

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM, JİNEKOLOJİ VE SUNİ TOHUMlama ANABİLİM DALI



**FARE SPERMINİN DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE
FERULİK ASİT, TRİPTOFAN VE L-GLUTAMİNE'İN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ
Gökhan KOÇAK

Danışman
Prof. Dr. Cengiz YILDIZ

HATAY-2022

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM, JİNEKOLOJİ VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI

**FARE SPERMİNİN DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE
FERULİK ASİT, TRİPTOFAN VE L-GLUTAMİNE'İN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ
Gökhan KOÇAK

Danışman

Prof. Dr. Cengiz YILDIZ

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
21.D.001'nolu proje olarak desteklenmiştir

HATAY-2022

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM, JİNEKOLOJİ VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI

FARE SPERMİNİN DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE FERULİK ASİT, TRİPTOFAN VE L-GLUTAMİNE'İN ETKİSİ

Doktora Tezi
Gökhan KOÇAK

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 14/10/2022 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oyçokluğu/oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi; **Jüri başkanı:** Prof. Dr. Fikret KARACA.....
Üye: Prof. Dr. Ümüt CİRİT.....
Üye: Prof. Dr. Seyfettin GÜR
Üye: Prof. Dr. Cengiz YILDIZ.....
Üye: Prof. Dr. Tolunay KOZLU.....

Bu tez, Enstitümüz Doğum, Jinekoloji ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda
hazırlanmıştır.

.../.../2022
Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora ve tez çalışmam boyunca hiçbir desteğini esirgemeyen, yönlendirici ve destekleyici tutumunu eksik etmeyen danışman hocam Prof. Dr. Cengiz YILDIZ'a; Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Fikret KARACA ve Prof. Dr. İlker YAVAŞ'a, tezin laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen Dr. Öğr Üyesi Nurdan ÇOŞKUN ÇETİN ve Arş. Gör. Oğuz Kaan YALÇIN'a, verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde özverili yardımını için Iğdır Üniversitesi Zootekni Anabilim Dalında görev yapmakta olan Arş. Gör. Dr. Cem TIRINK'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Gönül KOÇAK, abim Serdar KOÇAK, ablam Seda KOÇAK ve eğitim hayatım boyunca her an desteğini esirgemeyen ne pahasına olursa olsun varlığını hissettiren babam Halil KOÇAK'ı rahmetle anıyor ve şükranlarımı sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ÖZET	XI
ABSTRACT.....	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2. 1. Zoolojik Sistemde Farelerin Yeri	2
2. 2. Deney Hayvanı Olarak Farelerin Kullanımı.....	2
2. 3. Biyoteknoloji Uygulamalarında Farelerin İşlevi	2
2. 4. Farelerin Seksüel Olgunlaşma Süreçleri ve Östrüs Siklusu	3
2. 5. Farelerde Spermatogenezis.....	4
2. 6. Fare Spermatozoonlarının Epididimisten Alınması	4
2. 6.1. Motilite	5
2. 6. 2. Ölü Spermatozoon Oranı	5
2. 6. 3. Anormal Akrozom Oranı.....	6
2. 6. 4. Hipoozmotik Şişme Testi (HOST)	6
2. 7. Apoptoz	7
2. 7. 1. Apoptotik Hücrelerde Gözlenen Değişiklikler	8
2. 7. 2. Spermatozoon Hücrelerinde Apoptoz	9
2. 7. 3. Apoptoz Tespitinde Kullanılan Yöntemler.....	10
2. 7. 3. 1. Boyama yöntemleri.....	10
2. 7. 3. 2. Floresan mikroskop	10
2. 7. 3. 3. Elektron mikroskopi	11
2. 7. 3. 4. Faz kontrast mikroskop	11
2. 7. 3. 5. Anneksin V yöntemi.....	11
2. 7. 3. 6. TUNEL yöntemi	12
2. 7. 3. 7. M30 yöntemi	12
2. 7. 3. 8. Kaspaz-3 yöntemi.....	13
2. 7. 3. 9. Agaroz jel elektroforezi	13
2. 7. 3. 10. Western blotting	14

2. 7. 3. 11. Flow sitometri.....	14
2. 7. 3. 12. Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay).....	15
2. 8. Fare Spermatozoonlarının Sulandırılması ve Dondurulması.....	15
2. 8. 1. Fare Spermatozoonlarının Sulandırılması	15
2. 8. 2. Fare Spermatozoonlarının Dondurulması.....	16
2. 9. Sulandırıcılara İlave Edilen Kriyoprotektanlar.....	17
2. 9. 1. Hücre İçine Penetre Olabilen Kriyoprotektanlar	18
2. 9. 2. Hücre İçine Penetre Olamayan Kriyoprotektanlar	20
2. 10. Antioksidanlar, Serbest Radikaller ve Okasidatif Stres.....	21
2. 11. Sperma Sulandırıcısına Antioksidan Olarak Ferulik Asit, Triptofan ve L-Glutamin'in İlavesi	24
2. 11. 1. Ferulik Asit'in Özellikleri	24
2. 11. 2. Triptofan'ın Özellikleri.....	25
2. 11. 3. L-Glutamin'in Özellikleri.....	26
2. 12. Fare Sperması Üzerine Yapılan Araştırmalar.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3. 1. Gereç.....	30
3. 2. Yöntem	30
3. 2. 1. Sperma Sulandırıcılarının Hazırlanması.....	30
3. 2. 1. 1. Human Tubul Fluid (HTF)	30
3. 2. 1. 2. Kriyoprotektan Sulandırıcısına Ferulik Asit, Triptofan ve L-Glutamin'in Eklenmesi	31
3. 3. 2. Spermatozoonların Alınması ve Sulandırılması	32
3. 3. 3. Spermatozoonların Dondurulması	33
3. 3. 4. Payetlerin Çözdürülmesi	34
3. 3. 5. Spermatolojik Özelliklerin Belirlenmesi	34
3. 3. 5. 1. Motilite Muayenesi.....	34
3. 3. 5. 2. Ölü Spermatozoon Oranı	35
3. 3. 5. 3. Hipoozmotik Şişme Testi (HOST)	35
3. 3. 5. 4. Anormal Akrozom Muayenesi	36
3. 3. 5. 5. Motilite Dayanıklılık Testi (Longevity)	37
3. 3. 5. 6. Sperma Hücrelerinde Apoptoz Muayenesi.....	37
3. 4. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR.....	39
4. 1. Çalışma Gruplarında Dondurma Çözdürme Sonrası Spermatolojik Bulgular	39
4. 1. 1. Motilite Değerleri	39
4. 1. 2. Ölü Spermatozoon Oranı	40
4. 1. 3. HOST Test Pozitif Oranları (Plazma membran bütünlüğü)	40
4. 1. 4 Anormal Akrozom Oranı.....	41

4. 1. 5. Motilite Dayanıklılık Değerleri	41
4. 1. 6. Hücre Apoptoz Muayenesi	42
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ	49
7. KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	60



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2. 1. Ferulik asit'in kimyasal yapısı	25
Şekil 2. 2. Triptofan'ın kimyasal yapısı	25
Şekil 2. 3. L-Glutamin'in kimyasal yapısı.....	26
Şekil 3.1. Eppendorf tüplere konulan sulandırıcıların 14000 g deki soğutmalı santrifüjde santrifüj edilmesi.....	31
Şekil 3.2. Çalışmada %18 raffinoz+%3 yağsız süt tozu karışımının hazırlanması	32
Şekil 3.3. A: CD-1 ırkı farelerin tespiti ve intraperitoneal anestezi altına alma bölgesi, B: Ksilazin/ ketamin karışımı ve C:Cerrahi yöntem hazırlık aşaması	32
Şekil 3.4. Stereo mikroskop kullanılarak epididimal dokudaki spermatozoonların doku dışına çıkarılması işlemi.	33
Şekil 3.5. A: Payetlerin hazırlanması, B: Sıvı azot buharı üzerinde payetlerin dondurulması, C: Çalışmada kullanılan sıvı nitrojen tankı.....	34
Şekil 3.6. Eozin-nigrosin boyama yöntemi sonucu ölü spermatozoon (A), canlı spermatozoon (B).....	35
Şekil 3.7. Hipoozmotik şişme test solüsyonuna spermatozoonların verdiği reaksiyonların mikroskop altındaki görünümü. A) HOST- herhangi bir değişiklik yok, B) HOST+ kuyruğunda kıvrılma ve baş kısmında şişme var.	36
Şekil 3.8. Hücresel apoptozda baş kısmı kırmızı (ölü spermatozoon), kırmızı-yeşil (erken apoptotik spermatozoon) ve yeşil (geç apoptotik spermatozoon) renk veren spermatozoonlar.....	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2. 1. Fare spermatozoonlarının kriyoprezervasyonu üzerine yapılmış çalışmalar.....	27
Çizelge 3. 1. Human Tubal Fluid (HTF) kimyasal kompozisyonu	31
Çizelge 3. 2. Hancock solüsyonunun hazırlanması.	36
Çizelge 4.1. Çalışma gruplarında dondurulup çözündürülme sonrası belirlenen spermatolojik bulgular	39
Çizelge 4. 2. Çalışma guruplarında zamana bağlı motilite dayanıklılık değerleri.	42
Çizelge 4. 3. Çalışma guruplarında dondurma çözdürme sonrası hücre apoptoz oranları ..	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	Bovine Serum Albumin
CaCl₂	Kalsiyum Klorür
CO₂	Karbondioksit
Cm	Santimetre
°C	Santigrat Derece
Dk	Dakika
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
Elisa	Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay
CAD	Caspase Activated Dnazkaspaz
CASA	Computer-Assisted Sperm Analysis
CPA	Kriyoprotektan Ajan
COMET	Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
HE	Hematoksilen-Eozin
HOST	Hipoosmotik Şişme Testi
HTF	Human Tubal Fluid
ICAD	İnhibitor Of Caspase-Activated Deoxyribo Nuclease
ICSI	İntrastoplazmik Enjeksiyon
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IVF	İnvitro Fertilizasyon
KCl	Potasyum Klorür
kb	Kilo Baz Çifti
KH₂PO₄	Potasyum Fosfat
L	Litre
LH	Luteinleştirici Hormon
Longevity	Motilite Dayanıklılığı
M	Molar
MBCD	Metil-Beta-Siklodekstrin

Mg	Miligram
MgSO₄	Magnezyum Sülfat
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
mOsm	Miliosmol
N₂HPO₄	Sodyum Fosfat
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
NaHCO₃	Sodyum Bikarbonat
O	Oksijen
PBS	Phosphate Buffer Saline (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi)
PS	Fosfatidilserin
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Osijen Türleri
Rpm	Revolutionsper Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
Sn	Saniye
TUNEL	TdT-dUTPnick-end-labelling
WHO	World Health Organization
<	Küçüktür İşareti
>	Büyüktür İşareti
±	Artı eksi İşareti
µl	Mikrolitre
%	Yüzde
°	Derece

ÖZET

Fare Sperminin Dondurulabilirliği Üzerine Ferulik Asit, Triptofan ve L-Glutamin'in Etkisi

Sunulan çalışmada, fare spermatozoon hücrelerinin dondurulabilirliği üzerine %18 raffinoz+%3 yağsız süt tozu sperma sulandırıcısına ilave edilen farklı dozlardaki Ferulik asit (0.1mM, 1mM ve 10mM), Triptofan (5mM, 25mM ve 50mM) ve L-Glutamin (10mM, 50mM ve 100mM) etkinlikleri araştırıldı. Çalışmada %18 Raffinoz+%3 yağsız süt tozu kombinasyonu kontrol olarak tutuldu.

Araştırmada 12-24 haftalık yaşta 60 adet CD-1 ırkı erkek fareler kullanılmıştır. Fareler biri kontrol ve dokuzu deneme grubu olacak şekilde 10 gruba ayrıldı. Her grup 6 adet fareden oluşturuldu. Fareler servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek, kauda epididimislerden spermatozoa elde edildi. Kontrol grubu farelerden elde edilen spermatozoa, %18 raffinoz+%3 yağsız süt tozundan oluşan sperma sulandırıcısı ile sulandırıldı. Deneme gruplarına %18 raffinoz+%3 yağsız süt tozu sperma sulandırıcısına 0.1, 1 mM ve 10 mM ferulik asit, 5 mM, 25 mM ve 50 mM Triptofan ve 10 mM, 50 mM ve 100 mM L-Glutamin ilave edildi. Sulandırılmış sperma 10 dakika inkube edildikten sonra 0.25 ml'lik payetlere çekilerek sıvı azot buharında donduruldu. Dondurulmuş sperma 37°C'lik su banyosunda 30 saniyede çözdürüldü. Dondurma çözdürme sonrası sperma örneklerinin motilite, ölü spermatozoon oranı, plazma membran bütünlüğü, anormal akrozom oranı, HTF (Human Tubal Fluid) içerisinde 4 saat süresince motilite dayanıklılık, ve hücre apoptozu testleri yapıldı. Dondurma çözdürme sonrası kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek motilite ve plazma membran bütünlüğü sırası ile %56.67±2.11 ve %77.83±0.87 ile 10 mM L-Glutamin grubunda elde edildi (P<0.05). Ayrıca, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en düşük ölü spermatozoon oranı ve anormal akrozom oranı ise sırası ile %26.00±1.46 ve %6.33±1.09 olarak 10 mM L-Glutamin grubunda belirlendi (P<0.05). Dondurma ve çözdürme sonrası motilite dayanıklılık (longevity) süresi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4. saate kadar 10 mM ve 50 mM L-Glutamin grubunda belirlendi (P<0.05). Sperma örneklerinde apoptozun değerlendirilmesinde kontrol, 0.1 mM Ferulik asit ve 10 mM L-Glutamin grupları arasında önemli bir fark bulunmadı (P>0.05).

Sonuç olarak, sperma sulandırıcısına 10 mM L-Glutamin ilavesinin dondurup çözdürme sonrası motilite, canlı spermatozoon, fonksiyonel membran bütünlük oranı, anormal akrozom oranı veya motilite dayanıklılığını arttırdığı ve fare sperma dondurma sulandırıcılarında başarılı bir şekilde kullanılabileceği belirlendi.

Anahtar kelimeler: Fare, dondurulmuş çözdürülmüş sperma, ferulik asit, triptofan, L-glutamin.

ABSTRACT

The effects of Ferulic Acid, Tryptophan, and L-Glutamine on Mouse Sperm Freezability

In the present study, the activities of Ferulic acid (0.1mM, 1mM ve 10mM), Tryptophan (5mM, 25mM ve 50mM) and L-Glutamine (10mM, 50mM ve 100mM) at different doses added to 18% raffinose + 3% skimmed milk powder semen extender on the freezing of mouse spermatozoa cells were investigated. The group of 18% raffinose + 3% skimmed milk powder combination was used as the control group.

In the study, 60 male CD-1 mice aged 12-24 weeks were used. Mice were divided into 10 groups, including one control group and nine experimental groups. Each group consisted of 6 mice. Mice were sacrificed by cervical dislocation method and spermatozoa were obtained from cauda epididymis. The spermatozoa obtained from the control group mice were diluted with a semen extender consisting of 18% raffinose + 3% skimmed milk powder. To the experimental groups, 18% raffinose + 3% skimmed milk powder semen extender was added to 0.1, 1 mM and 10 mM ferulic acid, 5 mM, 25 mM and 50 mM Tryptophan and 10 mM, 50 mM and 100 mM L-Glutamine. After incubating for 10 minutes, diluted semen was drawn into 0.25 ml straws and frozen in liquid nitrogen vapor. Frozen semen was thawed in a 37°C water bath for 30 seconds. After freezing thawing, motility, dead spermatozoa ratio, plasma membrane integrity, abnormal acrosome ratio, motility endurance and cell apoptosis tests were performed in HTF (Human Tubal Fluid) for 4 hours. Compared with the control group after freeze-thaw, the highest motility and plasma membrane integrity were obtained in the 10 mM L-Glutamine group with $56.67 \pm 2.11\%$ and $77.83 \pm 0.87\%$, respectively ($P < 0.05$). In addition, when compared to the control group, the lowest rate of dead spermatozoa and abnormal acrosome were found in the 10 mM L-Glutamine group as $26.00 \pm 1.46\%$ and $6.33 \pm 1.09\%$, respectively ($P < 0.05$). The duration of longevity after freezing and thawing was determined in the 10 mM and 50 mM L-Glutamine group up to the 4th hour compared to the control group ($P < 0.05$). In the evaluation of apoptosis in semen samples, there was no significant difference between control, 0.1 mM Ferulic acid and 10 mM L-Glutamine groups ($P > 0.05$).

As a result, it was determined that the addition of 10 mM L-Glutamine to the semen extender increased the motility after freeze-thaw, viable spermatozoa, functional membrane integrity ratio, abnormal acrosome ratio or motility resistance and could be used successfully in mouse semen freezing extenders.

Keywords: Mouse, frozen-thawed semen, ferulic acid, tryptophan, L-glutamine.

1. GİRİŞ

İnsanların fareler ile olan yakınlıkları zooarkeolojik kayıtlara göre buzul dönemlerin son zamanlarındaki neolitik devrimden (tarım devrimi) bugüne kadar yaklaşık olarak 12000 yıl öncesine dayanmaktadır (Gabriel ve ark. 2010). Bazı araştırmacılar dünyada özellikle Japonya, Çin gibi ülkelerde farelerin üç bin yıl öncesinde evcil hayvan olarak beslendiklerini bildirmiştir (Gabriel ve ark. 2010, Guénet ve ark. 2012). Fare türleri arasında ev faresi olarak adlandırılan *Mus musculus* türü olarak fareler Rodentia sınıfının içerisinde bulunurlar. Fareler insanlarla beraber protein ve DNA benzerliği bakımından aynı yapıya sahip olduklarından deney hayvanı olarak araştırmalarda kullanılmaktadırlar. (Spencer 2002).

Küçük olmaları ve ucuz temin edilebilmeleri, hızlı üreme özelliğine sahip olmaları ve kısa süre içerisinde yeni generasyon oluşturmalarından dolayı bilimsel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadırlar. Uygun şartlar altında yıl boyu üreme özelliğine sahiptirler. Fareler poliöstrik hayvanlar olup spontan ovulasyon gösterirler. Diğer hayvanlardan farklı olarak farelerde, aynı soya ait bireyler arasında çiftleşme olur ise doğmasal anomali riski düşüktür. Fareler sayesinde geliştirilen mutant fareler insanlarda genetik hastalıkların hayvan modelini yansıttıklarından dolayı mutagenesis programlarında çalışma konusu olarak kullanılmışlardır (De Angelis ve ark. 2000, Nolan ve ark. 2000). Fare spermatozoonlarının başarılı şekilde dondurulması ve yeni sulandırıcılar geliştirilmesi biyoteknoloji açısından oldukça önemlidir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, fare spermatozoonlarının dondurma başarısı üzerine güçlü antioksidanlar olan Ferulik asit ve Triptofanın etkileri test edilmemiş, L-Glutamin üzerine ise çok sınırlı çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmanın amacı, fare spermatozoonu dondurma medyumuna bir antioksidan ve hücre koruyucusu olarak eklenen Ferulik asit (0.1 mM, 1 mM ve 10 mM), Triptofan (5 mM, 25 mM ve 50 mM) ve L-Glutamin'in (10 mM, 50 mM ve 100 mM) dondurma çözündürme sonrası kaudal spermatozoon parametreleri üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Zoolojik Sistemde Farelerin Yeri

Fareler Chordata Craniata grubunda Gnathostoma alt filumunun Tetrapoda üst sınıfında Mammalia sınıfına ek olarak Rodentia takımına bağlı Myomorpha alt takımında yer alan Muridae familyası, Musgenus, Mussubgenus, Mus Musculus türüne ait türdür. Fareler insanların bulunduğu ortamda rahatlıkla yaşayan bir hayvan grubudur. Ortam koşullarına çok iyi adapte olmuş ve dünyanın tamamına yakın her yerinde bulunmaktadır. Bugün laboratuvarlarda kullandığımız fareler ev ya da pirinç (Mus musculus domesticus / Mus domesticus domesticus) farelerinden geliştirilmiştir (Poyraz 2000).

2. 2. Deney Hayvanı Olarak Farelerin Kullanımı

Fare genleri üzerinde suni mutasyonun oluşturulabilmesi hem de üreme aralıklarının çok kısa olmasından dolayı biyomedikal araştırmalar ve genetik çalışmalar alanında en çok tercih edilen bir memeli türüdür (Critser ve Mobraten 2000, Pegg 2000).

Uluslararası Laboratuvar Hayvanları Komitesi açıklamalarına göre, fareler bilgi üretiminin yoğun olduğu ülkelerde en çok kullanılan laboratuvar hayvanıdır. Farelerin deney hayvanı olarak kullanılma nedenleri arasında; yetiştirilmesinin diğer hayvanlara nazaran elverişli olması, daha ekonomik olması, seksüel dönemlerinin uzun sürmemesi, gebe kalma zamanının kısa olması ve farelerin kontrol mekanizmaları üzerine bilim insanları tarafından kolaylıkla müdahale ediliyor olması da önemli rol oynamaktadır (Tuffery 1967).

2. 3. Biyoteknoloji Uygulamalarında Farelerin İşlevi

Fareler, genetik alanında ve moleküler biyolojide, transgenik ya da hedeflenmiş mutasyonların sebep olduğu birçok hastalık modelinin çalışılmasında farklı alternatifler sunmaktadır (Thornton ve ark. 1999, Tuffery 1967, Critser ve Mobraten 2000).

İnsanlarda genetik hastalıkların ortaya çıkmasına neden olan sorumlu genlerin belirlenmesi önem kazanmıştır. Bu çalışmalarda, farelerin deney hayvanı olarak kullanımı da yaygınlaşmıştır. Değişik genetik bozukluklar sonucu transgenik fareler elde edilmiş ve

elde edilen bu özel transgenik fareler değerli bir biyolojik materyal halini almıştır. Transgenik farelerin elde edilmesi ile oluşturulan hatlar uzun süre hem korunmalı hem de saklanabilmelidir. Bu nedenle embriyo, sperma ve somatik hücrelerin dondurulması yöntemi ile transgenik hayvanların genetik yapısı yıllarca korunabilmektedir (Noiles ve ark. 1997, Songsasen ve Leibo 1997-a, Storey ve ark. 1998, Koshimoto ve ark. 2000).

2. 4. Farelerin Seksüel Olgunlaşma Süreçleri ve Östrüs Siklusu

FSH (Folikül uyarıcı hormon) hem dişi hem de erkekte, gametogenezisi kontrol eden bir hormondur. LH (Lüteinleştirici hormon) dişi farede östrojen hormonu ile beraber progesteron hormonunu, erkek farede ise androjen hormonunun sekresyonunda görevlidir. Prolaktin, laktasyon ve gebelik süresince ovaryumun gelişmesine yardımcı olur. Gonadal hormonlar genital organların gelişmesine katkı sağlayarak çiftleşme belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Hormonal mekanizmada görev alan hipofiz bezi erkelerde 6. gün, dişilerde ise 12. gün itibarı ile hormonal uyarıya yanıt verir. Ovaryumun üzerinde meydana gelecek foliküller üçüncü haftadan itibaren gelişmeye başlar ve 30. günlerde gelişimi tamamlanır. Bu zaman içerisinde meydana gelen gonadotropin hormonu artışıdaki yükselme seksüel olgunluğun bir göstergesidir. 24-28 günlük yavrularda östrojen hormonu etkisi altında vajinanın epitelyumda keratinizasyon şekillenir. Dişilerde puberta erkeklere nazaran iki hafta daha erken görülmektedir. Seksüel gelişme ırklar arası ve barınma şartları ile bir değişkenlik göstermesine rağmen mevsim ve çevre şartlarına da bağlıdır. Ön hipofizin kontrolü ile salınımı gerçekleştirilen hormonlar sayesinde çiftleşme belirtisi, gebelik ve fetüsün taşınma işlevi gerçekleştirilmektedir (Jacoby ve ark. 2002).

Fareler, yıl boyu kızgınlık gösteren ‘‘poliöstrik’’ hayvanlar olup siklus süresi 4-5 gündür. Seksüel siklus; proöstrüs, östrüs, metöstrüs ve diöstrüs aşamalarını kapsar. Farelerde östrüs sırasında vaginal epitelyumda dikkate değer değişiklikler oluşur. Siklusun safhalarının tespitinde vajinal smear mükemmel bir indikatördür. İlk östrüs doğumdan sonraki 14-18. saatler arasında meydana gelmektedir. Eğer vajinadaki kornifikasyon gerçekleşti ise normalde görülen östrüse göre fertilité oranı düşüktür. Farelerde ovulasyon (spontan) şekillenmektedir. Her östrüste ovulasyon gözlenmeyebilir. Bunun sebebi östrüsün gonadal hormonların etkisine, ovulasyonun ise gonadotropinlere bağlı olarak şekillenmesidir. Östrüs periyodu ve ovulasyon genelde fotoperiyodun değişen etkisine

bağlı olarak gerçekleşmektedir. Östrüs, çiftleşme ve ovulasyon fotoperiyod safhasının karanlık süresinde meydana gelmektedir. Feromonlar ve çevre şartları da östrüs siklusunu etkilemektedir. Farelerde yalancı gebelik ve diöstrüsün uzama sebebi, kalabalık gruplar halinde birlikte tutulmalarıdır. Dişi ve erkek farelerin çiftleşmesi ile dişilerde östrüsler senkronize edilebilmektedir. Gruplar halinde yaşayan farelerde erkek farelerden salınan feromonlara bağlı olarak östrüslerin baskılanması sonucu dişilerde östrüs siklusu tekrardan başa dönmektedir. (Jacoby ve ark. 2002).

2. 5. Farelerde Spermatogenezis

Farelerde spermatogenezis ortalama beş haftada tamamlamaktadır (Otubanjo ve Mosuro 2001). Spermatogenez, puberte ile beraber seminifer tübüllerde olgun gamet üretimiyle tamamlanan süreçtir. Spermatogonyal faz, spermatosit fazı ve spermatid fazı olmak üzere 3 kısma ayrılır (Atia ve Abbas 2014). Spermatogonyal faz sürecinde, spermatogonyumların çoğalmasıyla başlayan spermatositlerin farklılaşmasıyla sona eren süreçtir. Bu süreçten sonra spermatositlerden ($2n$) spermatid (n) üretiminin meydana geldiği spermatosit fazına geçilir. Ortaya çıkan spermatidlerin yuvarlak spermatidlere dönüşerek olgunlaştığı morfolojik dönüşüm sürecine ise spermatid faz (spermiyogenez) adı verilir. Bu süreç içerisinde spermatitlerin polaritesi belirlenerek flagellumun oluşumu başlar. Sonraki aşamada ise akrozomal vezikülün düzleşmesi ile golgi aygıtı spermatidin boyun bölgesine göç etmektedir. Spermatid tekrardan yönlendirilerek flagellumunun lümen içerisine doğru uzanması ve akrozomun bazal lamina yönüne doğru dönmesi sağlanır. Çekirdek düzleşirerek uzar ve akrozomal granül, farklılaşan akrozomal zarın tamamına yayılır. Spermiyasyondan hemen önce ise son aşama olan testis seminifer tübül lümeni içinde özelleşmiş spermatozoonların salınması gerçekleşir (Griswold 2016).

2. 6. Fare Spermatozoonlarının Epididimisten Alınması

Epididimisten spermatozoon hücrelerini almak için farelere eter ya da servikal diskolasyon yöntemi uygulanır. Spermatozoon hücrelerinin alınması için farelerde karın duvarı yöntemine uygun bir şekilde açılıp genital organları dışarı alınır. Farelerden elde edilen kaudo epididimisler her bir farenin kaudo epididimisleri için ayrı ayrı içerisinde 1000 µl'lik sperma solüsyonu bulunan petri kaplarına bırakılır. Elde edilen kaudo

epididimisler dişsiz pens ve insülin iğnesi yardımı ile ortalama beş kısıma parçalanıp 10 dk süre ile spermatozoon sulandırıcısında kalması sağlanır. Bu süreç içerisinde kaudo epididimide bulunan spermatozoonlar sperma solüsyonuna geçer ve doku parçaları sperma solüsyonundan ayrılıp uzaklaştırılır. Farelerde spermatozoonun epididimisten ve genital kanaldan alınması ile yapılan muayeneler sonucunda her iki yöntemde de IVF sonucunda bir farklılık görülmemiştir. Farelerde kaudo epididimisten spermatozoon alma uygulamasının dezavantajı sakrifiye edilmesinden dolayı bir kez spermatozoonların alınabilmesidir. (Songsasen ve Leibo 1998). Ayrıca kaudo epididimisin parçalanması sonucu ortaya çıkabilecek olan kanın spermatozoonlar için toksik etkisi de diğeri bir olumsuzluktur (Noiles ve ark.1997, Katkov ve ark. 1998, Dewit ve ark. 2000, Koshimoto ve ark. 2000, Koshimoto ve Mazur 2002).

2. 6.1. Motilite

Fare spermatozoonlarında motilite hareketi boğa, aygır, insan, köpek ve kedi gibi baş kısmı oval şekilde olan spermatozoonlardan farklı olarak gözlenmektedir. Farelerde spermatozoon baş kısmı orak şekilli asimetrik yapıya sahip olup kuyruklarını aşağı yukarı hareket ettirerek medyum içerisinde yer değıştirirler. Kuyruklarında spiralin dışında farklı bir hareketlenme etkisi ortaya çıkmaktadır (Woolley 2003).

Fare spermatozoonları ileri yönde doğrusal, düzgün olarak hareket etmelerinin dışında, baş bölgesinde bulunan apikal kanca sayesinde etrafındaki spermatozoonlara tutunarak 10-50 kadar motil hücre ile grup oluşturarak da hareket ederler. Motilite muayenesinde kümeleşme benzeri bir durum fark edilse de bu fare spermatozoonunun doğal görüntüsüdür (Moore ve ark. 2002).

2. 6. 2. Ölü Spermatozoon Oranı

Ölü spermatozoon oranını belirlemek için eosin-nigrosin, eosin, fast green ve opal blue gibi boyalardan yararlanılır (Tekin 1990). Spermatozoonun hücre yapısında bozulma meydana gelir ise membran bütünlüğü morfolojik olarak bozularak eosin hücre içerisine girebilmektedir (Jeyendran ve ark. 1984). Buradaki amaç ölü spermatozoon oranını belirlemek için spermatozoonun baş kısmı boya aldıysa ya da post akrozomal bölgeyi de

kapsayacak şekilde boyalı ise ölü spermatozoon, eğer boya alınmamış ise canlı spermatozoon olarak değerlendirilmiştir (Somfai ve ark. 2002, Tekin 1990).

2. 6. 3. Anormal Akrozom Oranı

Farelerde anormal akrozom spermatozoon oranının belirlenmesi, spermatozoonların fertilite yeteneklerinin düşük oluşu ve kalıtsal bozukluk taşıması nedeniyle morfolojik muayene açısından önem taşımaktadır. Fare spermatozoonlarının morfolojik muayenelerinin yapılması için trypan blue, congored boyama yöntemleri ve sıvı fizkasyon yöntemleri kullanılmaktadır (Somfai ve ark. 2002, Tekin 1990).

2. 6. 4. Hipoozmotik Şişme Testi (HOST)

HOST test spermatozoon membran bütünlüğünün belirlenmesinde kullanılmaktadır. Membran bütünlüğünün incelenmesi iki şekilde yapılmaktadır. Supravital boyama ve HOST test ile belirlenmektedir. HOST test spermatozoon analizlerinde tamamlayıcı bir test olarak kullanım alanı bulmaktadır (Neild ve ark. 1999). Alternatif bir yöntem olarak spermatozoon dondurma işlemi sonucunda ortaya çıkan membran yıkımını belirtmek için de kullanılmaktadır (Correa ve Zavos 1994, Thundathil ve ark. 2002, Tartaglione ve Ritta 2004).

Hipoozmotik ortama sahip solüsyonda bulunan spermatozoon içine suyun girmesiyle hipozomotik stres oluşmaktadır. Aktif olarak membranında bozukluk olmayan spermatozoon plazma membranı, HOST test uygulaması süresince intraselüler ve ekstraselüler sıvı arasında ozmotik basıncı dengede tutmaya çalışmaktadır. Bu esnada spermatozoonun içerisine su girerek hacminde artış şekillenerek spermatozoon yapısında şişme başlayarak kuyruğunda kıvrılma gözlenir (Correa ve Zavos 1994, Nie ve Wenzel 2001, Jeyendran ve ark. 1984, Sliwa1993).

HOST testinde kuyruk yapıları kuyruğun esnemesi ile kıvrılması, kısılması ve kalınlaşması ve kuyrukte fibrillerin değişik derecelerde kıvrımlı bir hal alması gibi kuyruk tipleri ortaya çıkmaktadır (Jeyendran ve ark. 1992). Hipoozmotik bir solüsyonda spermatozoon kuyruğunda şişmenin görülmesi plazma membranından su geçişinin doğal olarak oluştuğunun göstergesidir (Jeyendran ve ark. 1984).

HOST testinde spermatozoonların kuyruklarında meydana gelen kıvrılma görülmesinin nedeni kuyruk membranının sağlam olduğunu göstermektedir. Fonksiyonel olarak ejakülasyon sonucu elde edilmiş spermatozoonda eğer kuyruk sağlam ise baş kısmında bulunan plazma membranı da sağlamlığını korumaktadır (Jeyendran ve ark. 1992).

HOST testinin uygulanması sonucunda insanlar ve hayvanlar arasında farklı sonuçlar elde edilmiştir (Kumi-Diaka 1993, Nie ve Wenzel 2001, Lagares ve ark. 2000). İnsanlarda 150 mOsm (Jeyendran ve ark. 1984), boğalarda 150 mOsm (Kathiravan ve ark. 2008), koçlarda 100 mOsm (Aisen ve ark. 2005), aygırlarda 25–100 mOsm (Neild ve ark. 1999), köpeklerde 60 mOsm (Kumi-Diaka 1993), tavşanlarda 60 mOsm (Ducci ve ark. 2002) ve alabalıklarda ise sperma 100 mOsm (Cabrita ve ark. 1999) düzeyde kuyruklarında kıvrılmalar gözlenmektedir. Farklı ırklarda ki deney hayvanlarının hipoozmotik basınca verdikleri tepkilerde birbirinden farklıdır (Songsasen ve Leibo 1997-b).

2. 7. Apoptoz

Hücre ölümü ile ilgili nekrozun tanımı boyama yöntemlerinin kullanılmaya başlanmasıyla yapılmıştır. Kerr ve arkadaşları (1972) nekrozdan farklı olarak oluşan hücre ölümünü Yunancada yaprak dökümü anlamında “apoptoz” olarak isimlendirmişlerdir. Apoptoz fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümü olarak ifade edilmiş, fonksiyonu bozulan hücrelerin çevresine zarar vermeyip programlı olarak hücre ölümü olarak tanımlanmıştır (Altunkaynak ve Özbek 2008, Öktem ve ark. 2001, Yılmaz 2005).

Apoptozis fizyolojik ve patolojik olarak iki bölümden oluşmaktadır. Anne karnında gelişen yavruda el ve ayak parmakları gelişim sürecinde yapışık haldeki iken apoptoz ile parmakların birbirinden ayrılması, yaşlılıkla beraber organlarda görülen atrofiler, laktasyonun sona ermesiyle meme bezlerinin gerilemesi, hücre sayılarının (kan hücreleri gibi) ideal oranda sabit tutulması fizyolojik apoptoz olarak tanımlanmıştır. Patolojik açıdan bakıldığında ise; kanal tıkanmaları sonucu parankimöz dokulardaki atrofiler, travma, kemoterapi, hipoksi ve radyasyon aracılığı ile oluşan hücrelerdeki ölümler, insüline bağımlı diabetes mellitus, otoimmün hastalıklarda sitotoksik T hücrelerinin oluşturduğu hücre ölümleri, viral enfeksiyonlarda görülen epitel hücrelerin ölümleri patolojik

apoptoz'lar olarak tanımlanmıştır (Öktem ve ark. 2001, Elmore 2007, Kiess ve Gallaher 1988, Özcan ve Atakişi 2003, Cohen 1993).

2. 7. 1. Apoptotik Hücrelerde Gözlenen Değişiklikler

Apoptozun başlaması için gereken uyarım alındıktan sonra morfolojik ve biyokimyasal değişimler ortaya çıkmaktadır. Hücre küçülür, kondanse olur, çekirdek zarı erimeye başlar, hücrenin iskeleti dağılarak çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır (Cohen 1993, Mountz ve Zhou 2001).

Apoptozlu hücrede laminin ve aktin filamentleri kesilerek sitoplazma çekilerek küçülür. Çekirdek ve kromatindeki proteinler parçalanarak çekirdekte kondensasyon başlar ve kromatinin çekirdek membranının iç yüzüne yerleşerek at nalı şeklinde bir görünüm alır. Hücrenin büzülerek küçülmesi sonucu makrofajların tanıyabileceği normal hücreden farklı küçük parçalara ayrılmış olur. Apoptotik cisimler içinde stoplazma, sıkı olarak paketlenmiş organeler ile çekirdek zarı bulunan bir yapı meydana gelmektedir (Mountz ve Zhou 2001, Pınarbaşı 2007, Trump ve ark. 1997). Çekirdek hücre gibi büzülerek membranla sarılmış bir halde parçalara ayrılabilir. (Mountz ve Zhou 2001).

Apoptoz anında meydana gelen değişimde, apoptotik hücre membranı sitoplazmik yüzeyindeki fosfatidilserinin hücre membranı dışına çıkmasına neden olur. Apoptozda hücrenin zarında gizlenmiş olarak bulunan N,N-diasetilşitabroz ve N-asetil glikozamin molekülleri ortaya çıkarak makrofajlar ile tanınırlar (Öniz 2004).

Apoptotik hücreler, morfolojik membran değişimi sonucu hücre içeriklerini, içinde bulundukları membran ile çevrili vezikül biçiminde apoptotik hücrelerden kopmuş tomurcuklar şeklinde gösterirler. Bu tomurcuklar apoptotik cisim olarak adlandırılır. Ortaya çıkan bu değişimler apoptotik süreç sonlarında görülür (Pınarbaşı 2007).

Apoptozda en belirgin özellik hücre içi Mg ve Ca bağımlı endojen endonükleaz enzimi etkisi sayesinde kromozomal DNA'nın nükleozomal birimlere kadar parçalanmasıdır. Apoptotik hücrelerdeki DNA, agaroz jel elektroforezinde merdiven basamağını andıran biçimde apoptozun tipik görüntüsünü verir (Bortner ve ark. 1995, Cohen 1993).

Fragmentasyon sırasında apoptotik hücreler CAD (caspase activated DNaz kaspazla-aktifleşen deoksiribo nükleaz) enzimi tarafından DNA nükleozom birimlerine ayrılır. CAD hücrelerde ICAD'a (inhibitor of caspase-activated deoxyribo nuclease) bağlı

olarak inaktif halde bulunmasına rağmen apoptoz uyarısı alan hücrede kaspaz 3'ün aktive edilmesi ile bu enzim DNaz (endonükleaz) DNA'nın 180-200 baz çiftlik nükleozomal fragmanlara ayrılmasını neden olur (Cohen 1993, Pınarbaşı 2007, Sakahira ve ark. 1998).

2. 7. 2. Spermatozoon Hücrelerinde Apoptoz

Ergin haldeki memelilerde spermatogenezis aşamasında germinal hücrenin kaybı önemli rol oynamaktadır. Testislerdeki aktif spermatozoonların %25 ya da 75'i dejenere olarak ölmektedir. Ganodotropinler (FSH- LH) veya testosteron eksikliği testislerdeki germinal hücrelerin kaybına yol açmaktadır. Erkeklerde infertilitenin belirlenmesindeki faktörler arasında spermatozoon DNA'sındaki hasar ve apoptoz da nedenler arasındadır. Anormal spermatozoon hücrelerindeki somatik hücrelerde görülen apoptoz için karakteristik olan bulgu DNA zincir kırıkları ve DNA in-situ denatürasyonundaki sensitivite artışıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda apoptozun normal spermatogenezis aşamasında germinal hücre ölümü mekanizmasında etkili olduğu ve çoğu memeli türündeki spermatogenezisin düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (Ok ve Öz 2007, Sakkas ve ark. 2007, Weng ve ark. 2002).

Apoptozun ortaya çıkması ile germinal hücreler meydana gelen kayıp, spermatogenezis sürecinde ortaya çıkan bir durum olup p21, p53, kaspaz, Fas ve bcl-2 genlerinin farklı yolları ile ayarlanmaktadır. Fas ekspresyonlu spermatozoon sayısı, spermiyogram sonuçlarının normal olduğu örneklerde düşük, ancak anormal parametre gösteren örneklerde ise yüksek oranda bulunmuştur. Ayrıca, fragmente olmuş DNA'ya sahip spermatozoon yüzdesinin ICSI ve IVF uygulamalarında fertilizasyon oranı ile negatif bir ilişki gösterdiği saptanmıştır. Germinal hücreler üzerinde meydana gelen genotoksik ve sitotoksik etki apoptozu uyarmaktadır. Apoptoz, hasar olmayan DNA'lı hücreleri seçmede etkin bir yöntem iken, apoptoza maruz kalmış spermatozoonların da ayırt edilmesine olanak sağlayarak spermatozoonun ovumu fertilize edemeyeceği bildirilmektedir (Anzar ve ark. 2002, Hikim ve Swerdloff 1999, Ok ve Öz 2007, Weng ve ark. 2002, Yılmaz 2005).

Spermanın dondurulması işleminde fosfatidilserinin translokasyonu sonucu potansiyel başlatıcı olarak apoptozu indüklendiği bildirilmiştir. Özellikle, sperma

sulandırma, sıvı azot buharı ve ekilibasyon işlemleri aşamaları hücre apoptozisi başlatıcılardır (Anzar ve ark. 2002, Martin ve ark. 2004).

Düşük spermatozoon yoğunluğu ve anomalilerin hücre apoptozunu indüklediği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda spermatozoonlarda apoptozun gerçekleşmesine bağlı olarak fertilizasyonda aksaklıkların olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark. 2006, Perticarari ve ark. 2007, Weng ve ark. 2002).

2. 7. 3. Apoptoz Tespitinde Kullanılan Yöntemler

2. 7. 3. 1. Boyama yöntemleri

Giemsa ile boyama hematoksilin-eozin (HE) boyama gibi nukleus morfolojisinin incelenmesi yapılarak apoptotik hücreler belirlenebilmektedir. Sitoplazmanın sınırı hematoksilin ile boyamada kromatini boyadığı için nukleus morfolojisi daha iyi seçilebilmektedir (Yılmaz 2005). HE ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu altında incelenmekte, hücre kültürü çalışmalarında ve doku boyamalarında rahatlıkla da kullanılabilir. HE ile boyamada, hematoksilin boyası kromatini boyadığı için apoptotik hücrelerdeki değişim nukleus morfolojisine göre değerlendirilebilmektedir. Ortaya çıkan morfolojik değişiklikler; sitoplazma ve dolayısıyla hücrenin küçülmesi, kromatinin kondanse olması, nukleus zarının perifere toplanması, nukleusun yapı olarak küçülmesi ya da parçalara ayrılmasıdır (Mountz ve Zhou 2001, Ulukaya 2003).

2. 7. 3. 2. Floresan mikroskop

Floresan mikroskopi yöntemi, floresan maddelerin (örn. propidium iyodür, etidyum bromür hoechst boyası, DAPI “4,6-diamidine-2’-phenylindole”, FITC “fluorescein isothiocyanate”, akridin orange,) kullanıldığı boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA’ya bağlanabilme özelliklerinin olmasından dolayı, hücre kromatinine bağlanarak nukleusun daha görünür hale gelmesine neden olmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarında, canlı hücre ile ölü hücrelerin ayırt edilmesine olanak tanır. Canlı ve ölü hücrenin ayrımının yapılabilmesi için, canlı ya da ölü hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayan diğer bir boya ile (örn. propidium iyodür) birlikte kullanılır. Membran bütünlüğü sağlam (canlı) hücreler, propidium iyodür gibi sadece membran

bütünlüğünde bozulma olan (ölü) hücrelerin boyanmasını sağlayan bir madde ile boyanmaz iken, ölü ya da canlı hücrelere girebilmekte olan Hoechst boyası ile boyanırlar. Bu yöntem ile hücrelerin ölü veya canlı olup olmadığı anlaşılmış olsada ölü hücrelerin apoptoz ya da nekroz ile ölüp ölmediğinin ayrımı, hematoksilen boyama yönteminde olduğu gibi nukleus morfolojisindeki değişime bakılarak da yapılır. Kromatindeki kondensasyon ya da nukleusda görülen fragmentasyon hücrelerin apoptotik olduklarını düşündürür (Ulukaya 2003, Yılmaz 2005).

2. 7. 3. 3. Elektron mikroskopi

Morfolojik değişikliklerin en iyi şekilde gözlemlendiği yöntemdir. Bu yöntemle sitoplazmadaki küçülme, kromatin kondensasyonu ve fragmentasyonu, mitokondri durumu, hücre zarı veya nukleus membranındaki bütünlüğün değişip değişmediği gibi ayrıntılar incelenebilir (Yılmaz 2005).

2. 7. 3. 4. Faz kontrast mikroskop

Faz kontrast mikroskop hücre kültür ortamında, hücrenin ya da hücre topluluğunun incelemesi amacıyla kullanılmaktadır. Ölen hücrelerin yapıştıkları substratundan (alt tabaka) ayrılmaları ile besiyeri içinde yüzmeye başlarlar. Bu hücrelerin gözlemlenebilmesi faz kontrast mikroskop ile yapılmaktadır. Faz kontrast mikroskop ile mitoz giden hücreler gözlemlenebilir fakat bu durum erken evredeki apoptotik hücre görüntüsü ile karıştırılabileceğinden dolayı ayırt edilmeleri imkansızdır. Faz kontrast mikroskop sayesinde apoptotik hücreler üzerindeki ortaya çıkan cepcikler (blebs) izlenebilmektedir (Ulukaya 2003).

2. 7. 3. 5. Anneksin V yöntemi

Normal hücrelerin hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde membran lipidlerinden fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Normal durumda hücrenin iç yüzeyinde yerleşmiş olarak bulunan PS molekülleri, apoptoz giden hücre zarı dış yüzeyine transloke olmaktadır. Bu durum hücre membranının bütünlüğünde bozukluk görülmediği apoptotik hücre ölümünün erken döneminde meydana gelmektedir. Anneksin-V, hücre dış yüzeyine

yer değiştiren fosfatidilserine bağlanabilme özelliğinde bir protein olmasından dolayı floresan bir madde (örn. FITC) tarafından işaretlenen apoptotik hücrenin görünebilir hale gelmesini sağlayabilmektedir (Bratton ve ark. 1997, Gatti ve ark. 1998, Overbeeke ve ark. 1998). Flow sitometri ile FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanması belirlenebilmektedir. Nekrotik hücre yüzeyinde de Anneksin-V bağlanması görüldüğü için ikinci bir boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Annexin V-FITC (green fluorescence) ve propidium iodide (red fluorescence) ile aynı anda boyanmış preparatlarda, canlı hücreler (FITCPI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik ya da nekrotik hücreler (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilebilir (Overbeeke ve ark. 1998, Tesarik ve ark. 1998).

2. 7. 3. 6. TUNEL yöntemi

DNA kırıklarının ortaya çıktığı yerin belirlenmesine kullanılan bir yöntemdir (Gavrieli ve ark. 1992, Kressel ve Groscurth 1994, Yılmaz 2005). Apoptotik parçalanma sonrası DNA uçları, DNA polimeraz ya da klenow fragmentinin kullanılması ile işaretlenmektedir. Fakat terminal deoksi nükleotidil transferaz (TdT) kullanımı ile yapılan işaretlemeler ise daha duyarlı bir yöntem olarak bulunmuştur. Konvansiyonel parafin kesitleri, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler (biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücrelerin diğer hücrelerden ayırt edilmesinde yeterli olmaktadır. Uygulanan bu yöntem “TdT-dUTP nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” yöntemi adıyla bilinmektedir (Aral 1996, Elmore 2007, Kressel ve Groscurth 1994).

2. 7. 3. 7. M30 yöntemi

M30 yöntemi, apoptotik hücrelerdeki sitokeratin 18’in kaspazlar sayesinde kırılması sonucunda ortaya çıkan antijenik bölgenin immuno histokimyasal yöntem ile boyanması esasına dayanmaktadır. Yalnızca sitokeratin 18’i eksprese eden dokularda kullanımı mümkündür (Leers ve ark. 1999, Ulukaya 2003). Sitokeratin 18 (CK18) tek katlı ve glanduler yapıdaki epitel hücrelerde bulunan tip 1 intermediate filament proteinidir. Çoğunlukla karaciğer, akciğer, göğüs, kolon ve prostat, kanser tiplerinde eksprese edilirken, nöral vel enfoid hücrelerde bulunmaz (Caulin ve ark. 1997).

2. 7. 3. 8. Kaspaz-3 yöntemi

Kaspaz-3 yöntemi sayesinde sadece apoptotik hücrelerde meydana gelen aktif kaspaz-3, immuno histokimyasal boyama metoduyla belirlenebilir. Bu yöntemde, dokunun kaspaz 3'ü expire ettiği veya üzerinde çalışılan dokudaki kaspaz 3'ü kırıp kırmadığına göre apoptotik hücreler görünebilir bir hal alırlar. (Overbeeke ve ark. 1998, Ulukaya 2003).

2. 7. 3. 9. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz orta büyüklükte olan büyük DNA moleküllerinin elektroforez ile ayrılması için en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Ayrıştırılacak olan moleküllerin büyüklüğüne göre genelde %0.3 ile %2 agaroz konsantrasyonları kullanılmaktadır. En fazla 50 kb'a kadar olan nükleik asitler agaroz jel elektroforezi yardımı ile ayrıştırılabilir. Agaroz konsantrasyonunun ayarlanması ile jelde moleküllerin hareket ettikleri porların çapı değiştirilebilir. Jel konsantrasyonunun artması ile porların çapı küçülmektedir. Bunun sayesinde büyük DNA parçaları için düşük, küçük DNA parçaları için ise yüksek agaroz konsantrasyonları kullanıldığında nükleik asitler en iyi şekilde ayrılmış olduğu görülür. Agaroz jeller floresan boya olan ethidium bromide ile boyanıp UV ışığının altında DNA parçaları görüntülenir. DNA'nin jelde görünür bir hal alması ethidium bromide'in DNA'nin iki zinciri arasına girmesi ile 300 veya 360 nm dalga boyundaki ışığı soğurması sonucu floresan etkinin görülmesi ile gerçekleşir (Bardakçı ve Yenidünya 2007). Apoptotik hücrelerde görülen endonükleaz aktivasyonun etkisi kromatindeki oligo nükleozomal parçacıkların ayrılmasına yol açmaktadır. Endonükleaz enzimi magnezyum ve kalsiyum bağımlı olup, DNA'da tipik olarak ortaya çıkan 180-200 baz çifti ve katları şeklinde parçalanmalara yol açar. Bu şekildeki parçalanma paterni, agaroz jel elektroforezde merdiven görünümünde "ladder pattern" ortaya çıkarak apoptoz için tipik bir şekil alır (Aral 1996, Bortner ve ark. 1995, Bossù 1999, Carson ve Rbiero 1993, Cohen 1993). Agaroz jel elektroforez yöntemi, güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlayan kalitatif bir analiz yöntemidir (Bossù 1999, Sereno 2001).

2. 7. 3. 10. Western blotting

Western blotlama her hangi bir protein karışımının içerisindeki belirlenmiş bir protein ve büyüklüğünün belirlenmesi için kullanılan nicel bir yöntemdir. Bu metodun işleyişi, elde edilmek istenilen proteine karşı yönlendirilmiş olan yüksek kalitede bir antikor kullanımının etkinliğidir. Bu antikor belirleyici olarak kullanılarak, bir karışımın içinden ilgili protein rahatlıkla saptanabilir. Western blot yöntemi hücrede ne kadar proteinin biriktiğini gösterir (Bardakçı ve Yenidünya 2007). Bu yöntem sayesinde apoptoza özgü olarak bazı proteinlerin eksprese olup olmadığı (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadığının (örn. kaspaz-3) belirlenmesi mümkündür. Bu yöntem ile sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığı da belirlenebilir. Yalnız, sitokrom c tespiti yapılmadan önce alt-fraksiyonlama yapıp hücrenin sitoplazmik ve mitokondriyal fraksiyonlarının ayrımı yapılarak, normal durumda sitoplazmik fraksiyonda bulunmayan sitokrom c'nin bu fraksiyon sürecinde tespit edilmesiyle hücrelerin apoptoza uğradıkları anlaşılmaktadır (Yılmaz 2005).

2. 7. 3. 11. Flow sitometri

Flow sitometri lazer kaynaklı florometre kullanımı ile parçacık ışık yayılım analizi bileşimi toplamından oluşur. Flow sitometri ile farklı hücreler, parçacıklar ve moleküller, dik ve düşük açılı ışık yayılımının kullanılmasıyla ayrılabilirler. Bu hücreler, parçacıklar veya moleküller, FITC, 13- phycoerithrin ve rhodamine-GG gibi farklı özel floresan işaretleyiciler ile ya da boya işaretli antikorlar sayesinde işaretlenebilir (Aral 1996). Flow sitometrinin kullanımı ile floresan bir madde ile işaretlenen antikor sayesinde apoptozda eksprese olduğu belirtilen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Bunun sayesinde apoptotik hücreler de belirlenmiş olur. Uygulanması kolay, sürecin kısa olması ve kantitatif sonuç vermesi bakımından apoptozun belirlenmesinde kullanılmaktadır. Apoptozun flow sitometri ile belirlenmesinde floresan bir madde olan propidium iyodür ve Anneksin V kullanılır (Kockx 1998, Overbeeke ve ark. 1998, Tesarik ve ark. 1998, Ulukaya 2003).

2. 7. 3. 12. Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay)

Elisa testi, bakteriyel, paraziter ve viral enfeksiyonların tanısının yanında apoptozun belirlenmesi amacıyla kullanılan, serolojik tanı yöntemlerindendir. Elisa yönteminde esas olan antijen-antikor kompleks yapısına enzimle işaretlenmiş olan anti globulinin ilave edilmesi sonrasında substratında eklenmesi ile eğer antijen veya antikor mevcut ise renk oluşumu gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Duyarlı spesifik ve çabuk sonuçlar elde edilmesini sağlayan bir testtir. Apoptozda ortaya çıkan ilk durum sitoplazma içine nükleozomların salınması ve DNA fragmentasyonudur (Salgame 1997). Elisa yöntemi kullanarak, kültürü yapılmış olan hücre populasyonlarında ve insan plazmasında DNA fragmentasyonun tespit edilmesi mümkün olmaktadır (Overbeeke ve ark. 1998, Ulukaya 2003). Elisa analizinde, Elisa pleytlerinde bulunan sitoplazmik nükleozomların belirlenmesi ve yakalanması için iki nükleozomal epitopa özel bir çift olarak monoklonal antikor kullanılır. Bu yöntem sayesinde agaroz jel elektroforez ile yapılan apoptotik DNA merdiveni belirlenmesinden yaklaşık olarak 500 kat daha duyarlı olan çok sayıda örneğin test edilmesi açısından daha uygun olduğu bildirilmiştir (Salgame ve ark. 1997).

2. 8. Fare Spermatozoonlarının Sulandırılması ve Dondurulması

2.8. 1. Fare Spermatozoonlarının Sulandırılması

Günümüz şartlarında gamet hücrelerini saklamak için 5°C de kısa süreli saklama, dondurma ya da liyolifizasyon yöntemi ile uzun süre saklama yöntemleri kullanılmaktadır. Memelilerden elde edilen spermanın kısımlara ayrılması, hacimce arttırılması, metabolizması sonucu ortaya çıkan atıkların ortadan kaldırılması, enerji ihtiyacının karşılanması gibi ihtiyaçlar için sulandırma işlemine gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca spermanın soğutulup kısa süreli saklanması veya dondurulması için sulandırılması zorunludur. Spermanın sulandırılması ve soğutulmasındaki ısı, sulandırıcıya eklenen kimyasal maddelerin içeriği ve kriyoprotektif ajanlar başarıyı etkileyebilmektedir (Kaneko ve ark. 2014, Sönmez 2013).

2. 8. 2. Fare Spermatozoonlarının Dondurulması

Fare spermatozoonları ilk olarak Tada ve ark. (1990) tarafından dondurulmuştur. Bu yöntem embriyo çalışmalarına da katkı yaparak daha az maliyetle embriyoların dondurulmasına olanak sağlamıştır. Daha sonraki süreçlerde yapılan araştırmalarda fare spermatozoonlarının dondurulmasıyla elde edilen fertilite oranları başarılı bulunmuştur (Songsasen ve Leibo 1997-b, Szein ve ark. 2001). Fare spermatozoonlarının taze olarak ya da dondurulmasıyla IVF sonuçları, in vivo ortamdaki embriyolarla karşılaştırıldığında elde edilen bulguların benzer olduğu anlaşılmıştır (Tada ve ark. 1990).

Spermatozoonların fertilizasyon sürecindeki başarısını koruyabilmesi için dondurma işlemine dikkat edilmelidir (Szein ve ark. 2001). Birçok türe göre fare spermasının dondurulma yeteneği oldukça düşüktür. Farklı fare ırklarının ve seçilen kryopreservatif maddelerin spermanın dondurulabilirliğinde önemli etkileri bulunmaktadır (Evans ve Maxwell 1987; Tada ve ark. 1990; Takeshima ve ark. 1991; Yıldız ve ark. 2007).

Fare spermatozoonları, diğer evcil hayvanların spermatozoonları ile kıyaslandığında daha hassas bir yapıya sahip olmalarından dolayı, günümüzde araştırmaların odağı haline gelmiştir (Noiles ve ark. 1997, Storey ve ark. 1998, Dewit ve ark. 2000, Koshimoto ve Mazur 2002).

Fare spermatozoonunun, serbest oksijen radikallerine karşı aşırı duyarlılığı (Katkov ve ark. 1998), baş kısmının memelilerden farklı bir yapıda şekillenmesi, spermatozoonlarının plazma membranındaki suyu geçirme özelliğinin az olması (Dewit ve ark. 2000), spermatozoonda dondurma sırasında meydana gelen soğuk şoku etkisi, mekanik stres faktörlerine (santrifüj, karıştırma, pipetleme ve sulandırma gibi) karşı daha duyarlı bir hücre membranına sahip olması yapısının hassas oluşunun nedi olarak gösterilmektedir (Katkov ve ark. 1998, Koshimoto ve ark. 2000).

Fare spermatozoonunun membran yapısının güçüz olmasından dolayı bulunduğu ortamdaki ozmotik basınca karşı koyma gücü daha düşüktür (Noiles ve ark. 1997, Katkov ve ark. 1998, Dewit ve ark. 2000, Koshimoto ve Mazur 2002). Hücre membranının hassas olmasının nedeni; spermatozoonun hücresindeki yapısal değişiklikten ileri gelmektedir. Hücresel yapıda bulunan aktin filamentler spermatozoon membranının dayanıklı olmasına

katkı sağlamaktadır. Hipoozmotik bir ortama maruz kalındığında hücre membranı yapısı sağlam değil ise membran bütünlüğünün geçirgen özelliği kaybedilir (Noiles ve ark. 1997).

Spermanın dondurulmasında kullanılacak sulandırıcının içerisine farklı kriyoprotektanların katılması, spermatozoonlarda ozmotik dengeyi etkileyerek plazma membranında suyun geçirgenliğini değiştirmektedir (Gilmore ve ark. 1995, Gilmore ve ark. 1996, Katkov ve ark. 1998, Koshimoto ve Mazur 2002). Fare spermatzoası diğer hayvan türlerinden farklı bir yapıya sahip olmasından dolayı, sperma sulandırıcısına ilave edilen kriyoprotektan ajanlar spermatozoonun membranı ile karşılaşınca ozmotik basınca verilen tepkiyi değiştirir ve membran bütünlüğünün ortadan kalkmasına neden olur (Songsasen ve Leibo 1997-a). Spermatozoon membran yapısının bozulması ile hücre dışından hücre içerisine giren sıvı, spermatozoonun dondurulması aşamasında hücre içerisinde oluşan buz kristalleri, spermatozoonun ölümüne neden olur (Koshimoto ve Mazur 2002).

Ayrıca, spermatozoonların dondurulup çözündürülmesinden sonra, ortam da bulunan kriyoprotektan maddelerin uzaklaştırılması ile ozmotik basınçta değişimler meydana gelir. Buna adapte olmayan spermatozoonun plazma membranının yapısı değişerek, bütünlüğünün kaybolmasına neden olabilir (Songsasen ve Leibo 1997-a). Fare spermatozoonunun dondurulmasında uygulanan yöntemlere göre yapılan tohumlamalarda elde edilen canlı yavruların sayısında farklılıklar gözlenmektedir (Songsasen ve Leibo 1997-a).

2. 9. Sulandırıcılara İlave Edilen Kriyoprotektanlar

Spermatozoonların sulandırılması, soğutulması, dondurulması ve eritilmesi süreçlerinde farklı sıcaklık, ozmotik basınç, kimyasal ve mekanik etkenlere maruz kalmalarının sonucunda fonksiyonel, morfolojik ve nükleer hasarlar ortaya çıkabilmektedir. Ortaya çıkan bu hasarların nedenleri kullanılmakta olan kimyasal ajanlara ve hayvanların türlerine (spermatozoonlarının plazma membran yapıları ile permabilitelerinin özellikleri) bağlı olarak değişmektedir. Oluşan hasarların etkilerini azaltmak ve daha iyi protokollerin ortaya çıkarılması için kriyoprotektif ajanlar ile sıcaklık farklılıkları ile ilgili çalışmalara ağırlık verilmiştir (Vajta ve Kuwayama 2006).

Spermaların dondurulmasında plazma membranı, akrozomdaki morfolojik yapı, spermatozoon DNA'sı ve spermatozoonun organellerinde oluşabilecek hasara engel olmak için sperma sulandırıcısına kriyoprotektif maddeler katılmaktadır. Sulandırıcıya katılan bu maddeler spermanın dondurulması sırasında sıvı halden katı hale geçmede molekülün hacminde ve aktif molekül (iyon) miktarında azaltıcı etki gösterir (Critser ve ark. 1988).

Spermanın sulandırılmasında kullanılan kriyoprotektif ajanların görevi spermanın dondurulması ya da soğutulması sırasında oluşabilecek zarar verici etkenlere karşı hücreyi korumaktır. Kriyoprotektanlar etkilerini hücrenin içinde ve dışında ortaya çıkan maddelerin etkilerini toksik olmayacak seviyelerde sınırlayarak, hücrede meydana gelebilecek dehidrasyonu ve hücre membranının sağlam kalmasını sağlayarak gösterirler (Critser ve ark. 1988). Kriyoprotektif ajanların sentetik ya da doğal yapıda olanları oluşabilecek buz kristallerinin hücre membranındaki değişik yüzeylerine etki ederek oluşabilecek kristallerin genişlemesinin önüne geçtiği öne sürülmektedir (Uchida ve ark. 2007).

Kriyoprotektan ajanlar; hücre içerisine penetre olabilen ve hücre içerisine penetre olamayan kriyoprotektan ajanlar şeklinde sınıflandırılmaktadır (Amann 1999). Kütlece düşük ağırlıkta olan kriyoprotektif ajanların fazlalığı spermatozoonlarda negatif bir etki oluşturmaktadır (Payne ve ark. 1994, Palasz ve Mapletoft 1996). Spermanın dondurulmasındaki başarı kriyoprotektan ajanların ve suyun hücre içi ve hücre dışı ortamdaki yer değişimidir. Meydana gelen bu olay spermatozoonun plazma membranındaki protein yapısında olan molekülleri ile oluşmaktadır. Bu sayede protein yapısında olan kriyoprotektan ajanların sperma sulandırıcısına eklenmesi ile sıcaklık değişimi ve ozmotik basınçtaki değişimlere karşı spermatozoonun hücre yapısında koruma sağlanabileceği kaydedilmektedir (Edashige ve ark. 2003).

2. 9. 1. Hücre İçine Penetre Olabilen Kriyoprotektanlar

Hücre içerisine girerek etkisini gösteren kriyoprotektan ajanlar, sperma sulandırıcısına ilave edildiğinde, hücre içerisindeki suyun hücre dışına geçmesini sağlayarak spermatozoonlarda dehidrasyon oluştururlar (Purdy 2006). Böylece sulandırıcıya eklenen kriyoprotektanın etkisi ile suyun hücrenin içinde ve dışında yoğunlukları eşitlenerek denge sağlanmış olur (Amann 1999).

Dehidrasyon sonucu hücre içindeki su miktarı azalarak donma noktasındaki düşüş ile beraber hücrenin içindeki su kristalleri azalmaktadır. Eğer hücre içindeki suyun miktarı fazla ise buz kristali miktarı fazla olacağından, hücrelerde ölüm ve fertilizasyonda düşüşlerin görüldüğü bildirilmektedir (Purdy 2006). Hücre içerisine giren kriyoprotektan ajanlar, spermatozoon membranındaki lipitleri ve proteini tekrardan düzenlemektedir. Membranda akışkanlığın artırılmasını sağlayarak sıcaklık düştüğünde dehidrasyonu artırıp donma sonunda hücrenin canlılığının korunmasını sağlarlar (Holt 2000).

Spermanın dondurulmasında en çok kullanılan permeabl kriyoprotektan ajanlar gliserol, etilen glikol ve dimetil sülfoksittir (DMSO). Gliserol ilk olarak 20. yüzyılın ortasında kullanılarak koruma özelliği bulunmuştur (Salamon ve Maxwell 2000). Hidrofilik bir yapıya sahip olan gliserol'ün koruma etkisi yoğunluğu, yapısında karbonun bulunmasına buna bağlı olarak düşük hidroksit oranı ve suyu bağlama özelliği ile ilgilidir. Gliserol; spermatozoonun içerisine girerek hücrede suyun azalmasını sağlar böylece sıcaklık düştüğünde büyük buz kristallerinin ortaya çıkmasını engeller (Nauk ve ark. 1970, Farrant ve ark. 1977, Salamon ve Maxwell 1995). Sperma sulandırıcısına eklenen gliserolün optimum miktarı yumurta sarısının oranına bağlı olarak etkilenmektedir (First ve ark. 1957, Watson ve Martin 1976).

Hücre membranını kolaylıkla geçebilen gliserol membranda lipit yapısını etkileyerek membran stabilitesinde, akışkanlığında ve suyu geçirme özelliğinde değişimlere sebep olmaktadır (Noiles ve ark. 1995, Holt 2000,). Kullanılacak gliserol miktarı sulandırıcı bileşimine ve sulandırıcıdaki ozmotik basınca göre etkisini göstermektedir (Lightfoot ve Salamon 1970). Gliserolün eklenen miktarı ya da uygulama yöntemi yanlış ise hücrede zarar verici bir etki göstermektedir (Salamon ve Maxwell 2000). Ortaya çıkan bu zararlı etkinin gliserolün metabolizması sonucu ortaya çıkan 'methylglycosal' sebebiyle oluştuğu ortaya konulmuştur (Katkov ve ark. 1998, Alvarenga ve ark. 2000, Gilmore ve ark. 2000).

Gliserolün dışında kriyoprotektif amaçlı sulandırıcı içerisine farklı maddeler eklenmektedir. DMSO, etilen glikol, düşük moleküler ağırlıklı poliyoller, polimerik bileşikler, surfaktanlar ve yüksek yoğunlukta şekerler araştırma amaçlı kullanılmış ama gliserolün etkinliği kadar başarılı olmamışlardır (Salamon ve Maxwell 2000).

2. 9. 2. Hücre İçine Penetre Olamayan Kriyoprotektanlar

Hücre içine giremeyen kriyoprotektanlar spermatozoonun plazma membranını geçemedikleri için hücre dışında etki gösterirler. Sulandırıcının ozmolaritesinde artış sağladıkları için hücrenin membranında değişimlere yol açarak hücre içindeki su ile katyonik moleküllerin hücre dışına geçmesine neden olurlar. Hücre içine giremeyen kriyoprotektanlar hücrelerin plazma membranını etkilemesi dışında çözelti görevinde görerek içinde bulunduğu ortamın donma noktasında da düşmeye sebep olurlar (Amann 1999).

Çözelti görevinde etkisini gösteren kriyoprotektanların sulandırıcı içerisinde olması hücre içerisine girebilecek toksik madde etkisini de azaltır (Arav ve ark. 1993). Farklı miktarlarda şeker yoğunluğu içeren hiperozmotik sulandırıcılar ile hazırlanan sulandırıcılarda donma-eritme sonrası spermatozoon membran bütünlüğünde iyileşme olduğu bildirilmiştir (Salamon ve Visser 1972). Şekerler, monosakkaritler, disakkaritler ve trisakkaritler olarak sınıflandırılıp her birinin donma ve erime sonrası kriyoprotektif etkileri farklılık göstermektedir (Yıldız ve ark. 2000, Panyaboriban ve ark. 2015). Sperma sulandırıcılarına katılan şekerlerin bir faydası da enerji vermeleridir (Panyaboriban ve ark. 2015). Sakkaritler ve trisakkaritler hücre membranını geçemeyip sulandırıcıya eklendiklerinde hiperozmotik bir ortam oluşturarak hücrede dehidrasyonu sağlamaktadırlar (Schmehl ve ark. 1986, Fiser ve ark. 1987, Molinia ve ark. 1994, Storey ve ark. 1998).

Monosakkaritlerin molekül ağırlıkları düşük olduğu için spermatozoonların plazma membranı üzerine etkili ve enerji metabolizmasında rol oynamaktadırlar (Purdy 2006, Panyaboriban ve ark. 2015). Disakkaritler basit şekerlerden (glukoz ve fruktoz) daha etkili bir kriyoprotektandır (Purdy 2006). Daha yüksek bir ozmotik basınç oluşturarak hücrede dehidrasyonu başlatıp buz kristallerinin oluşmasını azaltırlar (Parks ve Graham 1992). Disakkaritler hücre plazması membranında bulunan fofolipitlerle etkileşim sağlayarak membranı tekrar düzenlerler. Membranda akışkanlığın artmasını sağlayarak spermatozoonun donma aşamasından sonra daha sağlıklı olmalarına katkı da bulunurlar (McGann 1978, Molinia ve ark. 1994, McWilliams ve ark. 1995, Aisen ve ark. 2002, Purdy 2006).

Hücre içerisine giremeyen şekerler plazma membranı katmanında etki göstererek fosfolipit polar gurubu ile hidrojen bağı oluşturup buz kristalleri oluşumunu önlemektedirler (Liu ve ark. 1998, Aboagla ve Terada 2003, Purdy 2006, Uchida ve ark.

2007, Panyaboriban ve ark. 2015). Lipit katmanı arasına girerek membranda bulunan kuru lipidlerin sıvı faza geçişinin kolaylaşması (Aisen ve ark. 2002, Fernández-Santos ve ark. 2007, Molinia ve ark. 1994, Patist ve Zoerb 2005) ile buz kristalinin meydana gelmesi azalmış olmaktadır. Trehaloz sperma sulandırıcısında bulunan serbest su moleküllerinin azalmasını sağlayıp hücrede dehidrasyon oluşumunu sağlayarak buz kristallerinin ortaya çıkmasında azaltıcı etki meydana getirip, çözündürme sonrasında membran bütünlüğünün korunmasında etkilidir (Cirit ve ark. 2013). Benzer şekilde sükrozunda buz kristalinin ortaya çıkmasını azaltıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (Panyaboriban ve ark. 2015).

2. 10. Antioksidanlar, Serbest Radikaller ve Okasidatif Stres

Vücut içerisinde hücre ve dokulardaki serbest radikallerin oluşumu sonucu ortaya çıkan oksidatif etkilerin engellenmesini sağlayan savunma sistemleri bulunmaktadır. Bu savunma işleyişinde görevli olan maddeler antioksidan maddeler olarak adlandırılmaktadırlar (Bucak ve ark. 2015, Şimşek 1999). Antioksidanlar işlevsel özellikleri bakımından; radikallerin temizlenmesi ile etki eden “serbest radikallerin oluşumunu önleyen” ve radikaller ile uyumlu bir ürün ortaya çıkararak reaksiyonları sonlandıran “zincir kıran antioksidanlar” diye iki gruba ayrılırlar. Serbest radikal oluşumuna engel olan antioksidanlar, transferin, albümin benzeri metal bağlayıcılar, katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz olarak kendi içerisinde ayrılırken; zincir kırıcı olanlar ise yağda eriyebilenler (ubikuinon, alfa tokoferol, beta karoten) ve suda eriyenler (sistein, glutatyon ürat, askorbat) olarak kendi içerisinde ayrılmaktadır (Şimşek 1999). Ayrıca, çinko ve selenyum gibi antioksidatif etkili enzimler için kofaktör görevinde maddelerde yer almaktadır (Hezavehei ve ark. 2018).

Dondurulmuş sperma, taze sperma ile karşılaştırıldığında genelde fertilité oranı daha düşük olmaktadır. Bunun sebebi çözündürme sonu hem canlı spermatozoon oranı düşüklüğü, hem de canlı fakat işlev yeteneği azalmış hücrelerden ileri gelmektedir (Alcay ve ark. 2016). Donma hızı, soğuk şoku, sulandırıcının bileşenleri, ozmotik basınçtaki farklılıklar gibi çok sayıda etken spermatozoonların yaşam yeteneğinin azalmasına yol açarken, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu membran yapısında görülen değişiklikler (oksidatif zarar), membran reseptörleri yapısında bozulma, yer küre nükleer yapısındaki radyoaktivite gibi etkilerin de spermanın işlevsel yapısına zarar verdiği bildirilmiştir (Hafez 2000, Mazur 1984, Sönmez 2013, Türk 2015).

Yapısında bir ya da birden fazla sayıda ortaklanmamış elektron barındıran moleküllere “serbest radikaller” adı verilmektedir. (Türk 2015, Zhong ve Zhou 2013). Bu radikaller, yapılarındaki elektronları hücre içinde bulunan iyon transfer kanallarının sayesinde hücrelerden geçirip onların membran yapılarında bulunan lipid ve protein bölümlerini etkilemektedir (Bucak ve ark. 2015). Serbest radikaller yapıları itibarı ile reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türlerini barındırmaktadırlar. Reaktif oksijen türleri üç büyük tip olarak hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil şeklindedir (Zhong ve Zhou 2013).

Serbest oksijen radikalleri, radikal yapıda ya da radikal yapıda olamayan moleküller ile reaksiyona girip onların yapı ve işlevlerinde değişikliklere neden olurlar (Şimşek 1999). Halliwell (2006), serbest radikalleri reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırıp, oksijen moleküllerinin radikal yapıda olduklarını fakat reaktif yapıya sahip olmayanlarında olduğunu bildirmiştir.

Testis dokusu içerisindeki sperma üretimi aşamasında, kanal sistemi, epididimis, ejakülasyon sırası ve ejakülasyon sonrasındaki süreçte olduğu gibi sulandırma, dondurma ve çözündürme işlemleri esnasında ya da sonrasında meydana gelen hücre ölümü ve hücre işlevindeki azalma, oksidatif stres ile bağlantılıdır (Bailey ve ark. 2000, Bilodeau ve ark. 2000). Spermatozoanın olgunlaşması testisten kauda epididimise geçiş sırasında olmaktadır. Bu geçiş sırasında spermatozoalar yüzeyinde oluşan pek çok değişik yapılar epididimise kadar ulaşabilmektedir. Plazma membranındaki yüksek miktardaki doymamış yağ asitleri, spermatozoanın ROS ataklarına karşı savunmasız bir duruma gelmesine neden olmaktadır (Wai-Sum ve ark. 2006).

Olgunluğa ulaşmamış ve morfolojik yapı olarak anormal şekildedeki spermatozoalar ve seminal plazmadaki lökositler ejakülat içinde bulunan temel ROS kaynağıdır. Dondurma, saklama ya da transfer etmek amacı ile alınan sperma, dış ortamdaki kirleticiler, gün ışığı etkisi ve oksijen kaynaklı ROS’un ortaya çıkmasını tetikleyip, spermatozoon genel yapısında geri dönüşümü olmayan bozukluklara yol açmaktadır (Sarıözkan ve ark. 2009a, Sarıözkan ve ark. 2009b).

Serbest oksijen radikalleri ortaya çıkan zararlı etkilerinin önüne geçmek ve lipid peroksidasyonu önlemek için, seminal plazma ve spermatozoa bir takım antioksidanları yapısında bulundurmaktadır (Alvarez ve Storey 1983). Seminal plazma yapısında çoğunlukla erkek eklenti bezi salgılarını bulundurur ve bu salgılar fertilizasyon aşamasına

kadar spermanın besin gereksinimi ihtiyacını karşılayıp, katalaz, glutatyon peroksidaz ve superoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlere ek olarak, vitamin E ve C, taurin, hipotaurin, ürik asit ve albumin gibi stres etkisine karşı spermatozoanın korunmasında etkili antioksidan maddeleri içermektedir (Chen ve ark. 2003, Wai-Sum ve ark. 2006, Vernet ve ark. 2004).

Oksidatif stres, antioksidanların parçalayamayacağından fazla miktarda reaktif oksijen türevinin (ROS) üretilmesi olarak tanımlanmaktadır. Akrozom reaksiyonu, kapasitasyon, protein ve tirozin fosforilasyonu ve spermatozoon-oosit füzyonu gibi spermatozoon işlevleri içinde bir miktar da ROS olması gereklidir (Agarwal ve Allamaneni 2004, Türk 2015, Zhong ve Zhou 2013). Hücre ve dokularda aşırı miktarda ROS bulunması antioksidan savunma sisteminin baskılanması sonucu oksidatif stresin meydana gelmesine neden olmaktadır. ROS'un plazma membranı bütünlüğünü etkilemesi, nükleer DNA'yı da etkileyip DNA ve kromatin bağlarının kopmasına da neden olduğu bildirilmiştir (Said ve ark. 2005). Bu kopmaların artması ile beraber DNA hasarı, morfolojik olarak değişiklikler, mitokondrial yapıda bozukluklar ortaya çıkarak infertilitede artış olmaktadır (Zhong ve Zhou 2013, Gagnon ve ark. 1991, Sikka ve ark. 1995).

Spermatozoonlar plazma membran yapılarında yüksek miktarda doğal lipitler, fosfolipitler ve glikolipit yapılarını bulundurmaktadırlar. Kriyoprezervasyon işlemi sırasında spermatozoon membran yapısı ve akrozom üzerinde yapısal olarak deformasyonlar meydana gelmektedir. Farklı hayvan türleri arasında değişen miktarlarda hücresel yağ oranı, dondurma ve çözündürme başarısında değişime neden olmaktadır (Salamon ve Maxwell 2000). Serbest oksijen parçacıkları sonucu ortaya çıkan zararlı etkileri ortadan kaldırmak için indirgenmiş glutatyon peroksidaz, glutatyon, süperoksit dismutaz ve katalaz içeren endojen antioksidan sistemi bulunmaktadır. Endojen antioksidan savunma sistemi bulunmasına rağmen bu sistem, ölü spermatozoonların neden olduğu fazla miktarda ROS'un oksidatif zararlı etkilerini önlemede yeterli olmamaktadır. Ortaya çıkan bu etkiler sperma membran yapısı ve bütünlüğünde kayıba, membran geçirgenliğinde artma, DNA'nın yapısal yıkımı ve hücre ölümüne yol açmaktadır (Banday ve ark. 2017, Taylor 2001). Antioksidan ilavesinin spermatozoonların saklanması işleminde ortaya çıkacak oksidatif stresi azaltarak soğutulmuş ya da dondurulmuş sperma kalitesini arttırmada etkili olduğu belirtilmektedir (Bilodeau ve ark. 2001).

2. 11. Sperma Sulandırıcısına Antioksidan Olarak Ferulik Asit, Triptofan ve L-Glutamin'in İlavesi

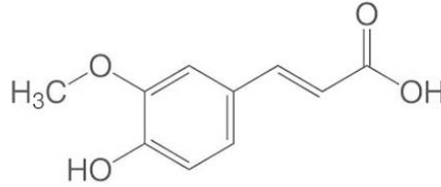
2. 11. 1. Ferulik Asit'in Özellikleri

Ferulik asit adını ilk defa *Ferula foetida* denilen bir bitkiden elde edilerek almıştır. Kimyasal olarak isimlendirilmesi ise 4-hidroksi-3-metoksisinnamik asit şeklinde belirtilmiştir (Kumar ve Pruthi 2014). Ferulik asit sebze ve meyvelerin yapısında, bitkilerin tohumları ya da yapraklarında bulunur. Bitki yapraklarında serbest şekilde bulunan ferulik asit lignin ya da polimer yapıda bileşikler olarak bulunmaktadır (Andersons ve ark.1980, Bravo 1998). Ferulik asit, DNA ya zarar veren etkenlere karşı oluşan hidroksil radikalleri olan süperoksit ve nitrik oksit gibi serbest radikal gruplarına karşı savunucu etki gösterir. Ferulik asit etkisini sadece hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil radikalleri ve nitrojen dioksit gibi serbest radikallere göstermek ile ortaya çıkarmaz ayrıca antioksidan enzim aktivitelerinin artmasına da neden olup oksidaz aktivitelerinin etkisini baskılar (Ou ve Kwok. 2004).

Ferulik asitin fenolik bir bileşik olması ve lipit peroksidasyonuna engel olmasından dolayı ülkeler bazında gıda takviye ürünü olarak tercih edilmektedir. Ferulik asit, fenil alanin ve tirozin metabolizması sonucu ortaya çıkan bitki bileşeni olup pirinçlerden elde edilen yağların üretim aşamasında arta kalan kepeklerinin ziftlerinde de bulunmaktadır (Kikuzaki ve ark. 2002). Ferulik asitin reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkilerine karşı antioksidan etkileri mevcuttur (Adam ve ark. 2002, Alam 2019, Graf 1992, Kelainy ve ark. 2019). Ferulik asit, sebze, meyve ya da tohumlarının temel bileşeni kabul edilen bitki hücre duvarlarında bulunan organik bir bileşendir (Itagaki S ve ark. 2009). Antioksidan etki gösteren ferulik asit reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerinin işlevlerini ortadan kaldırdığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Koh 2012, Urbaniak ve ark. 2013). Ferulik asit ile kimyasal olarak benzer yapıya sahip olan fenolik asit yapısındaki (vanilik asit, sinnamik asit ve kumarik asit) maddeler ile kıyaslandığında ferulik asitin 1,1-difenil-2-pikrilhidrazile göre antioksidan etkisinin daha iyi olduğu belirlenmiştir (Kanski ve ark. 2002).

Ferulik asit insanlarda invitro (Zheng ve Zhang 1997) spermatozoonun motilitesi ve sıçanlarda invivo spermatozoon parametrelerinde (Roy ve ark. 2014) artışa neden olduğu

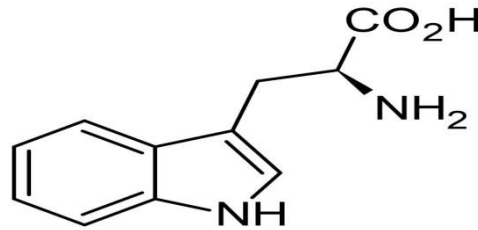
ortaya konulmuştur. Ferulik asitin antimikrobiyal, anti-inflamatuar, antihiperlipidemik, antidiyabetik, antikanser, antiapoptotik, antiviral, antimikrobiyal, antitrombotik, vazodilatör ve spermatozoon motilitesini aktive edici gibi etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Borges ve ark. 2013, Srinivasan ve ark. 2007, Kumar ve Pruthi 2014).



Şekil 2. 1. Ferulik asit'in kimyasal yapısı

2. 11. 2. Triptofan'ın Özellikleri

Hopkins ve Cole (1901) beraberliğinde kazein proteininin 1900'li yılların başında elde edilmesi ile beraber triptofan bulunmuş ve moleküler yapısı ise Ellinger ve Flammedin (1908) çalışmaları sonucu ortaya çıkarılmıştır. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) sistemi isimlendirmesine göre 2- amino-3-(1H-indol-3-il) propiyonik asit şeklinde adlandırılmış olan triptofan apolar zincirli bir yapıda esansiyel bir aminoasit olarak bilinir (Richard ve ark. 2009).



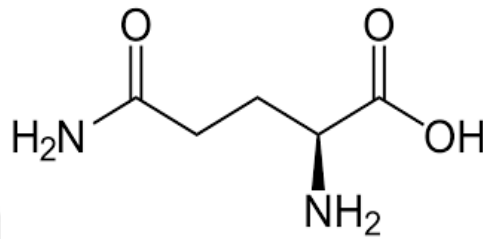
Şekil 2. 2. Triptofan'ın kimyasal yapısı

Triptofan memelilerin protein sentezinde rol oynayan, hücresel yol ve fizyolojik tepkilerde etkili olduğu bilinen metabolitler için pleiotropik yapıda aromatik amino asittir (Yao ve ark. 2011). Triptofanın absorbe edildikten sonra %90 oranda albümin ya da serbest şekilde periferel dolaşıma katılarak varlığını sürdürmektedir. Kan-beyin bariyerindeki geçisi kompetitif non-spesifik L-amino asit taşıyıcıları ile serbest şekilde olmaktadır. Triptofan'ın periferel ve santral sinir sistemindeki metabolizma aktivitesinin ana iletim yeri kinürenin yapısındaki iletim yeridir (Chen ve Guillemin 2009). Triptofan

aromatik amino asit yapısında bir amino asit olup farklı çalışmalarda antioksidan özelliğinin varlığı saptanmıştır (Christen ve ark. 1990, Moosmann ve Behl 2000, Nayak ve Buttar 2016, Xu ve ark. 2018).

2.11. 3. L-Glutamin'in Özellikleri

L-Glutamin vücutta en çok bulunan serbest amino asit olup metabolizma, protein sentezi ve yıkımında, hücre bütünlüğün korunması, redoks potansiyeli ve hücre dışı matris gibi farklı hücre yapısına katkıda bulunmaktadır (Spodenkiewicz ve ark. 2016).



Şekil 2. 3. L-Glutamin'in kimyasal yapısı.

L-Glutamin glutatyon oluşumunda hayati fonksiyona sahip bir glutamat öncüsü olup spermatozoondaki ROS lipid peroksidasyonundaki etkisini ortadan kaldırıcı yönde etki gösteren antioksidandır (Amores-Sánchez ve Medina 1999). L-Glutaminin gama-glutamil döngüsündeki etkisinden dolayı glutatyon sentezi için gereklidir (Roth ve ark. 2002). Glutatyon spermatozoonların oksidatif stres etkisine karşılık hücre içi savunma mekanizması olarak antioksidan etki göstermektedir (Gadea ve ark. 2004). L-Glutamin hücre metabolizmasının düzenlenmesinde ve hücre membranı yapısında koruyucu bir etkiye sahip olup protein yapısındaki oksidasyon-redüksiyon aktivitelerine, gen ekspresyonu ve solunum patlamasına katkıda bulunur (Curi ve ark. 2007).

Kriyoprotektan özelliğine sahip olan L-Glutamin maymun (Li ve ark. 2003), insan (Renard ve ark. 1996) ve koç (Bucak ve ark. 2009) gibi farklı türlerde spermanın dondurulma çalışmalarında antioksidan özelliğinden dolayı kullanılmaktadır. Hücre membranı boyunca taşınan L-Glutamin, glutamat ve amonyağın üretimi nedeni ile mitokondri tarafından demanine edilmesi sağlanır. Elde edilen glutamat glutatyon sentezi için kullanılacağından sitozele taşınması sağlanmış olur (Yu ve ark. 1999, Gaurav ve ark. 2012).

2. 12. Fare Sperması Üzerine Yapılan Araştırmalar

Birçok türe göre fare spermasının dondurulma yeteneği oldukça düşüktür. Bununla birlikte özellikle dondurulma yeteneği ve başarısı üzerine, kullanılan fare ırkı, seçilen kryopreservatif madde, karbonhidratlar, lipidler, aminoasitler ve antioksidanların oldukça önemli etkileri bulunmaktadır (Evans ve Maxwell 1987; Tada ve ark. 1990; Takeshima ve ark. 1991; Dewit ve ark. 2000; Yıldız ve ark. 2007; Takeo ve Nakagata 2010).

Çizelge 2. 1. Fare spermatozoonlarının kriyoprezervasyonu üzerine yapılmış çalışmalar.

Araştırmacı	Yıl	Araştırmanın Amacı	Kullanılan Sulandırıcılar	Sonuç
Graham ve ark.	1978	Fare spermatozoonları üzerinde kryoprezervasyon denemesi	Raffinoz ve gliserol	Dondurulmuş spermatozoonlardan ilk fareler üretildi.
Yokoyama ve ark.	1990	Farklı oranlarda rafinoz ve gliserolün spermatozoon kryoprezervasyonu üzerindeki etkileri	%20 rafinoz + %5 gliserol	%37 fertilizasyon
Tada ve ark.	1990	Farklı oranlarda rafinoz ve gliserolün farklı fare ırkları spermatozoon üzerindeki etkileri	%18 rafinoz + % 1,75gliserol	Farklı fare ırklarına göre % 13-65 fertilizasyon
Penfold ve Moore	1993	Farklı kryoprotektanların etkisi	Tris, gliserol, yumurta sarısı ve sodyum dodesil sülfat	%59 oranında fertilizasyon
Sztejn ve ark.	2001	%3 yağsız süt içerisinde internal ve eksternal kryoprotektanların farklı kombinasyonlarının motilite üzerindeki etkisi	- İnternal kryoprotektanlardan gliserol, formamid, propandiol, DMSO, adonitol-eksternal kryoprotektanlardan laktoz, rafinoz, sukroz, trehaloz, D-manitol kullanılmış	En yüksek Raffinoz + Yağsız süt tozu karışımından sırasıyla %23 motilite ve %42 membran bütünlük oranı tespit etmişlerdir
Yıldız ve Ark.	2007	Kryoprezervasyonun spermatozoon kalitesine,	Farklı doğal ve kimyasal kryoprotektanlar ve yağsız süttozu	Spermatozoon dondurmanın

		nükleer DNA bütünlüğü, invitrofertilizasyonu ve invitro embriyo gelişimi üzerindeki etkileri		çözüm sonrası başarısı ve DNA bütünlüğünün korunması farklı kryoprotektan cinsi ve kullanılan fare ırkına bağlı olarak değişken olduğunu rapor etmişlerdir.
--	--	---	--	---



Araştırmacı	Yıl	Araştırmanın Amacı	Kullanılan Sulandırıcılar	Sonuç
Takeo ve Nakagata	2010	Glutaminin kryoprezervasyon üzerindeki etkisi	%18 rafinoz , % 3 yağsız, 100 mM/L glutamin ve metil b-siklodekstrin	Dondurup çözödürölen spermelerin döölleme yeteneklerinde ciddi oranında artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir.
Yildiz ve Ark.	2010	Kryoprezervasyonun mutant ve mutant olmayan fare spermelerinin dondurulabilirliğine, DNA bütönlüğüne, invitro fertilizasyonu ve invitro embriyo gelişimi üzerindeki etkileri	Rafinoz ve yağsız süttözu	Rafinoz ve yağsız süttözu karışımının farklı mutasyona tabi tutulmuş fare spermelerinin başarılı kryoprezervasyonun da güvenle kullanılabileceğini bildirmişlerdir.
Bertoldo ve ark.	2014	5000 µM Metforminin kryoprezervasyon üzerindeki etkisi	%22.5 rafinoz, %3 yağsız süttö	Metforminin antioksidan etkisiyle dondurup çözödürme sonrasında fertilizasyon ve embriyo gelişim oranında artış elde etmişlerdir.
Raspa ve ark.	2017	Dondurulmuş spermelerin kuru buz içerisinde saklanması	%18 rafinoz , %3 yağsız süttö	-196 °C deki azot tankından alınan dondurulmuş spermelerin - 80°C deki kuru buz içerisinde döölleme yeteneğinde önemli bir kayıp olmaksızın 7 gün boyunca depolanabileceğini bildirmişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Gereç

Sunulan çalışma, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi ile Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı laboratuvarında yürütüldü. Çalışmada 12-24 haftalık yaşta, 60 adet CD-1 ırkı erkek fareler kullanıldı.

Çalışmada kullanılan farelerin bakımı, kullanım şartlarına (12 saat aydınlık: 12 saat karanlık ve $24\pm3^{\circ}\text{C}$) uygun olarak yürütüldü. Deneysel uygulama boyunca fareler için standart ticari fare yemi (pellet yem) ve musluk suyu adlibitum düzeyde verildi. Fareler biri kontrol ve dokuzu deneme grubu olacak şekilde 10 gruba ayrıldı. Her grup 6 adet fareden oluşturuldu. Fare spermatozoonunun dondurulmasında kryoprotektan sulandırıcı olarak %18 raffinöz+%3 yağsız süt tozu kullanıldı (Nakagata 2000). Deneme gruplarına Ferulik asit, Triptofan ve L-Glutamin farklı oranlarda ilave edildi.

3. 2. Yöntem

3. 2. 1. Sperma Sulandırıcılarının Hazırlanması

3. 2. 1. 1. Human Tubul Fluid (HTF)

Çalışmada, 100 ml distile suya göre hazırlan Human Tubal Fluid (Quinn 1985) kompozisyonu Çizelge 3.1. de görülmektedir.

Çizelge 3. 1. Human Tubal Fluid (HTF) kimyasal kompozisyonu

HTF (Human Tubal Fluid)		
Kimyasallar	Miktar(100 ml için)	Tedarikçi Firma
NaCl	0.5938 gr	Sigma S-5886
KCL	0.035 gr	Sigma P-5405
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.03 gr	Sigma C-7902
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.00493 gr	Sigma M-7774
KH ₂ PO ₄	0.00503 gr	Sigma P-5655
NaHCO ₃	0.2101 gr	Sigma S-5761
Glucose	0.05 gr	Sigma G-6152
Sodium lactate	342 µl	Sigma L-7900
Sodium pyruvate	0.00363 gr	Sigma P-4562
Penicillin-G	0.0075 gr	Sigma P-7794
Streptomycin	0.005 gr	Sigma S-9137
Phenolred (0.5%)	40 µl	Sigma P-0290

3. 2. 1. 2. Kriyoprotektan Sulandırıcısına Ferulik Asit, Triptofan ve L-Glutamin'in Eklenmesi

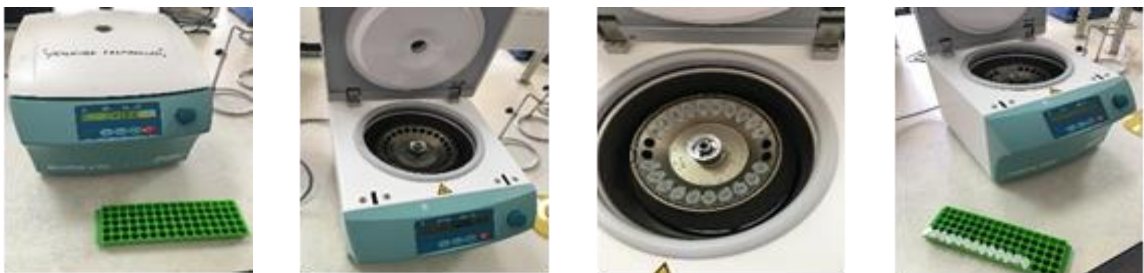
Nakagata'nın (2000) bildirdiği formüle göre, %18 raffinoz+%3 yağsız süt tozu karışımı 100 ml distile su içerisinde çözdürüldü ve soğutmalı santrifüjde 14000 g de santrifüje edildi (Şekil 3.1). Elde edilen süpernatant içerisine 0,1 mM, 1 mM ve 10 mM Ferulik asit, 5 mM, 25 mM ve 50 mM Triptofan, 10 mM, 50 mM ve 100 mM L-Glutamin eklenerek araştırma gruplarına ait solüsyonlar aşağıda özetlendiği gibi (Şekil 3.2) ayrı ayrı hazırlandı.

%18 raffinoz+%3 yağsız süt tozu (Kontrol)

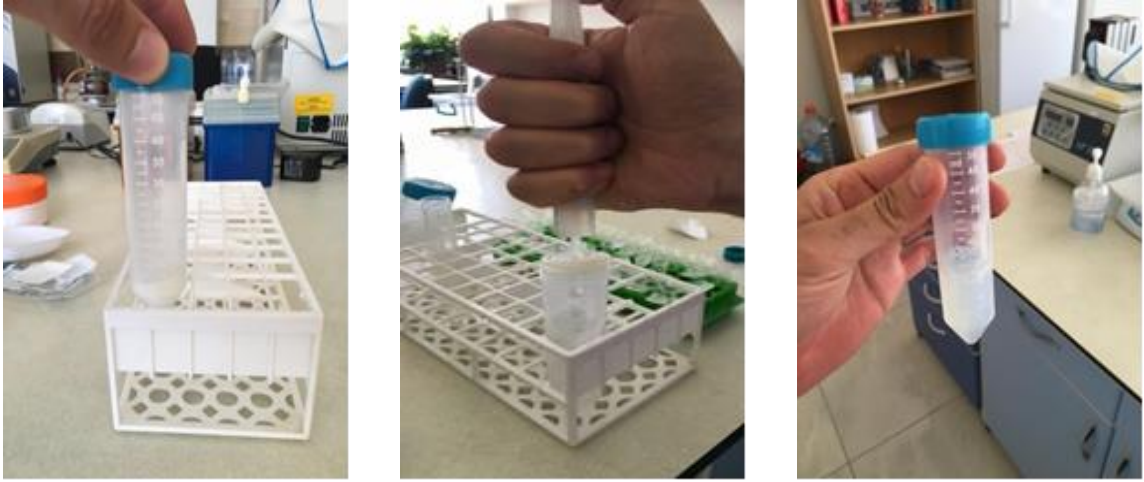
%18 raffinoz+%3 yağsız süt tozu + ayrı ayrı 0.1 mM, 1 mM veya 10 mM Ferulik asit

%18 raffinoz+%3 yağsız süt tozu + ayrı ayrı 5 mM, 25 mM veya 50 mM Triptofan

%18raffinoz+%3 yağsız süt tozu + ayrı ayrı 10 mM, 50 mM veya 100 mM L-Glutamin



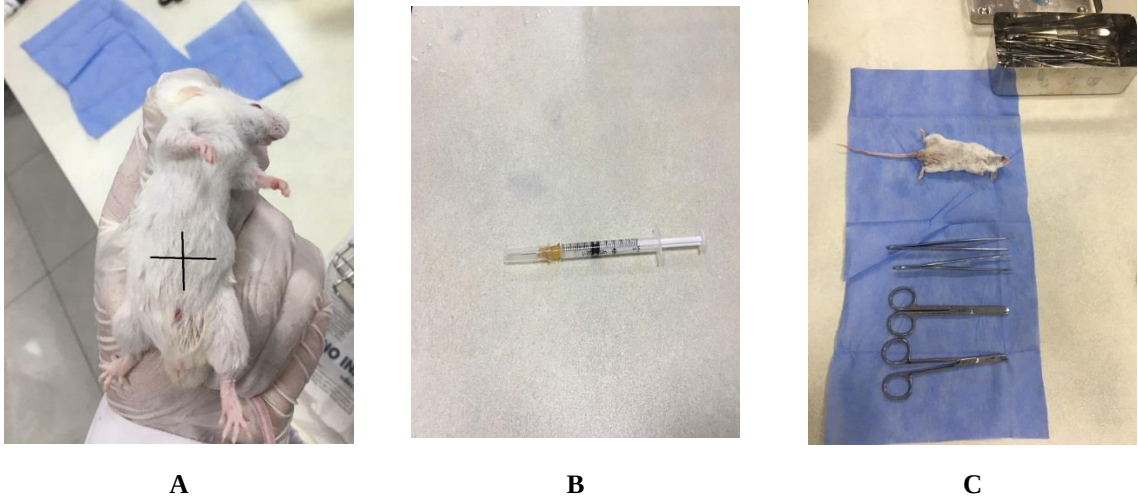
Şekil 3.1. Eppendorf tüplere konulan sulandırıcıların 14000 g deki soğutmalı santrifüjde santrifüj edilmesi.



Şekil 3.2. Çalışmada %18 raffinöz+%3 yağsız süt tozu karışımının hazırlanması

3. 3. 2. Spermatozoonların Alınması ve Sulandırılması

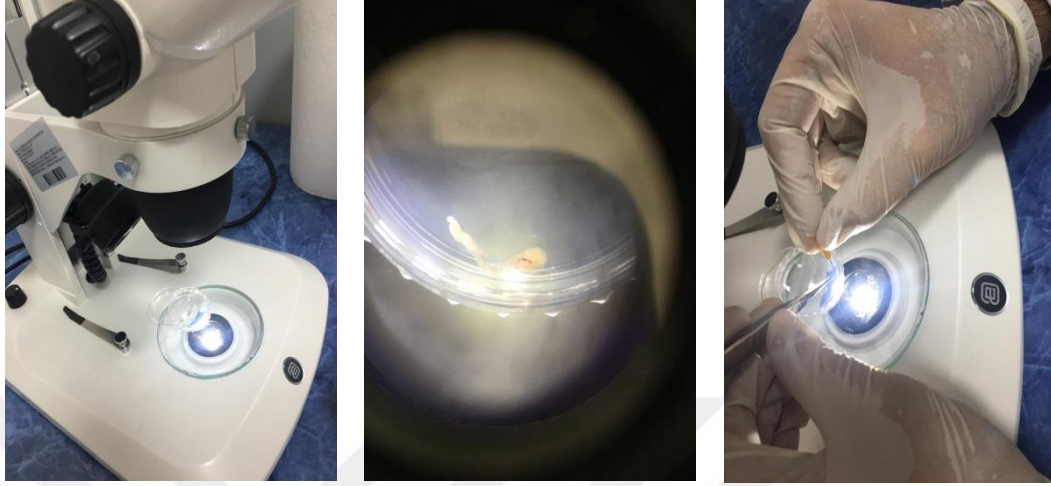
Kauda epididimisten spermatozoonların alınması; çalışmada kullanılan erkek fareler ketamin/ksilazin anestezi altında servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi ve Laminer Flow kabini içerisinde steril şartlarda cerrahi yöntemlerle ürogenital bölgeye ulaşıldı. Testisler dışarı alınıp yağ dokularından arındırılan kauda epididimisler diseke edildiler.



Şekil 3.3. A: CD-1 ırkı farelerin tespiti ve intraperitoneal anestezi altına alma bölgesi, B: Ksilazin/ ketamin karışımı ve C:Cerrahi yöntem hazırlık aşaması.

Sol ve sağ kauda epididimisler, kontrol ve deneme grupları için hazırlanan sperma sulandırıcısı bulunan petri kutularına alındı ve 37°C' deki inkubatöre konuldu. Daha sonra

stereo mikroskop altında dişsiz pens ve insülin iğnesi ucu yardımıyla kaudo epididisler parçalanarak spermatozoonların sulandırıcıya çıkması sağlandı.



Şekil 3.4. Stereo mikroskop kullanılarak epididimal dokudaki spermatozoonların doku dışına çıkarılması işlemi.

Sperma örneklerinden (inkübasyon bittikten sonra) eppendorf tüplere 10 µl alındı ve üzerine HTF solüsyonu alınarak 1/10 oranında dilüe edildi. Motilite ve yoğunluk muayenesi için eppendorf tüpler 37°C de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 37°C’ de ki Makler lamına (World Health Organization, WHO 1999) 10 µl sperma örneklerinden konularak faz kontrast mikroskopun 20 lik objektifinde incelendi. Spermatoon yoğunluğu $20-75 \times 10^6$ /ml ve motilitesi %70’in üzerinde olan spermatozoon örnekleri donduruldu.

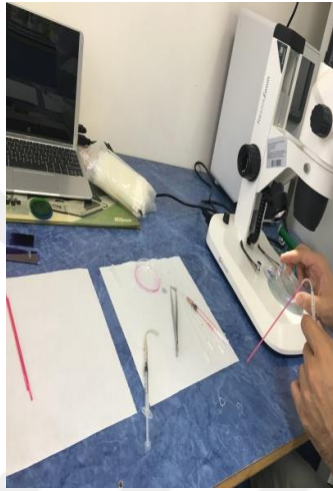
Kontrol ve çalışma gruplarına ait sulandırılmış sperma örnekleri konsantrasyonları $1-3 \times 10^7$ /ml olacak şekilde farklı renklerdeki 0.25 ml payetlere yüklendi ve payetler sıcak pres ile kapatıldı.

3. 3. 3. Spermatozoonların Dondurulması

Payetlerin dondurulma işlemi ön çalışma yapılarak belirlendi. Ön çalışmada dondurma yüksekliğini optimize etmek için payetler sıvı nitrojen seviyesinden 4, 6, ve 8 cm yüksekliklerde 10 dakika süre ile sıvı nitrojen buharında donduruldu. Ön çalışmada sıvı nitrojen seviyesinden 6 cm yükseklikteki payetlerden en iyi sonuç elde edildi. Çalışmada kontrol ve deneme gruplarında bu yükseklik seviyesi kullanıldı.

Çalışmada sperma payetlerinin dondurulması için 27x27x22 ebatlarındaki strafor kutu kullanıldı. Çalışma gruplarına göre renklendirilmiş payetler azot seviyesinden 6 cm yükseklikteki raflara dizilerek 10 dakika süre ile sıvı nitojen buharında donduruldu. Daha sonra payetler sıvı nitrojen içerisine daldırılarak 10 dakika bekletildi.

Dondurulan farklı guruplara ait payetler farklı renkteki gobletlere alındı ve kanisterlere aktarıldı. Payetler 24 saat süre ile sıvı azot tankında muhafaza edildi (Şekil 3. 5).



A



B



C

Şekil 3.5. A: Payetlerin hazırlanması, B: Sıvı azot buharı üzerinde payetlerin dondurulması, C: Çalışmada kullanılan sıvı nitrojen tankı.

3. 3. 4. Payetlerin Çözdürülmesi

Payetler 37° C'de su banyosunda 30 saniye süreyle çözdürüldü. Çözdürülen payetler 37°C karbondioksitli inkübatörde muhafaza edilen ve içerisinde HTF medyumunu bulunan eppendorf tüplere aktarıldı (1/4 oranında). İnkübatörde 10 dakika süreyle bekletilen araştırma örneklerinin spermatolojik özellikleri incelendi.

3. 3. 5. Spermatolojik Özelliklerin Belirlenmesi

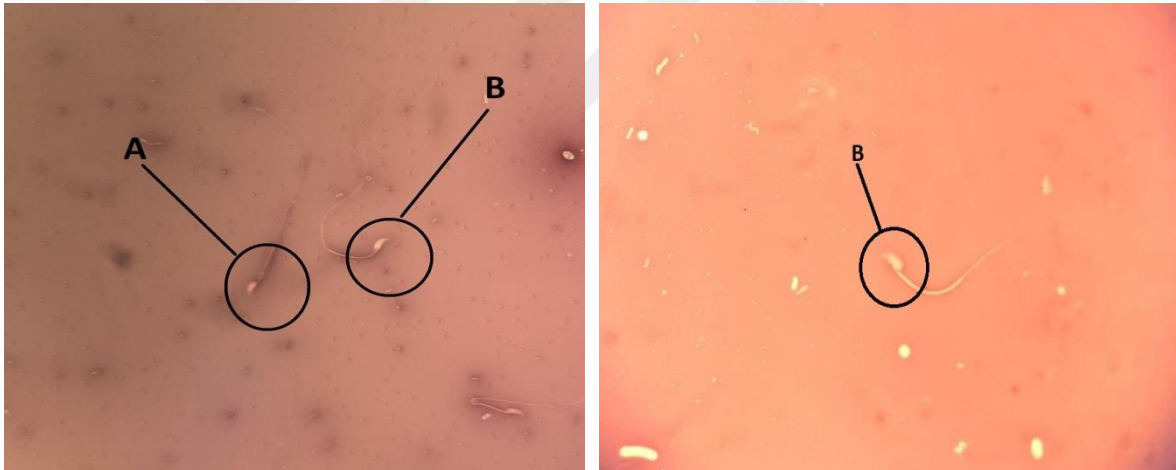
3. 3. 5. 1. Motilite Muayenesi

İnkübasyon süresi sonunda hazırlanan HTF ile sulandırılan spermatozoon örnekleri 10 µl miktarda makler lamı üzerine alınıp, faz kontrast mikroskop yardımı ile 20 lik objektifte muayenesi yapıldı. Sayım alanında yukarıdan aşağıya ya da soldan sağa olacak

şekilde 10 adet karede (toplamda 100 adet kare) spermatozoa sayımı yapıldı. Sayım karelerinde ileri yönde güçlü, düzgün ve doğrusal hareket eden spermatozoonlar ile hareketsiz olan spermatozoonların sayıları kaydedildi. Bu işlem 3-4 defa tekrarlandı ve ortalama motilite değeri % olarak hesaplandı. Spermatozoon konsantrasyonu makler sayım lamı ile üretici protokolüne göre gerçekleştirildi.

3. 3. 5. 2. Ölü Spermatozoon Oranı

Eozin-nigrosin boyama yöntemi Watson'a (1975) göre yapıldı. Bu yöntemde lam üzerine bir damla sperma örneği alındı üzerine bir damla Eosin, bir damla Nigrosin boyası ilave edilerek lamel ile sürme froti hazırlandı. Hazırlanan froti 60°C deki inkübatörde kurutuldu. Faz kontrast mikroskobun 40 lık objektifi ile 300 spermatozoon sayıldı. Baş kısmı boya almayan spermatozoonlar canlı, baş kısmı kırmızı şekilde boya alanlar ölü olarak değerlendirildi. Ölü spermatozoon oranı % olarak hesaplandı.

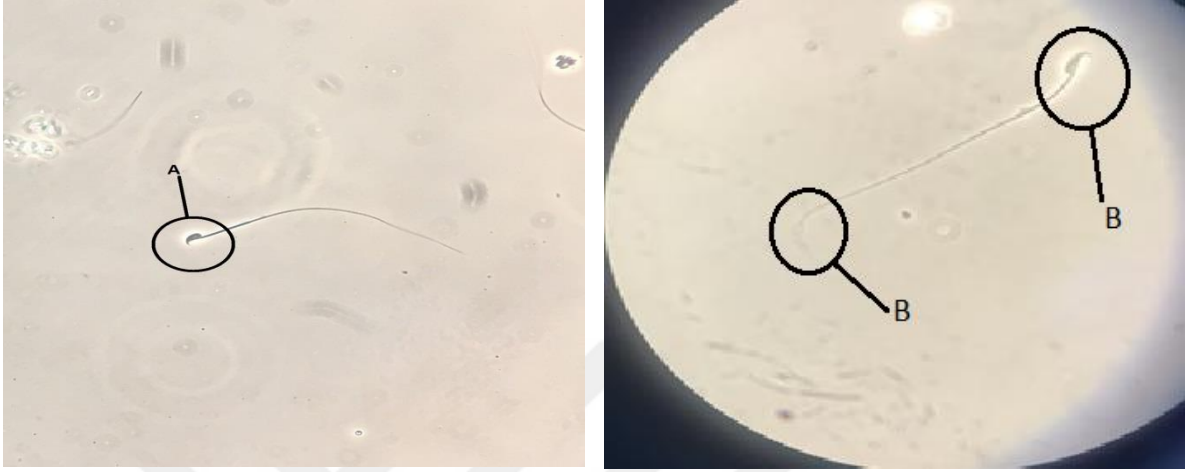


Şekil 3.6. Eozin-nigrosin boyama yöntemi sonucu ölü spermatozoon (A), canlı spermatozoon (B)

3. 3. 5. 3. Hipoozmotik Şişme Testi (HOST)

Hipoozmotik şişme testi (HOST) Jeyendran ve ark. (1984) formül modifiye edilerek yapıldı. Buna göre 100 ml distile su için; 0.55 gr Sodyum sitrat ve 1.1 gr D-fruktoz çözdürülerek HOST solüsyonu hazırlandı. HOST solüsyonundan 100 µl alınarak çalışma gruplarına göre etiketlenen ve inkübatörde (37°C) muhafaza edilen eppendorflara konuldu. Üzerine inkübasyon halindeki araştırma guruplarına ait sperma örneklerinden 10 µl ilave edildi ve 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sperma örneklerinden lam üzerine

konuldu ve lamel kapatılarak faz kontras mikroskopta incelendi. Mikroskobun 40 lık objektifi ile 200 adet spermatozoon sayılarak HOST pozitif olanların (kuyruğu kıvrılmış olanlar) olmayanlara oranı % olarak belirlendi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Hipoozmotik şişme test solüsyonuna spermatozoonların verdiği reaksiyonların mikroskop altındaki görünümü. A) HOST- herhangi bir değişiklik yok, B) HOST+ kuyruğunda kıvrılma ve baş kısmında şişme var.

3. 3. 5. 4. Anormal Akrozom Muayenesi

Akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi, Somfai ve ark. (2002) bildirdiği yöntemle yapıldı. Çizelge 3. 2 de belirtilen formülasyona göre hazırlanan Hancock solüsyonundan eppendorf tüplere 1 ml konuldu ve üzerine 1-2 damla sulandırılmış sperma solüsyonu ilave edildi. Bu örnekten 50 µl alınarak lam üzerine bırakıldı ve lamel kapatılıp immersiyon objektifi (100 lük) ile incelendi. Toplam 300 adet spermatozoon sayılarak akrozom hasarına sahip olanlar % olarak belirlendi.

Çizelge 3. 2. Hancock solüsyonunun hazırlanması.

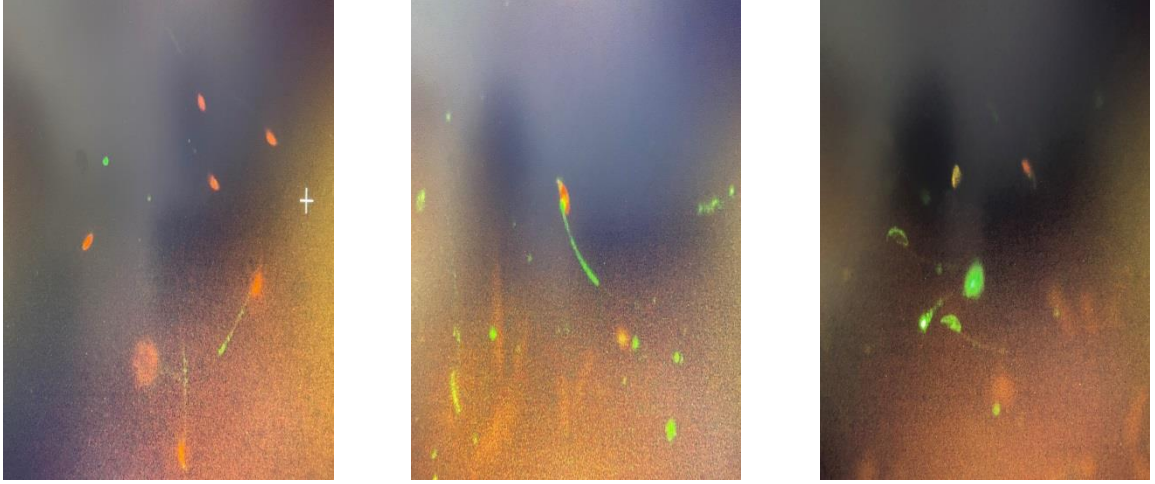
A. Solüsyon	NaCl	1.13 gr
	Bidistile su ilave edildi.	62.50l
B. Solüsyon	Na2 HPO4	2.71 gr
	Bidistile su ilave edildi.	62.50 ml
	K2HPO4	2.78 gr
	Bidistile su ilave edildi.	62.50l
Hancock Solüsyon	A. Solüsyon	18.75ml
	B. Solüsyon	12.50 ml
	Formalin	7.80 ml
	Bidistile su ilave edildi.	62.50 ml

3. 3. 5. 5. Motilite Dayanıklılık Testi (Longevity)

Payetler çözündürüldükten sonra HTF ile sulandırılmış olan spermatozoon örneklerinden 10 µl Makler lamı üzerine alınarak faz kontrast mikroskopta değerlendirildi. motilite muayeneleri sıfırıncı saatten başlanılarak birer saat aralıklar ile dört kez yapıldı ve motilite % olarak hesaplandı. Böylece dondurulup çözündürülen araştırma guruplarına ait payetlerdeki spermatozoonların dayanıklılık süreleri tespit edildi.

3. 3. 5. 6. Sperma Hücrelerinde Apoptoz Muayenesi

Sunulan araştırmada Ferulik asit, Triptofan ve L-Glutamin çalışma gruplarında, spermatolojik oranları en iyi tespit edilen gruplar Ferulik asit (0.1 mM), Triptofan (5 mM) ve L-Glutamin (10 mM) ile kontrol grubu dahil edilerek gerçekleştirildi. Apoptoz oranının belirlenmesinde Annexin-V FITC konjüge/PI boyama yöntemi olarak Abcam ab14085 kiti kullanıldı ve üretici firmanın prosedürü takip edildi. Kısaca: 1 ml eppendorf tüp içerisine 10×10^6 spermatozoon alındı, üzerine 500 µL PBS (+24°C) ilave edilerek 400 g hızda 5dk santrifüj edildi. Üstte kalan kısım uzaklaştırıldıktan sonra 500 µL Binding Buffer eklendi. Üzerine 5 µL ANNEXIN-V FITC konjüge eklendi ve 5 dakika sonra 5 µL PI (Propidium Iodide) ilave edilerek 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında Trinoküler florasana mikroskopta spermatozoonlardaki florasana ışımaya rengine göre sayım yapıldı. Baş kısmı tamamen kırmızı olan spermatozoonlar ölü, baş kısmı yeşil-kırmızı ışık veren spermatozoonlar erken apoptotik spermatozoon ve baş kısmı tamamen yeşil olanlar geç apoptotik spermatozoon olarak değerlendirildi (Şekil 3. 8.). Sonuç olarak apoptotik olan hücreler yeşil florasana ışımaya yaparken apoptotik olmayan hücrelerde yeşil florasana ışımaya gözlenmedi. 500 adet spermatozoon sayılarak apoptotik olarak yeşil florasana ışımaya veren spermatozoonların, sayılan bütün spermatozoonlara oranı % olarak hesaplandı.



Şekil 3.8. Hücresel apoptozda baş kısmı kırmızı (ölü spermatozoon), kırmızı-yeşil (erken apoptotik spermatozoon) ve yeşil (geç apoptotik spermatozoon) renk veren spermatozoonlar.

3. 4. İstatistiksel Analiz

Araştırma sonucunda elde edilen verilerin ortalama ve standart hata değerleri hesaplanmıştır. İstatistiki değerlendirmelerde SPSS 22.0 paket programı kullanıldı. Spermatozoon numunelerinden elde edilen verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulaması ve analiz sonucunda gruplar arası farkın önemini belirtmek için Duncan testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4. 1. Çalışma Gruplarında Dondurma Çözdürme Sonrası Spermatolojik Bulgular

Çalışma guruplarında dondurulup çözündürülme sonrası motilite, ölü spermatozoon, HOST test pozitif ve anormal akrozom oranları çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4. 1. Çalışma gruplarında dondurulup çözündürülme sonrası belirlenen spermatolojik bulgular

Gruplar	Motilite (%)	Ölü Spermatozoon Oranı (%)	HOST Test Pozitif Oranı (%)	Anormal Akrozom Oranı (%)
Kontrol	29.17 ± 3.27 ^{cd}	45.17 ± 2.24 ^{bc}	41.83 ± 2.27 ^d	12.83 ± 1.22 ^{bc}
Ferulik asit 0.1mM	38.33 ± 1.67 ^{bc}	51.17 ± 11.21 ^c	34.17 ± 2.39 ^d	12.50 ± 2.14 ^{bc}
Ferulik asit 1mM	31.67 ± 4.77 ^c	35.33 ± 4.73 ^{ab}	40.83 ± 3.52 ^d	14.00 ± 1.59 ^c
Ferulik asit 10mM	0.0 ± 0.0 ^f	81.67 ± 4.22 ^d	0.0 ± 0.0 ^g	11.83 ± 1.14 ^{bc}
Triptofan 5mM	18.33 ± 4.01 ^e	41.00 ± 3.58 ^{bc}	51.17 ± 2.37 ^c	14.17 ± 1.35 ^c
Triptofan 25mM	20.83 ± 3.96 ^{de}	46.33 ± 2.76 ^{bc}	20.00 ± 2.89 ^{ef}	11.17 ± 1.22 ^{bc}
Triptofan 50mM	20.00 ± 3.65 ^{de}	47.83 ± 1.99 ^{bc}	21.50 ± 3.76 ^e	23.33 ± 2.55 ^d
L-Glutamin 10mM	56.67 ± 2.11 ^a	26.00 ± 1.46 ^a	77.83 ± 0.87 ^a	6.33 ± 1.09 ^a
L-Glutamin 50mM	45.00 ± 2.24 ^b	37.33 ± 2.11 ^{abc}	59.33 ± 2.44 ^b	11.33 ± 1.15 ^{bc}
L-Glutamin 100mM	8.33 ± 3.07 ^f	78.33 ± 3.14 ^d	13.50 ± 3.20 ^f	9.00 ± 0.73 ^{ab}

a - g: Aynı sütundaki farklı harfler, gruplar arası farklılıkları ifade etmektedir (P<0.05).

4. 1. 1. Motilite Değerleri

Dondurulup çözündürülme sonrası en yüksek motilite değerleri %29.17±3.27'lik kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %56.67±2.11 ile 10 mM L-Glutamin ve %45±2.24 ile 50 mM L-Glutamin gruplarında belirlendi (p<0.05). Çözdürme sonrası motilite açısından değerleri 25 mM ve 50 mM Triptofan grupları arasında önemli istatistiki bir fark bulunmazken, bu gruplar ile kontrol, 0,1 mM ve 1 mM Ferulik asit, 10 mM ve 50 mM L-

Glutamin grupları arasındaki farklılık bulundu ($p<0.05$). Çalışma grupları kendi aralarında kıyaslandığında en düşük motilite değeri 10 mM Ferulik asit grubunda saptandı ($p<0.05$).

Ferulik asitin çalışma grupları kendi içinde değerlendirildiğinde en yüksek motilite oranı 38.33 ± 1.67 ile 0,1 mM Ferulik asit grubunda saptanırken, en düşük motilite oranı 0.0 ± 0.0 ile 10 mM Ferulik asit grubunda bulundu ($p<0.05$). L-Glutaminin çalışma grupları kendi içinde değerlendirildiğinde en yüksek motilite oranı 56.67 ± 2.11 ile 10 mM L-Glutamin iken, en düşük motilite oranı 8.33 ± 3.07 ile 100 mM L-Glutamin grubunda belirlendi ($p<0.05$).

4. 1. 2. Ölü Spermatozoon Oranı

Kontrol grubunun ölü spermatozoon oranı Ferulik asit 10 mM ve L-Glutamin 100 mM gruplarından önemli derecede düşük, L-Glutamin 10 mM grubundan ise önemli derecede yüksek bulundu ($p<0.05$). Gruplar arası değerlendirmede dondurulup çözündürülme sonrası en yüksek ölü spermatozoon oranları 81.67 ± 4.22 ile 10 mM Ferulik asit grubunda, en düşük ölü spermatozoon oranı ise 26.00 ± 1.46 ile 10 mM L-Glutamin grubunda tespit edildi. Çalışma grupları kendi içinde değerlendirildiğinde en yüksek ölü spermatozoon oranı 0,1 mM Ferulik asit iken, en düşük ölü spermatozoon oranı 1 mM Ferulik asit grubunda bulundu. L-Glutamin 10 mM grubunun ölü spermatozoon oranı Ferulik asit 1 mM ve Triptofan 50 mM grupları hariç diğer tüm gruplardan önemli derecede daha düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$). Ölü spermatozoon oranı 5 mM, 25 mM ve 50 mM Triptofan gruplarında benzer bulundu ($p>0.05$).

4. 1. 3. HOST Test Pozitif Oranları (Plazma membran bütünlüğü)

Gruplar arası en yüksek pozitif sağlam membran bütünlüğü değeri 77.83 ± 0.87 ile 10 mM L-Glutamin grubunda saptandı. En düşük membran bütünlüğü ise 0.0 ± 0.0 ile 10 mM Ferulik asit grubunda belirlendi.

Yapılan istatistiki değerlendirmelerde kontrol grubunun sağlam membran bütünlüğü oranı, 0.1 mM ve 1 mM Ferulik asit grubu ile benzer ($p>0.05$), 5 mM Triptofan, 10 mM L-Glutamin ve 50 mM L-Glutamin gruplarından önemli düzeyde daha düşüktü ($p<0.05$). 25 mM Triptofan, 50 mM Triptofan ve 100 mM L-Glutamin gruplarından ise daha yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

4. 1. 4 Anormal Akrozom Oranı

Gruplar arası değerlendirmede dondurulup özdürölme sonrası en yüksek anormal akrozom oranı %23.33±2.55 değeri ile 50 mM Triptofan grubunda, en düşük anormal akrozom oranı ise 6.33±1.09 ile 10 mM L-Glutamin grubunda bulundu. Yapılan değerlendirme sonucunda kontrol grubunun anormal akrozom oranları 50mM Triptofan grubundan önemli derecede düşük bulunurken 10 mM L-Glutamin grubundan belirgin oranda yüksek tespit edildi ($p<0.05$).

4. 1. 5. Motilite Dayanıklılık Değerleri

Dondurulma özdürölme sonrası bir'er saatlik zaman aralığında gerçekleştirilen motilite dayanıklılık sonuçları izelge 4.8 de verilmiştir. Birinci saatin sonunda, en yüksek motilite değerleri %50.00±2.89 ile 10 mM L-Glutamin ve %36.67±4.59 ile 50 mM L-Glutamin gruplarında saptandı ve diğer gruplara göre farklılıklar önemli bulundu. Ayrıca, motilite dayanıklılığı bakımından bu iki grup arasında da farklılık önemli idi. İkinci ve 3.saatin sonunda, en yüksek motilite değerleri 10 mM ve 50 mM L-Glutamin gruplarında belirlendi ve diğer gruplar ile aralarındaki farklar önemli bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubunun motilitesi, (%10.00±2.24) 10 mM ve 50 mM L-Glutamin gruplarından daha düşük bulunurken ($p<0.05$), diğer tüm gruplardan yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Dördüncü saatin sonunda en yüksek motilite oranı %6.67±3.33 ile 50 mM L-Glutamin grubunda saptandı ve diğer tüm gruplar ile aralarındaki farklılık önemliydi ($p<0.05$). 50 mM L-Glutamin grubu hariç, kontrol grubu ile diğer çalışma grupları arasında istatistiki bir fark görölmedi ($p>0.05$). Dördüncü saatin sonunda kontrol ve 50 mM L-Glutamin grubu hariç hiçbir grupta motilite saptanmadı (%0.0).

Çizelge 4. 2. Çalışma gruplarında zamana bağlı motilite dayanıklılık değerleri.

Gruplar	Motilite dayanıklılığı (%)				
	0. saat	1. saat	2. saat	3. saat	4. saat
Kontrol	29.17 ± 3.27 ^{cd}	21.67 ± 3.57 ^c	10.00 ± 2.24 ^b	3.33 ± 2.47 ^b	0.83 ± 0.83 ^b
Ferulik asit 0,1 mM	38.33 ± 1.67 ^{bc}	0.0 ± 0.00 ^d	0.0 ± 0.00 ^c	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b
Ferulik asit 1 mM	31.67 ± 4.77 ^c	0.0 ± 0.00 ^d	0.0 ± 0.00 ^c	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b
Ferulik asit 10 mM	0 ± 0 ^f	0.0 ± 0.00 ^d	0.0 ± 0.00 ^c	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b
Triptofan 5 mM	18.33 ± 4.01 ^e	6.67 ± 1.05 ^d	1.67 ± 1.05 ^c	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b
Triptofan 25 mM	20.83 ± 3.96 ^{de}	5.00 ± 3.16 ^d	0.0 ± 0.00 ^c	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b
Triptofan 50 mM	20.00 ± 3.65 ^{de}	4.17 ± 1.54 ^d	0.83 ± 0.83 ^c	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b
L-Glutamin 10 mM	56.67 ± 2.11 ^a	50.00 ± 2.89 ^a	22.5 ± 2.14 ^a	8.33 ± 1.05 ^a	0.0 ± 0.00 ^b
L-Glutamin 50 mM	45.00 ± 2.24 ^b	36.67 ± 4.59 ^b	21.67 ± 3.33 ^a	10.00 ± 3.42 ^a	6.67 ± 3.33 ^a
L-Glutamin 100 mM	8.33 ± 3.07 ^f	0.0 ± 0.00 ^d	0.0 ± 0.00 ^c	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b

a - f: Aynı sütundaki farklı harfler, gruplar arası farklılıkları ifade etmektedir (P<0.05).

4. 1. 6. Hücre Apoptoz Muayenesi

Çalışma gruplarında dondurulma çözündürülme sonrası elde edilen hücre apoptoz oranları Çizelge 4. 3’de verilmiştir. Apoptoz için yapılan istatistiki karşılaştırma sonucunda kontrol, 0.1 mM Ferulik asit ve 10 mM L-Glutamin grupları arasında fark bulunmazken (p>0.05), en yüksek apoptoz oranının saptandığı 5 mM Triptofan grubu ile diğer gruplar arasındaki farkların önemli olduğu tespit edildi (p<0.05).

Çizelge 4. 3. Çalışma gruplarında dondurma çözündürme sonrası hücre apoptoz oranları

Gruplar	Apoptoz (%)
Kontrol	34.25±2.3 ^b
Ferulik asit 0.1mM	35.90± 2.8 ^b
Triptofan 5mM	60.50±1.4 ^a
L-Glutamin 10mM	34.55±2.5 ^b

a - b : Aynı sütundaki farklı harfler, gruplar arası farklılıkları ifade etmektedir (P<0.05).

5. TARTIŞMA

Kriyoprotektan maddeler hücrelerin soğutulması, dondurulması ve çözündürülmesi sırasında ortaya çıkan fiziksel, kimyasal ve oksidatif strese bağlı olarak oluşan ozmotik değişim, ısı şoku, intraselüler kristal oluşumu ve oluşan serbest oksijen radikallerinin meydana getirdiği hasarı azaltmak için kullanılmaktadır (Ball ve ark. 2001, Aisen ve ark. 2005, Funahashia ve Sano 2005). Kriyopreservasyon işleminde kriyoprotektan amaçlı kullanılan maddeler koruyucu etkilerini ortamdaki donmamış fraksiyonu arttırarak ve iyon miktarını azaltarak gösterirler. Kriyoprotektanlar düşük moleküler ağırlıkta olup, toksik etkilerini yüksek oranda ilave edilmeleri durumunda açığa çıkarırlar (Polge ve ark. 1949, Watson 1979, Critser ve Mobraten 2000).

Hücre ve dokulardaki serbest radikallerin oluşumu sonucu ortaya çıkan oksidatif etkilerin engellenmesinde görevli olan savunma sistemindeki maddelere antioksidan maddeler denilmektedir (Bucak ve ark. 2015, Şimşek 1999). Ferulik asit antioksidan özellikte olup kriyoprotektif amaçlı spermatozoonun korunması için yapılan çalışmalarda spermatozoon motilitesi ve sıçanlarda in vivo spermatozoon parametrelerinde (Roy ve ark. 2014) olumlu bir artışa neden olduğu ortaya konulmuştur. Triptofan aromatik amino asit yapısında olup farklı çalışmalarda antioksidan özelliğine sahip olduğu saptanmıştır (Christen ve ark. 1990, Moosmann ve Behl 2000, Nayak ve Buttar 2016, Xu ve ark. 2018). Kriyoprotektan özelliğine sahip olan L-Glutamin, maymun (Li ve ark. 2003), insan (Renard ve ark. 1996) ve koç (Bucak ve ark. 2009) gibi farklı türlerde spermanın dondurulmasında antioksidan özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, CD-1 fare spermatozoonlarının dondurularak saklanması sperma sulandırıcısına (%18 rafinoz+%3 yağsız süt tozu) farklı oranlarda Ferulik asit, Triptofan ve L-Glutamin ilavesinin etkileri araştırıldı. Yapılan çalışmada dondurulup çözündürülme sonrası hareket ve canlılık kriterleri olarak kabul edilen en yüksek motilite ve sağlam plazma membran bütünlük oranları ile en düşük ölü spermatozoon ve anormal akrozom 10 mM L-Glutamin grubunda bulundu ($p<0.05$). 10 mM L-Glutamin grubunda motilite, canlı spermatozoon, sağlam plazma membran bütünlük ve motilite dayanıklılığı açısından kontrol grubu, Ferulik asit ve Triptofan grupları ile 100 mM L-Glutamin grubundan daha başarılı olduğu belirlendi ($p<0.05$). Ayrıca, dondurulup çözündürülme sonrası farklı

saatlerdeki motilite dayanıklılığı (4.saat hariç) yine en iyi 10 mM L-Glutamin ilave edilen çalışma gurubunda tespit edildi.

Yildiz ve ark. (2010) CD-1 farelerinde raffinoz+yağsız süt tozu sulandırıcısı ile kriyotüplerde dondurma-çözdürme sonrası sırasıyla %23 motilite ve %36.2 membran bütünlük oranı elde etmişlerdir. Liu ve ark. (2017) C57BL/6 ve DBA/2 farelerinde raffinoz+yağsız süt tozu sulandırıcısı ile payetlerde dondurma-çözdürme sonrasında sırasıyla %15 ve %17 motilite, %30 ve %48 membran bütünlük oranı belirlemişlerdir. Sztejn ve ark. (2001) C57BL/6J ve CB6F1 farelerinde raffinoz+yağsız süt tozu sulandırıcısı ile kriyotüplerde dondurma-çözdürme sonrası sırasıyla %15 ve %23 motilite, %37 ve %42 membran bütünlük oranı tespit etmişlerdir. Sunulan araştırmada'da dondurulup çözdürülen payetlerde tespit edilen 56.67 ± 2.11 motilite ve 77.83 ± 0.87 sağlam membran bütünlüğü oranları yüksek bulundu. Araştırmalar arasındaki sonuçların farklı olmasının başta kullanılan antioksidan maddenin etkisi olmak üzere, fare ırkından, sulandırılmış spermanın paketlenme şekli ve dondurma prosedür farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Birçok araştırmacı (Tada ve ark. 1990, Takeshima ve ark. 1991, Yıldiz ve ark. 2007) kullanılan fare ırkının spermatozoon dondurma başarısı üzerinde önemli bir faktör olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde koç (Molinia ve ark. 1994), sığır (Garcia ve Graham 1989), köpek (Yildiz ve ark. 2000) ve insan gibi (Critser ve ark. 1988, McGonagle ve ark. 2002) farklı türlerde farklı kryoprotektanlar, şekerler ve antioksidanların birlikte kullanımının spermatozoon değerlendirme parametreleri üzerinde koruyucu ve geliştirici etkileri tespit edilmiştir.

Omur ve ark. (2019) boğa spermasının dondurulması üzerine yaptıkları çalışmada, Tris bazlı kontrol sulandırıcı grubu ile 100 μ M Ferulik asit ilaveli grubun motilite sırasıyla $50 \pm 6,1$ ve 62 ± 2 ve membran bütünlüğü oranlarını $48,75 \pm 7,2$ ve $58,25 \pm 3,5$ benzer bulmuşlardır ($p > 0.05$). Lançon (2015) aygır sperması üzerine yaptıkları çalışmada sperma sulandırıcısı içerisine farklı oranlarda (0.5 mM ve 1.2 mM) katılan Ferulik asit gruplarının dondurma çözdürme sonrası motilite değerlerinin kontrol grubundan yüksek olmadığını bildirmişlerdir. Affonso ve ark. (2017) aygır sperması için hazırladıkları sperma sulandırıcısına ilave ettikleri Ferulik asitin (165 μ M) çözdürme sonrası motiliteyi kontrol grubuna kıyasla (73.8 ± 2.0) membran bütünlüğünü iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Pei ve ark. (2018) domuz sperması ile yapmış oldukları çalışmada, sperma sulandırıcısına ekledikleri farklı dozlarda Ferulik asidin (0.1 mmol/L, 0.15 mmol/L, 0.25 mmol/L, 0.35

mmol/L ve 0.45 mmol/L) dondurma çözündürme işleminden sonra membran bütünlüğünü kontrol grubuna göre ($\%24.80 \pm 1.32$) iyileştirdiğini (sırasıyla $\%36.50 \pm 0.68$, $\%42.40 \pm 0.75$, $\%65.10 \pm 1.23$, $\%63.80 \pm 2.01$ ve $\%44.70 \pm 0.49$) bildirmektedirler. Benzer şekilde sunulan çalışmada da sulandırıcıya 0.1 ve 1 mM Ferulik asit ilavesinin kontrol grubuna kıyasla çözündürme sonrası motilite, canlılık, fonksiyonel membran bütünlüğü ve anormal akrozom oranlarını geliştirmediği bulundu. Bununla birlikte fare sperma sulandırıcısına 10 mM Ferulik asit ilavesinin belirgin şekilde toksik etki yaptığı saptanmıştır. Yapılan tez araştırmasında, çözündürme sonrası 10 mM L- Glutamin grubunda motilite ($\%56.67 \pm 2.11$) ve membran bütünlüğünü ($\%77.83 \pm 0.87$) iyileştirdiği tespit edildi.

Kutluyer (2018) yaptığı çalışmada nesli tükenmekte olan alabalık *Salmocoruhensis*, Anadolu alabalığı *Salmorizeensis* ve gökkuşağı alabalığı *Oncorhynchus mykiss*'te L-triptofanın spermatozoon motilitesi üzerine yaptıkları çalışmada L-Triptofanın 0,5 mM dozunun çözündürme sonrası motilite oranını arttırdığını bildirmişlerdir. Kutluyer ve ark. (2019) Tigriscraper (*C. umbla*) ırkı balıklarda sperma sulandırıcısına 1 mM L-Triptofan eklenmesinin motilitede artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Wang ve ark. (2018) domuz spermasında yapmış oldukları çalışmada, sulandırma medyumu içerisine kattıkları 10, 20, 40 ve 80 mM dozlarındaki Glutamini araştırmışlar ve dondurma çözündürme sonrası 20 mM Glutaminin motilite ve hücre membran bütünlüğünü koruduğunu kaydetmektedirler ($P < 0.05$). Hasanpoor ve ark. (2014) koçlarda yapmış oldukları çalışmada sperma sulandırıcısına 80 mM L-Glutaminin çözündürme sonrası spermatozoon motilitesi ve membran bütünlüğünü arttırdığını kaydetmektedirler. Öztürk ve Aksoy. (2021) yaptıkları çalışmada, 20 mM L-Glutaminin köpek spermasının dondurulup çözündürülmesi sonrasında motilite ve membran bütünlüğünü kontrol grubuna göre arttırdığını bildirmişlerdir. Li ve ark. (2003) *sinomolgus maymunu* (maçaca fascicularis) spermasının dondurularak saklanması çalışmasında, sulandırıcıya 10 mM glutamin ilavesinin kontrol grubuna kıyasla spermatozoon motilitesi ve membran bütünlüğünün önemli ölçüde daha iyi koruduğunu ifade etmektedirler. Zhu ve ark. (2017) tavşanlarda sperma sulandırıcısına 20 mM Glutamin ilavesinin, dondurma sonrası membran bütünlüğü ve spermatozoon hareketliliğini önemli ölçüde koruduğunu bildirmektedirler. Khelifaoui ve ark. (2005) yapmış oldukları çalışmada, 50 mM Glutamin+%2,5 gliserolün çözündürme sonrasında spermatozoon hareketliliğini önemli ölçüde iyileştirdiğini saptamışlardır. Singh ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada geyiklerde sperma sulandırıcısına ilave ettikleri 50 mM

Glutamin'in çözündürme sonrası spermatozoon hareketliliğini, canlılığını ve HOST reaktivitesini önemli ölçüde iyileştirdiğini rapor etmişlerdir. Ek olarak, Tuncer ve ark. (2021) boğalarda, 2.5 mM Glutamini sperma sulandırıcısına ekleyerek yürüttükleri çalışmada dondurma çözündürme sonrası spermatozoon motilitesini arttırdığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da, yukarıda rapor edilen farklı türlerdeki çalışmalarla uyumlu olarak, spermatozoon dondurma medyumuna Ferulik asit ilavesinin çözündürme sonrası sperma kalite parametrelerinde olumlu etki yapmadığı tespit edildi. Sperma sulandırıcılarının başarısının, sulandırılan spermanın paketleme şekillerine (payet, kriyotüp, pelet vb.), sulandırıcıda kullanılan koruyucu komponentlere, hücredeki geçirgenlik farklılıklarına, hücre büyüklüğüne, sperma dondurma metotlarına, sulandırıcının bileşenlerine, pH ve ozmotik basıncına bağlı olduğu da bildirilmiştir (Evans ve Maxwell 1987, Jackson ve ark. 1997).

Deneme grupları kendi aralarında kıyaslandığında en düşük motilite, membran bütünlük ve en yüksek ölü spermatozoon değerleri sırası ile 10 mM Ferulik asit ve 100 mM L-Glutamin gruplarında belirlendi. Bu anlamlı düşme, bu gruplara eklenen farklı dozlardaki antioksidan maddelerin fizyolojik sınırı aşarak, spermatozoon hücreleri üzerinde toksik bir etki meydana getirmesinden kaynaklanmış olabilir. Önceden rapor edildiği gibi, eğer kryoprotektanlar ve antioksidanlar uygun molar konsantrasyonda kullanılmaz ise, donma sırasında yetersiz veya aşırı su kaybına, hücre içi elektrolit konsantrasyonun bozulmasına, membranlarda hasar ve ölümle sonuçlanan hücre içi ve dışı buz kristallerine sebep olabileceği bildirilmiştir (Critser ve ark. 1988, Hammerstedt ve ark. 1990, Parks ve Graham 1992).

Çalışmada, motilite dayanıklılığı açısından, dondurulup çözündürülme sonrası 0. saatte en yüksek motilite değeri 56.67 ± 2.11 ile 10 mM L-Glutamin grubunda bulundu. Üçüncü saate kadar en yüksek motilite dayanıklılık değerleri 10 mM L-Glutamin grubunda, 4. saate kadar ise 50 mM L-Glutamin grubunda belirlendi ($p < 0.05$). Bu sonuçlar, 10 mM L-Glutaminin sperma sulandırıcısına ilavesinin, çözüm sonrası motilite dayanıklılığını arttırdığını göstermektedir. Benzer şekilde farklı türlerde de sulandırıcıya ilave edilen bazı antioksidanların motilite dayanıklılığı üzerine olumlu etkileri rapor edilmiştir. Shayan-Nasr ve ark. (2021) sperma medyumuna ilave ettikleri 10 mM, 25 mM ve 50 mM trans-ferulik asidin, 24 ve 48 saate kadar motiliteyi sürdürdüğünü bildirmişlerdir. Kutluyer ve ark. (2019) Tigris scraper (*C. umbla*) ırkı balık spermasındaki

yaptıkları çalışmalarında sperma sulandırıcısına 1 mM L-Triptofan eklenmesinin spermatozoon canlılık süresini arttırdığını saptamışlardır. Kocabaş ve ark. (2019) yapmış oldukları çalışmada sulandırıcıya L-Triptofan ilavesinin, dere alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) ve gökkuşuğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoon motilite süresini önemli ölçüde uzatan bir etki sağladığı bildirilmiştir. Kutluyer (2018) yaptığı çalışmada nesli tükenmekte olan alabalık *Salmo coruhensis*, Anadolu alabalığı *Salmorizeensis* ve gökkuşuğu alabalığı *Oncorhynchus mykiss*'te L-Triptofanın spermatozoon motilitesi üzerine yaptıkları çalışmada 5 mM L-Triptofan'ın motilite süresini arttırdığını tespit etmişlerdir. Al-Ameri ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada koç spermasında, sulandırıcıya 5 ve 10 mM Triptofan ilavesinin çözdürme sonrası 72. saate kadar motilite dayanıklılığını devam ettirdiklerini bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada, çözdürme sonrası en yüksek akrozom hasarı 23.33 ± 2.55 değeri ile 50 mM Triptofan grubunda, en düşük akrozom hasarı oranı ise 6.33 ± 1.09 ile 10 mM L-Glutamin grubunda tespit edildi. 10 mM L-Glutamin grubunun akrozom hasar oranı, Liu ve ark. (2017) C57BL/6J ve DBA/2J ırkı farelerde rafinoz+yağsız süt tozu sulandırıcısından dondurma sonrası sırasıyla %15.6 ve %20.4 oranlarındaki akrozom hasarı oranlarından daha yüksek bulundu. Bununla birlikte Liu ve ark. (2017) bildirdikleri bu sonuçlar, sunulan çalışmada CD-1 farelerinde 0.1 mM, 1 mM ve 10 mM Ferulik asit, 5 mM ve 25 mM Triptofan, 10 mM, 50 mM, 100 mM L-Glutamin ve kontrol gruplarından daha yüksekti.

Yapılan çalışmayla benzer şekilde, fare hariç, farklı türlerde Ferulik asit ve L-Glutaminin çözdürme sonrası akrozom üzerine koruyucu etkileri daha önceden birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Affonso ve ark. (2017) aygır sperması için hazırladıkları sperma sulandırıcısına ilave ettikleri Ferulik Asitin ($165 \mu\text{M}$) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, çözdürme sonrası sağlam akrozom oranlarını iyileştirici etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Pei ve ark. (2018) domuz sperması ile yapmış oldukları çalışmada, sperma sulandırıcısına ekledikleri farklı dozlardaki Ferulik asitin (0.1 mmol/L, 0.15 mmol/L, 0.25 mmol/L, 0.35 mmol/L ve 0.45 mmol/L) çözdürme sonrası akrozom hasarı üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar akrozom hasarını, Ferulik asit grubunda (sırasıyla 39.80 ± 1.07 , 47.60 ± 0.51 , 60.20 ± 0.37 , 53.00 ± 1.76 ve 42.40 ± 1.12) kontrol grubundan (31.80 ± 1.11) daha yüksek olduğunu kaydetmişlerdir. Wang ve ark. (2018) domuz spermasında farklı dozlardaki (10, 20, 40 ve 80 mM)

Glutaminin etkilerini inceledikleri çalışmalarında 20 mM Glutamin konsantrasyonunun, çözündürme sonrası akrozom bütünlüğünü daha iyi koruduğunu bildirilmişlerdir ($p<0.05$). Öztürk ve Aksoy (2021) yaptıkları çalışmada L-Glutaminin köpek spermasının dondurulup çözündürülmesi sonrasında, 20 mM Glutamin dozunun spermatozoon akrozom bütünlüğü oranını kontrol grubuna göre daha iyi koruduğunu bildirmişlerdir. Li ve ark. (2003) yapmış oldukları çalışmada sinomolgus maymunu (*macaca fascicularis*) spermasının dondurularak saklanması çalışmalarında, dondurma solüsyonu içerisine 10 mM glutamin ilavesinin spermatozoa akrozom bütünlüğünü kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttırdığını tespit etmişlerdir. Zhu ve ark. (2017) da tavşan spermasında yürüttükleri çalışmada, sperma sulandırıcısına 20 mM Glutamin ilavesinin, çözüm sonrası akrozom bütünlüğünü önemli ölçüde koruduğunu bulmuşlardır. Soy içi (inbred) Fare ırklarının (C57BL/6, 129S ve DBA/2 gibi), soy dışı (outbred) (ICR ve CD-1 gibi) ve melezlere (hybrid) (CB6F1 gibi) göre donma hasarlarına karşı akrozom bölgesinin ve hücre membranının çok daha duyarlı ve dayanıksız olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (An ve ark. 2000, Yıldız ve ark. 2007, Nakagata 2011). Sunulan çalışmada kontrol grubunun anormal akrozom oranı 50 mM Triptofan grubundan önemli derecede düşük, 10 mM L-Glutamin grubundan önemli düzeyde yüksek bulundu ($p<0.05$). Diğer bir ifade ile dondurma hasarlarına karşı oldukça hassas olan fare spermatozoonunun akrozomunun, 10 mM L-Glutamin tarafından kontrol grubuna göre daha iyi korunduğu görüldü ($p<0.05$).

Kontrol, 0.1 mM Ferulik asit, 5 mM Triptofan ve 10 mM L-Glutamin grupları arasında spermatozoon apoptozu açısından istatistiki farklılıklar meydana geldiği tespit edildi. Dondurulup çözündürülme sonrası en yüksek apoptoz oranı 5 mM Triptofan grubunda tespit edildi ve diğer tüm gruplarla aralarındaki fark önemli bulundu ($p<0.05$). Bu sonuç dondurma aşamaları boyunca 5 mM Triptofanın muhtemelen hücre savunma sistemi ve hücre membranları üzerinde olumsuz etkiler meydana getirmiş olabileceğini göstermektedir. Farelerde Ferulik asit, Triptofan ve L-Glutamin dondurulmuş çözündürülmüş spermada spermatozoa apoptozusuna etkisi ile ilgili araştırmalara ulaşılamadığından burada tartışma imkanı bulunamadı. Ancak, Meles ve ark. (2022) erkek sıçanlarda 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksi'nin spermatozoon apoptozisi üzerindeki etkilerini incelediği çalışmalarında, kontrol grubunda apoptoz oranını 8.32 ± 2.26 bulurken, uygulama grubunda spermatozoon apoptoz oranını (35.43 ± 6.05) arttırdığını bildirmişlerdir ($p<0.05$).

6. SONUÇ

Sunulan çalışma, fare spermatozoonunun başarılı olarak dondurulabilmesi için standart %18 raffinoz+%3 yağsız süt tozu içeren sperma sulandırıcısına Ferulik asit (0,1mM, 1 mM ve 10 mM), Triptofan (5 mM, 25 mM ve 50 mM) ve L-Glutaminin (10 mM, 50 mM ve 100 mM) ilavesinin spermatozoon kalite parametreleri üzerine etkilerini ortaya koymak için planlandı.

Dondurma çözündürme sonrası gruplar arası değerlendirmede kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek motilite ve plazma membran bütünlüğü sırası ile %56.67±2.11, %77.83±0.87 ile 10 mM L-Glutamin grubunda bulundu ($p<0.05$). Yine kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en düşük ölü spermatozoon oranı ve anormal akrozom oranı sırasıyla %26.00±1.46, %6.33±1.09 olarak 10 mM L-Glutamin grubunda tespit edildi ($p<0.05$).

Çalışmada dondurulma çözündürülme sonrası bir'er saatlik zaman aralığında gerçekleştirilen motilite dayanıklılık testinde 1. ve 2. saat için motilite dayanıklılık bakımından en yüksek sonuçlar 10 mM L-Glutamin grubundan elde edilmişken, 3. ve 4. saatler için en iyi sonuçlar 50 mM L-Glutamin grubunda belirlendi ($p<0.05$).

Çözündürme sonrası en yüksek apoptoz oranı 5 mM Triptofan grubunda tespit edilmiş ve diğer tüm gruplarla aralarındaki fark önemli bulundu ($p<0.05$). Kontrol, 0.1 mM Ferulik asit, 10 mM L-Glutamin ve 5 mM Triptofan ile diğer gruplar arasında önemli bir fark olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Çalışma grupları arası değerlendirmede, sperma sulandırıcısına katılan 5 mM Triptofan uygulamasının apoptoz oranı kontrol grubundan daha yüksek olduğu için olumsuz etkilediği belirlendi ($p<0.05$).

Sonuç olarak; Fare sperma sulandırıcısına 10 mM L-Glutamin ilavesinin çözündürme sonrası incelenen spermatolojik özellikler üzerinde (apoptoz oranı hariç) önemli düzeyde olumlu etkilerinin olduğu, Ferulik asit ilavesinin çözündürme sonrası sperma kalite parametrelerine olumlu etki yapmadığı, aksine 10 mM Ferulik asitin belirgin şekilde toksik etki yaptığı ve Triptofan ilavesinin çözündürme sonrası incelenen spermatolojik özellikler üzerinde olumlu etki yapmadığı, tersine, özellikle motilite dayanıklılığı olmak üzere, doza bağlı olarak motilite, fonksiyonel membran bütünlüğü, akrozom ve apoptozis üzerine olumsuz etkilerinin olduğu sonuçlarına varıldı.

7. KAYNAKLAR

1. **Aboagla EME, Terada T.** Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of reproduction*, **2003**, 69(4), 1245-1250.
2. **Adam A, Crespy V, Levrat-Verny MA, Leenhardt F, Leuillet M ve ark.** The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *Thejournal of nutrition*, **2002**, 132(7), 1962-1968.
3. **Affonso FJ, Carvalho HF, Lançon R, Lemes KM, Leite TG ve ark.** Addition of antioxidants myoinositol, ferulic acid, and melatonin and their effects on sperm motility, membrane integrity, and reactive oxygen species production in cooled equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, **2017**, 59, 57-63.
4. **Agarwal A, Allamaneni SS.** Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reproductive Biomedicine Online*, **2004**, 9(3): 338-347.
5. **Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A.** Ultra microscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, **2005**, 50(3), 239-249.
6. **Aisen EG, Medina VH, Venturino A.** Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, **2002**, 57(7), 1801-1808.
7. **Alam M.** Anti-hypertensive effect of cereal antioxidant ferulic acid and its mechanism of action. *Frontiers in nutrition*, **2019**, 6, 121.
8. **AL-Ameri MH, Mohammed AJ, Abdul-Rahaman YT, Abd AL-Razaq MT.** Effect of addition of Cysteine and Tryptophan to diluted and cooled semen of Awassi Rams. **2020**.
9. **Alcay S, Gokce E, Toker MB, Onder NT, Ustuner B ve ark.** Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology*, **2016**, 72(3), 269-273.
10. **Altunkaynak ZB, Özbek E.** Programlanmış hücre ölümü; apoptoz nedir? *Tıp Araş Derg*, **2008**, 6 (2): 93-104.
11. **Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM.** Acrosomal ultra structure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Veterinary Journal*, **2000**, 32(6), 541-545.
12. **Alvarez JG, Storey BT.** Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod*, **1983**, 29 (3): 548-555.
13. **Amann R.** Cryopreservation of sperm In: Knobil E, Neill JD (eds) *Encyclopedia of Reproduction*. **1999**.
14. **Amores-Sánchez MI, Medina MÁ.** Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. *Molecular genetics and metabolism*, **1999**, 67(2), 100-105.
15. **An TZ, Iwakiri M, Edashige K, Sakurai T, Kashi M.** Factors Affecting The Survival Of Frozen Mouse Spermatozoa. *Cryobiology*, **2000**, 40: 237-249.
16. **Andersons BA, Gravitis YA, Erin'sh PP.** A study of macro molecular models of lignin obtained from ferulic acid. *Chemistry of Natural Compounds*, **1980**, 16(2), 191-196.
17. **Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch GT, PaulsPK.** Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relation ship with fertility. *Biol Reprod*, **2002**, 66 (2): 354-360.
18. **Aral H.** Apoptotik hücrelerin tanınma yöntemleri. *Sendrom*, **1996**, 1, 38-42.
19. **Arav A, Shehu D, Mattioli M.** Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *Reproduction*, **1993**, 99(2), 353-358.
20. **Atia TA, Abbas M.** Genetics of Spermatogenesis. **2014**.
21. **Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N.** Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, **2000**, 21: 1-7.
22. **Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumber J.** Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. *Theriogenology*, **2001**, 56(4), 577-589.
23. **Banday MN, Lone FA, Rasool F, Rashid M, Shikari A.** Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. *Cryobiology*, **2017**, 74, 25-30.

24. **Bardakçı F, Yenidünya AF.** Moleküler biyoloji teknikleri 1: Nükleik asit analiz teknikleri (in) Moleküler Biyoloji. *A Yıldırım, F Bardakçı, M Karataş, B Tanyolaç (Editör)*, **2007**, 519-553.
25. **Bertoldo MJ, Guibert E, Tartarin P, Guillory V, Froment P.** Effect of metformin on the fertilizing ability of Mouse spermatozoa. *Cryobiology*, **2014**, 68(2): 262-268
26. **Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA.** Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, **2001**, 56(2): 275-286.
27. **Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C.** Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev: Incorporating Gamete Res*, **2000**, 55: 282-88.
28. **Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simões M.** Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*, **2013**, 19(4), 256-265.
29. **Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA.** The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in cellbiology*, **1995**, 5(1), 21-26.
30. **Bossù P.** Qualitative analysis of DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis. *Apoptosis: A laboratory Manual of Experimental Methods A. Cossarizza D. Boraschi, (Eds). Purdue cytometry CD-ROM*, **1999**, 4.
31. **Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA ve ark.** Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the amino phospholipid translocase. *Journal of Biological Chemistry*, **1997**, 272(42), 26159-26165.
32. **Bravo L.** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, **1998**, 56(11), 317-333.
33. **Bucak MN, Güngör Ş, Sariozkan S.** Spermanın dondurulmasında antioksidanların etkisi. *Türkiye Klinikleri*, **2015**, 1(3): 39-47.
34. **Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Ulutaş PA.** Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research*, **2009**, 81(1), 13-17.
35. **Cabrita E, Alvarez R, Anel E, Herraes MP.** The hypoosmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. *Animal reproduction science*, **1999**, 55(3-4), 279-287.
36. **Carson DA, Rbiero JM.** Apoptosis and disease. *The Lancet*, **1993**, 341: 1251-1254.
37. **Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG.** Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *The Journal of cell biology*, **1997**, 138(6), 1379-1394.
38. **Chen H, Chow PH, Cheng SK, Cheung AL, Cheng LY ve ark.** Male genital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. *Journal of Andrology*, **2003**, 24: 704-711.
39. **Chen Y, Guillemin GJ.** Kynurenine path way metabolites in humans: disease and healthy states. *International Journal of Tryptophan Research*, **2009**, 2, IJTR-S2097.
40. **Chen Z, Hauser R, Trbovich MA, Shifren LJ, Dorer JD ve ark.** The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis. *J Androl*, **2006**, 27 (1): 112-120.
41. **Christen S, Peterhans E, Stocker R.** Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1990**, 87(7), 2506-2510.
42. **Cirit Ü, Bağış H, Demir K, Agca C, Pabuccuoğlu S ve ark.** Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose and cysteamine on ram semen. *Animal Reproduction Science*, **2013**, 139(1-4), 38-44.
43. **Cohen JJ.** Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *American College of Physicians, CHEST*, **1993**, 103: 99-101.
44. **Correa JR, Zavos PM.** The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, **1994**, 42(2), 351-360.

45. **Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD.** Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertility and Sterility*, **1988**, 50(2), 314-320.
46. **Critser JK, Mobraten LE.** Cryopreservation of Murine Spermatozoa. *ILAR Journal*, **2000**, 41 4.
47. **Curi R, Newsholme P, Procopio J, Lagranha C, Gorjão R ve ark.** Glutamine, gene expression, and cell function. *Front Biosci*, **2007**, 12(1), 344-357.
48. **De Angelis M. H, Flaswinkel H, Fuchs H, Rathkolb B, Soewarto D ve ark.** Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nature genetics*, **2000**, 25(4), 444-447.
49. **Dewit M, Marley WS, Graham JK.** Fertilizing potential of Mouse spermatozoa cryopreserved in a medium containing whole eggs. *Cryobiology*, **2000**, 40(1), 36-45.
50. **Ducci M, Gazzano A, Villani C, Cela V, Artini PG ve ark.** Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **2002**, 102(1), 53-56.
51. **Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans FW, Kasai M.** Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of Mouse oocytes after cryopreservation. *Biology of Reproduction*, **2003**, 68(1), 87-94.
52. **Ellinger A, Flamand C.** Über synthetisch gewonnenes Tryptophan und einige seiner Derivate, **1908**.
53. **Elmore S.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, **2007**, 35(4), 495-516.
54. **Evans G, Maxwell WMC.** *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butter worths, pp, Sidney, **1987**, 8(21): 107-141.
55. **Farrant J, Lee H, Walter CA.** Effects of interactions between cooling and rewarming conditions on survival of cells. *The Freezing of Mammalian Embryos*, **1977**, 49-62.
56. **Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, García-Macías V, Estes MC, Soler AJ ve ark.** Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, **2007**, 67(4), 738-753.
57. **First NL.** *The influence of glycerol and various diluents on low temperature survival of ram spermatozoa*. Michigan State College of Agriculture and Applied Science. Department of Animal Husbandry, **1957**.
58. **Fiser PS, Ainsworth L, Fairfull RW.** Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, **1987**, 28(5), 599-607.
59. **Funahashia H, Sano T.** Select Antioxidants ImproveThe Function of Extended Boar Semen Stored At 10°C. *Theriogenology*, **2005**, 63: 1605-1616.
60. **Gabriel SI, Jóhannesdóttir F, Jones EP, Searle JB.** Colonization, mouse-style. *BMC biology*, **2010**, 8(1), 1-3.
61. **Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R ve ark.** Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, **2004**, 62(3-4), 690-701.
62. **Gagnon C, Iwasaki A, De Lamirande, EVE, Kovalski N.** Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1991**, 637: 436-444.
63. **Garcia MA, Graham EF.** Development of a buffer system for dialysis of bovine spermatozoa before freezing. II. Effect of sugars and sugar alcohols on posthaw motility. *Theriogenology*, **1989**, 31(5), 1029-1037.
64. **Gatti R, Belletti S, Orlandini G, Bussolati O, Dall'Asta V, Gazzola GC.** Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocallaser microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **1998**, 46(8), 895-900.
65. **Gaurav K, Goel RK, Shukla M, Pandey M.** Glutamine: A novel approach to chemotherapy-induced toxicity. *Indian journal of medical and paediatric oncology: official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology*, **2012**, 33(1), 13.
66. **Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA.** Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology*, **1992**, 119(3), 493-501.
67. **Gilmore J A, Liu J, Woods EJ, Peter AT, Critser J K.** Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of the oretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Human Reproduction*, **2000**, 15(2), 335-343.
68. **Gilmore JA, Liu J, Critser JK.** Activation energies for membrane permeability characteristics of human spermatozoa. *Cryobiology*, **1996**, 33, 633-634.

69. **Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT ve ark.** Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biology of reproduction*, **1995**, 53(5), 985-995.
70. **Graham EF, Schmehl MK, Evensen BK, Nelson DS.** Semen preservation in non-domestic mammals. In Symp Zool Soc Lond, **1978**, 43: 153-173
71. **Graf E.** Antioxidant potential of ferulic acid. *Free radical biology and medicine*, **1992**, 13(4), 435-448.
72. **Griswold MD.** Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiological reviews*, **2016**, 96(1), 1-17.
73. **Guénet JL, Orth A, Bonhomme F.** Origins and phylogenetic relationships of the laboratory mouse. *The Laboratory Mouse; Hedrich, HJ, Ed; Elsevier Science: Amsterdam, The Nether lands*, **2012**, 3-20.
74. **Hafez ESE.** Reproduction in Farm Animals, 7th edition, Philadelphia, **2000**, pp: 111, 330-343, 385, 405-423.
75. **Halliwell B.** Reactive species and antioxidants. Redoxbiology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, **2006**, 141(2): 312-322.
76. **Hasanpoor S, Roostaei-Ali Mehr M, Mohammadi M.** Effect of adding L-glutamine to Tris diluent on cryopreservation of coated sperm of Taleshi ram. *Iranian Journal of animal Science*, **2014**, 45(3), 289-296.
77. **Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A ve ark.** Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive Biomedicine Online*, **2018**, 37(3): 327-339.
78. **Hikim SPA, Swerdloff SR.** Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *RevReprod*, **1999**, 4 (1): 38-47.
79. **Holt WV.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal reproduction science*, **2000**, 62(1-3), 3-22.
80. **Hopkins FG, Cole SW.** A contribution to the chemistry of proteids: Part I. A preliminary study of a hithertoun described product of trypticdigestion. *The Journal of physiology*, **1901**, 27(4-5), 418-428.
81. **Itagaki S, Kurokawa T, Nakata C, Saito Y, Oikawa S ve ark.** Invitroand in vivo antioxidant properties of ferulic acid: a comparative study withother natural oxidation inhibitors. *Food Chemistry*, **2009**, 114(2), 466-471.
82. **Jackson TH, Ungan A, Critser JK, Gao D.** Novel micro wave technology for cryopreservation of biomaterials by suppression of apparentice formation. *Cryobiology*, **1997**, 34(4), 363-372.
83. **Jacoby RO, Fox JG, Davisson M.** Biology and diseases of mice. *Laboratory animal medicine*, **2002**, 35.
84. **Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG ve ark.** Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*, **1984**, 70(1), 219-228.
85. **Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJD.** The hypoosmotic swelling test: an update. *Archives of Andrology*, **1992**, 29(2), 105-116.
86. **Kaneko T, Ito H, Sakamoto H, Onuma M, Inoue-Murayama M.** Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. *PloSone*, **2014**, 9(11), e113381.
87. **Kanski J, Aksenova M, Stoyanova A, Butterfield DA.** Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. *The Journal of nutritional biochemistry*, **2002**, 13(5), 273-281.
88. **Kathiravan P, Kalatharan J, Edwin MJ, Veerapandian C.** Computer automated motion analysis of cross bred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Animal reproduction science*, **2008**, 104(1), 9-17.
89. **Katkov II, Katkova N, Critser J.K, Mazur P.** Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, **1998**, 37(4), 325-338.
90. **Kelainy EG, Laila IMI, Ibrahim SR.** The effect of ferulic acid against lead-induced oxidative stres and DNA damage in kidney and testes of rats. *Environmental Science and Pollution Research*, **2019**, 26(31), 31675-31684.
91. **Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, **1972**, 26(4), 239-257.
92. **Khelifaoui M, Battut I, Bruyas JF, Chatagnon G, Trimeche A ve ark.** Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology*, **2005**, 63(1), 138-149.

93. **Kiess W, Gallaher B.** Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *European Journal of Endocrinology*, **1998**, 138(5), 482-491.
94. **Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, Taniguchi H.** Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *Journal of agricultura land food chemistry*, **2002**, 50(7), 2161-2168.
95. **Kockx MM, Muhring J, Knaapen MW, De Meyer GR.** RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ labeling techniques used to detect apoptosis. *The American journal of pathology*, **1998**, 152(4), 885.
96. **Kocabaş M, Kutluyer F, Ertekin Ö, Aksu Ö, Başçınar N.** Improvement of sperm motility of *Oncorhynchus mykiss* and *Salvelinus fontinalis* by L-tryptophan. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, **2019**, 65(3), 187-193.
97. **Koh PO.** Ferulic acid prevents the cerebral ischemic injury-induced decrease of Akt and Bad phosphorylation. *Neuro science letters*, **2012**, 507(2), 156-160.
98. **Koshimoto C, Gamliel E, Mazur P.** Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose. *Cryobiology*, **2000**, 41(3), 204-231.
99. **Koshimoto C, Mazur P.** Effects of warming rate, temperature, and antifreeze proteins on the survival of Mouse spermatozoa frozen at an optimal rate. *Cryobiology*, **2002**, 45(1), 49-59.
100. **Kressel M, Groscurth P.** Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell and tissue research*, **1994**, 278(3), 549-556.
101. **Kumar N, Pruthi V.** Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, **2014**, 4, 86-93.
102. **Kumi-Diaka J.** Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, **1993**, 39(6), 1279-1289.
103. **Kutluyer F, Aksu Ö, Kocabaş M.** Effect of L-tryptophan on sperm quality of tigris scraper (*Capoeta umbla*) (Pisces: Cyprinidae) after cryopreservation. *Cryoletters*, **2019**, 40(2), 77-82.
104. **Kutluyer F.** In vitro effect of L-tryptophan on the quality and fertilizing capacity of sperms of endangered species of trouts. *Pak. J. Zool*, **2018**, 50, 903-910.
105. **Lagares MA, Petzoldt R, Sieme H, Klug E.** Assessing equine sperm-membrane integrity. *Andrologia*, **2000**, 32(3), 163-167.
106. **Lançon R.** Use of melatonin and ferulic acid as promoters of cryopreserved equine sperm. *Use of melatonin and ferulic acid as promoters of cryopreserved equine sperm*, **2015**.
107. **Leers MP, Kölgen W, Björklund V, Bergman T, Tribbick G ve ark.** Immuno cytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *The Journal of pathology*, **1999**, 187(5), 567-572.
108. **Li Y, Si W, Zhang X, Dinnyes A, Ji W.** Effect of amino acids on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. *American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists*, **2003**, 59(4), 159-165.
109. **Lightfoot RJ, Salamon S.** Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. I. Transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, **1970**, 22, 385-398.
110. **Liu J, Mochida K, Hasegawa A, Inoue K, Ogura A.** Identification of quantitative trait loci associated with the susceptibility of Mouse spermatozoa to cryopreservation. *Journal of Reproduction and Development*, **2017**.
111. **Liu Z, Foote RH, Brackett CC.** Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolality. *Cryobiology*, **1998**, 37(3), 219-230.
112. **Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R.** Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod*, **2004**, 71 (1): 28-37.
113. **Mazur P.** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **1984**, 247(3): C125-C142.
114. **McGann LE.** Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*, **1978**, 15(4), 382-390.
115. **McGonagle LS, Goldstein M, Feldschuh J, Foote RH.** The influence of cryoprotective media and processing procedures on motility and migration of frozen-thawed human sperm. *Asian journal of andrology*, **2002**, 4(2), 137-142.
116. **McWilliams RB, Gibbons WE, Leibo SP.** Fertilization and early embryology: Osmotic and physiological responses of Mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. *Human reproduction*, **1995**, 10(5), 1163-1171.

117. **Meles DK, Rachmawati K, Hamid IS, Mustofa I, Wurlina W ve ark.** α -Tocopherol Prevents Sperm Apoptosis and Necrosis in Rats Exposed to 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Veterinary Medicine International*, **2022**.
118. **Molinia FC, Evans G, Casares PQ, Maxwell WMC.** Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, **1994**, 36(1-2), 113-122.
119. **Moore H, Dvorakova K, Jenkins N, Breed W.** Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. *Nature*, **2002**, 418(6894), 174-177.
120. **Moosmann B, Behl C.** Cytoprotective antioxidant function of tyrosine and tryptophan residues in trans membrane proteins. *European journal of biochemistry*, **2000**, 267(18), 5687-5692.
121. **Mountz JD, Zhou T.** Apoptosis and auto immunity (in) A Text book of Rheumatology: Arthritis and allied conditions. WJ Kopman (Editör), **2001**, Lippincott-Williams & Wilkins.
122. **Nakagata N.** Cryopreservation of Mouse Spermatozoa. *Mammalian Genome*, **2000**, 11(7): 572-576.
123. **Nakagata, N.** Cryopreservation of Mouse spermatozoa and in vitro fertilization. In *Transgenic Mouse Methods and Protocols*, **2011**, (pp. 57-73). Humana Press.
124. **Nauk VA, Ljansberg ES, Seikin VN.** Cryogenic changes on ram spermatozoa. *Ovtsevodstvo*, **1970**, 16(10), 25-27.
125. **Nayak BN, Buttar HS.** Evaluation of the antioxidant properties of tryptophan and its metabolites in in vitro assay. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, **2016**, 13(2), 129-136.
126. **Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M ve ark.** Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, **1999**, 51(4), 721-727.
127. **Nie G, Wenzel JGW.** Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*, **2001**, 55(4), 1005-1018.
128. **Noiles EE, Bailey JL, Storey BT.** The temperature dependence in the hydraulic conductivity, Lp, of the mouse sperm plasma membrane shows a discontinuity between 4 and 0°C. *Cryobiology*, **1995**, 32(3), 220-238.
129. **Noiles EE, Thompson KA, Storey BT.** Water permeability, Lp, of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. *Cryobiology*, **1997**, 35(1), 79-92.
130. **Nolan PM, Peters J, Strivens M, Rogers D, Hagan J ve ark.** A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse. *Nature genetics*, **2000**, 25, 4, 440.
131. **Ok E, Öz ZS.** Sperm hücrelerinde apoptoz. *Androloji Bülteni*, **2007**, cilt 30: 215-218.
132. **Omur AD, Ertay S, Güney M, Sahin A, Kucukler S ve ark.** Antioxidant Potential of Ferulic Acid on the Freez ability of Bull Semen. *Open Access Journal of Veterinary Science Research*, **2019**, ISSN: 2474-9222.
133. **Otubanjo OA, Mosuro AA.** An InVivo Evaluation of Induction of Abnormal Sperm Morphology by Some Antelmintic Drugs in Mice, *Mutation Research*, **2001**, 497, 131- 138.
134. **Ou S, Kwok KC.** Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2004**, 84(11), 1261-1269.
135. **Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelings perger C, Haanen C.** Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, **1998**, 3(2), 115-121.
136. **Öktem S, Özhan HM, Özol D.** Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, **2001**, 2 (1): 91- 95.
137. **Öniz H.** Apoptoz: Ölmeye yatmak. *SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi*, **2004**, 14(1)
138. **Özcan A, Atakişi E.** Apoptosisin Biyokimyasal Önemi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2003**, 9(1): 95-100.
139. **Öztürk C, Aksoy NH.** The effect of L-glutamine and trehalose on dog sperm cryopreservation. *Acta Veterinaria Brno*, **2021**, 90(2), 201-206.
140. **Palasz AT, Mapletoft RJ.** Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, **1996**, 14(2), 127-149.
141. **Panyaboriban S, Suwimonteerabutr J, Phutikanit N, Swangchan-Uthai T, Tharasanit T ve ark.** Effect of various combinations of sugar supplementation in the extender on frozen-thawed ram semen quality and fertility. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, **2015**, 45(2), 229.
142. **Parks JE, Graham JK.** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, **1992**, 38(2), 209-222.
143. **Patist A, Zoerb H.** Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids and Surfaces B: Bio interfaces*, **2005**, 40(2), 107-113.

144. **Payne SR, Oliver JE, Upreti GC.** Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, **1994**, 31(2), 180-184.
145. **Pegg DE.** The History and Principles of Cryopreservation. *Semin. Reprod. Med*, **2000**, 20(1): 5-13.
146. **Pei Y, Yang L, Wu L, He H, Geng G ve ark.** Combined effect of apigenin and feruli cacid on frozen-thawed boar sperm quality. *Animal Science Journal*, **2018**, 89(7), 956-965.
147. **Penfold LM, Moore HDM.** A new method for cryopreservation of Mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil*, **1993**, 99:131-134
148. **Perticarari S, Ricci G, Granzotto M, Boscolo R, Pozzobon C ve ark.** A new multi parameter flow cytometric method for human semen analysis. *Hum Reprod*, **2007**, 22 (2): 485-494.
149. **Pınarbaşı E.** Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü) (in) Moleküler Biyoloji. A Yıldırım, F Bardakçı, M Karataş, B Tanyolaç (Editör), **2007**, 423-468, Nobel Yayın, Ankara
150. **Polge C, Smith AU, Parkes AS.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, **1949**, 164(4172), 666-666.
151. **Poyraz Ö.** Laboratuvar hayvanları bilimi. *Kardelen Yayınevi, Ankara*, **2000**.
152. **Purdy PH.** A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, **2006**, 63(3), 215-225.
153. **Quinn P, Kerin JF, Warnes GM.** Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertility and sterility*, **1985**, 44(4), 493-498.
154. **Raspa M, Guan M, Paoletti R, Montoliu L, Ayadi A ve ark.** Infrafrontier Technical Working Group. Dryice is a reliable substrate for the distribution of frozen Mouse spermatozoa: A multicentric study. *Theriogenology*, **2017**, 96: 49-57.
155. **Renard P, Grizard G, Griveau JF, Sion B, Boucher D ve ark.** Improvement of motility and fertilization potential of post thaw human sperm using glutamine. *Cryobiology*, **1996**, 33(3), 311-319.
156. **Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N ve ark.** L-tryptophan: basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *International Journal of Tryptophan Research*, **2009**, 2, IJTR-S2129.
157. **Roth E, Oehler R, Manhart N, Exner R, Wessner B ve ark.** Regulative potential of glutamine relation to glutathione metabolism. *Nutrition*, **2002**, 18(3), 217-221.
158. **Roy S, Metya SK, Rahaman N, Sannigrahi S, Ahmed F.** Feruli cacid in the treatment of post-diabetes testicular damage: Relevance to the down regulation of apoptosis correlates with antioxidant status via modulation of tgf- β 1, il-1 β and akt signalling. *Cell biochemistry and function*, **2014**, 32(1), 115-124.
159. **Said TM, Aziz N, Sharma RK, Lewis Jones I, Thomas Jr AJ ve ark.** Novel association between sperm deformity index and oxidative stres induced DNA damage in infertile male patients. *Asian journal of andrology*, **2005**, 7(2), 121-126.
160. **Sakahira H, Enari M, Nagata S.** Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, **1998**, 391: 96-9.
161. **Sakkas D, Bizzaro D, Manicardi CG.** Cromatin damage and male infertility. In: The genetics of male infertility. Human apress, Totowa New Jersey, **2007**, 304-306.
162. **Salamon S, Maxwell WMC.** Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, **1995**, 37(3-4), 185-249.
163. **Salamon S, Maxwell WMC.** Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, **2000**, 62, 77-111.
164. **Salamon S, Visser D.** Effect of composition of Tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Australian journal of biological sciences*, **1972**, 25(3), 605-618.
165. **Salgame P, Primiano LL, Fincke JE, Muller S, Monestier M.** An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic acids research*, **1997**, 25(3), 680-681.
166. **Sarıözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutaş PA, Bilgen A.** The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stres sparameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*, **2009b**, 58(2), 134-138.
167. **Sarıözkan S, Tuncer PB, Bucak M.N, Ulutaş P0.** Influence of Various Antioxidants on Microscopic-Oxidative Stress Indicators and Fertilizing Ability of Frozen-Thawed Bull Semen. *Acta Veterinaria Brno*, **2009a**, 78(3).

168. **Schmehl MK, Vazquez IA, Graham EF.** The effects of non penetrating cryoprotectants added to test yolk glycerol extender on the post thaw motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, **1986**, 23, 512-517.
169. **Sereno D, Holzmüller P, Mangot I, Cun, G, Ouaisi A ve ark.** Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2001**, 45(7), 2064-2069.
170. **Shayan-Nasr M, Ghanie, A, Eslami, M, Hashem EZ.** Ameliorative role of trans-ferulic acid on induced oxidative toxicity of rooster semen by β -cyfluthrin during low temperature liquid storage. *Poultry Science*, **2021**, 101308.
171. **Sikka SC, Rajasekaran MAHADEVAN, Hellstrom WJ.** Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of andrology*, **1995**, 16(6), 464-468.
172. **Singh HO, Singh B, Kumar R, Srivastava S, Singh JP.** Role of Alanine, Arginine and Glutamine on Storage Capacity of Abattoir Derived Epididymal Buck Semen at Refrigerated Temperature. *The Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology*, **2021**, 17(3), 52.
173. **Sliwa L.** Usability of the hypoosmotic swelling "Water-test"--a simple method to assess sperm membrane integrity in Mouse spermatozoa. *Folia biologica*, **1993**, 41(1-2), 29-31.
174. **Somfai T, Bodo SZ, Nagy SZ, Gocza E, Ivancsics J ve ark.** Simultaneous Evaluation of Viability and Acrosome Integrity of Mouse Spermatozoa Using light Microscopy, Biotechnic & Histochemistry, **2002**, 77 (3), 117-120.
175. **Songsasen N, Leibo SP.** Cryopreservation of Mouse Spermatozoa. I. Effect of Seeding on Fertilizing Ability of Cryopreserved Spermatozoa, *Cryobiology*, **1997-a**, 35, 240- 254.
176. **Songsasen N, Leibo SP.** Cryopreservation of Mouse Spermatozoa. II. Relationship Between Survival After Cryopreservation and Osmotic Tolerance of Spermatozoa from Three Strains of Mice, *Cryobiology*, **1997-b**, 35, 255-269
177. **Songsasen N, Leibo SP.** Live Mice Cryopreserved Embryos Derive In Vitro with Cryopreserved Ejaculated Spermatozoa, *Lab Anim Sci*, **1998**, 48 (3), 275-281.
178. **Sönmez M.** Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. *Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Elazığ*, **2013**, 237-287.
179. **Spencer G.** International Team of Researchers Assembles Draft Sequence of Mouse Genome. <https://www.genome.gov/10002983/2002-release-draft-sequence-of-mouse-genome>, Erişim Tarihi: 03.01.2020. **2002**.
180. **Spodenkiewicz M, Diez-Fernandez C, Rüfenacht V, Gemperle-Britschgi C, Häberle J.** Mini review on glutamine synthetase deficiency, an ultra-rare inborn error of amino acid biosynthesis. *Biology*, **2016**, 5(4), 40.
181. **Srinivasan M, Sudheer, AR, Menon VP.** 2007 Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, **2007**, 40(2), 92-100.
182. **Storey BT, Noiles EE, Thompson KA.** Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, **1998**, 37(1), 46-58.
183. **Sztejn JM, Noble K, Farley JS, Mobraaten LE.** Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, **2001**, 42(1), 28-39.
184. **Şimşek F.** Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu. *Türkiye Klinikleri Journal of Pediatrics*, **1999**, 8(1): 42-47.
185. **Tada N, Sato M, Yamanoi J, Mizorogi T, Kasai K, Ogawa S.** Cryopreservation of Mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *Journal of Reproduction and Fertility*, **1990**, 89 511–516.
186. **Takeo T, Nakagata N.** Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a pre incubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Laboratory animal*, **2010**, s. 44(2): 132-137.
187. **Takeshima T, Nakagata N, Ogawa S.** Cryopreservation of Mouse spermatozoa. *Jikken Dobutsu*, **1991**, 40 493–497.
188. **Tartaglione CM, Ritta MN.** Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, **2004**, 62(7), 1245-1252.
189. **Taylor CT.** Antioxidants and reactive oxygen species in human infertility. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, **2001**, 10: 189-198.

190. **Tekin N.** Erkek Üreme Organlarının Muayenesi (Androlojik Muayeneler), In “Theriogenology” Ed. E Alaçam, 53-67, Nürol Matbaacılık AŞ, Ankara, **1990**.
191. **Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C.** Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Molecular human reproduction*, **1998**, 4(8), 757-762.
192. **Thornton CE, Brown SD, Glenister PH.** Large numbers of mice established by in vitro fertilization with cryopreserved spermatozoa: implications and applications for genetic resource banks, mutagenesis screens, and Mouse back crosses. *Mammalian Genome*, **1999**, 10(10), 987-992.
193. **Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ.** Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect. *Theriogenology*, **2002**, 58(1), 87-102.
194. **Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC.** The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol. Pathol*, **1997**, 25: 82–8.
195. **Tuffery AA.** The Mouse In “The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals” Ed. by W Lane-Petter, AN Worden, BF Hill, JS Paterson, HG Vevers, 288-310, Third Edition E. & S. Living Stone Ltd, Edinburgh and London, **1967**.
196. **Tuncer PB, Sariözkan S, Bucak MN, Büyükleblebici S.** Antioxidant supplementation ameliorates bull sperm parameters and fertilizing ability following the freeze-thaw process. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **2021**, 45(3), 457-462.
197. **Türk G.** Reaktif oksijen türlerinin spermatozoon fonksiyonları üzerindeki fizyolojik ve patolojik etkileri. *Türkiye Klinikleri*, **2015**, 1(3): 26–34.
198. **Uchida T, Nagayama M, Shibayama T, Gohara K.** Morphological investigations of disaccharide molecules for growth inhibition of ice crystals. *Journal of Crystal Growth*, **2007**, 299(1), 125-135.
199. **Ulukaya E.** Apoptosis ders notları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı*, **2003**, 15-26.
200. **Urbaniak A, Szeląg M, Molski M.** Theoretical investigation of stereo chemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid. *Computational and Theoretical Chemistry*, **2013**, 1012, 33-40.
201. **Vajta G, Kuwayama M.** Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, **2006**, 65(1), 236-244.
202. **Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR.** Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and cellular endocrinology*, **2004**, 216(1-2), 31-39.
203. **Wai-Sum O, Chen H, Chow, PH.** Male genital tract antioxidant enzymes the inability to preserve sperm DNA integrity. *Molecular and cellular endocrinology*, **2006**, 250(1-2), 80-83.
204. **Wang S, Sun M, Wang N, Yang K, Guo H ve ark.** Effects of L-glutamine on boar sperm quality during liquid storage at 17°C. *Animal reproduction science*, **2018**, 191, 76-84.
205. **Watson PF, Martin ICA.** Artificial insemination of sheep: the effect of semen diluent containing egg yolk on the fertility of ram semen. *Theriogenology*, **1976**, 6(5), 559-564.
206. **Watson PF.** Oxford: Oxford University Press, The preservation of semen in mammals, Oxford Reviews of Reproduction Biology, **1979**, 283–351
207. **Watson PF.** Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *The Veterinary Record*, **1975**, 97(1), 12-15.
208. **Weng LS, Taylor LS, Morshedi M, Schuffner A, Duran HE ve ark.** Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod*, **2002**, 8 (10): 984-991.
209. **Woolley DM.** Motility of the Spermatozoa at surfaces, *Reproduction*, **2003**, 126, 259-270.
210. **World Health Organisation.** WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge university press, **1999**.
211. **Xu K, Liu G, Fu C.** The tryptophan pathway targeting antioxidant capacity in the placenta. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2018**.
212. **Yao K, Fang J, Yin YL, Feng ZM, Tang ZR ve ark.** Tryptophan metabolism in animals: important roles in nutrition and health. *Front Biosci (ScholEd)*, **2011**, 3(1), 286-97.
213. **Yılmaz İ.** Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi. *Uzmanlık Tezi, İstanbul*, **2005**.
214. **Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T.** Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, **2000**, 54, 579-585.
215. **Yildiz C, Law N, Ottaviani P, Jarvi K, McKelvie C.** Comparison of sperm quality and DNA integrity in mouse sperm exposed to various cooling velocities and osmotic stress. *Theriogenology*, **2010**, 74(8), 1420-1430.

216. **Yildiz C, Ottaviani P, Law N, Ayearst R, Liu L ve ark.** Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction*, **2007**, 133(3):585-95.
217. **Yokoyama M, Akiba H, Katsuki M, Nomura T.** Production of normal young following transfer of Mouse embryos obtained by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa. *Jikken Dobutsu*, **1990**, 39 125–128.
218. **Yu JC, Jiang ZM, Li DM.** Glutamine: a precursor of glutathione and its effect on liver. *World journal of Gastroenterology*, **1999**, 5(2), 143.
219. **Zheng RL, Zhang H.** Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic in fertile human sperm motility, viability, lipid peroxidation, and cyclic nucleotides. *Free Radical Biology and Medicine*, **1997**, 22(4), 581-586.
220. **Zhong RZ, Zhou DW.** Oxidative stres and role of natural plant derived antioxidants in animal reproduction. *Journal of integrative agriculture*, **2013**, 12(10), 1826-1838.
221. **Zhu Z, Fan X, Lv Y, Lin Y, Wu D, ZengW.** Glutamine protects rabbit spermatozoa against oxidative stress via glutathione synthesis during cryopreservation. *Reproduction, Fertility and Development*, **2017**, 29(11), 2183-2194.



ÖZGEÇMİŞ

İlkokulu Tokat'ın Artova İlçesi Gazipaşa İlkokulu'nda bir yıl okuduktan sonra son dört yılı Tokat/Merkez Gazipaşa İlkokulu'nda tamamladı. Orta öğrenimini Tokat İbn-i Kemal İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini bir yıl süreli Tokat Cumhuriyet Lisesi'nde okuduktan sonra son iki yılını Samsun Bafra Lisesi'nde tamamladı. 2005 yılında kazandığı Bursa Uludağ Üniversitesi Karacabey Meslek Yüksekokulu Hayvan Yetiştiriciliği ve Sağlığı bölümünden 2007 yılında mezun oldu. 2007 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazanıp 2012 yılında mezun oldu. 2018 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doğum Jinekoloji ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda açılan doktora bilim sınavını kazanıp doktora eğitimine başladı. 2019 yılında Iğdır Üniversitesi Uygulamalı Bilimler Fakültesinde açılan Araştırma Görevlisi sınavını kazanıp aynı yıl içinde Iğdır Üniversitesi Hayvan Hastanesine Başhekim olarak görevlendirildi. 2019 yılında göreve başlamış olduğu Iğdır Üniversitesinde Hayvan Hastanesi Başhekimisi olarak görevine devam etmektedir.