel koruyucu etkileri bildirilememiştir. Muhtemelen böyle bir etkinin var olup olmadığını ortaya koyabilmek için hasarın daha yüksek boyutlarda olduğu spermalar üzerinde planlı çalışmaların yapılması daha yerinde olacaktır.

Urbano vd. (2013), tarafından köpek spermasının dondurulması ve tek katmanlı santrifüjleme sonrası spermatozoada meydana gelen DNA fragmentasyonu araştırılmıştır. Yapılan çalışmada, 4 farklı köpeğin 3'er ejakülatı karıştırılarak, dondurma öncesi ve çözüm sonrası spermatozoada DNA bütünlüğü karşılaştırılmıştır. Araştırma sonucunda SCD testi ile değerlendirilen köpek spermasını dondurmanın DNA fragmentasyonuna herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Köpek spermasını dondurma ve çözüm sonrasında Androcoll-C kullanılarak tek katmanlı santrifüjleme ile 38°C'de 24 saat inkübasyona tabi tutarak yaptıkları DNA fragmentasyon değerlendirmesinde ise tek katmanlı santrifüjleme ile spermatozoon seçiminde santrifüjlenmeyen spermaya göre daha düşük fragmente DNA oranı elde etmişlerdir. Urbano vd. (2013), bu sonuçlar ile spermatozoada meydana gelen DNA hasarının çoğunun çözüldükten sonraki ilk dakikalarda değil, inkübasyon sırasında meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca spermanın çözüldükten hemen sonra spermatozoon DNA bütünlüğünün değerlendirilmesi, Alkmin vd. (2013)'e göre buzdağının yalnızca görünen kısmı olarak da açıklanmaktadır. Mevcut doktora tez çalışmasında da tür özelliği olarak köpek spermatozoa DNA'sının dondurmaya karşı dayanıklı olması sebebi ve doktora tez çalışmasında dondurulduktan sonra herhangi bir stres etkenine maruz bırakılmaması sebebiyle selenyum formlarının antioksidan etkinliğinin ortaya konulamamış olması, gruplar arası DNA bütünlüğü oranlarında istatistiksel bir fark şekillenememesinin nedeni olarak açıklanabilir.

Varesi vd. (2014), köpek epididimal spermasında sulandırıcıya antioksidan madde olarak eklenen melatoninin taze ve dondurma sonrası spermatozoa DNA

bütünlüğüne etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada gruplar arasındaki DNA bütünlüğü, mevcut tez çalışmasında kullanılan SCD yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonuçlarında taze, dondurma sonrası ve melatonin ile dondurma sonrası sperma grupları arasında DNA bütünlüğünde istatistiksel olarak farklılık bildirilmemiştir. Bu farklılığın oluşmama nedeni, köpek epididimal spermatozoasının DNA bütünlüğünün uygun dondurma prosedürü uygulandığında DNA bütünlüğünün etkilenmediği ve bu nedenle melatoninin koruyucu etkisinin ortaya konulamaması ile açıklanmıştır. Söz konusu çalışmanın verileri, bu doktora tez çalışmasındaki veriler ile uyumlu bulunmuştur. Yapılan tez çalışmasında da uygun dondurma prosedürü izlendiği ve dolayısı ile gruplar arası DNA bütünlüklerinin etkilenmediği ve farklı selenyum formlarının potansiyel protektif etkinliği belirlenemediği kanısına varılmıştır.

Ortiz vd. (2017), epididimal köpek spermasında dondurma ve çözündürme sonrası, inkübasyon sürelerinin SCD ve Sperm Kromatin Yapı Analizi (SCSA) yöntemleri ile DNA hasarına etkisi karşılaştırılan çalışmada, çözüm sonrası 0., 3., ve 6. saatlik inkübasyon sonrasında fragmente DNA oranlarında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Ancak 24 saatlik inkübasyon sonrasında fragmente DNA hasarı oranında anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma verileri tez çalışmamız ile örtüşmekle birlikte, çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşmamasına rağmen kontrol grubu verilerinin SeNP1, SeNP2 ve SS1 gruplarına kıyasla daha yüksek oranda fragmente DNA içerdiği belirlenmiştir. Bu tez çalışmasının kontrol grubu verilerinin de GoldCyto Sperm Kitinin prosedürüne göre fragmente DNA bakımından düşük seviyede saptanmış olması sebebiyle antioksidan olarak eklenen selenyum formlarının fragmente DNA oranını azaltmaya etki etmediği söylenebilir.

9.2.5. Antioksidan Profilin Değerlendirilmesi

Her bir grupta bulunan tüm spermaların antioksidan profili değişimlerinin belirlenmesi amacıyla Glutasyon peroksidaz (GPX), Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Lipid Peroksidasyon (LPO) kitleri kullanılarak ELISA yöntemi ile oksidatif stres parametrelerindeki değişimler ölçüldü ve değerlendirildi. Çalışma gruplarındaki çözüm sonrası antioksidan profil bulguları Tablo 9.6'da sunulmuştur.

Tablo 9.6. Çalışma gruplarındaki çözüm sonrası antioksidan profil bulguları

Antioksidan Kiti	Kontrol	Nanopartikül Selenyum (1 µg/ml)	Nanopartikül Selenyum (2 µg/ml)	Sodyum Selenit (1 µg/ml)	Sodyum Selenit (2 µg/ml)
GPX (ng/ml)	18,29±1,63*	20,18±1,34*	19,7±1,34*	19,45±1,31*	18,54±1,58*
SOD (ng/ml)	12,72±0,89*	14,67±0,81*	14,80±0,87*	14,16±0,74*	13,87±0,76*
CAT (ng/ml)	9,13±1,31*	10,36±1,38*	10,18±1,15*	10,14±1,25*	11,05±0,87*
Lipid Peroksidasyon (nmol/ml)	3,02±0,12*	2,90±0,07*	3,16±0,10*	3,07±0,08*	2,98±0,06*

*: (P> 0,05)

Neagu vd. (2010), köpek seminal plazmasında glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinin belirlenmesi ve bunun spermatozoa kalitesi ve çözülme sonrası lipid peroksidasyonu ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmada 4 farklı köpekten 5'er kez ejakülat alınmış ve her bir köpeğin sperması ayrı ayrı kullanılmıştır. Dondurulmadan önce plazmalemmada lipid peroksidasyonunu gösteren spermatozoon yüzdesinde köpekler arasında önemli fark gözlemlenmiştir (P<0,05). Ancak çözüm sonrasında lipid peroksidasyon seviyelerinde çalışmaya dahil edilen köpeklerin spermaları arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Bu çalışma, kriyoprezervasyon sonrası köpek spermatozoonlarının yaşadığı hasarda lipid peroksidasyonu (LPO) ve enzimatik antioksidan sistemlerin rolü olduğunu ancak köpek spermasının oksidatif hasara duyarlılığında bireysel farklılıkların olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan tez çalışmasında da 6 farklı köpekten elde edilen 3'er ejakülat ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Spermaların dondurulup-çözülme işlemi sonrasında, gruplar arasındaki antioksidan enzimlerin ve lipid peroksidasyon verilerinde istatistiksel fark bulunmaması referans olarak yukarıda bahsi geçen Neagu vd. (2010)'nin çalışması ile uyumlu şekilde köpeklerin bireysel olarak oksidatif hasara direnç göstermeleri ile açıklanabilir.

10. SONUÇ

Günümüzde köpek yetiştiriciliği ve köpeklerde suni tohumlama işlemine rağbet giderek artmaktadır. Suni tohumlama başarısını artırmanın en etkin yolu ise köpeklerde sperma dondurulabilirliğinin arttırılmasıdır. Bu amaçla sperma dondurulabilirliğine zarar veren oksidatif stresten korunma ve en aza indirmek amacıyla güncel antioksidan maddeler arayışına girilmiştir. Bu çalışma ile protektif etkili güncel antioksidan kullanımı (özellikle de nanoteknolojik ürünlerin bu sürece dahil edilmesi vs.) ve köpek sperması dondurulmasındaki etkisinin ortaya konması hedeflenmiştir. Doktora tez çalışmasında köpek sperma sulandırıcısı kompozisyonu için nanoteknoloji ürünü olan bir antioksidan maddenin kullanımının spermatolojik parametrelere ve spermatozoa antioksidan profiline etkileri incelendi. Mevcut sonuçlarımızda köpek sperma sulandırıcısına nanopartikül eklenmesinin önemli spermatolojik parametreler üzerine olumlu etkileri belirlenmiştir. Özellikle progresif motilite, VAP ve VCL gibi kinematik parametreler ve spermatozoa morfolojisi üzerine protektif etkinliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Nanopartikül selenyumun spermatolojik parametrelere etkinliği sodyum selenite göre daha yüksektir. Buna neden olarak, nanopartikül formun daha küçük parçacıklar olması ve daha fazla yüzey alanına sahip olarak serbest radikallere karşı daha fazla direnç sağlayabilmesi, daha etkili ve nanopartikül formun daha az toksisite özelliğinde olması ile açıklanabilir. Tez çalışmasında spermatozoada dondurma sırasında meydana gelen oksidatif stres, dondurma işlemi sonucunda oluşan DNA hasarı ve spermatozoa antioksidan profili üzerine farklı selenyum formlarının etkisi ortaya konulmuş, ancak beklenen protektif etki ortaya çıkmamıştır. Bu durum, doktora tez çalışmasında köpek spermasının uygun şekilde dondurma işlemi sonrasında kontrol grubundaki değerin iyileştirmeye gerek duyulmayan normal değer aralığında olması ve dondurma işlemi haricinde spermalara herhangi bir stres faktörüne maruz bırakılmaması sebepleriyle açıklanabilir. Ayrıca çalışmada kullanılan köpek spermalarının bireysel özellikleri ile de ilişkili olduğu söylenebilir. Bu sebeplerle selenyum formlarının ve özellikle de nanopartikül formunun etkisinin spermatozoada DNA hasarı ve antioksidan profil üzerindeki etkisinin net olarak anlaşılabilmesi için infertilite problemlili erkek köpeklerden toplanan spermaların kullanımı ya da spermanın işlenmesi sırasında hasar oluşturabilen uygulamalar (santrifüjleme, flowsitometri gibi) ile çalışmaların yapılması etkinliğin net olarak ortaya çıkabilmesi açısından daha yerinde olabilir.

Sonuç olarak, köpek sperma sulandırıcısına özellikle 1 µg/ml dozda SeNP ilavesi yapılmış Tris bazlı sulandırıcı ile bazı spermatolojik parametrelerde bir iyileşme gözlendi. Bu tez çalışması sonuçları, köpeklerde spermatolojik parametreleri iyileştirmek için nano teknoloji ürünlerinin sperma dondurma protokollerine kolayca dahil edilebileceğini ortaya koymuştur.



KAYNAKÇA

- Abdelnour, S. A., Hassan, M. A., Mohammed, A. K., Alhimaiddi, A. R., Al-Gabri, N., Al-Khalidi, K. O., & Swelum, A. A. (2020). The effect of adding different levels of curcumin and its nanoparticles to extender on post-thaw quality of cryopreserved rabbit sperm. *Animals*. 10(9), 1508.
- Agarwal, A., Prabakaran, S. A., & Said, T. M. (2005). Prevention of oxidative stress injury to sperm. *Journal of andrology*. 26(6), 654-660.
- Agarwal, A., & Said, T. M. (2005). Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU international*. 95(4), 503-507.
- Ahsan, U., Kamran, Z., Raza, I., Ahmad, S., Babar, W., Riaz, M. H., & Iqbal, Z. (2014). Role of selenium in male reproduction—A review. *Animal reproduction science*. 146(1-2), 55-62.
- Al-Mutary, G. M. (2020). Use of antioxidants to augment semen efficiency during liquid storage and cryopreservation in livestock animals: a review. *Journal of King Saud University-Science*.
- Albanese, A., Tang, P. S., & Chan, W. C. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*. 14, 1-16.
- Alkmin, D. V., Martinez-Alborcia, M. J., Parrilla, I., Vazquez, J. M., Martinez, E. A., & Roca, J. (2013). The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the Sperm-Sus-Halomax. *Theriogenology*. 79(9), 1294-1300.
- Amidi, F., Pazhohan, A., Nashtaei, M. S., Khodarahmian, M., & Nekoonam, S. (2016). The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and tissue banking*. 17(4), 745-756.
- Ashrafi, I., Kohram, H., Najjian, H., Bahreini, M., & Poorhamdollah, M. (2011). Protective effect of melatonin on sperm motility parameters on liquid storage of ram semen at 5°C. *African Journal of Biotechnology*. 10(34), 6670-6674.
- Asmus, K. D., Bensasson, R. V., Bernier, J. L., Houssin, R., & Land, E. J. (1996). One-electron oxidation of ergothioneine and analogues investigated by pulse radiolysis: redox reaction involving ergothioneine and vitamin C. *Biochemical Journal*. 315(2), 625-629.
- Badouard, C., Ménéz, Y., Panteix, G., Ravanat, J. L., Douki, T., Cadet, J., & Favier, A. (2008). Determination of new types of DNA lesions in human sperm. *Zygote*. 16(1), 9.
- Baiomy, A. A., Mohamed, A. E. A., & Mottelib, A. A. (2009). Effect of dietary selenium and vitamin E supplementation on productive and reproductive performance in rams. *Journal of Veterinary Medical Research*. 19(1), 39-43.
- Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2010). Effect of vitamin E and Mn²⁺ on the thiol status of cattle bull spermatozoa under induced oxidative stress. *Animal Science Papers and Reports*. 28(4), 335-345.
- Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary medicine international*.
- Barber, S. J., Parker, H. M., & McDaniel, C. D. (2005). Broiler breeder semen quality as affected by trace minerals in vitro. *Poultry science*. 84(1), 100-105.
- Barkalina, N., Jones, C., Kashir, J., Coote, S., Huang, X., Morrison, R., ... & Coward, K. (2014). Effects of mesoporous silica nanoparticles upon the function of mammalian sperm in vitro. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 10(4), 859-870.
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., ... & Tainturier, D. (2012). The advantages of using a combination of LDL and glutamine in

- comparison with TRIS egg yolk and Equex[®] STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Research in veterinary science*. 93(1), 440-447.
- Bencharif, D., & Dordas-Perpinya, M. (2020). Canine semen cryoconservation: Emerging data over the last 20 years. *Reproduction in Domestic Animals*. 55, 61-65.
- Benhenia, K., Rahab, H., Smadi, M. A., Benmakhlouf, H., Lamara, A., Idres, T., & Iguer-Ouada, M. (2018). Beneficial and harmful effects of cyclodextrin-vitamin E complex on cryopreserved ram sperm. *Animal reproduction science*. 195, 266-273.
- Bhanmeechao, C., Srisuwatanasagul, S., Prapaiwan, N., & Ponglowhapan, S. (2018). Reproductive aging in male dogs: the epididymal sperm defects and expression of androgen receptor in reproductive tissues. *Theriogenology*. 108, 74-80.
- Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C., & Sirard, M. A. (2001). Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*. 56(2), 275-286.
- Bousseau, S., Brillard, J. P., Marquant-Le Guienne, 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(5), 699-706.
- Bray, T. M., & Bettger, W. J. (1990). The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*. 8(3), 281-291.
- Bréque, C., Surai, P., & Brillard, J. P. (2003). Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 66(3), 314-323.
- Brown, D. V., & Senger, P. L. (1977). Glutathione peroxidase in bovine ejaculated semen, seminal plasma, and epididymal spermatozoa. *Journal Reprod. Fert.* 50, 117-118.
- Bucak, M. N., & Tekin, N. (2007). Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54(1), 67-72.
- Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sariözkan, S., Başpınar, N., Taşpınar, M., Çoyan, K., ... & Öztuna, D. (2010). Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*. 61(3), 248-253.
- Chatterjee, S., & Gagnon, C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 59(4), 451-458.
- Chiachun, T., Hong, C., & Haifun, R. (1991). The effects of selenium on gestation, fertility, and offspring in mice. *Biological trace element research*. 30(3), 227-231.
- Cnubben, N. H., Rietjens, I. M., Wortelboer, H., van Zanden, J., & van Bladeren, P. J. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental toxicology and pharmacology*. 10(4), 141-152.
- Combs Jr, G. F., & Combs, S. B. (1986). *The role of selenium in nutrition*. Orlando FL: Academic Press.
- Curry, M. R., & Watson, P. F. (1994). Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*. 31(1), 39-46.
- Çoyan, K., Başpınar, N., Bucak, M. N., & Akalın, P. P. (2011). Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. *Cryobiology*. 63(1), 1-6.
- Dahl, T. A., Midden, W. R., & Hartman, P. E. (1988). Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damage. *Photochemistry and Photobiology*. 47(3), 357-

- Davis, T. Z., Tiwary, A. K., Stegelmeier, B. L., Pfister, J. A., Panter, K. E., & Hall, J. O. (2017). Comparative oral dose toxicokinetics of sodium selenite and selenomethionine. *Journal of Applied Toxicology*. 37(2), 231-238.
- Dimitrov, S. G., Atanasov, V. K., Surai, P. F., & Denev, S. A. (2007). Effect of organic selenium on turkey semen quality during liquid storage. *Animal Reproduction Science*. 100(3-4), 311-317.
- Dorostkar, K., Alavi-Shoushtari, S. M., & Mokarizadeh, A. (2012). Effects of in vitro selenium addition to the semen extender on the spermatozoa characteristics before and after freezing in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). In *Veterinary Research Forum*. 3(4), 263-268.
- Dündar, Y., & Aslan, R. (1999). *Bir antioksidan olarak vitamin E. Genel Tıp Dergisi*. 9(3), 109-116.
- Edens, F. W., & Sefton, A. E. (2009). Sel-Plex® improves spermatozoa morphology in broiler breeder males. *Int J Poult Sci*. 8(9), 853-861.
- Eid, Y., Ebeid, T., & Younis, H. (2006). Vitamin E supplementation reduces dexamethasone-induced oxidative stress in chicken semen. *British poultry science*. 47(3), 350-356.
- Eilts, B. E. (2005). Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*, 64(3), 685-691.
- Evenson, D. P., Larson, K. L., & Jost, L. K. (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of andrology*. 23(1), 25-43.
- Fahrig, B. M. (2003). *Cryopreservation by Pellet Freezing of Epididymal and Ejaculated Spermatozoa from Male Dogs*. Master's thesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, B. S. Louisiana State University, USA.
- Falchi, L., Galleri, G., Dore, G. M., Zedda, M. T., Pau, S., Bogliolo, L., ... & Ledda, S. (2018a). Effect of exposure to CeO₂ nanoparticles on ram spermatozoa during storage at 4°C for 96 hours. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 16(1), 1-10.
- Falchi, L., Khalil, W. A., Hassan, M., & Marei, W. F. (2018b). Perspectives of nanotechnology in male fertility and sperm function. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 6(2), 265-269.
- Farstad, W. (1996). Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*. 42(1-4), 251-260.
- Farstad, W. (2009). Cryopreservation of canine semen—new challenges. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 336-341.
- Fattman, C. L., Schaefer, L. M., & Oury, T. D. (2003). Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine*. 35(3), 236-256.
- Feldman, E. C., & Nelson, R. W. (1996). *Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. Philadelphia: WB Saunders*.
- Flowers, W. L. (2009). Selection for boar fertility and semen quality—the way ahead. *Society of Reproduction and Fertility*. 66, 67-78.
- Forsberg, L. C. 2014. “Regulations and Recommendations for International Shipment of Chilled and Frozen Canine Semen”. *International Veterinary Information Service*. www.ivis.org.
- Fouad, W. F., & Ashour, A. F. (2021). Selenium and Zinc as Supplements to Extenders Frozen

- Semen for Improving Sperm Characteristics during Cryopreservation. *Journal of Animal and Poultry Production*. 12(2), 71-77.
- Freshman, J. L. (2001). Clinical management of the subfertile stud dog. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 31(2), 259-269.
- Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M. A., Garcia-Vazquez, F. A., & Gardon, J. C. (2011). Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*. 62(1), 40-46.
- Gagnon, C., Iwasaki, A., DE LAMIRANDE, E. V. E., & Kovalski, N. (1991). Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 637(1), 436-444.
- Ghafarizadeh, A. A., Vaezi, G., Shariatzadeh, M. A., & Malekirad, A. A. (2018). Effect of in vitro selenium supplementation on sperm quality in asthenoteratozoospermic men. *Andrologia*. 50(2), 1-7.
- Ghorbani, M., Vatannejad, A., Khodadadi, I., Amiri, I., & Tavailani, H. (2016). Protective effects of glutathione supplementation against oxidative stress during cryopreservation of human spermatozoa. *Cryoletters*. 37(1), 34-40.
- Giaretta, E., Estrada, E., Bucci, D., Spinaci, M., Rodríguez-Gil, J. E., & Yeste, M. (2015). Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*. 83(3), 399-407.
- Gilmore, J. A., Liu, J., Woods, E. J., Peter, A. T., & Critser, J. K. (2000). Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Human Reproduction*. 15(2), 335-343.
- Gosálvez, J., López-Fernández, C., Fernández, J. L., Gouraud, A., & Holt, W. V. (2011). Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Molecular Reproduction and Development*. 78(12), 951-961.
- Guemouri, L. Y. B. C. G. G., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G., & Siest, G. (1991). Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clinical chemistry*. 37(11), 1932-1937.
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*. 41(12), 1819-1828.
- Han, J. S. (1992). Effects of various chemical compounds on spontaneous and hydrogen peroxide-induced reversion in strain TA104 of *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 266(2), 77-84.
- Hartman, P. E., Hartman, Z., & Ault, K. T. (1990). Scavenging of singlet molecular oxygen by imidazole compounds: high and sustained activities of carboxy terminal histidine dipeptides and exceptional activity of imidazole-4-acetic acid. *Photochemistry and Photobiology*. 51(1), 59-66.
- Haşegan, I., Şonea, A., Matei, M., Vintilă, L., Ion, C., & Bîrtoiu, A. (2012). Semen Collection, Assessment and Processing for in vitro Fertilization in Dog—a Review. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*. 45(1), 163-171.
- Hatamoto, L. K., Sobrinho, C. B., Nichi, M., Barnabe, V. H., Barnabe, R. C., & Cortada, C. N. M. (2006). Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermiogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology*. 66(6-7), 1610-1614.

- Heath, H., Lawson, A., & Rimington, C. (1951). 488. 2-Mercaptoglyoxalines. Part I. The synthesis of ergothioneine. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 2215-2217.
- Hellander, J. C., Samper, J. C., & Crabo, B. G. (1991). Fertility of a stallion with low sperm motility and a high incidence of an unusual sperm tail defect. *The Veterinary Record*. 128(19), 449-451.
- Hill, K. E., Xia, Y., Åkesson, B., Boeglin, M. E., & Burk, R. F. (1996). Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium-deficient and selenium-supplemented Chinese subjects. *The Journal of Nutrition*. 126(1), 138-145.
- Holmes, R. P., Goodman, H. O., Shihabi, Z. K., & Jarow, J. P. (1992). The taurine and hypotauroine content of human semen. *Journal of Andrology*. 13(3), 289-292.
- Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 53(1), 47-58.
- Horky, P., Jancikova, P., Sochor, J., Hynek, D., Chavis, G. J., Ruttkay-Nedecky, B., ... & Kizek, R. (2012). Effect of organic and inorganic form of selenium on antioxidant status of breeding boars ejaculate revealed by electrochemistry. *International Journal of Electrochemical Science*. 7(10), 9643-9657.
- Hozyen, H. F., El-Shamy, A. A., & Farghali, A. A. (2019). In vitro supplementation of nano selenium minimizes freeze-thaw induced damage to ram spermatozoa. *International Journal of Veterinary Science*. 8(4), 249-254.
- Hu, J. H., Zan, L. S., Zhao, X. L., Li, Q. W., Jiang, Z. L., Li, Y. K., & Li, X. (2010). Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. *Journal of Animal Science*. 88(5), 1657-1662.
- Iguer-Ouada, M., & Verstegen, J. P. (2001). Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis. *Theriogenology*. 55(5), 1143-1158.
- Ismail, A. A., Abdel-Khalek, A. E., Khalil, W., & El-Hairiry, M. A. (2020b). Influence of adding green synthesized gold nanoparticles to tris-extender on sperm characteristics of cryopreserved goat semen. *Journal of Animal and Poultry Production*. 11(2), 39-45.
- Ismail, A. A., Abdel-Khalek, A. K. E., Khalil, W. A., Yousif, A. I., Saadeldin, I. M., Abomughaid, M. M., & El-Hairiry, M. A. (2020a). Effects of mint, thyme, and curcumin extract nanoformulations on the sperm quality, apoptosis, chromatin decondensation, enzyme activity, and oxidative status of cryopreserved goat semen. *Cryobiology*. 97, 144-152.
- Jackson, R. E., Bormann, C. L., Hassun, P. A., Rocha, A. M., Motta, E. L., Serafini, P. C., & Smith, G. D. (2010). Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility*. 94(7), 2626-2630.
- Jahanbin, R., Yazdanshenas, P., Amin Afshar, M., Mohammadi Sangcheshmeh, A., Varnaseri, H., Chamani, M., ... & Bakhtiarizadeh, M. R. (2015). Effect of zinc nano-complex on bull semen quality after freeze-thawing process. *Animal Production*. 17(2), 371-380.
- Jang, H. Y., Kim, Y. H., Kim, B. W., Park, I. C., Cheong, H. T., Kim, J. T., ... & Yang, B. K. (2010). Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*. 45(6), 943-950.
- Jeong, Y. J., Kim, M. K., Song, H. J., Kang, E. J., Ock, S. A., Kumar, B. M., ... & Rho, G. J. (2009). Effect of α -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*. 58(2), 181-189.
- Jeulin, C., Soufir, J. C., Weber, P., Laval-Martin, D., & Calvayrac, R. (1989). Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Research*. 24(2), 185-196.

- Johnston, S. D. (1989). *New canine semen evaluation techniques for the small animal practitioner. Proceedings of the Annual Meeting, Society for Theriogenology*, Coeur d'Alene, ID.
- Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R., & Olson, P. N. S. (2001). *Semen collection, evaluation and preservation, Canine and Feline Theriogenology*, W.B. Saunders.
- Kadirvel, G., Kumar, S., & Kumaresan, A. (2009). Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Animal Reproduction Science*. 114(1-3), 125-134.
- Kalthur, G., Adiga, S. K., Upadhy, D., Rao, S., & Kumar, P. (2008). Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. *Fertility and Sterility*. 89(6), 1723-1727.
- Kaur, R., & Kaur, K. (2000). Effects of dietary selenium (SE) on morphology of testis and cauda epididymis in rats. *Indian journal of physiology and pharmacology*. 44(3), 265-272.
- Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan, A. E., & Hassan, M. A. (2019). Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. *Theriogenology*. 126, 121-127.
- Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan, A. E., Hassan, M. A., & Mohey-Elsaeed, O. (2018). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 6, 49-56.
- Kim, A. Y., Ha, J. H., & Park, S. N. (2017). Selective release system for antioxidative and anti-inflammatory activities using H₂O₂-responsive therapeutic nanoparticles. *Biomacromolecules*. 18(10), 3197-3206.
- Koderle, M., Aurich, C., & Schäfer-Somi, S. (2009). The influence of cryopreservation and seminal plasma on the chromatin structure of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 72(9), 1215-1220.
- Lancôt, C. M., Cresswell, T., Callaghan, P. D., & Melvin, S. D. (2017). Bioaccumulation and biodistribution of selenium in metamorphosing tadpoles. *Environmental science & technology*. 51(10), 5764-5773.
- Larsen, R. E. (1980). Infertility in the male dog. *Morrow, DA Current Therapy in Theriogenology*, Philadelphia, Saunder.
- Lasso, J. L., Noiles, E. E., Alvarez, J. G., & Storey, B. T. (1994). Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *Journal of Andrology*. 15(3), 255-265.
- Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., & Parks, J. E. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*. 172, 1-9.
- Lee, C. H., & Cho, Y. H. (1999). Aspects of mammalian spermatogenesis: electrophoretical analysis of protamines in mammalian species. *Molecules and cells*. 9(5), 556-559.
- Leibo, S. P. (2004). *The early history of gamete cryobiology. In Life in the Frozen State*. London: CRC Press.
- Leonhard-Marek, S. (2000). Why do trace elements have an influence on fertility? *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere*. 28(2), 60-65.
- Lewis, S. E. M., & Aitken, R. J. (2005). DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell and Tissue Research*. 322(1), 33-41.

- Li, T. K. (1975). The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biology of Reproduction*. 12(5), 641-646.
- Liu, X., Xu, Y., Liu, F., Pan, Y., Miao, L., Zhu, Q., & Tan, S. (2021). The feasibility of antioxidants avoiding oxidative damages from reactive oxygen species in cryopreservation. *Frontiers in Chemistry*. 9, 64.
- Love, C. C., Thompson, J. A., Lowry, V. K., & Varner, D. D. (2002). Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology*. 57(3), 1135-1142.
- Maidin, M. S., Adanan, N. F., Aminudin, M. T., & Tawang, A. (2014). In vitro supplements improves motility and progressive score of spermatozoa in jermasia goats. *APCBEE Procedia*. 8, 329-333.
- Marai, I. F. M., El-Darawany, A. H., Ismail, E., & Abdel-Hafez, M. A. M. (2009). Reproductive and physiological traits of Egyptian Suffolk rams as affected by selenium dietary supplementation and housing heat radiation effects during winter of the sub-tropical environment of Egypt. *Archives Animal Breeding*. 52(4), 402-409.
- Martins-Bessa, A., Rocha, A., & Mayenco-Aguirre, A. (2007). Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. *Theriogenology*. 68(8), 1088-1096.
- Martínez, A. P. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*. 82, 209-224.
- Mazur, P., & Fuller, B. J. (2004). *Life in the frozen state. Principles of Cryobiology*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., & Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*. 57(1), 327-344.
- Michael, A. J., Alexopoulos, C., Pontiki, E. A., Hadjipavlou-Litina, D. J., Saratsis, P., Ververidis, H. N., & Boscós, C. M. (2009). Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 112(1-2), 119-135.
- Molnár, A., Sarlós, P., Fánási, G., Rátky, J., Nagy, S., & Kovács, A. (2001). A sperm tail defect associated with infertility in a goat—case report. *Acta Veterinaria Hungarica*. 49(3), 341-348.
- Morris, I. D., Ilott, S., Dixon, L., & Brison, D. R. (2002). The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction*. 17(4), 990-998.
- Mousavi, S. M., Towhidi, A., Zhandi, M., Amoabediny, G., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Sharafi, M., & Hussaini, S. M. H. (2019). Comparison of two different antioxidants in a nano lecithin-based extender for bull sperm cryopreservation. *Animal reproduction science*. 209, 106171.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: Cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 57, 1695– 1706.
- Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A., & Van Remmen, H. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine*. 43(4), 477-503.
- Nadri, T., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Martínez-Pastor, F., Mousavi, M., Noei, R., ... & Sangcheshmeh, A. M. (2019). Lecithin nanoparticles enhance the cryosurvival of caprine sperm. *Theriogenology*. 133, 38-44.

- Nair, S. J., Brar, A. S., Ahuja, C. S., Sangha, S. P. S., & Chaudhary, K. C. (2006). A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Animal Reproduction Science*. 96(1-2), 21-29.
- Nateq, S., Moghaddam, G., Alijani, S., & Behnam, M. (2020). The effects of different levels of Nano selenium on the quality of frozen-thawed sperm in ram. *Journal of Applied Animal Research*. 48(1), 434-439.
- Neagu, V. R., García, B. M., Sandoval, C. S., Rodríguez, A. M., Ferrusola, C. O., Fernández, L. G., ... & Peña, F. J. (2010). Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology*. 73(5), 645-650.
- Neild, D. M., Brouwers, J. F. H. M., Colenbrander, B., Agüero, A., & Gadella, B. M. (2005). Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*. 72(2), 230-238.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 311(5761), 622-627.
- Niki, E. (1987). Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*. 44(2-4), 227-253.
- Oettlé, E. E. (1990). *Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study*. Ph.D. thesis, University of Cape Town.
- Olson, P. N., Behrendt, M. D., Amann, R. P., Weiss, D. E., Bowen, R. A., Nett, T. M., & McGarry, J. D. (1987). Concentrations of carnitine in the seminal fluid of normospermic, vasectomized, and castrated dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 48(8), 1211-1215.
- Ortiz, I., Urbano, M., Dorado, J., Morrell, J. M., Al-Essawe, E., Johannisson, A., & Hidalgo, M. (2017). Comparison of DNA fragmentation of frozen-thawed epididymal sperm of dogs using Sperm Chromatin Structure Analysis and Sperm Chromatin Dispersion test. *Animal reproduction science*. 187, 74-78.
- Panke, E. S., Rollag, M. D., & Reiter, R. J. (1979). Pineal melatonin concentrations in the Syrian hamster. *Endocrinology*. 104(1), 194-197.
- Parks, J. E., & Lynch, D. V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 29(2), 255-266.
- Partyka, A., Łukaszewicz, E., & Nizański, W. (2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*. 77(8), 1497-1504.
- Pena, F. J., Núñez-Martínez, I., & Morán, J. M. (2006). Semen technologies in dog breeding: an update. *Reproduction in Domestic Animals*. 41, 21-29.
- Peng, D., Zhang, J., Liu, Q., & Taylor, E. W. (2007). Size effect of elemental selenium nanoparticles (Nano-Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 101(10), 1457-1463.
- Peris, S. I., Bilodeau, J. F., Dufour, M., & Bailey, J. L. (2007). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular Reproduction and Development*. 74(7), 878-892.
- Pesch, S., & Hoffmann, B. (2007). Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie-Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology*. 4(2), 101-105.

- Pillich, R. T., Scarsella, G., & Risuleo, G. (2005). Reduction of apoptosis through the mitochondrial pathway by the administration of acetyl-L-carnitine to mouse fibroblasts in culture. *Experimental Cell Research*. 306(1), 1-8.
- Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164(4172), 666-666.
- Ponglowhapan, S., Essén-Gustavsson, B., & Forsberg, C. L. (2004). Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 62(8), 1498-1517.
- Pratt, W. D., Murray, F. A., Conrad, H. R., Moxon, A. L., & Kinder, J. E. (1980). Effects of selenium supplementation on bull sperm metabolism in vitro. *Theriogenology*. 13(5), 369-379.
- Quinn, P. J., Chow, P., & With, I. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*. 60, 403–407.
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., & Rodriguez-Gil, J. E. (2004). Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*. 61(4), 673-690.
- Ramadan, T. A., Taha, T. A., Samak, M. A., & Hassan, A. (2009). Effectiveness of exposure to longday followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goats during breeding and non-breeding seasons. *Theriogenology*. 71(3), 458-468.
- Reiter, R. J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., ... & AcuñaCastroviejo, D. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*. 18(1), 1-11.
- Rezaeian, Z., Yazdekhasti, H., Nasri, S., Rajabi, Z., Fallahi, P., & Amidi, F. (2016). Effect of selenium on human sperm parameters after freezing and thawing procedures. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 5(6), 462-466.
- Rezvanfar, M. A., Rezvanfar, M. A., Shahverdi, A. R., Ahmadi, A., Baeeri, M., Mohammadirad, A., & Abdollahi, M. (2013). Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 266(3), 356-365.
- Robert, M. A., Jayaprakash, G., Pawshe, M., Tamilmani, T., & Sathiyabarathi, M. (2016). Collection and evaluation of canine semen-A review. *International Journal of Science*. 1586(5), 1586-1595.
- Rodenas, C., Parrilla, I., Roca, J., Martinez, E. A., & Lucas, X. (2014). Effects of rapid cooling prior to freezing on the quality of canine cryopreserved spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*. 60(5), 355-361.
- Rota, A., Manuali, E., Caire, S., & Appino, S. (2008). Severe tail defects in the spermatozoa ejaculated by an English bulldog. *Journal of Veterinary Medical Science*. 70(1), 123-125.
- Saadeldin, I. M., Khalil, W. A., Alharbi, M. G., & Lee, S. H. (2020). The Current Trends in Using Nanoparticles, Liposomes, and Exosomes for Semen Cryopreservation. *Animals*. 10(12), 2281.
- Safa, S., Moghaddam, G., Jozani, R. J., Kia, H. D., & Janmohammadi, H. (2016). Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. *Animal Reproduction Science*. 174, 100-106.
- Sánchez-Calabuig, M. J., Maillo, V., Beltrán-Breña, P., de la Fuente Martínez, J., Galera-Carrillo, S., Pérez-Gutiérrez, J. F., & Pérez-Cerezales, S. (2017). Cryopreservation of canine sperm using egg yolk and soy bean based extenders. *Reproductive*

biology. 17(3), 233-238.

- Sánchez-Gutiérrez, M., García-Montalvo, E. A., Izquierdo-Vega, J. A., & Del Razo, L. M. (2008). Effect of dietary selenium deficiency on the in vitro fertilizing ability of mice spermatozoa. *Cell Biology and Toxicology*. 24(4), 321-329.
- Sanders, D. E. (1984). Use of selenium in problem cattle herds. *Modern Veterinary Practice*. 65(2), 136-138.
- Sanocka, D., Miesel, R., Jędrzejczak, P., Chełmonska-Soyta, A., & Kurpisz, M. (1997). Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems on human semen; association with male infertility. *International Journal of Andrology*. 20(5), 255-264.
- Sarkar, B., Bhattacharjee, S., Daware, A., Tribedi, P., Krishnani, K. K., & Minhas, P. S. (2015). Selenium nanoparticles for stress-resilient fish and livestock. *Nanoscale research letters*. 10(1), 1-14.
- Seager, S. W. J. (1969). Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest*. 17, 6-10.
- Searle, A. J., & Tomasi, A. (1982). Hydroxyl free radical production in iron-cysteine solutions and protection by zinc. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 17(2), 161-166.
- Segerson, E. C., & Johnson, B. H. (1980). Selenium and reproductive function in yearling Angus bulls. *Journal of animal science*. 51(2), 395-401.
- Seremak, B., Udala, J., & Lasota, B. (1999). Influence of selenium additive on ram semen freezing quality. *Electron J Pol Agric Univ*. 2(1).
- Shahin, M. A., Khalil, W. A., Saadeldin, I. M., Swelum, A. A. A., & El-Hairiry, M. A. (2020). Comparison between the effects of adding vitamins, trace elements, and nanoparticles to shotor extender on the cryopreservation of dromedary camel epididymal spermatozoa. *Animals*. 10(1), 78.
- Shamsi, M. B., Venkatesh, S., Tanwar, M., Singh, G., Mukherjee, S., Malhotra, N., ... & Dada, R. (2010). Comet assay: a prognostic tool for DNA integrity assessment in infertile men opting for assisted reproduction. *Indian Journal of Medical Research*. 131(5), 675.
- Sharma, R. K., & Agarwal, A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 48(6), 835-850.
- Shi, L. G., Yang, R. J., Yue, W. B., Xun, W. J., Zhang, C. X., Ren, Y. S., ... & Lei, F. L. (2010). Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. *Animal Reproduction Science*. 118(2-4), 248-254.
- Sierens, J., Hartley, J. A., Campbell, M. J., Leathem, A. J. C., & Woodside, J. V. (2002). In vitro isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in sperm. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 22(3), 227-234.
- Sikka, S. C., Rajasekaran, M., & Hellstrom, W. J. (1995). Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology*. 16(6), 464-468.
- Soler, C., Alambiaga, A., Martí, M. A., García-Molina, A., Valverde, A., Contell, J., & Campos, M. (2017a). Dog sperm head morphometry: its diversity and evolution. *Asian Journal of Andrology*. 19(2), 149-153.
- Soler, C., Valverde, A., Bompard, D., Fereidounfar, S., Sancho, M., Yániz, J., & Korneenko-Zhilyaev, Y. (2017b). New methods of semen analysis by casa. *Agricultural Biology*. 52(2), 232-241.
- 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. *Reproductive Toxicology*. 23(2), 226-231.

- Srivastava, A. K., Kumar, S., & Mathur, A. K. (2011). Cryo-damage of canine semen and its minimization: present scenario. *Indian Journal of Canine Practice Volume*, 3(2), 90-98.
- Stănescu, M., & Birțoiu, A. I. (2010). Comparative studies of canine semen freezing protocols. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine*. 67(2): 209-215.
- Stevanović, M., Bračko, I., Milenković, M., Filipović, N., Nunić, J., Filipič, M., & Uskoković, D. P. (2014). Multifunctional PLGA particles containing poly (l-glutamic acid)-capped silver nanoparticles and ascorbic acid with simultaneous antioxidative and prolonged antimicrobial activity. *Acta Biomaterialia*. 10(1), 151-162.
- Strzezek, R., Szemplinska, K., Filipowicz, K., & Kordan, W. (2015). Semen characteristics and selected biochemical markers of canine seminal plasma in various seasons of the year. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 18(1).
- Surai, P. F., Brillard, J. P., Speake, B. K., Blesbois, E., Seigneurin, F., & Sparks, N. H. C. (2000). Phospholipid fatty acid composition, vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation of duck spermatozoa. *Theriogenology*. 53(5), 1025-1039.
- Surai, P. F., Cerolini, S., Wishart, G. J., Speake, B. K., Noble, R. C., & Sparks, N. H. (1998). Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. *Avian and Poultry Biology Reviews*. 9(1), 11-23.
- Talebi, E., Ghasemi, F., & Haghigat Jahromi, M. (2014). Effect of Selenium nanoparticles antioxidant on sperm parameters in mature and adult rats. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 4(1), 111-119.
- Tareq, K. M. A., Akter, Q. S., Takagi, Y., Hamano, K. I., Sawada, T., & Tsujii, H. (2010). Effect of selenium and vitamin E on acrosome reaction in porcine spermatozoa. *Reproductive Medicine and Biology*. 9(2), 73-81.
- Tarze, A., Dauplais, M., Grigoras, I., Lazard, M., Ha-Duong, N. T., Barbier, F., ... & Plateau, P. (2007). Extracellular production of hydrogen selenide accounts for thiol-assisted toxicity of selenite against *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 282(12), 8759-8767.
- Thirumala, S., Ferrer, M. S., Al-Jarrah, A., Eilts, B. E., Paccamonti, D. L., & Devireddy, R. V. (2003). Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents. *Cryobiology*. 47(2), 109-124.
- Threlfall, W.R. (2003). *Semen collection and evaluation, The practical veterinarian: Small Animal Theriogenology*. St. Louis: Butterworth Heineman.
- Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human Reproduction Update*. 14(3), 243-258.
- Urbano, M., Dorado, J., Ortiz, I., Morrell, J. M., Demyda-Peyrás, S., Gálvez, M. J., ... & Hidalgo, M. (2013). Effect of cryopreservation and single layer centrifugation on canine sperm DNA fragmentation assessed by the sperm chromatin dispersion test. *Animal reproduction science*. 143(1-4), 118-125.
- Urbano, M., Ortiz, I., Dorado, J., & Hidalgo, M. (2017). Identification of sperm morphometric subpopulations in cooled-stored canine sperm and its relation with sperm DNA integrity. *Reproduction in Domestic Animals*. 52(3), 468-476.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., & Flohé, L. (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*. 285(5432), 1393-1396.
- Uysal, O., & Bucak, M. N. (2007). Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Veterinaria Brno*. 76(3), 383-390.

- Van der Horst, G., & Maree, L. (2010). SpermBlue[®]: a new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis. *Biotechnic & Histochemistry*. 84(6), 299-308.
- Varesi, S., Vernocchi, V., Morselli, M. G., & Luvoni, G. C. (2014). DNA integrity of fresh and frozen canine epididymal spermatozoa. *Reproductive Biology*. 14(4), 257-261.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57(1), 149-179.
- Wang, A. W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D. J., & Loughlin, K. R. (1997). Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*. 49(6), 921-925.
- Wu, T. W., Hashimoto, N., Wu, J., Carey, D., Li, R. K., Mickle, D. A., & Weisel, R. D. (1990). The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells. *Biochemistry and Cell Biology*. 68(10), 1189-1194.
- Yániz, J. L., Silvestre, M. A., Santolaria, P., & Soler, C. (2018). CASA-Mot in mammals: an update. *Reproduction, Fertility and Development*. 30(6), 799-809.
- Yoon, S. J., Kwon, W. S., Rahman, M. S., Lee, J. S., & Pang, M. G. (2015). A novel approach to identifying physical markers of cryo-damage in bull spermatozoa. *PLoS One*. 10(5), 1-12.
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. 74(1), 139-162.
- Zeliha, T., Yetkin, G., Ilknur, O., Burhan, A., Selami, G., & Ismet, Y. (2015). Synthesis, antioxidant and anti-microbial properties of two organoselenium compounds. 28(2).
- Zhang, J., Robinson, D., & Salmon, P. (2006). A novel function for selenium in biological system: selenite as a highly effective iron carrier for Chinese hamster ovary cell growth and monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*. 95(6), 1188-1197.
- Zini, A., De Lamirande, E., & Gagnon, C. (1993). Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase-and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology*. 16(3), 183-188.

Etik Kurul Kararı



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



Sayı : 68489742-604.01.03-E.12335
Konu : HADYЕК izin onayı gerekmediđi hk.

10/06/2019

PROF. DR. MESUT ÇEVİK
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ

Sahipli Hayvanlar üzerinde Araştırma amaçlı çalışma yapmak üzere başvuran Prof. Dr. Mesut ÇEVİK'in 2019/29 Kabul nolu "**Köpek Spermasının Dondurulmasında Farklı Selenyum Formlarının Kriyoprotektif Etkilerinin Araştırılması: Nanopartikül Selenyum ve Sodyum Selenit Karşılaştırması**" başlıklı projesi 31.05.2019 tarihli Kurul toplantısında ÖMU-HADYЕК'in yönergesi kapsamında değerlendirilmiştir. Çalışmanın yapılması için HADYЕК kapsamında izin gerekmemektedir.
Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır

Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ
HADYЕК Başkanı

Adres: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Rektörlüğü
Telefon: 0362 312 19 19 Faks: 0362 457 60 91
Elektronik Ağ: <http://www.omu.edu.tr/>

Kep Adresi: omu@hs01.kep.tr

Hayriye ÇELİK
Dahili Tel: 2588

5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'na uygun olarak Güvenli Elektronik İmza ile üretilmiştir.
Evrak teyidi <https://ebysorgu.omu.edu.tr> adresinden 801T-APSM-09BZ kodu ile yapılabilir.

ÖZ GEÇMİŞ

Burcu Esin, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2015 yılında mezun oldu. 2016 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Lisansüstü Doktora programına girmiştir. 2018 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır. Eğitim hayatına Araştırma Görevlisi olarak devam etmektedir.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0002-5728-1478

Yayınlar:

1. B. ESİN, M. AKAR, M. D. GENÇ, C. KAYA & M. ÇEVİK, The Effects of Fast and Slow Thawing on Spermatological Parameters and Detect of Chromatin Condensation by Toluidine Blue Staining in Frozen-Thawed Bull Sperm, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2022, 1300-6045.
2. M. ÇEVİK, O. ERGİN & B. ESİN, Effects of a single dose HCG administration on the induction of ovulation, follicular dynamics, uterine changes and pregnancy outcomes in mares during the breeding season, Thai J Vet Med., 2022, 01256491, 52, 2, 259-265.
3. C. KAYA, M. AKAR, B. ESİN & M. ÇEVİK, The Use Of Different Staining Methods In The Evaluation Of Frozen-Thawed Cauda Epididymal Ram Sperm Morphology, Spermova, 2022, 2308-4928, 12, 1, 33-38.
4. A. ÖZKÖK, B. ESİN & M. SELÇUK, Bal Arısı Sperma Sulandırıcısına Katılan Shilajitin Spermanın Dondurulması Üzerine Etkileri, KSU J. Agric Nat, 2022, 2619-9149.
5. E. AKAL, M. SELÇUK, B. ESİN, M. AKAR & C. KAYA, Comparison of the effects of different thawing methods on post-thaw sperm characteristics of buffalo bull semen, Thai J Vet Med., 2021, 0125-6491.
6. C. KAYA, M. AKAR & B. ESİN, Diseases Transmission Via Semen: Importance and Control Strategies, Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences, 2021, 2548-0006.
7. A. ÖZKÖK & B. ESİN, Effects of antioxidant use on semen storage in honey bees, International Journal of Science Letters, 2021, 2319-7064.

8. M. SELÇUK, E. AKAL, B. ESİN, M. Y. NİZAM & M. D. GENÇ, Comparative evaluation of the effects of different thawing methods on bull sperm characteristics with computer-assisted semen analysis, Turkish Journal Of Veterinary And Animal Sciences, 2020, 1303-6181, 44.
9. B. ESİN & M. ÇEVİK, Memelilerde Cinsiyetin Tayini ve Değerlendirilmesi / Gender Determination and Evaluation in Mammals, Hayvansal Üretim, 2020, 2645-9043, 61, 1, 63-71.
10. B. ESİN & M. ÇEVİK, Erkek İnfertilitesinde Spermatozoon DNA Hasarının Rolü ve Önemi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2018, 2458-9268, 3, 135-140.
11. M. ÇEVİK, A. KOÇYİĞİT & B. ESİN, Köpek Spermasının Saklanması, Tr Klinikleri, 2018, 978-605-7597-17-5, 2018, 24-31.
12. E. AKAL & B. ESİN, Evcil Hayvan Spermalarının Dondurulmasında Farklı Kanatlı Türü Yumurta Sarılarının Koruyucu Etkileri, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2017, 2458-9268, 2, 1, 51-59.
13. M. ÇEVİK, A. KOÇYİĞİT & B. ESİN, Mandalarda Üreme Performansının Arttırılmasına Yönelik Yaklaşımlar, Türkiye Klinikleri Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Özel Dergisi, 2017, 2149-5718.
14. C. KAYA, B. ESİN, M. AKAR & M. ÇEVİK, A Case Of Alopecia X In A Dog; Sterilization Request, Semen Freezing and Offspring, Sözlü Sunum, Ist INTERNATIONAL 10th NATIONAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION SCIENCE CONGRESS, 28 Eylül 2022, 01 Ekim 2022.
15. B. ESİN, C. KAYA, M. AKAR & M. ÇEVİK, Evaluation of Chromatin Dispersion of Dog Spermatozoa with the Goldcyto Dna Kit: Factors Affecting the Analysis, Sözlü Sunum, Ist INTERNATIONAL 10th NATIONAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION SCIENCE CONGRESS, 28 Eylül 2022, 01 Ekim 2022.
16. A. ÖZKÖK & B. ESİN, EFFECTS OF FEATHER FOLLICLE CYSTS ON REPRODUCTION IN CANARIES, Sözlü Sunum, İSTANBUL INTERNATIONAL MODERN SCIENTIFIC RESEARCH CONGRESS -II, 23 Aralık 2021, 25 Aralık 2021.
17. B. ESİN & M. ÇEVİK, Effect of Sodium Selenite (Na₂SeO₃) on the Motility Parameters of Cryopreserved Dog Spermatozoa, Sözlü Sunum, EDUVET

INTERNATIONAL VETERINARY SCIENCES CONGRESS, 25 Haziran 2021, 27 Haziran 2021.

18. B. ESİN & M. ÇEVİK, Effects of Sodium Selenite Supplementation to Semen Extender on Canine Semen Quality during Short Time Storage, Sözlü Sunum, INTERNATIONAL CONGRESS OF MEDICINE AND HEALTH SCIENCES, 26 Nisan 2021, 28 Nisan 2021, 268 - 273.

19. B. ESİN, C. KAYA & M. AKAR, Viral Diseases Transmission Via Semen and Their Control Strategies in Cattle , Poster Sunumu, International Congress on Biological and Health Sciences, 26 Şubat 2021, 28 Şubat 2021, 325 - 325.

20. B. ESİN, C. KAYA & M. AKAR, Viral Diseases Transmission Via Semen and Their Control Strategies in Cattle , Poster Sunumu, International Congress on Biological and Health Sciences, 26 Şubat 2021, 28 Şubat 2021, 325 - 325.

21. B. ESİN & M. ÇEVİK, BACTERIAL INFECTIONS AFFECTING REPRODUCTIVE PERFORMANCE IN MARES, Sözlü Sunum, 2. ULUSLARARASI 19 MAYIS YENİLİKÇİ BİLİMSEL YAKLAŞIMLAR KONGRESİ, 27 Aralık 2019, 29 Aralık 2019.

22. B. ESİN & M. ÇEVİK, Bacterial infections affecting reproductive performance in mares, Sözlü Sunum, II. ULUSLARARASI 19 MAYIS YENİLİKÇİ BİLİMSEL YAKLAŞIMLAR KONGRESİ, 27 Aralık 2019, 29 Aralık 2019, 978-625-7029-74-2, 486 - 490.

23. B. ESİN, M. SELÇUK & M. AKAR, CONTROL OF REPRODUCTION IN MARES, Poster Sunumu, I. INTERNATIONAL EQUINE MEDICINE AND TRAINING CONGRESS, 21 Mart 2019, 24 Mart 2019, 121 - 122.,

24. M. ÇEVİK, B. ESİN, M. SELÇUK & C. KAYA, Gender Diagnosis in the Preimplante Equine Embryos, Poster Sunumu, I. INTERNATIONAL EQUINE MEDICINE AND TRAINING CONGRESS, 21 Mart 2019, 24 Mart 2019, 123 - 124.

25. C. KAYA, B. ESİN, M. SELÇUK & M. ÇEVİK, Gender Diagnosis in the Preimplante Equine Embryos, Poster Sunumu, I.INTERNATIONALEQUINE MEDICINETRAINING CONGRESS, 21 Mart 2019, 24 Mart 2019.

26. B. ESİN, E. AKAL, M. G. SEZENER, V. E. ERGÜDEN & A. FINDIK, The Determination of Bacterial Loads of Preputial Washing Fluid in Stallion, Sözlü Sunum, I. INTERNATIONAL EQUINE MEDICINE AND TRAINING CONGRESS, 21 Mart 2019, 24 Mart 2019, 62 - 64.

27. B. ESİN & E. AKAL, ERKEK SOKAK HAYVANLARINDA ÜREMENİN DENETLENMESİ, Sözlü Sunum, 3. SOKAK HAYVANLARI REFAHI KONGRESİ, 11 Ekim 2018, 13 Ekim 2018.
28. M. ÇEVİK & B. ESİN, ERKEK İNFERTİLİTESİNDE SPERMATOZOON DNA HASARININ ROLÜ VE ÖNEMİ, Sözlü Sunum, 9. ULUSAL REPRODÜKSİYON VE SUNİ TOHURLAMA BİLİM KONGRESİ, 05 Eylül 2018, 09 Eylül 2018.
29. M. ÇEVİK & B. ESİN, MEMELİLERDE CİNSİYETİN TAYİNİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ, Poster Sunumu, 9. REPRODÜKSİYON VE SUNİ TOHURLAMA BİLİM KONGRESİ, 05 Eylül 2018, 09 Eylül 2018, 46 - 47.
30. B. ESİN & E. AKAL, EVCİL HAYVAN SPERMALARININ DONDURULMASINDA FARKLI KANATLI TÜRÜ YUMURTA SARILARININ KORUYUCU ETKİLERİ, Poster Sunumu, 8. ULUSAL REPRODÜKSİYON VE SUNİ TOHURLAMA BİLİM KONGRESİ, 05 Ekim 2016, 09 Ekim 2016.
31. M. ÇEVİK, B. ESİN & M. D. GENÇ, Mandalarda Reprodüktif Biyoteknoloji, DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA, ISBN: 978-625-401-403-1: Ortadoğu Reklam Tanıtım Yayıncılık Turizm Eğitim İnşaat Sanayi ve Ticaret A.Ş., Kitapta Bölüm.
32. M. ÇEVİK, M. D. GENÇ & B. ESİN, Erkek Hayvanlarda Üremenin Kontrolü (Kontrasepsiyon), Erkek Hayvanlarda İnfertilite Sorunu ve Çözüme Yönelik Güncel Yaklaşımlar(49 - 58), ISBN: 978-605-034-097-6: Ortadoğu Reklam Tanıtım Yayıncılık Turizm Eğitim İnşaat Sanayi ve Ticaret A.Ş., Kitapta Bölüm.
33. M. ÇEVİK, A. KOÇYİĞİT & B. ESİN, Köpek Spermasının Saklanması, Evcil Hayvanların Spermasının Saklanması Son Gelişmeler(24 - 31), ISBN: 978-605-7597-17-5: ORTADOĞU REKLAM TANITIM YAYINCILIK TURİZM EĞİTİM İNŞAAT SANAYİ VE TİCARET A.Ş., Kitap.

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. 1st International, 10th National Reproduction and Artificial Insemination Congress, Konya, TÜRKİYE (Young Researcher Award) & (Excellent Poster Presentation).