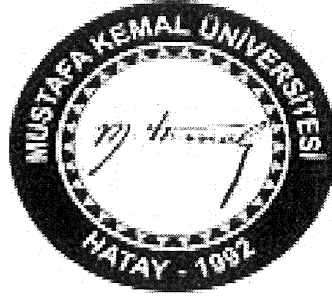




T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

DONDURULUP-ÇÖZDÜRÜLEN TAVŞAN SPERMİ ÜZERİNE
METİONİN, SİSTEAMİN, ELLAJİK ASİT VE ARJİNİNİN
ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Metin ER
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANLARI

Doç. Dr. Ayşe Yıldırım

Yrd. Doç. Dr. Harun Alp

HATAY-2013

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

DONDURULUP-ÇÖZDÜRÜLEN TAVŞAN SPERMİ ÜZERİNE
METİONİN, SİSTEAMİN, ELLAJİK ASİT VE ARJİNİNİN
ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Metin ER
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANLARI

Doç. Dr. Ayşe Yıldırım

Yrd. Doç. Dr. Harun Alp

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 399 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI

T. C.

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DONDURULUP-ÇÖZDÜRÜLEN TAVŞAN SPERMİ ÜZERİNE METİONİN, SİSTEAMİN, ELLAJİK ASİT VE ARJİNİNİN ETKİLERİ

Dr. Metin Er

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

.....
Prof. Dr. Ali Özcan
Tıp Fakültesi Dekan V.

Bu tez çalışmasının ‘Tıpta Uzmanlık’ derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

.....
Doç. Dr. Ayşe Yıldırım
Ana Bilim Dalı Başkanı V.

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile ‘Tıpta Uzmanlık’ tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

.....
Doç. Dr. Ayşe Yıldırım
Tez Danışmanı

.....
Yrd. Doç. Dr. Harun Alp
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ

1. Doç. Dr. Ayşe Yıldırım
2. Yrd. Doç. Dr. Harun Alp
3. Prof. Dr. Mehmet Yıldız

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar LİSTESİ	viii
RESİMLER LİSTESİ	ix
KISALTMALAR	x
TEŞEKKÜR	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tavşanlarda Üreme	4
2.1.1. Erkek Tavşanlarda Üreme Organları	4
2.1.2. Spermatogenez	6
2.1.3. Spermatozoa Üretimini Etkileyen Faktörler	8
2.1.4. Tavşan Semeninin Özellikleri	9
2.2. Tavşan Semeninin Dondurularak Saklanması (Kriyoprezervasyonu) Ve Çözdürülmesi	12
2.2.1. Tavşan Semeninin Dondurulmasında Kullanılan Sulandırıcıların (Kriyodilüentlerin) İçeriği	12

2.2.2. Tavşan Semeninin Dondurulmasında Kullanılan Kriyodilüentler	16
2.2.3. Tavşan Semeninin Sulandırılması	21
2.2.4. Tavşan Semenini Dondurma Ve Çözdürme Yöntemleri	21
2.2.5. Tavşan Semeninin Dondurulmasında Başarıyı Etkileyen Faktörler	22
2.3. Semen Dondurulması Ve Çözdürülmesi Sırasında Spermatozoada Ortaya Çıkan Hasarların Oluş Mekanizmaları Ve Önlenmesi	23
2.3.1. Semen Dondurulması Ve Çözdürülmesi Sırasında Spermatozoada Ortaya Çıkan Hasarların Oluş Mekanizmaları	23
2.3.2. Semen Dondurulması Sırasında Spermatozoada Görülen Hasarlar	25
2.3.3. Kriyoprezervasyon Ve Hücre Membran Parametreleri	25
2.3.4. Kriyoprezervasyonda Buz Nükleasyonunun Kontrol Edilmesi	26
2.4. Reaktif Oksijen Substantları (ROS), Antioksidan Savunma Sistemi Ve Antioksidan Kullanımı	27
2.4.1. Reaktif Oksijen Substantları	28
2.4.2. Semende Serbest Radikallerin Kaynağı	31
2.4.3. Oksidatif Strese Karşı Spermatozoayı Koruyan Antioksidan Savunma Sistemi	33
2.4.3.1. Enzimatik Antioksidanlar	34

2.4.3.2. Non-Enzimatik Antioksidanlar	36
2.4.4. Fizyolojik Düzeydeki Reaktif Oksijen Substantlarının Spermatozoa Üzerine Etkileri	39
2.4.5. Patolojik Düzeydeki Reaktif Oksijen Substantlarının Spermatozoa Üzerine Etkileri	40
2.4.6. Spermatozoayı Reaktif Oksijen Substantlarının Zararlı Etkilerine Karşı Duyarlılaştıran Etmenler	42
2.4.6.1. Spermatozoaya Bağlı Faktörler	43
2.4.6.2. Spermatozoaya Bağlı Olmayan Faktörler	43
2.4.7. Dondurulan Tavşan Semeninde Spermatozoaları Oksidatif Strese Karşı Koruma Yöntemleri	43
2.4.7.1. Antioksidanların Tavşan Semeni Üzerine Etkileri	44
2.4.7.2. Arjinin, Ellajik Asit, Metionin Ve Sisteamin'in Antioksidatif Etkinliği	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM	50
3.1. Tavşan Semeninin Alınmasında, Dondurulmasında, Çözdürülmesinde Ve Çözdürülmesi Sonrasında Spermatolojik Ve Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesinde Kullanılan Gereçler	50
3.2. Hayvan Materyali Ve Hayvanların Bakımı- Beslenmesi	55
3.3. Tavşanlardan Semen Alınması	55
3.4. Semeni Dondurmadan Önce Motil Spermatozoa Oranının Değerlendirilmesi	55

3.5. Semen in Sulandırılması Ve Sulandırıcı Gruplar	55
3.6. Semen in Dondurulması	56
3.7. Dondurulan Semen in Çözdürülmesi	57
3.8. Dondurulup Çözdürülen Semen in Değerlendirilmesi	57
3.8.1. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi	57
3.8.1.1. Spermatozoaların Motilitesinin Değerlendirilmesi	58
3.8.1.2. Spermatozoaların Canlılığının Değerlendirilmesi	58
3.8.1.3. Spermatozoaların Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi	60
3.8.1.4. Spermatozoaların Mitokondriyal Aktivitesinin Değerlendirilmesi	62
3.8.2. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi	64
3.8.2.1. Lipid Peroksidasyon Ürünlerinin Analizi	65
3.8.2.2. Total Redükte Glutasyon Analizi	66
3.8.2.3. Total Antioksidan Kapasite Analizi	66
3.9. Bulguların İstatiksel Analizi	66
4.BULGULAR	67
4.1. Dondurulup Çözdürülen Semende Spermatolojik Parametrelerin Analizi	67
4.1.1. Spermatozoaların Motilitesinin Analizi	67

4.1.2. Spermatozoaların Canlılığının Analizi	68
4.1.3. Spermatozoaların Akrozom Bütünlüğünün Analizi	69
4.1.4. Spermatozoaların Mitokondriyal Aktivitesi	70
4.2. Dondurulup Çözdürülen Semende Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi	71
4.2.1. Lipid Peroksidasyon (LPO) Ürünlerinin Analizi	71
4.2.2. Total Redükte Glutasyon (GSH) Analizi	72
4.2.3. Total Antioksidan Kapasite Analizi	73
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
7.KAYNAKLAR	95
8.ÖZGEÇMİŞ	113

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Dondurulup-çözdürülen semende ortalama spermatozoa motilitesi.....	67
Tablo 2: Dondurulup-çözdürülen semende ortalama canlı spermatozoa oranı.....	68
Tablo 3: Dondurulup-çözdürülen semende akrozom bütünlüğü sağlam spermatozoaların ortalama oranı.....	69
Tablo 4: Dondurulup-çözdürülen semende mitokondriyal aktivitesi yüksek spermatozoaların ortalama oranı.....	70
Tablo 5: Semen in dondurulup-çözdürülmesi sonrası ortalama lipid peroksidasyon düzeyi	71
Tablo 6: Semen in dondurulup-çözdürülmesi sonrası ortalama total redükte glutatyon düzeyi.....	72
Tablo 7: Semen in dondurulup-çözdürülmesi sonrası ortalama total antioksidan kapasite.....	73

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 1:** Spermatolojik parametrelerin değerlendirildiği floresan mikroskop odası.....58
- Resim 2:** Spermalarda ölü-canlı spermatozoa oranının SYBR/PI boyama tekniği ile değerlendirilmesi. Baş kısmı yeşil floresan verenler, canlı spermatozoayı; baş kısmı kırmızı floresan veren hücreler, ölü spermatozoayı göstermektedir.....60
- Resim 3:** Spermalarda akrozom bütünlüğünün FITCH-PNA/PI boyama tekniği ile değerlendirilmesi. Akrozom kısımları yeşil floresan veren hücreler, hasarlı akrozoma sahip spermatozoayı; akrozom kısımları yeşil floresan vermeyen ya da kırmızı floresan hücreler, sağlam akrozomu olan spermatozoayı göstermektedir.....62
- Resim 4:** Spermatozoalarda mitokondriyal aktivitenin JC-1/PI boyama tekniği ile değerlendirilmesi. Gövde kısmı turuncu floresan veren hücreler, yüksek mitokondriyal aktivite gösteren spermatozoayı; gövde kısmı yeşil floresan veren hücreler, düşük mitokondriyal aktivite gösteren spermatozoayı; gövde kısmı floresan vermeyen hücreler, mitokondriyal aktivite göstermeyen spermatozoayı göstermektedir.....64
- Resim 5:** Spermatozoaların parçalanmasında kullanılan sonikasyon cihazı.....65

KISALTMALAR

mM	: Mili Molar
°C	: Santigrat Derece
%	: Yüzde
ROS	: Reaktif Oksijen Substantları
DNA	: Deoksiribonükleik asit
CAT	: Katalaz
SOD	: Süperoksit Dismutaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
G-6P DHG	: Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz
ml	: Mililitre
ms	: Milisaniye
PUFA	: Poliansatüre Yağ Asidi
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
CPA	: Kriyoprotektan
C	: Karbon
OH	: Hidroksil
U	: Ünite
L	: Litre
TES	: N-Tris [hidroksimetil] Metil-2 Aminometan Sülfonik Asit
DMA	: Dimetilasetamid
BSA	: Sığır Serum Albumini
FCS	: Sığır Fetüsü Serumu
MDA	: Malondialdehit

OEP	: Orvus Es Paste
ATP	: Adenozin Trifosfat
Lp	: Hidraulitik İletkenlik
Vp	: Eriyik Permeabilitesinin Aktivasyon Enerjisi
LPO	: Lipid Peroksidasyon
O ₂	: Moleküler Oksijen
O ₂ ^{•-}	: Süperoksit Radikali
OH ^{•-}	: Hidroksil Radikali
R [•]	: Lipid Alkil Radikali
ROO [•]	: Lipid Peroksil Radikali
HOCl	: Hipokloröz Asit
O ₃	: Ozon
¹ O ₂	: Singlet Oksijen
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
NO	: Nitrik Oksit
NO ⁻	: Nitroksil Anyonu
NO ₂	: Nitrik Dioksit
ONOO ⁻	: Peroksinitrit
HOONO	: Peroksinitröz Asit
NADPH	: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
RS [•]	: Thil Radikali
Fe	: Demir
e ⁻	: Elektron
Cu	: Bakır
LPS	: Lipopolisakkarit
GSH	: Redükte Glutatyon

GSSG	: Okside Glutasyon
NADP	: Okside Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
-SH	: Sülfidril Grubu
Zn	: Çinko
Se	: Selenyum
OS	: Oksidatif Stres
AlCl ₃	: Alüminyum Klorit
AUG	: Adenin Urasil Guanin
UGG	: Urasil Guanin Guanin
mRNA	: Mitokondriyal Ribonükleik Asit
mOsm	: Mili Osmol
FITCH-PNA	: Arachis hypogaea (peanut) ile konjuge floressein asetat
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
µl	: Mikrolitre
PI	: Propidyum İyodid
NaCl	: Sodyum Klorür
BHT	: Butil Hidroksi Toluen
SD	: Standart Sapma
µM	: Mikromolar
CFDA	: Karboksifloressein Asetat
DAPI	: Diamino-Fenilindol Dihidroklorit

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tez danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ayşe Yıldırım'a ve yardımcı tez danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Harun Alp'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin deneysel kısmının yapılmasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen ve karşılaştığım sıkıntıların çözümünde yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Mustafa Numan Bucak hocama çok teşekkür ederim. Ayrıca tezimin biyokimyasal analizlerinin yapılmasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Nuri Başpınar hocama çok teşekkür ederim. Tez çalışmam sırasında bana yardımcı olan Arş. Gör. Şükrü Güngör ve Arş. Gör. Caner Öztürk'e teşekkür ederim. Son olarak tüm yaşamım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen annem ve babama ve bu süreçte her anlamda beni destekleyen sevgili eşim Fatma Er'e çok teşekkür ederim.

Metin Er

HATAY/2013

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada 5 mM dozundaki arjinin, ellajik asit, metionin ve sisteaminin dondurulup-çözdürülmüş tavşan semenleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Yöntem: Beyaz Yeni Zellanda tavşanlarından alınan semenler birleştirildi. Birleştirilen semenler, 5 eşit kısma bölündü. Her bir kısım sırasıyla arjinin, ellajik asit, metionin ve sisteaminin 5 mM dozlarını içeren ve içermeyen (kontrol) Tris bazlı sulandırıcısıyla 37°C'de sulandırıldı. Dilüe numuneler, 5°C'de 1 saat ekilibrasyona bırakıldı. Ekilibrasyondan sonra numuneler, sıvı azot buharında donduruldu ve sonrasında saklamak amacıyla sıvı azota (-196°C) atıldı. Numune, 1 ay sıvı azotta bekletildikten sonra 37°C'lik su banyosunda 25-30 saniye bekletilerek çözdürüldü. Dondurup-çözdürme sonrası kontrol ve antioksidan gruplarının spermatozoanın motilitesi, canlılığı, akrozom bütünlüğü, mitokondriyal aktivitesi üzerine etkileri birlikte total redükte glutatyon düzeyi ve total antioksidan kapasite üzerine etkileri karşılaştırıldı.

Bulgular: Motil spermatozoa oranını kontrol grubuna (%19.00) kıyasla; sisteamin grubunda (%35.00) önemli ölçüde, diğer antioksidan gruplarında ise önemsiz düzeyde yüksek bulduk ($p<0.05$). Spermatozoa canlılık oranı, hasarsız akrozomlu spermatozoa oranı, yüksek mitokondriyal aktiviteli spermatozoa oranı ve malondialdehit oluşum düzeyi açısından; kontrol grubu ile diğer gruplar arasında önemli farklılık olmadığını tespit ettik ($p>0.05$). Yüksek mitokondriyal aktiviteli spermatozoa oranını, arjinin ve sisteamin gruplarında ellajik asite kıyasla önemli düzeyde yüksek tespit ettik ($p<0.05$). Total redükte glutatyon düzeyi, ellajik asit grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda önemli ölçüde yüksek bulundu ($p<0.05$). Total antioksidan kapasitesini ellajik asit grubuna kıyasla; metionin grubunda önemli düzeyde, diğer antioksidan gruplarında ise önemsiz düzeyde yüksek olduğunu tespit ettik ($p<0.05$).

Sonuç: Bu çalışmada dondurulup-çözdürülen tavşan semeninin spermatolojik ve oksidatif stres parametreleri üzerine grupların etkileri değerlendirildiğinde; genel itibarıyla sisteamin ile en iyi, ellajik asit ile en kötü sonuçları elde ettik.

Anahtar kelimeler: Tavşan semeni, semenin dondurulması, antioksidan, spermatolojik ve oksidatif stres parametreleri.

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to investigate the effects of arginine, ellagic acid, methionine and cysteamine at 5 mM doses on rabbit semen.

Methods: Semens collected from New Zealand rabbits were pooled. Pooled semen divided into 5 equal aliquots. The aliquots were diluted in tris-base extender containing arginine, ellagic acid, methionine and cysteamine at doses of 5 mM, and no additive (control) at 37°C. Diluted samples were equilibrated at 5°C for 1 h. After equilibration, the samples were frozen in liquid nitrogen vapour and then plunged into liquid nitrogen (-196°C) for storage. After storage about one month, samples thawed via plunging into water bath at 37°C for 25-30 second. Following freeze-thawing, effects of control and antioxidant groups on motility, acrosome integrity, viability, mitochondrial activity of spermatozoa and levels of total reduced glutathione and total antioxidant capacity were compared.

Results: We found that the cysteamine (%35.00) led to higher significantly and other antioxidants except cysteamine led to higher non-significantly in the percentage of spermatozoa motility, compared to control (%19.00) ($p < 0.05$). We found that there were't significant difference in the percentage of spermatozoa viability, spermatozoa with non-damaged acrosome, spermatozoa with high mitochondrial activity and formation of malondialdehyde between control and other groups ($p > 0.05$). We found that arginine and cysteamine led to higher percentage of spermatozoa with high mitochondrial activity, compared to ellagic acid ($p < 0.05$). Compared to ellagic acid group, other groups led higher significantly levels of total reduced glutathione to be found ($p < 0.05$). We found that the methionine led to higher significantly and other antioxidants except methionine led to higher non-significantly in the level of antioxidant capacity compared to ellagic acid ($p < 0.05$).

Conclusion: When effects of groups on spermatological and oxidative stress parameters of frozen-thawed rabbit semen were evaluated; in generally cysteamine led to the best results and ellagic acid led to the worst results to be found.

Key words: Rabbit semen, freezing of semen, antioxidant, spermatologic and oxidative stress parameters.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ülkemizde gerek kadın gerek erkek faktörlerine bağlı görülen infertilite, sosyokültürel açıdan ciddi bir sıkıntı oluşturmaktadır. Bu amaçla Tüp bebek merkezlerinde infertilite sorunlarını çözebilmek için yapılan çalışmalar son derece hız kazanmıştır. Özellikle erkek faktörlerine bağlı infertilite ülkemizdeki bireylerin sosyokültüre yaşam kalitelerini olumsuz etkilemektedir. İn-vitro fertilizasyon laboratuvarlarında yapılan son çalışmalar neticesinde sperm ve oosit gibi eşey hücreleri ve zigot, kriyoprezervasyon (dondurarak koruma) yöntemi ile yıllarca saklanabilmektedir. Bu bilimsel gelişmelerin neticesinde günümüzde; genital kanser tanısı almış ve bu nedenle kemoterapi alacak olan bireyler, tedavi bitimine kadar ya da anne-baba olmak istedikleri zamana kadar sperm ya da oositlerini kriyoprezervasyon ile yıllarca saklatabilme imkanına kavuşmuştur. Son yıllarda bölgemiz olan Hatay/Antakya yöresinde daha da belirgin olmak üzere sperm kriyoprezervasyonu için hasta taleplerinde bir artış izlenmektedir.

Kriyoprezervasyon, sözcük anlamı olarak hücreyi canlılığını korumak suretiyle soğukta (-196°C 'lik nitrojen tankında) dondurarak saklama demektir. Kriyoprezervasyon süresince hücrelerin, canlılığı korunmak kaydıyla metabolik aktiviteleri durdurulmaktadır. Kriyoprezervasyon ile spermatozoa, yıllarca canlılığı korunarak saklanabilmektedir. Semen dondurulması, soğuk şokuna ve oksidatif strese yol açmakta ve spermatozoanın plazma membranı üzerinde kalıcı hasarlara neden olmaktadır. Semen sulandırılması ve dondurulması seminal plazmada ve spermatozoada antioksidan seviyelerinin düşmesine neden olduğundan, dondurulan semen oksidatif strese duyarlı hale gelir. Spermatozoanın plazma membranı, dondurulma esnasında gelişen soğuk şokundan başlıca etkilenen yerlerden birisidir (1). Spermatozoanın plazma membranında kolesterol/fosfolipid oranının yüksek olması, dondurma-çözdürmenin meydana getireceği olumsuz etkilere spermatozoayı dirençli kılar. İnsan ve tavşan spermatozoasının plazma membranında

kolesterol/fosfolipid oranı yüksektir; bu nedenle plazma membranında bu oranın düşük olduğu diğer canlılarla kıyas edildiğinde, insan ve tavşan spermatozoasının dondurma-çözdürme hasarına karşı direnci daha yüksektir (2). İnsan spermatozoası ile tavşan spermatozoası arasındaki bu benzerlik düşünüldüğünde, tavşan semen kriyoprezervasyonunda elde edilecek başarının insan semen kriyoprezervasyonunun etkinliğinin arttırılmasına katkı sağlayacağı aşıkardır.

Semenin dondurulması-çözdürülmesi sırasında oluşan reaktif oksijen substantları (ROS), endojen savunma sisteminin tolere edemeyeceği düzeye çıkarsa oksidatif stres gelişir. ROS'un düşük konsantrasyonları hiperaktivasyon, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi spermatolojik fonksiyonların gerçekleşmesinde önemli rol üstlenirken; yüksek miktarda üretilen ROS spermatolojik fonksiyonları olumsuz etkilemekte ve buna bağlı olarak da infertilite gelişimine sebep olabilmektedir (3). Serbest oksijen radikallerinin toksik etkilerine karşı koymak için, spermatozoa ve seminal plazmada bazı antioksidanlar içermektedir (4,5). Fakat bu antioksidan sisteminin kapasitesi, ROS ürünlerinin olası toksik etkilerine ve oksidatif hasara karşı koymada yeterli değildir (6).

Spermatozoanın antioksidan kapasitesinin düşük olması, plazma membranının doymamış yağ asitlerince zengin olması ve DNA tamir yetisinin yetersiz olması gibi nedenlerden dolayı spermatozoa; dondurmanın ve çözdürmenin meydana getirdiği hasarlara karşı duyarlıdır (7). Bu nedenle spermatozoadaki dondurma ve çözdürme esnasında meydana gelebilecek olan hasarları minimize etmek için; semen sulandırıcılarına koruyucu ve antioksidan özellikli maddeler eklenmektedir. Literatüre baktığımızda tavşan semenini dondurma ve çözdürmeden kaynaklanan hasara karşı korumaya ilişkin; çok az sayıda çalışma yapılmıştır ve antioksidan etkinlikleri kanıtlanmış olan arjinin, ellajik asit, metionin ve sisteaminin kullanıldığı hiçbir çalışma yapılmamıştır. Bu sebeplerden dolayı bu çalışmamızda bu konu üzerine yöneldik ve antioksidan olarak arjinin, ellajik asit, metionin ve sisteaminin etkinliğini incelemeyi amaçladık.

Bu çalışmadaki amaçlarımız şunlardı:

- ✓ Tavşan semen kriyoprezervasyonunda antioksidanların dondurup-çözdürme hasarına karşı spermatozoayı koruyup korumadıklarını değerlendiren çalışma sayısının azlığına bağlı literatürde oluşan bu boşluğu doldurmak
- ✓ Dondurup çözdürmenin neden olduğu spermatolojik parametrelerdeki kalite düşüklüğünü ve oksidatif stresi önleme noktasında arjinin, ellajik asit, metionin ve sisteamin koruyucu etkilerinin olup olmadığını ortaya koymak
- ✓ İnsan semeni üzerine yapılan kriyoprezervasyon uygulamalarına ışık tutmak ve katkıda bulmak

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tavşanlarda Üreme

Erkek tavşanlarda testis, doğumdan sonra 12. haftada skrotuma inişini tamamlar. 4 aylıkken, semende motil spermatozoalar görülürse de; tavşanlarda günlük spermatozoa üretimi en üst düzeye 7-8. aylarda ulaşır.

Dişi tavşanlarda, diğer memelilerden farklı olarak bir östrus siklusu yoktur ve tüm sene boyunca cinsel aktivite gösterebilirler. Gebelik süresi 29-35 gündür (8).

2.1.1. Erkek Tavşanlarda Üreme Organları

-Testis

Tavşanlarda testisler; iki bacak arasında, iki ayrı skrotum içerisinde yerleşim gösterir. Her iki testis de, hemen hemen aynı hizadadır. Uzun eksen, kraniyo-medial ve kauda-lateral yerleşimlidir. Oval şekillidir ve yanlardan basıktır (9). Doğumdan sonra, 12. haftada skrotuma inişini tamamlarlar (8).

Tavşan testisi; germ hücrelerini, mezenşimal hücreleri, leyding ve sertoli hücrelerini içermektedir.

Prespermatogonya, postnatal dönemde seminifer tübülün periferinde bulunan germ hücresidir. Stoplazmasının büyük olmasıyla ve kendisiyle özdeş diğer hücrelerle aralarında köprülerin bulunmasıyla, fetal gonositlerden ayrılır. Postnatal dönemin 7. haftasının sonunda spermatogonya tip-A'ya dönüşene kadar; boyutu azalır, stoplazması yoğunlaşır, nükleolusu genişler. Diğer germ hücreleri de çeşitli zamanlarda ortaya çıkar.

Sertoli hücresi, bazal laminaya dik konumludur ve postnatal dönem boyunca komşuluğundaki germ hücreleriyle yakın ilişki içerisinde. Stoplazmalarında; uzunlamasına seyreden mitokondri, çok sayıda düz endoplazmik retikulum ve

belirgin golgi kompleksleri bulunur. Sertoli hücrelerinin çoğu, olasılıkla dejenere germ hücrelerinden kaynaklanan fagosite materyal içermektedir. Bu bilgi, sertoli hücrelerinin erken dönemde germ hücre matürasyonuna katıldığını desteklemektedir (10).

Leyding hücreleri, postnatal dönemin 5. haftasına kadar; oval şekilli nükleusu, belirgin nükleolusu ve geniş stoplazması ile steroid sentez eden hücrelerin özelliklerini taşımaktadır, ancak kısmen farklılaşmış durumdadır. 5. haftada tamamen farklılaşmış olup; çok sayıda düz endoplazmik retikulum içerir ve damarların çevresinde gruplar şeklinde lokalizasyon gösterir. 7. haftada erişkin testisinde olduğu gibi, interstisyel dokunun büyük bir kısmını kaplar hale gelmektedir (11).

-Duktuli Efferentis

Duktuli efferentis epiteli, esas hücre ve silyalı hücre olmak üzere iki tip hücreden ibarettir. Esas hücre, plazma membran yüzeyinde bulunan mikropinositotik veziküller ve stoplazma boyunca dağılım gösteren küçük dens cisimciklerle karakterizedir. Silyalı hücre, lümene uzanan silyalarının olması ve çekirdeğinin apikal üst kısmında bulunmasıyla ayırt edilir.

-Duktus Epididimis

Duktus epididimis, kaput, korpus ve kauda olmak üzere üç segmente sahiptir. Duktus epididimis epiteli; esas hücre ve bazal hücre olmak üzere iki tip hücreden ibarettir, ancak epididimisin farklı segmentlerinde esas hücrelerin yapısı farklılık gösterir.

- ✓ Kaput epididimisteki esas hücreler: Boyu uzundur, uzun mikrovillusa sahiptir, küçük bir golgi aparatına ve nükleusa komşu dens cisimcikler kümesine sahiptir, apikal stoplazması çok sayıdaki mikropinositotik veziküller ve büyük multiveziküler cisimciklerle doludur.
- ✓ Korpus epididimisteki esas hücreler: Çok sayıda düz endoplazmik retikuluma, büyük bir golgi aparatına, lipid damlacıklarına ve dens

cisimciklere sahiptir.

- ✓ Kauda epididimisteki esas hücreler: Boyları kısadır, bazal stoplazmasında konsantrik düzenlenmiş granüllü endoplazmik retikuluma sahiptir, dens cisimciklerin sayısı diğer segmentlere nazaran daha fazladır (12).

-Aksesuar bezler

Tavşanlarda aksesuar bezler; veziküler bez, proprostat bezi, prostat bezi, paraprostat bezi ve bulboüretral bezlerden ibarettir. Veziküler bez, iki lopludur ve mesanenin boynunda lokalizedir ve kaudalde prostat kompleksi ile komşudur. İçeriğini her bir loptan ayrılan birer boşaltıcı kanal aracılığı ile üretraya boşaltır. Proprostat bezi, iki lopludur ve kraniyalde veziküler bez, kaudalde ise prostat ile komşudur. İçeriğini her bir loptan ayrılan birer boşaltıcı kanal aracılığı ile üretraya boşaltır. Prostat bezi, iki lopludur ve kraniyalde proprostat bezi ile komşudur. İçeriğini her iki lobun ventral yüzeyinden çıkan birer boşaltıcı kanal aracılığıyla üretraya boşaltır. Paraprostat bezi, prostat bezinin venterolateralinde lokalizedir ve kaudalde bulboüretral bezlerle komşudur ve mikroskobik olarak iki farklı tiptedir: Bir tipi, prostat bezi ile aynı yapıya sahipken; diğer tipi bulboüretral bezleri andırır. Bulboüretral bez, iki lopludur ve prostat kompleksinin kaudalinde yer alır. İçeriğini her bir lobun ventral yüzeyinden çıkan ve sayıları değişken olan boşaltıcı kanallar aracılığı ile üretraya boşaltır (13).

-Skrotum ve Penis

Skrotum tüysüzdür, penis ise prepisyum içine gizlenmiştir ve sivri uçludur (8).

2.1.2. Spermatogenez

Tavşanlarda spermatogenezis esnasında görülen hücre tipleri; spermatogonya, spermatogonya tip-A, spermatogonya intermediat, spermatogonya tip-B, primer spermatosit, sekonder spermatosit ve spermatittir (14). Tavşanlarda spermatogenezis 51.8 günde tamamlanır (15).

-Spermatogonya

Mitoz bölünme geçirerek iki tane spermatogonya tip-A meydana getirir.

-Spermatogonya tip-A

Oluşan iki spermatogonya tip-A'dan birisi mitoz bölünmeyle kendisi gibi spermatogonya tip-A'ları üretirken, diğeri mitoz bölünmeyle iki adet spermatogonya intermediat hücreye dönüşür.

-Spermatogonya intermediat

2 mitoz bölünme geçirir ve bir tanesinden 4 adet spermatogonya tip-B oluşur.

-Spermatogonya tip-B

Mitoz bölünme geçirir ve primer spermatosit dönüşür. Neticede 1 adet spermatogonya tip-A'dan 16 adet primer spermatosit üretilmiş olur.

-Primer spermatosit

Mayoz bölünme geçirerek sekonder spermatosit dönüşür.

-Sekonder spermatosit

Mayoz bölünme geçirerek spermatite dönüşür.

-Spermatit

Spermatogenez sürecinin son hücresidir. 15.6 adet primer spermatosit; 62.4 adet spermatit değil de, 47.5 spermatit üretildiği bildirilmiştir. Bu durum, mayoz bölünmeler sürecinde spermatositlerin dejenere olduğunu göstermektedir (14). ³H-timidin enjeksiyonu sonrası işaretlenen tavşan spermatitlerinin; yaklaşık 30. günde seminifer tübül lümenine salıverildiği, yaklaşık 12 saat sonra da epididimisin kaput kısmına geçtiği bildirilmiştir. Tavşanlarda günlük spermatit üretiminin testis başına 368 milyon olduğu bildirilmiştir (16). 4 aylıkken, semende motil spermatozoalar görülürse de; günlük spermatozoa verimi 7-8. aylarda üst düzeye erişir (8).

2.1.3. Spermatozoa Üretimini Etkileyen Faktörler

Tavşan semeninin kalitatif ve kantitatif üretimini; tavşanın genetik yapısı, yaşı, beslenmesiyle birlikte mevsim şartları, çevre şartları ve tavşandan sperma alma sıklığı etkilemektedir

Genetikleri farklı tavşanlar, semen özellikleri ve fertilite kabiliyetleri bakımından farklılıklar gösterir. Melezliğin; çeşitli semen özelliklerinde orta düzeyde avantaj sağladığı, ancak bunlardan alınan semen ile yapılan yapay inseminasyonda negatif heterotik etkisi olduğu bildirilmiştir (17).

İlk 2 yılını tamamlayan tavşanlarda yaş ilerledikçe, semen kalitesinin düştüğü belirtilmektedir.

%15'ten fazla protein içeren diyetler, yeterli sperm üretimi için tavsiye edilmektedir. En az %1 oranında, ancak fazla olmamak kaydıyla dengeli yağ asidi içeren diyetlerin verilmesinin; membran akışkanlığının modifikasyonunda rol aldığı bildirilmektedir. Antioksidan alımı, lipid peroksidasyonu önlediğinden tavsiye edilmektedir (18).

Spermatozoa yoğunluğu, yaz mevsiminde düşmektedir (19).

Işığa maruz kalma süresi, hipotalamo-hipofiziyer aksı ve sonuçta hormon salınımını ve spermatozoa üretimini etkiler. Günlük sabit 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olan bir ortam spermatozoa üretimini artırır (18).

Haftada ik kezden fazla semen alınması, semen miktarını ve spermatozoa yoğunluğunu azaltır (17).

2.1.4. Tavşan Semeninin Özellikleri

-Sperma Miktarı

Tavşan sperması, semen ve jelden oluşmaktadır. Tavşanda semenden bahsedilirken, jelsiz kısım kast edilir. Sperma miktarı; tavşanın ırkı, genetik yapısı, yaşı ve beslenmesiyle birlikte mevsim şartlarına, çevre şartlarına ve tavşandan sperma alma sıklığına göre değişkenlik göstermektedir (17).

Beyaz Yeni Zellanda tavşanının ejakülat miktarı üzerine yapılan çalışmalarda; Keskin 0.4 ml., Macari ve Machado 0.61 ml., Pachado ve Macedo 0.74 ml. ve Dubiel ve arkadaşları 0.97 ml. olduğunu bildirmişlerdir (8,19,20).

-Semen pH'sı:

Semen pH'ı; semene idrar, genitoüriner inflamasyon sonucu kan ya da irin veya dışardan herhangi bir maddenin karışması sonucu değişebilir (8).

Beyaz Yeni Zellanda tavşanının semen pH'sı üzerine yapılan çalışmalarda; Pachado ve Macedo 6.74, Keskin 7.10, Macari ve Machado 7.22 ve Öztemel ve arkadaşları 7.72 olduğunu bildirmişlerdir (8,19,20).

-Semen Bileşenleri

Semen, seminal plazma ve spermatozoadan ibarettir. Seminal plazma; su, iyonlar, antioksidan enzimler, glikoproteinler, protein kompleksleri, yağ vezikülleri ve yağ damlacıkları ihtiva eder.

Tavşan semeninde ayrıca 'dynein-ATP'az inhibitörü' adlı glikoprotein tanımlanmıştır. Bu glikoprotein, spermatozoayı dekapasite eder ve başlangıç motilitesini önler.

Tavşan semeni üzerine yapılan bir çalışmada 150 kDa'lık protein kompleksi tanımlanmıştır. Bu protein kompleksi; bir asit-labil birim, bir asit-stabil bağlayıcı protein ve insülin benzeri büyüme faktöründen ibarettir. Spermatozoa motilitesini ve akrozom reaksiyonunu modüle eder.

Yağ damlacıkları kolesterolden zengindir ve spermatozoayı soğuk şoku ve prematür akrozom reaksiyonuna karşı korumak için sterol kaynağı olarak etki eder.

Veziküller, yüksek kolesterol/fosfolipid oranına sahip olup; tavşan spermatozoası için büyük miktarda enerji temin eder, immün-modülatör etkilidir ve fertilizasyon yetisinin kazanılmasında rol üstlenir (21).

Semen enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar ihtiva eder. Enzimatik antioksidanlar; katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidazdır (GPx), glutatyon redüktez (GR) ve glukoz-6 fosfat dehidrogenazdır (G-6P DHG) Non-enzimatik antioksidanlar ise; albumin, taurin, hipotaurin, ürik asit, selenyum, sistein, pirüvat, çinko, glutatyon, vitamin-C, vitamin E, karotenler, karnitin, laktoferrin, koenzim-Q10 ve protozomlardır (7).

-Spermatozoa Yoğunluğu

Birim hacim semende bulunan spermatozoa miktarıdır. Spermatozoa yoğunluğu; tavşanın ırkı, genetik yapısı, yaşı ve beslenmesiyle birlikte mevsim şartları, çevre şartları ve tavşandan alınan sperma sıklığına göre değişkenlik göstermektedir (17).

Beyaz Yeni Zellanda tavşanının spermatozoa yoğunluğu üzerine yapılan çalışmalarda; Öztemel ve arkadaşları ortalama $287.2 \times 10^6/\text{ml}$., Dubiel ve arkadaşları ortalama $309.0 \times 10^6/\text{ml}$. ve Keskin ortalama $386.1 \times 10^6/\text{ml}$. olduğunu bildirmişlerdir (8,19).

-Spermatozoa Motilitesi

Spermatozoa motilitesi, bir yönde ve güçlü hareket eden spermatozoaların hareketsiz veya diğer hareket biçimi gösterenlere oranı olarak tanımlanmaktadır. Yalnızca motil spermatozoaların dölleme yetileri olduğu kabul edildiğinden; yapay inseminasyon uygulamalarında spermanın sulandırılması, dozlanması ve dondurulması sırasında motilitenin doğru değerlendirilmesi önemli yer tutar (8).

Beyaz Yeni Zellanda tavşanının spermatozoa motilitesi üzerine yapılan çalışmalarda; Dubiel ve arkadaşları ortalama %66, Keskin ortalama %69 ve Öztemel ve arkadaşları ortalama %81.3 olduğunu bildirmişlerdir (8,19).

-Spermatozoanın Özellikleri

Diğer çiftlik hayvanlarından farklı olarak insan spermatozoasının plazma membranına benzer şekilde tavşan spermatozoasının plazma membranındaki kolesterolün fosfolipidlere oranı yüksektir (0.88) ve fosfolipidlerde çoklu doymamış yağ asitlerinin doymuş yağ asitlerine oranı yüksektir (0.8). Bu özelliklerinden dolayı, tavşan spermatozoası diğer çiftlik hayvanlarınkine kıyasla soğuk şokuna daha dirençlidir (2). Tavşan spermatozoasının plazma membranında poliansatüre yağ asidinin (PUFA) başlıcası dokozopentaenoik asit (C22:5n-6) iken, n-3 serisi poliansatüre yağ asitleri çok düşük düzeydedir. Spermatozoa hücrelerinde doymamış yağ asitlerinin yüksek düzeyde olması; hücrenin hareketinin regüle edilmesinde aktif rol oynar, fertilizasyonu karakterize eden füzyon olayları için spermatozoanın plazma membranına yeterli akışkanlık kazandırır. Ancak bununla beraber yüksek düzeyde PUFA bulunması, peroksidatif hasarla indüklenen serbest radikallere karşı spermatozoanın duyarlılığını artırır (22).

Spermatozoa plazma membranının su geçirgenlik katsayısı düşüktür. Bu nedenle semenin dondurulması esnasında; dimetilsülfoksit (DMSO) ya da amidler gibi düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektantların kullanımı gereklidir. Aktivasyon enerjisi ise yüksektir (23).

Sperm DNA'sı, eşsiz paketlenme düzeni sayesinde yapısal ve fonksiyonel bütünlük kazanacak ölçüde yüksek düzeyde organizedir. Somatik hücrelerden farklı olarak, büyük çoğunluğu protaminlerin yerleştirilmiş olmasına bağlı olarak kondanse halkalar halinde kıvrılmıştır ve küçük bir kısmı gevşek formda histonlara bağlanırken, geride kalan DNA kısmı ise genom boyunca 50 kilobazlık aralıklarla matriks tutunma bölgelerinde spermatozoanın nükleer matriksine tutunur. Protaminler, DNA'nın negatif fosfodiester iskeletini nötralize eden pozitif yüklü arjinin rezidüleri ihtiva eder ve zamana bağlı olarak DNA'nın aşırı kondensasyonun

ve dekompresyonun kontrolünü sağlayarak DNA'nın kıvrılmasını sağlar. Spermatozoa oosit ile kaynaştıktan sonra oosit tarafından temin edilen histon proteinleri ile yer değiştirir (24).

Spermatozoa enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar içerir. İçerdiği enzimatik antioksidanlar; glutatyon redüktaz (GR), glukoz-6 fosfat dehidrogenaz (G-6P DHG), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidazdır (GPx). İçerdiği non-enzimatik antioksidanlar selenyum, askorbik asit, α -tokoferol, redükte glutatyon (GSH), taurin, hipotaurin, koenzim Q-10 ve laktoferrindir (7).

2.2. Tavşan Semeninin Dondurularak Saklanması (Kriyoprezervasyonu) Ve Çözdürülmesi

Tavşan semeninin dondurularak saklanması yani kriyoprezervasyonu; tavşan yetiştiriciliğine ve döl verimi yüksek değerli genetiğe sahip tavşan türlerinin çoğaltılmasına katkılar sağlamaktadır.

Tavşan spermatozoası ilk kez Smith ve Polge (1950) tarafından gliserol ile dondurulmuştur. Günümüze kadar, bu çalışmalar giderek artmıştır (2).

2.2.1. Tavşan Semeninin Dondurulmasında Kullanılan Sulandırıcıların (Kriyodilüentlerin) İçeriği

Spermatozoa, kriyoprezervasyona bağlı olarak çeşitli sebeplerden dolayı hasar gördüğünden; kullanılan sulandırıcıların aşağıdaki temel özellikleri taşımaları gerekir:

- Laktik asit oluşumuna bağlı pH değişikliklerini telafi etmek için tampon görevi görmeli,
- Ortamdaki elektrolit dengesini ve optimum osmotik basıncı devam ettirebilmeli,
- Spermatozoalar için besin ve enerji temin etmeli,
- Hızlı soğutma ve ısı şokuna karşı koruyucu olmalı,

-Patolojik olanlar dahil mikroorganizmaları üremesini durdurabilmelidir.

-Ekonomik ve rutinde hazırlanması nispeten kolay olmalıdır (25,26).

-Tampon Solüsyonlar

Spermatozoanın metabolik aktivitesi, hidrojen iyonlarının açığa çıkmasına neden olur. Açığa çıkan bu iyonların taşınması için bir mekanizmanın olmaması, sulandırıcı pH'sinin düşmesine ve dolayısıyla spermatozoanın olumsuz etkilenmesine neden olur. Bu nedenle, semen sulandırıcılarında tampon solüsyonların kullanılması zorunludur (27). Spermatozoa, pH değişikliklerine karşı genellikle dar bir tolerans aralığına sahip olduğundan; sulandırıcıların tampon özelliği taşıyor olmaları gerekir. Metabolik aktivite soğutulan semende kaydedeğer olduğundan tampon maddeler, özellikle semenin dondurulmadan önceki soğutma dönemlerinde önemlidir (28). Semen sulandırıcılarının osmotik basıncı ve pH'si; izosmotik veya izotonik ya da nötrale yakın ya da hafif asidik olmalıdır (29).

Sulandırıcılarda osmotik basınç ve hidrojen iyon konsantrasyonunu ayarlamak için; tris (tris [hidroksimetil aminometan]), sitrik asit, MIII gibi tampon maddeleri kullanılmaktadır. Ancak etkinliği en iyi olan tris bazlı tamponlayıcıdır (2).

-Yumurta Sarısı

Semen sulandırıcısına yumurta sarısı katılması, soğutmanın zararlı etkilerine karşı spermatozoayı etkin şekilde korur. Yumurta sarısının soğuk şokuna karşı koruyuculuk sağlayan komponenti, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) olarak tanımlanan komponenttir. LDL'nin %89'u lipit (lipidlerin %74'ü nötral yağ, %26'sı fosfolipid) ve % 11'i proteinden ibarettir. Yumurta sarısı, kriyoprotektif etkinliğini şu şekillerde gösterir:

- İçerisindeki lipoprotein fosfolipitlerindeki yağ asitleri, spermatozoa yüzeyinde bir film tabakası oluşturarak soğuk şokuna ve kristal oluşumuna karşı koruyucu etkinlik göstermektedir (30).

- İçerisindeki lipoprotein bileşeni, membran lipitleri ile etkileşime girerek su ve iyon permeabilitesini değiştirmekte ve böylelikle indüklenen iyonik pompa ile membranlarda fosforilasyon arttırılmakta ve hücrel osmotik davranışta hücreye direnç kazandırılmaktadır (31).
- Seminal plazma proteinlerine bağlanarak, onların zararlı etkilerine karşı spermatozoa membranını korur (32).

-Kriyoprotektanlar (CPA'lar)

Kriyoprotektanlar, soğuk şokuna karşı koruyucu maddelerdir. Semen in dondurulmasında kullanılacak sulandırıcıda kriyoprotektif özellikli maddelerin bulunması gereklidir. Kriyoprotektanlar; hücrenin soğutulması, dondurulması ve çözündürülmesi esnasında gelişen fiziksel, kimyasal ve oksidatif stresi ve bunlardan doğan ısı şoku, osmotik değişim, intrasellüler kristal oluşumunu azaltmak amacıyla kullanılmakta ve çözündürme sonrası spermatolojik parametreleri ve fertilitiyi direkt etkilemektedirler (33).

Kriyoprotektanlar 2 gruba ayrılır: Permeabl (internal) kriyoprotektanlar ve non-permeabl (eksternal) kriyoprotektanlar. Permeabl kriyoprotektanlardan semen in dondurulmasında en çok kullanılanlar; gliserol, dimetilsülfoksit (DMSO), asetamid, propilen glikol, etilen glikol ve formamiddir. Non-permeabl kriyoprotektanlar, sakkaritler ve makromoleküller olarak ikiye ayrılır. Sakkaritler için; monosakkarit olarak glukoz ve galaktoz, disakkarit olarak sükroz ve trehaloz, trisakkarit olarak rafinoz sayılabilir. Makromoleküllerden ise en çok kullanılanları; sığır serum albumini (BSA), dekstran, polietilen glikol ve mannitoldür.

Permeabl kriyoprotektanlar koruyucu etkilerini şu şekilde gösterirler:

- Hücrenin dehidrate olmasını önleyerek
- Donma esnasında elektrolit yoğunluğunu azaltarak
- Protein yapıları koruyarak

- Düşük ısıların meydana getirdiği osmotik büzüşmeyi azaltarak

Gliserol, yüksek oranda hidrofilik yapı gösteren bir poliol bileşiğidir. Kimyasal yapısındaki karbonun hidroksile oranının (C/OH) eşit olması, spermatozoa üzerine etkisini arttırmaktadır. Spermatozoanın membran lipidleriyle etkileşime girerek, kimyasal ve fiziksel strese karşı membranları stabilize eder (34)

Dimetilsülfoksit (DMSO), bir hidrofilik sülfoksit grubuna ve iki hidrofobik metil grubuna sahip amfipatik bir moleküldür. Amfipatik doğası sayesinde, hem suda çözünür hem de birçok lipofilik bileşiği çözme yetisine sahiptir. Hem antioksidan hem de oksidan özelliğe sahiptir. Antioksidan etkinliğini hem lipid peroksidasyonunu hem de karbonil oluşumuyla protein oksidasyonunu azaltarak gösterirken, oksidan etkinliğini içeriğindeki sülfidril grubunun oksidasyonuna bağlı olarak serbest tiol düzeyini arttırarak gösterir (35). DMSO, in vitro ortamda fertilize olan sığır oositlerinin matürasyonunu ve gelişimini olumlu yönde etkiler (36).

Şekerler dondurma-çözdürme esnasında şu etkilerle spermatozoayı korurlar:

- Spermatozoanın yaşaması için gerekli olan enerjiyi temin ederler. Dondurulan spermatozoada metabolik aktivite geçici olarak durduğundan enerji temini nispeten çok önemli değildir. Zira spermatozoalar, dondurulmadan önce genellikle sadece birkaç saat için aktif kalırlar (28).
- Letal etkili hücre içi kristal oluşumunu engellemek için hücrede dehidrasyon oluştururlar.
- Hücre ile ortam arasında osmotik tamponlayıcı olarak görev yaparak soğuk şokuna karşı koruma sağlarlar. Monosakkaritler, disakkaritlere göre hücreye daha hızlı penetre olduğundan; monosakkaritlerin dehidrasyona neden olucu etkisi disakkaritlerden daha azdır.
- Dondurma ve çözdürme esnasında oluşan hasara karşı membran yapılarını; membrandaki fosfolipidlerle etkileşime girip yüzey artışı

sağlayarak, fosfolipidlerde meydana gelen ısı değişimlerini azaltarak, fosfolipid açıl zincirleri arasındaki van der Waals etkileşimlerini azaltarak, membran esneklik kaybını önleyerek, membran bileşiklerinin kaybını önleyerek, lipid faz değişimini önleyerek ve membran proteinlerini stabilize ederek korurlar (37,38).

-Antibiyotikler

Antibiyotikler, hijyen amacıyla sulandırıcıya katılır. Kullanılan sulandırıcıya bağlı olarak hem kristalizasyon sıcaklığını hem de oluşan buz miktarını modifiye ederler. Kullanılan antibiyotikler genellikle; 1000U/ml penisilin G, 1mg/ml streptomisin sülfat ya da 80mg/L kanamisin sülfattır (39-41).

2.2.2. Tavşan Semeninin Dondurulmasında Kullanılan Kriyodilüentler

İlk olarak 1950’de Smith ve Polge, %20 gliserol ve %0.25 arap sakızı içeren sulandırıcı kullanarak tavşan semenini sulandırmışlardır. Tavşan semeninin sulandırılmasında, o zamanlardan günümüze dek birçok tampon maddeler, kriyoprotektanlar, şekerler, makromoleküller, antibiyotikler ve başka çeşitli maddeler denenmiştir (2).

Tavşan semeninin kriyoprezervasyonu için genellikle tris (tris[hidroksimetil] aminometan) bazlı sulandırıcılar (tris, sitrik asit ve fruktoz ya da glukoz içerir) kullanılmaktadır. Tavşan semeninin sulandırılmasında tris sulandırıcısı dışında günümüze dek; yağsız süt tozu, TES (N-Tris[hidroksimetil] metil-2-aminometan sülfonik asit), BF-5 (TES + Tris içerir) ve içeriği bilinmeyen ticari M-III ve yine içeriği bilinmeyen ticari solid Cunigel sulandırıcıları kullanılmıştır Genel olarak çalışmalara bakıldığında, en üstün kriyodilüentin Tris bazlı sulandırıcı olduğu kabul edilmektedir (41-45).

Birçok türde olduğu gibi yumurta sarısı, tavşan semeninin dondurulması için yaygın olarak kullanılmaktadır ve kullanılan konsantrasyonu %10-20 arasında değişmektedir. Yağsız süt (nihai konsantrasyonu %8-10 olacak şekilde); yumurta

sarısına nazaran daha az kullanılmasına rağmen, tavşan semeni için bazı sulandırıcılarda kullanılmıştır. Bazı otörler; yağsız sütün ya da Laciphos'un (ticari yağsız süt bazlı genişletici) tavşan semeni için Tris-sitrik asit-fruktoz kadar etkin olmadığını gözlemlemişlerdir.

CPA olarak sadece gliserol kullanılarak dondurulan tavşan semeni ile elde edilen sonuçların kalitesi, taze semen ile elde edilen ve diğer CPA'lar ile dondurulan semen ile elde edilenlerden daha düşüktür. Bundan dolayı gliserol; birçok türün semeni için optimum CPA olmasına rağmen, tavşan semeni için iyi bir seçenek değildir. Gliserol ilavesiyle tavşan spermatozoası üzerindeki olumsuz etkiler; bu CPA'nın dişi üreme kanalı ya da taze spermatozoası üzerine kontraseptif etkisine bağlı değildir, kriyoprezervasyon sonrasında spermatozoa üzerine etkisine bağlıdır. Diğer türlerin spermatozoalarından farklı olarak tavşan spermatozoası, düşük su geçirgenlik katsayısına ve yüksek aktivasyon enerjisine sahiptir. Su geçirgenliğinin düşük olması; tavşan spermatozoasının kriyoprezervasyonu için gliserole nazaran düşük moleküler ağırlıklı ve permeabilitesi yüksek CPA'ların (DMSO ya da amidler) kullanılmasına ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Tavşan semeni için geliştirilen kriyodilüentlerin çoğu, kombine şekilde permeabl CPA'ların kullanımını ya da bir permeabl CPA ile bir non-permeabl CPA'nın kombinasyonunu kapsamaktadır. Tavşan semen kriyoprezervasyonunda, sulandırıcıda iki permeabl CPA'nın (genellikle DMSO ve gliserol) kullanımı, yaygın uygulama şeklidir.

Stranzinger ve arkadaşları tarafından geliştirilen genişletici; Tris-sitrik asit-glukoz-yumurta sarısı (%13.3), yüksek düzeyde DMSO (%10) ve gliserol (%4.8) içermekte idi. Bu genişletici, in-vivo fertilizasyonunun iyi düzeyde olmasını sağlamıştır. Ancak bazı otörler; CPA'nın konsantrasyonunu düşürerek bu kriyodilüente modifikasyonlar yapmışlar ve genel olarak DMSO düzeyi %4.5'in altına düşürülürse fertilizasyonun arttığını ve DMSO ile kombine edildiğinde gliserol düzeyinin %1.5'i aşmaması gerektiğini bildirilmiştir. Ancak; sperm kalitesi (motil sperm ve normal akrozomların oranı); CPA olarak yalnızca DMSO içeren

sulandırıcıdan elde edilene nazaran, DMSO-gliserol içeren sulandırıcı ile benzer ya da daha düşük elde edildiğinden; gliserolden vazgeçilebilir.

Permeabl CPA'ların en yaygın kullanılan kombinasyonu DMSO-gliserol olmasına rağmen, diğer kombinasyonlar da test edilmiştir. Castellini ve ark.; 1M asetamidin %0 gliserol, %2 gliserol ve %5 gliserol ile kombinasyonunu test etmişler. Ancak kriyodilüente gliserol ilavesinin kriyoprezervasyon sonrası sonuçları olumlu etkilemediğini bildirmişlerdir.

Birkaç çalışmada; yukarda belirtildiği gibi Tris sulandırıcısı kullanıldığında CPA konsantrasyonundaki azalmanın sperm kalitesi üzerine yararlı etkiler gösterdiği doğrulanmıştır. Ancak, bazı araştırmalarda genişleticideki optimal CPA'nın ve onun nihai konsantrasyonunun kullanılan sulandırıcının tipine bağlı olduğu bildirilmiştir. Buna ilaveten çalışılan sperm kalite parametrelerine bağlı olarak da, optimum CPA tipi ve konsantrasyonu değişebilir.

Tavşan sperm kriyoprezervasyonu için iki tip sulandırıcının en iyi sonucu verdikleri öne sürülmektedir. Bunlar, DMSO (tek başına ya da gliserol ile kombine) içeren ve asetamid içeren sulandırıcılardır. Ancak bunların hiçbirisi tekrarlanabilir sonuçlar vermemiş, bundan dolayı hiçbirisi tavşan semenini sulandırmak için iyi bir seçenek olarak ön plana çıkmamıştır. Bazı çalışmalarda, tavşan semen kriyoprezervasyonu için geliştirilen protokoller ve sulandırıcılar karşılaştırılmıştır. Genellikle kriyoprezervasyon sonrası sperm kalitesinin; DMSO ve gliserol karışımı ya da etilen glikol, gliserol ya da DMSO içeren genişleticilerle dondurulan sperme nazaran asetamid ile dondurulan spermde daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

CPA'nın konsantrasyonundaki azalma, genellikle dondurma-çözdürme sonrası sperm kalitesi üzerine yararlı etkiye sahiptir. Örneğin Fox ve Burdick; genişleticide gliserol ya da etilen glikol konsantrasyonu %8'den %4'e düşürüldüğünde sperm kalitesinin olumlu yönde etkilendiğini gözlemlemişlerdir, ki bu sonuç Hsieh'in çalışması ile doğrulanmıştır. Ancak yüksek konsantrasyondaki DMSO'nun bazı genişleticilerde kullanılmasıyla, yumurta sarısı ya da yağsız süt ilavesi önlenmiş olur

ve spermatozoa üzerine bu yüksek DMSO'nun olası toksik etkisine karşı korunulmuş olur. Bununla birlikte; DMSO konsantrasyonunun yumurta sarısı içeren genişleticide %4.5-5'in üzerine çıkarıldığı bazı çalışmalarda DMSO'nun; spermatozoa motilitesini arttırmasına rağmen, spermatozoanın akrozomlarına ve in-vivo fertilizasyon kabiliyeti üzerine zararlı etkiler yaptığı bildirilmiştir. Akrozom üzerine DMSO'nun bu negatif etkisinin, sulandırıcıda süktroz gibi bir disakkarit bulunduğunda minimize edilmesi muhtemeldir (2).

1980'den bu yana, tavşan semen kriyoprezervasyonu için, özellikle de Hanada ve Nagase adlı araştırmacılar amidleri kullanmışlardır. Amidler, gliserole nazaran düşük molekül ağırlıklıdır ve spermatozoada daha az osmotik hasara neden olurlar. Bu araştırmacılar, tavşan spermatozoası için amid ya da metil grupları içerenlere nazaran hidroksil grupları içeren bileşiklerin daha az etkin kriyoprotektif ajan olduğunu bildirmişlerdir. Test ettikleri kriyoprotektan niteliği taşıyan birbirinden farklı amidler, alkoller ve DMSO) arasında en yararlı sonuçların; sulandırıcıda 1M konsantrasyonda bulunan laktamid, asetamid ya da DMSO ile elde edildiğini bildirmişlerdir (46). Bu sonuçlar Kashiwazaki ve arkadaşlarının çalışmasıyla da teyit edilmiştir (39). Kozdrowski ve arkadaşları; 0.5M DMSO ve 0.5 M asetamidi çözüm sonu motilite, canlılık ve akrozom bütünlüğü açısından karşılaştırmışlar ve en yararlı sonuçların DMSO ile elde edildiğini bildirmişlerdir (40). DMSO ve dimetilasetamidin (DMA) tavşan semen kriyoprezervasyonundaki etkinliği, Rosato ve Iaffaldano'nun çalışmasıyla da teyit edilmiştir. Bu araştırmacılar; tavşan spermatozoası için en az toksik olanların %2.5 DMA, %2.5 DMSO ve %5 DMSO olduğunu ve dondurulup çözöürölen tavşan semeninde motil spermatozoa oranının %5 DMSO ile daha yüksek elde edildiğini bildirmişlerdir (33). Iaffaldano ve arkadaşları, çeşitli konsantrasyonlardaki DMSO ile DMA'yı karşılaştırmışlar. Bu araştırmacılar; dondurup-çözöürme sonrası spermatozoanın motilite, canlılık, akrozom bütünlüğü, osmotik direnç ve DNA bütünlüğünü değerlendirmişler ve nihai olarak en iyi kriyoprotektan konsantrasyonunun DMSO için %4 ve DMA için %3 olduğunu ve %4'lük DMSO'nun %3'lük DMA'ya nazaran tüm parametrelerde daha iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir (47).

Disakkaritler, genellikle membran fosfolipidlerinin polar baş grupları ile etkileşir ve kriyoprezervasyon süresince membranı stabilize ederler. Tavşan semen kriyoprezervasyonu için kullanılan sulandırıcılarda laktoz, sükroz, maltoz, rafinoz ya da trehaloz gibi non-permeabl CPA'lar; DMSO, gliserol ve asetamid gibi permeabl CPA'lar ile birlikte kullanılmıştır. Permeabl CPA olarak DMSO ile birlikte non-permeabl CPA olarak çeşitli şekerlerin 0.05M konsantrasyonda kullanıldığı bir çalışmada; sükrozun, diğer disakkaritlere göre spermatolojik parametreler üzerine daha etkili olduğu bildirilmiştir (48). Fertilizasyon yetisi üzerine yapılan bir başka çalışmada 0.05M sükrozun, 0.05M trehaloza göre daha etkili olduğu bildirilmiştir (33).

Tavşan semen kriyoprezervasyonu için bazı makromoleküller de denenmiştir. Makromoleküllerin tam etki mekanizması bilinmemekle birlikte, non-permeabl kriyoprotektantlar olarak etki ederek spermatozoayı hasara karşı koruyan buz kristal iskeleti oluşumunu indüklemektedirler (2). Rosato ve arkadaşları sığır serum albumini (BSA) içeren sulandırıcı kullanarak dondurup çözdürdükleri tavşan semeni ile elde edilen fertilizasyon oranının (%77), dondurulmamış taze semen ile elde edilene (%84) yakın olduğunu bildirmişlerdir (33). Sarıözkan ve arkadaşları; BSA ve sığır fetüsü albumini (FCS) kullanarak tavşan semenini sulandırmışlar, 5⁰C'ye soğutmuşlar, 0., 24., 48. ve 72. saatte motilite, plazma membran bütünlüğü, akrozom anormalliği, malondialdehit (MDA) düzeyi ve GPx düzeyini değerlendirmişler ve özellikle 48. ve 72. saatte hem BSA hem de FCS ilavesinin kontrole nazaran MDA düzeyini azalttığını ve GPx aktivitesini arttırdığını bildirmişlerdir (49). Metilsellülozun kendisi; spermatozoayı bir miktar korur, ancak diğer CPA'larla sinerjistik etki gösterir ve kriyoprezervasyon süresince hasara karşı spermatozoayı korur (2). Graham ve arkadaşları %0.5 metilsellüloz ilave ederek tavşan semenini dondurmışlar ve çözüm sonunda metilsellüloz ilavesinin spermatozoanın motilitesini ve canlılığını olumlu etkilemediğini bildirmişlerdir (50). Jelatin de, tavşan semen sulandırıcılarında denenmiştir. Jelatinin su ile birlikte jel oluşturma özelliği olduğundan, buz kristali oluşumunu modifiye ederek

ya da inhibe ederek dondurma sürecinde spermi koruyabilir. Ancak, genişleticiye jelatin ilavesinin (%1 nihai konsantrasyonda olacak şekilde) tavşanın sperm kalitesini ya da spermin fertilitesi olumlu yönde etkilemediği bildirilmiştir.

Birkaç çalışmada deterjan (trietanolamin lauryl sülfat-STLS ya da sodyum lauryl sülfat-Orvus Es Paste (OEP)) ilavesi denenmiştir. Sürfaktanlar yumurta kesesi granüllerinin emülsifiye edicileri olarak etki ederler ve yumurta sarısı ile spermin etkileşimini sağlayarak bazı türlerde akrozomun korunmasını sağlarlar. Tavşan semeni genişleticilerinde bulunduklarında, özellikle DMSO'nun yüksek konsantrasyonda olduğu durumlarda spermatozoanın akrozomunu korumuştur. Spermatozoa motilitesi üzerine etkileri net değildir ve spermin fertilizasyon yetisi üzerine negatif etkiye sahiptir. Deterjanlar sperm membranlarını ve sperm ile ovidukt hücreleri arasındaki etkileşimi modifiye ederek; spermin kapasitasyonunu, dış genital kanalında canlı kalışını ve taşınmasını da etkiler. Bu yüzden; sperm kalitesi üzerine yararlı etkileri gözlemlenmesine rağmen spermin fertilizasyon yetisini bozduğundan, tavşan semen kriyoprezervasyon sulandırıcılarına sürfaktanların ilavesi önerilmemektedir (2).

2.2.3. Tavşan Semeninin Sulandırılması

Tavşan semeninin sulandırılması, genellikle tek aşamada yapılmaktadır. Sulandırma işlemi; genellikle oda sıcaklığında yapılmakla birlikte, kimi zaman 37 °C'de kimi zaman da semen 5 °C'ye soğutulduktan sonra yapılmaktadır (33,44,49).

Semenin sulandırılma oranı, optimum tohumlama dozunun eldesinde önemli olmaktadır. Ancak, tavşan semeni için kriyoprezervasyon öncesi dilüsyon oranı fertilitite oranını etkilemez (2). Tavşan semeninde kullanılan dilüsyon oranı genel olarak 1:1 ile 1:10 arasındadır (50-52).

2.2.4. Tavşan Semenini Dondurma Ve Çözdürme Yöntemleri

Dilüe edilen tavşan semeninin, içerisine konularak muhafaza edilmesinde kullanılabilen gereçler; en sık kullanılanı payetler (0.25 ml. ve 05 ml.lik hacimli)

olmak üzere, peletler, camısı ampüller, plastik ampüller, polivinilklorid borular, endorf tüpleri ve günümüzde kullanımı sınırlı düzeyde olan 2 ml.lik hacimli camısı tüplerdir (42,44,45,53,54).

Sulandırılmış tavşan semeni ekilibrasyon ile dondurulurken; genellikle 4-5°C'de ekilibrasyona (genellikle 45 dk. ile 2 saat arası) tabi tutulur. Semen içeren payetler ekilibrasyon sonrası; genellikle yatay olarak sıvı azotun 4-5 cm. üzerinde (-120°C ila -130°C'ye tekabül eder) sıvı azot buharında 10-15 dk. tutulurken bazen -30°C'de yaklaşık 30 dk. tutulur ve sonrasında sıvı azota atılır (47,55,56,57). Bir çalışmada ikili dondurma uygulaması yapılmış ve semeni iki kez dondurmanın, bir kez dondurma ile kıyaslandığında spermatozoanın kalitesini ve fertilizasyon yetisini azalttığı bildirilmiştir (53). Dondurulan semen, birçok çalışmada 37-39°C'lik su banyosunda çözündürülmektedir. Ancak bazı çalışmalarda başka sıcaklıklarda da çözündürme yapılmıştır. Moce ve arkadaşları, 50°C'de ve 70°C'de 12 saniye sonunda semeni çözödmüşler ve gebe bırakma oranı bakımından farklılık olmamasına rağmen, canlı doğan birey sayısının 50°C'de çözödüren semen ile daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (58). Chen ve Foote tavşan semenini; 25°C'de 1 dakikanın, 45°C'de 30 saniyenin ve 65°C'de 7 saniyenin sonunda çözödmüşler ve yavaş çözödürme yapıldığında spermatozoa kalitesinin daha olumlu etkilendiğini bildirmişlerdir (59).

2.2.5. Tavşan Semeninin Dondurulmasında Başarıyı Etkileyen Etmenler

Tavşan spermasının dondurulmasında birçok faktör etkili olmaktadır:

- a)Fertilizasyon kabiliyeti olmayan tavşan semenlerinin dondurulması
- b)Dondurmada kullanılan sulandırıcının içeriği ve yumurta sarısının olup olmaması
- c)Dondurmadan önce ekilibrasyon uygulanıp uygulanmaması ve süresi
- d)Mini (0.25 ml) veya orta boy (0.5 ml) payet veya pelet yöntemi ile dondurma teknikleri
- e)Semenin santrifüj edilip edilmemesi
- e)Dondurulmuş semeninin çözödürlmesi.

2.3. Semen Dondurulması Ve Çözdürülmesi Sırasında Spermatozoada Ortaya Çıkan Hasarların Oluş Mekanizmaları Ve Önlenmesi

Donma aşamasında sıcaklığın düşmesiyle hücreler birçok strese maruz kalır. Bu durum, hücrenin yapısında ve fonksiyonunda değişiklikler meydana getirir. Ani sıcaklık düşmesi stresinin verdiği hasar olarak bilinen soğuk şoku türe spesifiktir. Soğuk şokunun meydana getirdiği değişiklikler, geri dönüşümsüz bir etki yapabilmektedir. Boğa ve koç spermatozoası soğuk şokuna son derece duyarlı iken, tavşan ve insan spermatozoası kısmen dirençlidir (34). Bu direnç, tavşan ve insan spermatozoa membranlarında kolesterolün fosfolipide oranının yüksek olmasından ve fosfolipidlerdeki doymuş yağ asitlerinin doymamış yağ asitlerine oranının yüksek olmasından ileri gelmektedir (2).

2.3.1. Semen Dondurulması Ve Çözdürülmesi Sırasında Spermatozoada Ortaya Çıkan Hasarların Oluş Mekanizmaları

Kriyoprezervasyon süresince spermatozoanın hasar görme mekanizmaları tamamen bilinmemekle birlikte; sıcaklıktaki değişiklikler, buz oluşumu, reaktif oksijen substantlarının ortaya çıkışına bağlı oksidatif hasar, spermatozoa membranındaki değişiklikler, osmotik stres ve kriyoprotektantların toksisitesi ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır (60).

Dondurma hasarından spermatozoanın başlıca etkilenen yerlerinden birisi plazma membranıdır (1). Sıcaklıktaki azalma, membran fosfolipidlerinde sıvı-kristal fazından jel fazına doğru termotropik faz geçişine neden olarak membran yapısını daha da rijitleştirir ve stabilitesi bozulur. Membrandaki farklı fosfolipidler için spesifik faz geçiş sıcaklıkları, membran komponentlerinin yeniden düzenlenimine ve membran düzlemi içinde lipid faz ayrılmalarıyla laterale kaymaya neden olur. Laterale kayma, iki katlı olmayan lipidlerin mikrodomanlerini oluşturur ve çevredeki proteinleri modifiye ederler. çözme durumunda; bu değişiklikler birbirine karşılık gelen membranların kaynaşmasına ve protein aktivitesinin etkilenmesine yatkınlık oluşturarak, su ve solütlere karşı membran permeabilitesinin

bütünüyle değişmesine neden olur (61).

Sıcaklık 0°C 'nin altına düştüğünde ekstrasellüler medyunda buz kristalleri oluşur. Donmamış sıvı fraksiyonda solütlerin konsantrasyonu artarak spermatozoanın dışında kalan ortamın osmolaritesi artar. Buna bağlı olarak da spermatozoa dehidrate olur. Çözdürülme esnasında ise durum tersine işler. Bu durum yavaş (ekilibrasyonlu) soğutma için geçerlidir. Hızlı soğutmada ise, hücre dehidrate olacak zaman bulamaz (1).

Hücre içindeki suyun donması ve buz kristalleri, mekanik strese bağlı harabiyet ortaya çıkarır. -5°C civarındaki sıcaklıklarda hücre içi ve hücre dışı su donmadan kalabilir. Ancak -5°C ile -10°C arasında hücre içi su aşırı soğuk iken, hücre dışı ortamda buz oluşur. Bu yüzden -10°C , spermatozoa için çok kritik bir sıcaklıktır (61).

CPA'lar, hücreyi dondurma esnasında hücrenin yaşaması için gerekli olmasına rağmen; ilavesi ve ayrıştırılması esnasında hücrelerde anizootik bir ortama, hücre hacminde dalgalanmalara ve potansiyel osmotik hasarlara neden olurlar. Kriyoprotektan ilavesiyle; hiperosmotik ortam oluşarak hücreler ilk önce dehidrate olarak büzülür ve ardından kriyoprotektantların içeriye girmesiyle şişerler. Kriyoprotektanların uzaklaştırılması esnasında ise hücreler sıvının içeri girmesiyle tekrar şişerler ve yavaşça izootik hacme ulaşırlar. Bu tekrarlanan değişimler, kritik noktaları geçtiğinde hiperosmoze bağlı irriversibl membran yıkımı olur (34).

Semenin dondurulması-çözdürülmesi esnasında oluşan membran lipid faz değişimi, osmotik-mekanik stres ve serbest oksijene bağlı gelişen lipid peroksidasyonu oluşabilir ve serbest oksijen radikalleri ortaya çıkmaktadır. Lipid peroksidasyon ürünleri büyük oranda membrandaki doymamış yağ asitlerden, az miktarda da membran glikolipitlerinden, fosfolipitlerden ve kolesterolden köken almaktadır (3).

2.3.2.Semenin Dondurulması Sırasında Spermatozoada Görülen Hasarlar

Spermatozoanın donması esnasında hücre yapısında gelişen hasarlar şöyledir:

- Mebranların ve hücre içi komponentlerin dehidrasyonu, membran lipidlerinde destabilizasyon, membran proteinlerinde denatürasyon
- Ortama sıvı çıkışı nedeniyle hücre membranlarında oluşan hasar
- Hücre ve endoplazmik retikulumda osmotik şişme
- Plazma membranında intramembranöz kümeleşme
- Motilite kaybı
- Spermatozoanın akrozomal membranda yaptığı zararlar enzimlerin salıverilmesi
- Tüm bunların sonucunda; hücrede apoptozis, serbest radikal oluşumu, ATP sentezinde aksama ve fertilite kaybı (34).

2.3.3. Kriyoprezervasyon Ve Hücre Membran Parametreleri

Hücrelerin su içeriğine, hacmine, şekline ve stoplazmik membranın sıvı permeabilite katsayısına bağlı olarak her hücre spesifik bir soğutulma oranına sahiptir. Bu soğutma oranının üzerindeki soğutma hızı uygulanırsa, hücreden sıvı çıkışı suyun kimyasal potansiyeline uyum sağlayamaz ve membrandaki su çıkışı her bir birim hacimde membranın yüzeyinde eşit dağılımlı basınç oluşturamaz. Sonuçta da ‘hızlı soğutma hasarı’ meydana gelir (62,63).

Donma esnasındaki su alış verişinin hesaplanması, hücrenin dondurulmaya ve kriyoprotektantlara karşı osmotik tepkinin belirlenmesi; bazı spesifik membran parametrelerinin belirlenmesine bağlıdır. Bu parametreler; osmotik inaktif hacim, hidrolik iletkenlik (L_p), eriyik permeabilitesi, eriyik permeabilitesinin aktivasyon enerjisi (V_p) ve hücre yüzeyinin hacmine oranıdır. Bu parametrelerin düzeyinin artması, soğutma hızının azaltılması gerekliliğini doğurur. Kriyoprotektantlar, bu

parametrelerin düzeyini azaltarak etki gösterir. Bu parametrelerin düzeylerinin bilinmesi; hücre içi donma insidansının azaltılmasına, soğutma esnasında spermatozoadan ayrılan sıvı miktarının azaltılmasına, ortamda gelişen osmotik stresin minimize edilmesine, hücre hacmindeki dalgalanmaların önlenmesine, letal etkili hücre içi donmanın önlenmesine, kriyoprotektantların optimum katılma oranlarının saptanmasına ve optimum kriyoprezervasyon protokollerinin uygulanmasına imkan tanır (34,62,63).

2.3.4. Kriyoprezervasyonda Buz Nükleasyonunun Kontrol Edilmesi

Kriyoprezervasyon sürecinde; spontan buz kristalleri oluşmakta, kristalleşmenin ardından ortaya çıkan çekirdekçikleşme (nükleasyon) spontan oluşmakta, numuneler arasında donma varyasyonları görülmekte ve hücreden hücre dışı ortama sıvı geçişi için yeterli zaman sağlanamamaktadır. Kriyoprezervasyon süresince buz nükleasyon sıcaklık aralığının daraltılması; spontan buz nükleasyonunu ve numuneler arasındaki donma varyasyonlarını azaltır ve hücreden hücre dışı ortama sıvı geçişi için yeterli zamanın kazanılmasına imkan tanır.

Sıvılar erime sıcaklıklarının altındaki değerlerde bile soğutulabilmektedir. Örneğin su, kontrollü bir soğutma işlemiyle buz kristalleri oluşmaksızın -40°C'nin altına kadar soğutulabilir. Bu işlem 'supercooling' ya da 'undercooling' olarak adlandırılmaktadır. Süpercooling işlemini etkileyen faktörler arasında; sıcaklık, sıcaklığa maruz kalma süresi, dondurulacak hücre ya da dokunun hacmi, ortamda oluşan kristalleşmenin işlevsel olarak atlanması önemlidir (64).

Kriyoprezervasyonda buz nükleasyonunu kontrol etmek için birkaç metod vardır. Bunlar günümüzde; 'seeding', 'elektrofreezing', mekanik metodlar, şok soğutma, basınç şifti ve kimyasal nükleantların kullanımından ibarettir (65).

'Seeding', kriyoprezervasyonda buz nükleasyonunu kontrol etmede yaygın kullanılan bir methodur. 'Seeding', kritik donma sıcaklıklarında kristalleşmenin oluşturulması işlemidir. Bu işlemde; 'supercooling' işlemi esnasında şok hasarına karşı dondurulacak materyalin erime noktasına yakın sıcaklıklarda ve donma

sıcaklığına ulaşmamış solüsyonlarda kristal oluşumu indüklenir, spotan kristal oluşumu önlenir ve kristalizasyonun latent ısı dalgasının meydana getireceği hasar olasılıkla minimize edilmektedir. Tavşan spermatozoaları için -6⁰C'de yapılan seeding işlemi, çözüm sonunda motiliteyi önemli düzeyde arttırmaktadır (64).

2.4. Reaktif Oksijen Substantları (ROS), Antioksidan Savunma Sistemi Ve Antioksidan Kullanımı

Semenin dondurulması-çözdürülmesi esnasında oluşan membran lipit faz değişimi, osmotik-mekanik stres ve ortamdaki serbest oksijen temelinde gelişen lipit peroksidasyonu ve reaktif oksijen radikalleri; membranlarda denatürasyona, hücre organellerinde yapısal deformasyonlara, DNA'da kırılmalara ve hücresel lizise neden olmaktadır. Lipid peroksidasyon (LPO) ürünleri; büyük oranda membran yapılarındaki doymamış yağ asitlerinden, az miktarda da membrandaki glikolipitlerden, fosfolipitlerden ve kolesterolden köken almaktadır.

Semenin dondurulması-çözdürülmesi sırasında oluşan ROS, endojen antioksidan savunma sisteminin etkinliğini azaltarak fertilitiyi olumsuz etkilemektedir. ROS'un düşük konsantrasyonları; hiperaktivasyon, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi spermatozoanın fizyolojik süreçlerinde önemli rol alır. Ancak, yüksek miktarda üretilmesi spermatolojik fonksiyonları olumsuz yönde etkilemektedir (3).

Serbest oksijen radikallerinin toksik etkilerine karşı koymak için, spermatozoa ve seminal plazma birtakım antioksidanlar içermektedir. Bu antioksidanların bir kısmı enzim (CAT, SOD, GPx) vafındadır, bir kısmı ROS ürünlerini temizleyicidir (albumin, taurin, vitamin E gibi), bir kısmı ise zincir reaksiyonlarını kırıcı (vitamin E, vitamin C, ürik asit, tiol bileşikleri gibi) özelliğindedir (66,67). Fakat bu antioksidan sisteminin kapasitesi, ROS ürünlerinin olası toksik etkilerine ve oksidatif hasara karşı koymada yeterli değildir (6). Bu nedenle spermatozoadaki dondurma ve çözündürme esnasında meydana gelebilecek olan hasarları minimize etmek için;

genellikle semen sulandırıcılarına koruyucu ve antioksidan özellikli maddeler eklenmekte ya da nadiren antioksidanlı diyet uygulaması yapılmaktadır.

2.4.1. Reaktif Oksijen Substantları (ROS)

Atomlar, nötron ve protondan ibaret çekirdek ve bu çekirdeğin çevresinde dönen elektronlardan (e^-) oluşur. Elektronların yer aldığı atom çekirdeğinin çevresindeki boşluğa 'orbital' denir. Her bir orbitalde spinleri birbirine zıt ($\uparrow\downarrow$) olan iki elektron bulunur. Bu elektronlara 'eşlenmiş (ortaklanmış) elektron' denir. Atom veya moleküller, yörüngelerindeki elektronlar eşlenmiş ve ters pozisyonda yer aldıklarından kararlı bir yapı gösterirler. Bu kararlı yapı, eşlenmemiş elektron bulundurdıklarında bozulur (68).

Moleküler oksijen (O_2), paylaşılmamış iki (e^-) içerir. Taşıdığı bu paylaşılmamış elektronlar nedeniyle metabolik olaylar sırasında kolaylıkla suya indirgenme eğilimindedir. Canlı organizmalar, moleküler oksijeni (O_2), oksidatif fosforilasyonda ve endojen bileşiklerin oksidasyonunda kullanır. Oksijenin canlı dokularda, indirgenmesi başlıca 2 yolla olur:

1) Dokulardaki oksijen tüketiminin %95'inde mitokondride bulunan enzimler (sitokrom oksidazlar), oksijeni dört değerli olarak indirgerler.

2) Dokulardaki oksijen tüketiminin kalan %5'inde oksijen, basamak basamak tek değerli indirgenir. Oksijen, aynı anda iki elektron (e^-) almasını engelleyen spin paralelliği nedeniyle elektronları tek tek alarak veya vererek reaksiyona girmeyi tercih etmektedir. Böylece iki orbitalinde eşlenmemiş birer elektronu bulunan O_2 'ye, elektronların tek tek eklenmesi ile reaktif oksijen ara ürünleri oluşur. ROS'ların bazıları eşlenmemiş elektrona sahipken yani serbest radikal özelliği taşıırken, bazılarının eşlenmemiş elektronu yoktur yani serbest radikal niteliği taşımaz (69).

ROS'lar genel olarak; reaktif oksijen türleri, reaktif nitrojen türleri ve reaktif

sülfür türleri (thiyl radikali) olarak sınıflandırılır. Reaktif oksijen türleri olarak; süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$), hidroperoksil radikali, alkoksil radikali, hipokloröz asit ($HOCl$), ozon (O_3), singlet oksijen (1O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) sayılabilir. Reaktif nitrojen türleri olarak; nitrik oksit (NO), nitrik dioksit (NO_2), nitroksil anyonu (NO^-), peroksinitrit ($ONOO^-$) ve peroksinitröz asit ($HOONO$) sayılabilir (70).

Serbest radikal; atomik veya moleküler yörüngesinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron (e^-) bulunduran basit bir molekül, atom veya iyondur. Başka bir ifadeyle serbest radikaller; negatif yüklü (e^-) sayısının pozitif yüklü (e^-) sayısına eşit olmadığı moleküllerdir. Serbest radikaller; çok kararsız, diğer moleküllerle çok hızlı reaksiyona giren, çok kısa ömürlü, güçlü oksidan nitelikli ve kimyasal olarak kararlı hale geçebilmek için elektron almaya gereksinim duyan moleküllerdir. Bir moleküle saldırdıklarında onun elektronunu çalarak okside eder ve bu yeni molekülün kendisi serbest radikal haline dönüşür. Serbest radikallerin başlattığı bu zincirleme reaksiyonlar dizisi, antioksidanlar tarafından durduruluncaya kadar devam eder. Serbest radikallerin ortaya çıkardığı en büyük hasar, hücre zarları üzerinedir. Serbest radikaller; maruz kalınan miktar ve süreye bağlı olarak hücre fonksiyonlarını bozarlar (68).

Serbest radikaller; ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, allerji, diyabet, katarakt gibi birçok hastalığın patogenezisinde rol oynayan ve bu nedenle son zamanlarda üzerinde en çok çalışma yapılan konular arasında yerini almaktadır. Ayrıca; mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu arttırırlar. Proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, lipooksijenaz, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktifleştirirken; α -1 antitripsin gibi bazı savunma sistemlerini inaktive ederler (70).

Organizmada çeşitli reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan $O_2^{\bullet-}$ radikali, $OH^{\bullet-}$ radikali ve H_2O_2 bilinen en önemli reaktif oksijen türleridir (68).

-Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)

Süperoksit radikali, moleküler oksijenin bir (e^-) alarak indirgenmesi sonucunda oluşur. Genel olarak anyon şeklinde tarif edildiği ve bu şekilde gösterildiği halde, ortam pH'ına bağlı olarak protonlanarak katyon haline dönüşebilir. Zayıf bir oksidan, güçlü bir redüktandır (69).

Aktive edilmiş lökositlerle kıyas edildiğinde hücre başına üretilen süperoksit radikali, spermatozoada 3 kat daha fazladır; ki bu, spermatozoadaki NADPH oksidazın lökositlerdekinden farklı olabileceğini düşündürmektedir. Hedefiyle reaksiyona girdiğinde thil radikalleri ($RS^{\bullet}$) gibi çok toksik ürünlerin ortaya çıkışına sebep olabilmelerine rağmen, reaktivitesi düşük olduğundan ve yarı ömrü kısa (1 ms) olduğundan çok zararlı değildir (71). Ortamdaki (+3) yüklü demiri, Haber-Weiss reaksiyonu ile (+2) yüklü demire dönüştürerek $OH^{\bullet}$ nin oluşumuna zemin hazırlar (Haber-Weiss reaksiyonu şu şekildedir: $(O_2^{\bullet-} + Fe^{+3} \rightarrow O_2 + Fe^{+2})$ (7). Spermatozoa membranının yüzey proteinlerinin sülfidril grupları üzerine etki ettiği düşünülmektedir. Lipid peroksidasyon zincirinin sonlandığı basamakta lipid alkil radikalleri ile reaksiyona girer. Reaksiyon şu şekildedir: $(R^{\bullet} + O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow ROOH)$ (72).

-Hidroksil Radikali ($OH^{\bullet}$)

Geçiş metalleri iyonları (Fe^{+2} ya da Cu^{+2}) varlığında hidrojen peroksitin (H_2O_2) indirgendiği Fenton reaksiyonunda üretilir. Reaksiyon şu şekildedir: $(H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + Fe^{+3})$ (7).

$OH^{\bullet}$, son derece reaktiftir, yarı ömrü çok kısadır (1 ns), ancak oluştuğu yerde büyük hasara neden olur (7,71). Biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü radikaldir. Çok aktif olması sebebiyle, canlı organizmalarda bu radikali substrat olarak kullanan enzim sistemleri bulunmamaktadır. Bu nedenle hücrenin tüm çabası, bu radikalın oluşumunu önlemek yönündedir (69). Hidroksil radikalının lipid peroksidasyonun güçlü tetikleyicisi olduğu düşünülmektedir ve semende yeterli düzeyde bulunan serbest demirin bu reaksiyonu kimyasal olarak desteklediğine dair güçlü deliller

vardır (73).

-Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin (O₂) 2 elektron veya süperoksitin (O₂^{•-}) 1 elektron (e⁻) alması sonucu meydana gelen peroksitin, 2 hidrojen atomu ile birleşmesi sonucu ortaya çıkar. Reaksiyon şu şekildedir: (O₂ + 2e + 2H→H₂O₂) veya (O₂^{•-} + 1e + 2H→H₂O₂) (74).

Ortaklanmamış (e⁻) içermediğinden kimyasal olarak radikal yapısında değildir. Ancak; oksijen türevi radikaller ile çok yakın ilişkisinin olması, organik substratlar için çok güçlü bir oksitleyici olması ve in-vivo şartlarda kolaylıkla hidroksil radikaline (OH[•]) dönüşme potansiyeline sahip olması nedeniyle çoğunlukla oksijen türevi radikallerle birlikte değerlendirilir (69). Yüksüz olduğundan membranlardan kolayca geçebilir, görece uzun ömürlüdür ve yüksek oksidasyon potansiyeline sahiptir (71). Geçiş metalleri iyonları (Fe⁺² ya da Cu⁺²) varlığında Fenton reaksiyonu ile OH[•] üretimine sebep olur (7). Spermatozoa membranının yüzey proteinlerinin sülfidril grupları üzerine etki ettiği düşünülmektedir. Spermatozoanın H₂O₂ tarafından indüklenen oksidatif hasara duyarlılığı, memeli türleri arasında büyük değişkenlik gösterir. Örneğin tavşan spermatozoası, 10 mM düzeyindeki H₂O₂'nin toksisitesine dirençli iken, sıgır spermi H₂O₂ toksisitesine çok duyarlıdır (72).

2.4.2. Semende Serbest Radikallerin Kaynağı

Spermadaki serbest radikallerin kaynağı; başlıca semendeki lökositler olmak üzere, spermatozoa, reproduktif epitel hücreleri ve genital kanalı enfekte eden bakterilerdir (68).

Lökositler, üreme kanalı boyunca ve semende bulunmaktadır. İmmün denetim ve anormal spermatozoayı fagosit etme fonksiyonunun yanında, ROS üretme yetisine de sahiptirler. İnflamasyon ve enfeksiyon dahil çeşitli uyaranlara yanıt olarak aktive edilebilirler. Aktive edilmiş lökositlerin ROS üretme kapasiteleri, aktif olmayanlarına göre 100 kattan daha fazladır (75). Sperm fonksiyonunun defektif

olmasından sorumlu olanları; peroksidaz (+) polimorfonükleer lökositlerdir (nötrofil ve makrofaj) (7). Semendeki lökositler, spermatozoanın ROS üretmesini de indükleyebilir (72).

Spermatozoa tarafından ROS üretimi normal fizyolojik süreçtir (76). Bununla birlikte spermatozoa tarafından aşırı ROS üretimi; orta parça anormallikleri, rezidü stoplazma, stoplazmik damlacık ve immatürite ile ilişkilendirilmiştir (75). Spermatozoa tarafından ROS üretimi genel itibarıyla 2 yolla gerçekleştirilmektedir: 1) Sperm plazma membranındaki nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz sistemi 2) Mitokondrideki NADPH'ye bağımlı oksidoredüktaz (dioforaz) (77). Çok yakın geçmişte; spermatozoadaki ROS'un subsellüler kaynağı daha da netleştirilmiştir, ki insan spermatozoasında mitokondriyal elektron transport akışının bozulmasının ROS üretimine sebep olduğu ortaya konulmuştur. Kompleks-I'de iç mitokondriyal matriks tarafından ROS'un indüksiyonunun, spermatozoanın orta parçasında peroksidatif hasara sebep olduğu ve böylelikle de spermatozoanın hareket kaybına maruz kaldığı gösterilmiştir (7).

Rezidü stoplazmalı ve stoplazmik damlacıklı spermatozoada glukoz-6 fosfat dehidrogenaz enzimi, gereksiz yere fazladan bulunur. Bu enzim, heksoz monofosfat şantı yoluyla glukoz akışından sorumludur ve NADPH üretimi ile ilişkilidir. Bu sistem aracılığı ile üretilen NADPH'nin, insan spermatozoası tarafından süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) üretiminden sorumlu elektronların major kaynağı olduğu varsayılmaktadır. Yine bu bağlamda rezidü stoplazmanın kalmış olması, aşırı düzeyde NADPH'a bağımlı ROS üretimi için yeterli substrat temin edecektir (75).

Erkek genital kanal enfeksiyonlarına sebep olan bakterilerin, özellikle de E.coli gibi gram negatif olanların; reaktif oksijen türlerinin üretimini tetikleyen lipopolisakkarit (LPS) ürettiği yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Bakterilerin ürettiği LPS ile muamele edilen spermatozoaların motilitesinin olumsuz etkilendiği ve reaktif oksijen türlerinin üretiminin belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir. LPS ilavesi sonrası antioksidanların eklenmesinin motiliteyi olumlu

etkilediği de gözlemlenmiştir.

2.4.3. Oksidatif Strese Karşı Spermatozoayı Koruyan Antioksidan Savunma Sistemi

Antioksidanlar; serbest radikallerin ya oluşumunu engellerler ya da mevcut olanların etkisini bloke ederler. Antioksidanlar etkilerinin çoğunu; tek bir mekanizma üzerinden değil, birden fazla mekanizma ile gösterir. Antioksidanlar etkilerini, şimdiye dek tespit edilebilen 6 değişik mekanizma ile gerçekleştirir:

1)Oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alarak lokal oksijen konsantrasyonunu azaltabilirler.

2)Hidroksil ($\text{OH}^\bullet$) radikali yapısında yer alan hidrojen atomları ile bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyerek peroksidasyonun başlamasını önleyebilirler.

3)Membran lipidlerine direkt etki ederek peroksit oluşturabilen singlet oksijeni ($^1\text{O}_2$) baskılayabilir ya da temizleyebilirler.

4)Metal iyonlarını bağlayarak reaktif grupların ($\text{OH}^\bullet$, ferril ya da $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}/\text{O}_2$ kompleksleri gibi) ve/veya lipid peroksitlerden peroksil ve alkoksil radikallerinin oluşumunu önleyebilirler. Membranlarda lipid peroksidasyonun başlamasına hangi reaktif ürünlerin neden olduğu tartışmalıdır, ancak hem başlangıç için hem de oluşan lipid peroksitlerin dekompozisyonu için transisyonel metal iyonlarına ihtiyaç olduğu konusunda genel bir kanı vardır.

5)Peroksitleri, alkol gibi non-radikal ürünlere dönüştürürler. Örneğin GPx, peroksitleri bu yolla temizleyen bir antioksidandır.

6)Zincir kırabilirler, yani zincir oluşumuna neden olabilen serbest radikaller ile reaksiyona girebilirler ve yağ asidi zincirlerinden sürekli hidrojen iyonu salınımını önleyebilirler. Zincir kırıcı antioksidanlar içerisinde fenoller, aromatik aminler ve en yaygın olanı α -tokoferol yer almakla birlikte başka lipiddde çözünebilir zincir kırıcı antioksidanlar da vardır (68).

Serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerine karşı koymak için, spermatozoa ve seminal plazma birtakım antioksidanlar içermektedir. Ancak bu antioksidan sistemi, reaktif oksijen türlerinin olası toksik etkilerine ve oksidatif hasara karşı koymada yeterli gelmemektedir. Bundan dolayı semendeki ve spermatozoadaki antioksidan sisteminin, antioksidan takviyesi ile desteklenmesi gerekmektedir.

2.4.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

Semende bulunan ve spermatozoayı oksidatif strese karşı koruyan enzimatik antioksidanlar; katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve glukoz-6 fosfat dehidrogenazdır (G-6P DHG) (7).

-Katalaz (CAT)

Tetramer yapıda olup; her bir subünitinde bir hem grubu ve NADPH bağlayıcı bölge ihtiva eder (72). Prostetik grup olarak yapısında Fe^{+3} içeren bir protoporfirin-IX içerir (69). Katıldığı tüm tepkimelerde demir, bakır ve selenyum gibi elementler kofaktör olarak görev yapmaktadır (78).

H_2O_2 konsantrasyonu yüksek olduğunda katalitik, düşük olduğunda ise peroksidatif etki gösterir. H_2O_2 konsantrasyonu yüksek olduğunda reaksiyon şu şekildedir: ($H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$) (katalitik etkinlik). H_2O_2 konsantrasyonu düşük olduğunda ve etanol, metanol ya da fenol gibi uygun hidrojen donörünün varlığında reaksiyon şu şekildedir: ($RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + 2 H_2O$) [RH_2 ; etanol, fenol ya da metanoldür] (peroksidatif etkinlik) (72). Süperoksit radikalini reaktif olmayan türlere dönüştürmede, SOD ile birlikte çalışır. (69). Ortamda bulunan ya da ortama ilave edilen CAT, lipid peroksidasyon sonucu oluşan süperoksit ve hidrojen peroksidin neden olduğu kapasitasyon ve akrozom reaksiyonuna olumsuz etki yapan membranlardaki trozin fosforilasyonunun indüksiyonunu engelleyerek sperm-oosit füzyonuna olumlu katkı yapmaktadır (79).

Katalaz; spermatozoada peroksizomda yer alır. Katalazın insan ve rat spermatozoasında çok düşük düzeyde bulunduğu; tavşan, fare ve boğa

spermatozoasında ise olmadığı gösterilmiştir (72).

-Süperoksit Dismutaz (SOD)

İki süperoksit radikalini hidrojen peroksit'e dönüştüren reaksiyonu katalizler. Reaksiyon şu şekildedir: $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. O_2 radikallerini tutarak veya onları daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek etkisini gösterir, bir başka ifadeyle toplayıcı tarzda etkinlik gösterir (74).

Süperoksit dismutaz; sitozolik bakır/çinko-SOD, intramitokondriyal mangan-SOD ve ekstrasellüler bakır/çinko-SOD olmak üzere üç izoforma sahiptir. Bu izoform yapılar epididimal kökenli olup; spermatozoa sitozolünden ve mitokondriyal yapılarından süperoksit anyon ve hidroksil radikallerini uzaklaştırıp, hücrel redoks homeostazisini koruyarak oksidatif stresi engellemeye çalışırlar (4,80). Spermatozoayı lipoperoksidatif saldırıya karşı koruma noktasında; reproduktif sistemin diğer savunma sistemlerine ait SOD'nin katkısı, spermatozoal SOD'nin kakısına nazaran daha büyüktür. Bununla birlikte savunma sistemine katkı bakımından spermatozoal SOD için; sitozolik formunun payı mitokondriyal formuna kıyasla daha çoktur.

-Glutasyon Peroksidaz (GPx)

H_2O_2 'yi de kapsayan çeşitli peroksitlerden peroksil radikallerini uzaklaştırıldığı ve elektron donörü olarak glutasyonun kullanıldığı reaksiyonu katalizleyen selenyum ihtiva eden enzimdir (75). Reaksiyon şu şekildedir: $(2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O)$. Oksijen radikallerini tutarak veya onları daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek etkisini gösterir, bir başka ifadeyle toplayıcı tarzda etkinlik gösterir (74).

GPx ailesi; primer sekanslarına, lokalizasyonlarına ve substrat özgünlüklerine göre 5 sınıfa (GPx 1,2,3,4,5) ayrılırlar. GPx1, hücrenin sitozolünde yer alıp; testis, epididimis, prostat ve seminal veziküllerde bulunur. GPx3, ekstrasellüler ortamda bulunmakta olup; epididimis ve vaz deferenste bulunmaktadır. GPx4, epididimdeki spermatozoanın baş ve orta parçasında bulunur. GPx5, epididim sıvısında ve

spermatozoada lokalizedir (72). GPx, spermatozoanın sadece orta parçasında bulunur; bu yüzden sperm başındaki plazma membranını ve kuyruk kısmını pek koruyamaz (7).

-Glutasyon Redüktaz (GR)

Okside glutatyondan (GSSG) redükte glutasyonun üretildiği ve elektron donörü olarak pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH'nin kullanıldığı reaksiyonu katalizleyen enzimdir. Reaksiyon şu şekildedir: $(GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2 GSH + NADP^+)$ (71). Spermatozoanın sadece orta parçasında bulunur; bu yüzden sperm başındaki plazma membranını ve kuyruk kısmını pek koruyamaz (7).

-Glukoz-6 Fosfat Dehidrogenaz (G6-P DHG)

$NADPH + H^+$ nin üretildiği pentoz-fosfat yolunda görev alır. Üretilen $NADPH + H^+$, glutasyon redüktaz enzimi tarafından kofaktör olarak kullanılır. GPx ve GR ile işbirliği halinde olup, spermatozoanın etkin savunulmasında rol alır (74). Spermatozoanın sadece orta parçasında bulunur; bu yüzden sperm başındaki plazma membranını ve kuyruk kısmını pek koruyamaz (7).

2.4.3.2. Non-enzimatik Antioksidanlar

Semende bulunan ve spermatozoayı oksidatif strese karşı koruyan non-enzimatik antioksidanlar; glutasyon, sistein, vitamin-E, vitamin-C, karotenler, ürik asit, pirüvat, taurin, hipotaurin, albumin, çinko, selenyum, koenzim-Q10, laktoferrin ve prostozomdur (7).

-Glutasyon

Tripeptit tiol niteliğindeki glutasyon (γ -glutamilsisteinilglisin), sülfidril (-SH) grubu içeren bir antioksidandır. Hücre içi redoks statüsünün korunmasında olduğu gibi, endojen ve ekzojen bileşiklerin detoksifikasyonunda da belirgin rol üstlenir. Oksidatif strese karşı savunma amacıyla hücreler tarafından hızlıca kullanılabilen redükte edici gücün doğal rezervuarıdır. Oksidatif strese karşı koruyucu etkinliği, -SH grubunun varlığından ileri gelmektedir (81). Glutasyon, glutasyon peroksidaz

enziminin H_2O_2 'yi detoksifiye ettiği reaksiyonda rol alır (74).

-Sistein

Tiol niteliğindeki sistein, sülfidril (-SH) grubu içeren bir antioksidandır. Redükte glutatyon (GSH) sentezinde temel rol oynar. GSH ve taurin sentezi için hız belirleyici bir enzim olan gama glutamat sistein ligaz enzimini onarır. Dolayısıyla sistein, GSH için hız belirleyici bir aminoasit olarak kabul edilebilir. Aynı zamanda hücre dışı indirgeyici ajan olarak önemli rol oynar.

-Vitamin E (α -tokoferol)

Vitamin-E, doğada en yaygın bulunan antioksidandır. Yağda çözünen ve hücre membranlarındaki en önemli zincir kırıcı antioksidandır. En önemli görevi, serbest oksijen radikallerinin saldırılarına karşı membran lipidlerindeki doymamış yağ asitlerini korumaktır. Antioksidan aktiviteleri, 6. karbonunda bulunan hidroksil (-OH) grubundan kaynaklanmaktadır. Peroksil radikali ile reaksiyona girerek, bu radikale bir hidrojen verirler ve kendileri de tokoferoksil radikale dönüşürler. Böylece kendileri oksitlenerek; protein, lipid, enzim gibi diğ er moleküllerin oksitlenmesini engellerler.

-Vitamin C (Askorbik Asit)

Vitamin-C, hidrofiliktir ve sulu ortamda etkindir. Antioksidan özelliği, bilinen serbest radikal temizleyici işlevi ile gösterilmiştir. İndirgeyici ve antioksidan ajan olarak, doğrudan singlet oksijen (1O_2) ve hidroksil radikali (OH $\cdot$) ve çeşitli lipid peroksitlerle etkileşir. Buna ek olarak, okside olmuş vitamin-E'nin antioksidan özelliğini restore eder. Bu özelliği, vitamin-C'nin en önemli fonksiyonunun vitamin-E'ye yeniden antioksidan aktivite kazandırmak olduğunu göstermektedir. Diğ er suda çözünen antioksidanlarla karşılaştırıldığında vitamin-C, plazma lipid peroksidasyonuna karşı en etkili korumayı sağlar.

-Karotenler

Doğada yaygın olarak bulunan ve hücreleri korumada önemli görevleri olan

pigmentlerdir. Vitamin-A'nın metabolik ön maddesi olan β -karotenin; singlet oksijeni (1O_2) bastırabildiği, süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot-}$) temizlediği ve peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$) ile direkt etkileşerek antioksidan rol oynadığı tespit edilmiştir.

-Ürik Asit

Suda çözünebilir olup; metal iyonları ile şelat yapar ve vitamin-C'yi oksidasyona karşı korur (68).

-Pirüvat

H_2O_2 'yi kimyasal olarak parçalar (82).

-Taurin

ROS ürünlerini temizler.

-Hipotaurin

ROS ürünlerini temizler.

-Albumin

ROS ürünlerini temizler (66).

-Çinko (Zn)

Erken dönemde, proteinlerin sülfidril gruplarını korumakla birlikte demir ve bakır gibi redoks-aktif transisyon metallerini antagonize ederek H_2O_2 'den $OH^{\cdot}$ oluşumunu azaltır. Uzun dönemde nihai olarak antioksidana dönüşecek olan metallotioninler gibi bazı substantları antioksidana dönüşmeleri için indükler (83).

-Selenyum (Se)

GPx'in yapısına katılarak antioksidatif etkinlik gösterir (74).

-Koenzim Q-10

Antioksidan özellikli olup, enerji üretimini destekler. Antioksidan özelliği, redükte

formu ubiquinol tarafından sağlanır. Spermatozoanın orta parçasında mitokondride yoğunlaşmıştır.

-Laktoferrin

Spermatozoanın başını kaplayan, transisyon metallerinin peroksidatif etkinliini önleyen demir bağlayıcı bir proteindir.

-Prostozom

Prostat tarafından semene sekrete edilen organellerdir. Bunlar, nötrofillerle etkileşime girme yetisine sahiptirler ve nötrofillerin süperoksit anyon radikali üretme kapasitelerini azaltma yetisine sahiptirler. Nötrofilin plazma membranına lipid transferi ile NADPH oksidaz aktivitesinin inhibisyonuna da sebep olurlar (7).

2.4.4. Fizyolojik Düzeydeki Reaktif Oksijen Substantlarının Spermatozoa Üzerine Etkileri

ROS'un spermatozoanın fonksiyonu üzerine hem yararlı hem de zararlı etkileri vardır. Bu etkilerin hangi yönde olacağını, ROS'un üretimi ile savuşturulması arasındaki denge belirler. ROS'un üretimi ile savuşturulması arasındaki denge; oksidanlar yönüne kaydığında oksidatif stres ve buna bağlı spermatozoal fonksiyonları olumsuz yönde etkileyen olaylar ortaya çıkarken, korunduğu takdirde ROS'lar spermatozoanın geçirdiği fizyolojik süreçlere katılırlar (71). Konsantrasyonu kontrol altında tutulan ROS; hiperaktivasyon, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, spermatozoanın yumurtaya bağlanması ve oosit ile füzyonu gibi spermatozoal fonksiyonlarda önemli fizyolojik etkilere sahiptir (75).

ROS'un spermatozoa fizyolojisine katıldığına dair ilk deneysel kanıt 1993'te de Lamirande ve Gagnon'un; $O_2^{\cdot -}$ 'ye maruz bırakılan spermatozoanın, yalnız 'kapasitasyon indükleyici' niteliğindeki fetal kord serumuna ya da yalnız Ham's F-10 medyumuna maruz kalan spermatozoaya nazaran daha yüksek düzeyde hiperaktif ve kapasite olduğu ve olumlu etkilerin SOD tarafından önlendiğini gözlemledikleri çalışmadır (71).

Kapasitasyon sürecinde moleküler düzeyde bir dizi olay gerçekleşmektedir. Bu sürecin en can alıcı noktası trozin fosforilasyonudur. Spermatozoanın kapasitasyonu süresince trozin fosforilasyonunun stimülasyonu, spermatozoa tarafından üretilen ROS ile stimüle edilen redoks ile regüle edilen olaylardır (84). Bir başka çalışmada ekzojen $O_2^{\bullet-}$ nin hiperaktivasyonu indüklediği ve kapasite spermatozoanın uzun bir periyotta $O_2^{\bullet-}$ ürettiği gözlemlenmiştir (85).

Yapılan in-vitro bir çalışmada NO'nun sperm proteinlerinin trozin fosforilasyonunu modüle ettiği gösterilmiştir (86). Sağlıklı gönüllülerden alınan semen üzerinde yapılan bir çalışmada, medyuma nitrik oksit salıverici ajanların (Dietilamin NONOat ya da spermin NONOat) eklenmiş olmasının spermatozoanın kapasitasyonunu önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir. NO'nun kapasite edici etkisinin, sadece H_2O_2 varlığında mümkün olabileceği öne sürülmüştür (87). H_2O_2 'nin, sperm kapasitasyonunu indükleyebileceği bildirilmiştir.

NO ve $O_2^{\bullet-}$ gibi ROS türlerinin, akrozom reaksiyonunu (AR) uyardığı gösterilmiştir. İnsan spermatozoasında endojen NADPH'ye bağımlı ROS üretiminin, trozin fosforilasyonu aracılığı ile akrozom reaksiyonunu stimüle ettiği bildirilmiştir.

Düşük düzeydeki ROS'un insan spermatozoasının zona pellusidaya bağlanma kapasitesini arttırdığı bildirilmiştir. Kapasitasyon medyumunda düşük konsantrasyondaki NO'nun, hemizonaya bağlanan spermatozoa sayısını arttırdığı bildirilmiştir.

Spermatozoa tarafından düşük konsantrasyondaki H_2O_2 ve $O_2^{\bullet-}$ üretiminin, kapasitasyon ve spermatozoa-oosit füzyonunu kontrol eden sinyal olaylarında fonksiyonel role sahip olabileceği belirtilmiştir (75).

2.4.5. Patolojik Düzeydeki Reaktif Oksijen Substantlarının Spermatozoa Üzerine Etkileri

Oksidatif stresin (OS) spermatozoa fonksiyonunun bozulmasında rol aldığına dair ilk gözlem, 1943 yılında insan spermatozoasının yüksek oksijen basıncı altında inkübe edildiğinde motilitelerini kaybettiğini gören MacLeod tarafından yapılmıştır.

MacLeod katalazın koruyucu etkisinden yola çıkarak, motilitenin azalmasına sebep olan ajanın H_2O_2 olduğunu öne sürmüştür (73). Oksidatif stresin üreme sistemi üzerine zarar verdiğine dair araştırmalar, günümüze kadar yoğun olarak devam etmiştir. OS'nin potansiyel hedefleri; lipidler, proteinler, şekerler ve nükleik asitlerin hepsi dahil olmak üzere tüm hücrel komponentlerdir. OS ile indüklenen hasarın boyutu; olaya katılan ROS'un türü ve miktarına bağlı olduğu gibi, ROS'a maruz kalınan süreye ve sıcaklık, oksijen basıncı ve de çevrenin kompozisyonu (antioksidanlar, iyonlar, proteinler gibi) gibi dış faktörlere bağlıdır (88).

-Lipid Peroksidasyon (LPO)

Spermatozoanın plazma membranındaki poliansatüre yağ asitleri oksidatif hasara maruz kaldığında lipid peroksidasyon meydana gelir. Lipid peroksidasyon genel olarak 3 aşamalı bir süreçtir: Başlangıç, toplanma ve sonlanma.

LPO'nun ilk basamağında; herhangi bir serbest radikal, membran lipidlerindeki ya da lipoproteinlerdeki doymamış yağ asidinin açıl zincirine (RH) ait hidrojen atomlarını uzaklaştırarak lipid alkil radikallerini ($R^\bullet$) serbestleştirir. Reaksiyon, şu şekildedir: ($RH + HO_2^\bullet \rightarrow R^\bullet + H_2O_2$)

LPO'nun ikinci basamağında; lipid alkil radikalleri ($R^\bullet$), aerobik koşullar altında moleküler oksijen (O_2) ile reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini ($ROO^\bullet$) oluşturur. Lipid peroksil radikalleri ($ROO^\bullet$), komşuluğundaki doymamış yağ asidinin açıl zincirine ait hidrojen atomunu (H) alarak oksidasyonu yayabilir. Sonuçta; peroksil radikalleri ($ROO^\bullet$) lipid hidroperoksit ($ROOH$) haline gelirken, komşuluğundaki doymamış yağ asitleri lipid-alkil radikali ($R^\bullet$) haline gelir. Reaksiyonlar şu şekildedir: ($R^\bullet + O_2 \rightarrow ROO^\bullet$) $\rightarrow \rightarrow$ ($ROO^\bullet + RH \rightarrow ROOH + R^\bullet$)

LPO'nun son basamağında; lipid alkil radikalleri ($R^\bullet$) kaskadı sonlandırmak için, H^+ varlığında $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyona girer $ROOH$ oluşur. Reaksiyon şu şekildedir: ($R^\bullet + O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow ROOH$) (72).

LPO'nun ürünlerinden birisi, spermatozoanın maruz kaldığı peroksidatif

hasarın derecesini gözlemlemek için çeşitli oksidatif stres analizlerindede kullanılan malondialdehittir (88). LPO ile; lipid peroksitler ve malondialdehit düzeyi artarken, doymamış yağ asitlerinin miktarı azalır (73).

Neticede; membranın akışkanlığı ve membrana bağlı enzimlerin aktivitesi bozularak spermatozoanın motilitesinde kayıp, oosit ile kaynaşmasında zorluk hatta ölümü meydana gelebilir (72).

-DNA Hasarı

Somatik hücrelerle kıyaslandığında spermatozoa DNA'sı, zarar veren etmenlere karşı kendisini sıkı sıkıya koruyabilen çok özel bir donanıma ve çok özel bir çevreye sahiptir. Ancak ROS düzeyi koruyucu sistem tarafından tolere edilemeyecek düzeyde olursa, DNA hasar görecektir. Spermatozoayı ROS'a karşı koruyan savunma sistemi, üstesinden gelemeyecek düzeyde ROS ile karşılaştığında spermatozoanın hem kendi hem de mitokondrisinin DNA etkilenir. Bu etkiler; baz çiftlerinin modifikasyonu, bazdan yoksun bölgelerin ortaya çıkışı, çerçeve kaymaları, DNA proteinlerinde çapraz bağlanma, tek ve çift iplik kırıklarının sayıca artması ve kromozomal yeniden düzenlenme şeklindedir (7). Thomson ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada kriyoprezervasyon ile indüklenen DNA hasarının apoptozisten ziyade esasen oksidatif stres aracılığı ile gerçekleştiğini ortaya koydular (89).

-ATP Kaybı

İnsan spermatozoasının ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen ROS'a maruziyetiyle indüklenen motilite kaybı, hücre içerisindeki ATP azalması ile ilişkilidir. H_2O_2 'nin gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz üzerine direkt etkisinin, ATP'nin azalmasından sorumlu mekanizma olduğu öne sürülmüştür (73).

2.4.6. Spermatozoayı ROS'un Zararlı Etkilerine Karşı Duyarlılaştıran Etmenler

Spermatozoayı ROS'u zararlı etkilerine karşı hassaslaştıran etmenler,

spermatozoanın kendisinden kaynaklanan ve kendisinden kaynaklanmayan etmenlerdir.

2.4.6.1. Spermatozoaya Bağlı Unsurlar

Spermatozoanın kendisine bağlı olan faktörler; spermatozoanın hem plazma membranının hem de organellerinin yüksek düzeyde poliansatüre yağ asiti (PUFA) içermesi, ROS'un zararlı etkilerini önleyen koruyucu sistemin kapasitesini sınırlayacak ölçüde küçük stoplazmik volüme sahip olması ve buna bağlı olarak antioksidan enzimleri düşük konsantrasyonlarda ihtiva etmesi şeklinde sıralanabilir (7).

Plazma membranı yüksek düzeyde PUFA içerdiğinden, tavşan spermatozoası peroksidatif hasarla indüklenen serbest radikallere karşı duyarlıdır (22).

Spermanın matürleşme sürecinde, stoplazmanın önemli bir kısmı ya seminifer tübülüne atılır ya da Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Böylelikle spermatozoa, kendisini oksidatif strese karşı koruyan antioksidanlardan az miktarda içermiş olur (90).

2.4.6.2. Spermatozoaya Bağlı Olmayan Unsurlar

Spermatozoanın kendisine bağlı olmayan faktörler ise; genital organların enfeksiyonu, inflamasyonu, skrotumda ROS düzeyini arttıracak sıcaklık artışı, iskemi, hipoksi gibi faktörler, androjen metabolizmasındaki düzensizlikler, beslenme (yağlı diyet), sigara içimi, kanda ve semende Fe & Cu gibi radikal oluşumuna katkı yapan elementlerin konsantrasyonlarının yüksek olması ve genetik yatkınlık (Glutatyon S-transferaz mull 1 geninin null genotipi) şeklinde sıralanabilir (7).

2.4.7. Dondurulan Tavşan Semeninde Spermatozoayı Oksidatif Strese Karşı Koruma Yöntemleri

Tavşan spermatozoasını oksidatif strese karşı korumak için antioksidanlı veya antioksidansız uygulama yapılabilir. Antioksidansız uygulama kapsamında; tavşanlara lipid peroksidasyon düzeyini arttıracak lipid içeriği yüksek diyet

vermekten kaçınmalı, hayvanlar stres altında kalacakları çevresel koşullardan uzak tutulmalıdır. Antioksidan uygulama kapsamında; antioksidan içerikli diyet uygulaması ya da semenini kriyoprezerve etmeden önce sulandırıcıya antioksidan ilavesi yapılmaktadır.

2.4.7.1. Antioksidanların Tavşan Semenine Üzerine Etkileri

Semenin dondurulması-çözdürülmesi esnasında ortaya çıkan toksik düzeydeki ROS; endojen antioksidan savunmanın kapasitesini düşürür, spermatolojik parametreleri ve fertilitiyi olumsuz yönde etkilemektedir (3). Semendeki ve spermatozoadaki antioksidan düzeyi, dondurma-çözdürmenin sebep olduğu strese karşı koymada daha önceden bahsedilen sebeplerden dolayı yetersiz kalır. Bu sebeple tavşan spermatozoasının oksidatif strese karşı korunması için, antioksidan takviyeye ihtiyaç söz konusudur.

Birçok araştırmacı çeşitli antioksidanları farklı yöntemlerle kullanarak tavşan semenine üzerine etkilerini araştırmışlardır.

Yousef ve arkadaşları; alüminyum klorid ($AlCl_3$) ile inkübe edilen tavşan semenine vitamin-E ve vitamin-C ilavesinin; tavşan semeninde $AlCl_3$ ile ortaya çıkan oksidasyonu azalttığını, aktivitesi azalan SOD ve CAT'ın aktivitelerini normale yaklaştırdığını bildirmişlerdir (91).

Castellini ve arkadaşları; tavşanlara diyet yoluyla verilen α -tokoferil asetatın semendeki vitamin-E düzeyini arttırdığını ve LPO düzeyini azalttığını, selenyum verilmesinin ise semende GPx düzeyini arttırdığını bildirmişlerdir (92).

Ata ve arkadaşları; endosülfan verilmesiyle olumsuz etkilenen motilite, canlılık ve plazma membran bütünlüğü gibi spermatolojik parametrelerin askorbik asit verilmesiyle önemli düzeyde düzeltildiğini bildirmişlerdir (93).

Rosato ve arkadaşları; dondurmadan önce semen sulandırıcısına likopen katılmış olan tavşanların katılmayanlarla kıyaslandığında; çözüm sonu motilitelerinin, canlılığın ve DNA bütünlüğünün yüksek olduğunu ve LPO'nun

düşük olduğunu bildirmişlerdir (55).

Alvarez ve Storey; tavşan epididimal spermatozoa üzerine yaptıkları çalışmada kontrole göre; taurin, hipotaurin, epinefrin and albuminin lipid peroksidasyonu azalttıklarını ve motilite kaybına karşı koruma sağladıklarını bildirmişlerdir (94).

Salem ve arkadaşları; subletal dozda aflatoksin B1 alan ve buna bağlı olarak serum testosteron düzeyi, sperm konsantrasyonu ve sperm motilitesi azalan tavşanlara askorbik asit verilmesiyle aflatoksin B1'in olumsuz etkilerinin azaltıldığını bildirmişlerdir (95).

2.4.7.2. Arjinin, Ellajik Asit, Metionin ve Sisteamin'in Antioksidatif Etkinliği

-Arjinin

Arjinin, spermatogenezise aktif olarak katılır. Spermatozoa motilitesinin stimüle edilmesinde önemli rol üstlenir. Spermatozoada glikoliz hızını arttırarak ATP üretimini arttırır. Savunma ve hücrel immünitenin modüle edilmesinde anahtar rol üstlenir. L-arjinin spermatozoa üzerine etkisi, primer olarak NO üretimi aracılığı ile (96).

O'Flaherty ve arkadaşları; akrozom reaksiyonunu değerlendirmek için katılan 10 mM dozundaki arjininin, akrozom reaksiyon indüktörüyle eşit düzeyde bu reaksiyonu stimüle ettiğini bildirmişlerdir (97).

Atreja ve arkadaşları; dondurma öncesi semen sulandırıcısına arjinin katılan buffalolarda katılmayanlarla kıyaslandığında; çözüm sonu motilitelerinin ve canlılığın daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (98).

Radany ve arkadaşları; semeni arjinin katılmış sulandırıcı ile dilüe edilen tavşanlarda arjinin katılmayanlarla kıyaslandığında; motilitenin daha uzun süre korunduğunu bildirmişler ve L-arjinin stimülasyonunun endojen sperm metabolizmasının bir fonksiyonu olabileceğini desteklediği sonucuna varmışlardır (99).

Keller ve arkadaşları; semeni arjinin içeren sulandırıcı ile dilüe edilen insanlarda kontrolle (arjinin katılmamış) kıyaslandığında, 37⁰C'de 60 dk.lık inkübasyonun ardından motiliteyi %81.6 oranında arttırdığını bildirmişlerdir (100).

Srivastava; medyuma arjinin katılarak semeni 24 saat inkübe edilen insanlarda kontrolle (arjinin katılmamış) kıyaslandığında, spermatozoa motilitesinin daha uzun süre korunduğunu ve daha az lipid peroksidasyon olduğunu bildirmişlerdir (101).

-Sisteamin

Sisteamin, kimyasal olarak trietanolamin (β -markaptoetilamin) yapısında olup, vücutta sisteinin dekarboksilasyonu ile oluşmaktadır. Kimyasal formülü $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 'dir. Sisteine dönüşerek glutatyonun yapısına girer, böylelikle hücre savunma sisteminde rol oynar. Hücre metabolizmasında görev alır. Koenzim A'nın yapısına girdiğinden enerji üretimi için gerekli bir maddedir.

Doğan ve arkadaşları; fibrosarkomaya neden olan 3-metilkolantren verilen albino farelerde sisteaminin koruyucu etkisini araştırmışlar ve sisteaminin 3-metilkolantrenin fibrosarkoma yapıcı etkisini yaklaşık %50 oranında azalttığını bildirmişlerdir (102).

Bucak ve arkadaşları; dondurma öncesi semen sulandırıcısına 5 mM ve 10 mM sisteamin katılan koçlarda kontrolle kıyaslandığında; çözüm sonu spermatozoa motilitesinin ve canlılığının daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (103).

Cirit ve arkadaşları; soğutma öncesi 5mM sisteamin ilave edilmiş sulandırıcı ile dilüe edilen semen çözdürüldüğünde membran bütünlüğünün %38.8, kontrol grubunda ise %36.9 olduğunu bildirmişlerdir (104).

Bucak ve arkadaşları; soğutma öncesi semeni 5mM sisteamin ilave edilmiş sulandırıcı ile dilüe edilen Angora keçisinde kontrolle kıyaslandığında; çözüm sonu motilitenin (kontrol: %50, 5mM sisteamin: %61.0) ve membran bütünlüğünün (kontrol: %30.25, 5mM sisteamin: %34.25) daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir

(105).

Matos ve arkadaşları; matürasyon medyumuna sisteamin katılmış koyun oositlerinde kontrolle kıyaslandığında; blastosist gelişim oranının daha yüksek olduğunu ve matürleşen oositlerde oosit başına GSH içeriğinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (106).

-Metionin

Metionin, sülfür atomu içeren aminoasitlerden birisidir. Metionin türevi olan S-adenozil metionin, enzimatik reaksiyonlarda metil grubu vericisidir. Metionin; transsülfürasyon reaksiyonlardaki katkısıyla sistein, karnitin ve taurin sentezinde rol alır. Ayrıca fosfatidilkolin ve diğer fosfolipidlerin sentezinde de kullanılır. Metioninin vücutta yanlış dönüşümü ateroskleroza yol açabilir. Standart genetik kodda sadece bir kodona sahip olan iki aminoasitten birisi metionin (AUG), diğeri ise triptofandır (UGG). AUG kodonunun bir özelliği, ribozomların mRNA'dan protein sentezine başlayabilmeleri için başlangıç sinyali taşımasıdır (70).

Metionin; hücreleri oksidatif hasara karşı korur ve detoksifikasyonda önemli rol alır, şelatları dokulardan uzaklaştırır (107). Metioninin bir başka etkisi de, serbest oksijen radikallerinin redüksiyonunda önemli rol almasıdır (108). Oksidatif hasara karşı hücreleri korumada glutatyon için prekürsör aminoasit olarak rol alır (109).

Tuncer ve arkadaşları; dondurma öncesi semen sulandırıcısına 2.5, 5, 10mM metionin katılan Angora tekesinde kontrolle (%45.1) kıyaslandığında; çözüm sonu motilitenin özellikle 2.5mM metionin (%63.6) ve 5mM metionin (%63.4) ile daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (110).

Çoyan ve arkadaşları; 5⁰C'ye soğutma öncesi semen sulandırıcısına 1,2,4mM metionin katılan koçlarda kontrolle (%66) kıyaslandığında; 72 saatlik ekilibrasyon sonunda çözüm sonu motilitenin 1mM metionin (%77) ile daha yüksek elde edildiğini bildirmişlerdir (109).

Bucak ve arkadaşları; dondurma öncesi 2.5mM ve 7.5mM metionin katılarak sulandırılan boğalarda kontrolle kıyaslandığında (0.96); çözündürme sonu antioksidan potansiyelin 2.5mM metionin (5.06) ve 7.5mM metionin (3.07) ile daha yüksek elde edildiğini bildirmişlerdir (111).

-Ellajik Asit

Ellajik asit; doğal fenolik bir bileşiktir. Güçlü bir antioksidandır, antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklere de sahiptir. Özellikle pankreatik kanser hücrelerinde proliferasyonu baskılar ve apoptozisi indükler (112).

Khanduja ve arkadaşları; fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada ellajik asitin akciğerlerde antikarsinojenik etki gösterdiğini bildirmiştir (113).

Priyadarsini ve arkadaşları; ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, ellajik asitin karaciğer dokusunda mikrozomal proteinlere bağlandığını ve lipid peroksidasyonu engellediğini bildirmiştir (114).

Özkaya ve arkadaşları; ratlar üzerine yaptıkları bir çalışmada ellajik asitin; alüminyum klorürün ratların karaciğerinde oluşturduğu oksidatif stresi azalttığını, redükte glutatyon (GSH) düzeyiyle birlikte GPx ve CAT aktivitelerini arttırdığını bildirmişlerdir (115).

Türk ve arkadaşları; ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada ellajik asitin, epididimal spermatozoa yoğunluğunu ve motilitesini arttırdığını ve anormal spermatozoa oranlarında artışa sebep olan sisplatinin olumsuz etkisini azalttığını bildirmişlerdir (116).

Çeribaşı ve arkadaşları; ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada; adriamisinin epididimal sperm parametreleri üzerine gösterdiği olumsuz etkilere ve testislerde oluşturduğu lipid peroksidasyon ve apoptozise karşı ellajik asitin koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir (117).

Tokeshi ve arkadaşları; domuz oositlerin in vitro fertilizasyonu süresince ellajik asitin sperm-zona etkileşimi ile indüklenen akrozom reaksiyonunu inhibe

ederek polispermiyi önlediğini bildirmişlerdir (118).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Tavşan Semeninin Alınmasında, Dondurulmasında, Çözdürülmesinde Ve Çözdürülmesi Sonrasında Spermatolojik Ve Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesinde Kullanılan Gereçler

- ✓ Kafes: 40x40x40 boyutlarında olan, içerisinde özel suluk bulunduran ve tavşanın barındırılmasını sağlayan gereçti.
- ✓ Tavşan: Ergin Beyaz Yeni Zellanda türü 15 adet erkek ve 3 adet dişi tavşan kullanıldı.
- ✓ Pelet yem: Tavşanların beslenmesi için istedikleri kadar yiyebildikleri diyetti.
- ✓ Havuç: Tavşanların beslenmesi için günde bir adet verildi.
- ✓ Suni vajen: Semen numunesi alınması için kullanılmaktadır. Yaklaşık 8-10 cm uzunlukta karbiraör borusu ve prezervatif sonda kullanılarak yapılmaktadır, içerisine 50-60 °C düzeyinde su konularak numune alınmaya hazır hale getirilmektedir.
- ✓ Puar: İçerisinde su bulunan suni vajenin içerisine hava pompalayarak, suni vajeni semen numunesi almak adına hazır hale getirmeye yarar.
- ✓ Dereceli konik cam tüp: Semen numunesinin bir yerde toplanmasını sağlar, semen numunesi alındıktan sonra kaç ml. semen alındığını tespit etmemize yarar ve suni vajenin erkek tavşanın temas etmeyeceği tarafına yerleştirilir.
- ✓ Spatül: Semendeki jelin ayrılması için kullanıldı.

- ✓ Sıcak su banyosu: Sıcaklık derecesi 38°C'ye ayarlandı. Alınan semenin dış ortam sıcaklığından olumsuz etkilenmemesi için alınan semen ilk olarak sıcak su banyosuna konuldu, semenin dilüe edilmesi bu sıcak su banyosunda yapıldı, spermatolojik ve biyokimyasal parametreler değerlendirilirken payetler bu sıcak su banyosunda çözündürüldü, floresan mikroskopta analizler yapılmadan önce -20°C'de saklanan floresan boyalar kullanıma hazır hale getirilmeleri için bu su banyosunda çözündürüldü.
- ✓ Distile su: Tris bazlı ana stok solüsyonu ve Hancock solüsyonunu hazırlamak için kullanıldı.
- ✓ Tris (Tris-[Hidroksimetilaminometan]): Semen sulandırıcısına katılan kimyasaldır.
- ✓ Sitrik asit: Semen sulandırıcısına katılan kimyasaldır.
- ✓ D-Glukoz monohidrat: Semen sulandırıcısına katılan kimyasaldır.
- ✓ Tris bazlı ana stok solüsyonu: Tartılan 0.25 M Tris, 88 mM sitrik asit ve 47 mM D (+) Glukoz monohidrat 100 ml.lik mezürde biraraya getirildi ve üzerlerine 100 ml.ye tamamlanmak kaydıyla bidistile su eklenerek hazırlandı. Osmotik basıncı 280-300 mOsm ve pH'sı 6.8-7.0 olarak ayarlandı.
- ✓ Sükroz: Semen sulandırıcısına katılan non-permeabl kriyoprotektanttır.
- ✓ Dimetilsülfoksit: Semen sulandırıcısına katılan permeabl kriyoprotektanttır.
- ✓ Tavuk yumurta sarısı: Semen sulandırıcısına katıldı.
- ✓ Santrifüj cihazı: Hem yumurta sarısındaki çözünmeyen proteinlerle lipidleri ayırtmak için hem de biyokimyasal analizler öncesi, semen ile spermatozoaları ayırmak için kullanıldı.
- ✓ Metionin: Semen sulandırıcısına katılan antioksidanlardan birisiydi. Oda sıcaklığında saklandı.

- ✓ Sisteamin monohidroklorid: Semen sulandırıcısına katılan antioksidanlardan birisiydi. +4 °C'de saklandı.
- ✓ Ellajik asit: Semen sulandırıcısına katılan antioksidanlardan birisiydi. Oda sıcaklığında saklandı.
- ✓ Arjinin: Semen sulandırıcısına katılan antioksidanlardan birisiydi. Oda sıcaklığında saklandı.
- ✓ Hassas terazi: Kimyasalları 1/10.000 hassaslıkta tartmak için kullanıldı.
- ✓ Flakon tüp: İçerisine hazırlanan sulandırıcıları koymak için kullanıldı.
- ✓ Payet: Semen kriyoprezerve edilmezden önce içerisine konulduğu bir ucu kapalı diğer ucu açık plastik gereçtir ve hacmi 0.25 ml. dir.
- ✓ Polivinil alkol tozu: İçerisine dilüe edilmiş semen numunesi çekilmiş olan payetlerin açık olan ucunu kapatmak için kullanılır. Oda sıcaklığında saklanır.
- ✓ Beherler: İçerisine su konuldu., içerisine dilüe edilmiş semen numunesi çekilmiş olan payetlerin polivinil alkol tozu ile kapatılan kısımlar beher içerisindeki su ile yaklaşık 5 dk. temas ettirilir. Böylelikle, beherler payetlerin toz ile kapatılan kısımlarını sağlamlaştırmak için kullanıldı.
- ✓ Spor: Payetleri dizmek için kullanılır.
- ✓ Dolap (5°C'ye ayarlı): Sıcaklığı 5°C'ye ayarlanmış ve kapağı camdan yapılmış olup, semen ile kriyoprezervasyon sulandırıcısıyla ekilibre edilmesi için kullanıldı.
- ✓ Sıvı azot: Sıcaklığı -196°C olup, semenin kriyoprezerve edilmesi için azot tankının içerisine konulmaktadır.
- ✓ Cetvel: Azot seviyesi belirlemek için kullanıldı.

- ✓ Strafor: İçerisine sıvı azot koyuldu ve payetler azot tankına atılmadan önce kademeli soğutma ile dondurmak amacıyla kullanıldı.
- ✓ Azot tankı: İçerisine, semenin kriyoprezervasyonu için gerekli sıvı azot konuldu.
- ✓ Sybr-14 boyası: DMSO ile 1:10 oranında dilüe edildi, sonrasında 30 µl.lik parçalara bölündü, daha sonra filtre edildi ve böylelikle stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyonu -20⁰C'de saklandı. Canlı spermatozoaya yeşil renk veren floresan boyadır.
- ✓ Arachis hypogaea (peanut) ile konjuge floressein izotiosiyanat (FITCH-PNA) boyası: 120 µgr FITCH-PNA 1 ml. fosfat tamponlu saline (PBS) eklendi, sonrasında 100 µl.lik parçalara bölündü, daha sonra filtre edildi ve böylelikle stok solüsyonu hazırlandı. Stok solüsyonu -20⁰C'de saklandı. Spermatozoanın akrozom bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılan floresan boyadır.
- ✓ JC-1 boyası: DMSO solüsyonunda çözdürüldü, sonrasında 100 µl.lik parçalara bölündü, daha sonra filtre edildi ve böylelikle stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyonu -20⁰C'de saklandı. Spermatozoanın mitokondriyal aktivitesini değerlendirmek için kullanılan floresan boyadır.
- ✓ Propidyum iyodid (PI) boyası: 2 mg/ml distile suda çözdürüldü, sonrasında 30 µl.lik parçalara bölündü, daha sonra filtre edildi ve böylelikle stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyonu -20⁰C'de saklandı. Spermatozoanın canlılığının, akrozom bütünlüğünün ve mitokondriyal aktivitesinin değerlendirilmesinde diğer floresan boyalarla kombine kullanılan floresan boyadır.
- ✓ Fosfat tamponlu salin (PBS): Hem spermatolojik parametreleri değerlendirmeden önce çözdürülen semeni sulandırmak hem de biyokimyasal parametreleri değerlendirmeden önce spermatozoaları yıkamak için kullanıldı.

- ✓ NaCl (9 gr): Hancock solüsyonunu hazırlamak için kullanıldı.
- ✓ NaCl solüsyonu: 9 gr NaCl solüsyonu tartıldı, üzerine bidistile su 500 ml'ye tamamlanmak kaydıyla eklenerek hazırlandı.
- ✓ Formalin (%35'lik): Hancock solüsyonunu hazırlamak için kullanıldı.
- ✓ Hancock solüsyonu: 62.5 ml formalinin (%35'lik) üzerine 150 ml NaCl solüsyonu katılarak ve hepsinin üzerine 500 ml'ye tamamlanmak kaydıyla bidistile su eklenerek hazırlandı. Floresan mikroskopta spermatolojik analizlerin yapılması için, spermatozoaların hareketini durdurmaya yarar.
- ✓ Pipetler: Semen kriyoprezervasyon medyumuna ile dilüe edilmesinde ve çözüm sonunda değerlendirme yapılırken katılan kimyasalların ve semenin uygun ölçülerde katılımında kullanıldı.
- ✓ Faz-kontrast mikroskobu: Kriyoprezervasyon öncesinde ve kriyoprezerve edilen semenin çözümü sonrasında spermatozoanın motilitesini değerlendirmek için kullanıldı.
- ✓ Floresan mikroskobu: Kriyoprezerve edilen semenin çözümü sonrasında spermatozoanın; canlılığını, akrozom bütünlüğünü ve mitokondriyal bütünlüğünü değerlendirmek için kullanıldı.
- ✓ Isıtma tablası: Spermatozoanın dış ortam sıcaklığı ile karşılaşarak zarar görmesini önlemek adına 37°C'ye ayarlanmış, mikroskobun şaryo kısmına yerleştirilen ve üzerine lam-lamelin konularak spermatozoal parametrelerin değerlendirme yapılmasına olanak sağlayan gereçtir.
- ✓ Dolap (-86°C'ye ayarlı): Biyokimyasal analizler öncesinde numunenin saklanması için kullanıldı.
- ✓ Lipid peroksidasyon kiti: Lipid peroksidasyonu tespit etmek için kullanıldı.
- ✓ Glutasyon kiti: Glutasyon düzeyini tespit etmek için kullanıldı.

- ✓ Total antioksidan kiti: Total antioksidan düzeyini tespit etmek için kullanıldı.
- ✓ Spektrofotometre: Biyokimyasal analizler için kullanıldı.

3.2. Hayvan Materyali Ve Hayvanların Bakımı-beslenmesi:

Çalışmada 15 erkek ve 3 dişi olmak üzere, toplam 18 Beyaz Yeni Zellenda ırkı tavşan kullanıldı. Tavşanlar, her birinin içerisinde özel suluğu ve yem bölümü olan kafeslerde tek kalacakları şekilde barındırıldı. Beslenmeleri için günde; istedikleri kadar pelet yem, su ve günde bir adet orta boy havuç verildi.

3.3. Tavşanlardan Semen Alınması:

Erkek tavşanlar çalışmanın başlangıcında, yaklaşık 15 gün süreyle dişi tavşan kullanılarak alt kısmına semen toplama kadehi yerleştirilen suni vajene sperma (jelli semen) vermeye alıştıdırıldı. Çalışma süresince erkek tavşanlardan haftada 2 gün semen alındı. Jel bulunduran spermalarda, jel kısmı atıldı ve çalışmaya sadece beyaz renkte olan semen dahil edildi.

3.4. Semen Dondurmadan Önce Motil Spermatozoa Oranının Değerlendirilmesi

Spermanın jel kısmı ayrıldıktan sonra ortaya çıkan semenden, ısıtma tablalı lam üzerine pipet yardımıyla bir damla damlatılarak en az 4 değişik sahada bakılıp ve dört değer ortalaması alınarak faz-kontrast mikrokobunda x400'lük büyütmede progresif motil spermatozoaların diğer spermatozoalara oranı (%) olarak değerlendirildi. Motil spermatozoa oranı % 80'den fazla olan semenler, çalışmaya dahil edildi; % 80'den daha az olanlar ise çalışmadan çıkarıldı.

3.5. Semen Sulandırılması Ve Sulandırıcı Gruplar:

Semenlerin sulandırılmasında; temel sulandırıcı olarak tris bazlı ana stok solüsyonu kullanıldı. Semen sulandırıcısına; kriyoprotektant olarak DMSO, sükröz ve tavuk yumurta sarısı; antibiyotik olarak kanamisin sülfat; antioksidan olarak arjinin, ellajik asit, metionin ve sisteamin eklendi.

Tris bazlı temel sulandırıcının üzerine % 20 oranında tavuk yumurta sarısı ilave edildi. Yumurta sarısındaki çözünmeyen lipid ve proteinleri çöktürmek amacıyla elde edilen solüsyon, 15 dakika süreliğine 1500 devirde santrifüj edildi. Daha sonra solüsyona 50 mM süktroz ve % 8 oranında DMSO ve onunda üzerine Tris bazlı yumurta sarısı içermeyen ana solüsyon 100 ml'ye tamamlanacak şekilde ilave edildi ve en sonunda antimikrobiyal etkinlik için 80 mg/L kanamisin sülfat eklenerek temel kriyodilüent hazır hale getirildi.

Hazırlanan kriyodilüent 5 ayrı flakon tüplere eşit şekilde bölündü ve her bir flakon tüpe antioksidan olarak sırasıyla arjinin, ellajik asit, metionin ve sisteamin 5 mM dozlarında katıldı. Ayrıca kontrol grubu olarak antioksidan içermeyen kriyodilüent kullanıldı.

Çalışmada yer alan farklı kriyodilüent grupları şu şekildeydi:

- 1-) Arjinin grubu: Temel kriyodilüent + Arjinin (5 mM)**
- 2-) Ellajik asit grubu: Temel kriyodilüent + Ellajik asit (5 mM)**
- 3-) Metionin grubu: Temel kriyodilüent + Metionin (5 mM)**
- 4-) Sisteamin grubu: Temel kriyodilüent + Sisteamin (5 mM)**
- 5-) Kontrol grubu: Temel kriyodilüent (antioksidansız, kontrol)**

Bireysel farklılıkları elimine etmek için alınan tüm semenler birbirleriyle karıştırıldı. 5 eşit hacme bölünerek beş ayrı flakon tüplere aktarıldı ve sırasıyla arjinin (5 mM), ellajik asit (5 mM), metionin (5 mM), sisteamin (5 mM) içeren ve antioksidan içermeyen (kontrol) kriyodilüentleriyle 1:2 (1 birim semen, 2 birim kriyodilüent) oranında 37⁰C'de sulandırıldı. Sulandırma sonrası, faz-kontrast mikroskopunda motil spermatozoa oranı değerlendirildi ve sadece motil spermatozoa oranı % 80'den fazla numuneler çalışmaya dahil edildi.

3.6. Semen Dondurulması:

Sulandırma işleminden sonra beş farklı numune oda ısısında (22±2⁰C), her bir grubu temsilen farklı renklerdeki 0.25 ml.lik payetlere aspire edildi. Sonra payetler, +5⁰C'lik buzdolabına yerleştirildi ve numuneler 1 saat ekilibre edildi. Daha sonra

numuneler, sıvı azotun 5 cm üzerinde olacak şekilde sıvı azot buharında (-120°C ila -130°C 'ye takabül etmektedir) 15 dkikalık süre içerisinde donduruldu ve ardından saklanmak üzere sıvı azota (-196°C) atıldı. Numuneler, yaklaşık 1 ay sıvı azotta saklı tutuldu.

3.7. Dondurulan Semen Çözdürülmesi

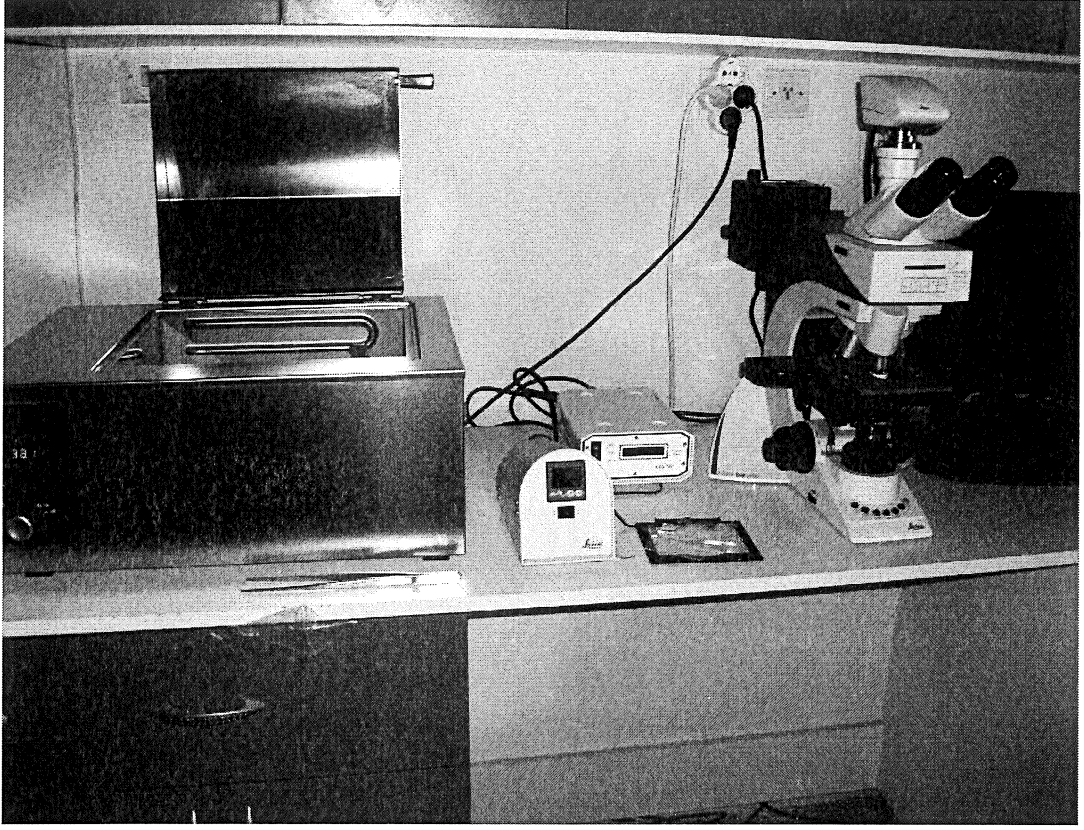
İçerisinde semen bulundurulan azota atılmış payetler, 37°C 'lik su banyosuna atılarak 25-30 saniye süre içerisinde semen çözdürüldü.

3.8. Dondurulup Çözdürülen Semen Değerlendirilmesi

Dondurulan tavşan semeni, çözdürüldükten sonra spermatolojik ve biyokimyasal parametreler yönünden değerlendirildi.

3.8.1. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Spermatolojik parametreler olarak; dondurulup çözdürülen semende motil spermatozoa oranı, canlı spermatozoa oranı, sağlam akrozomlu spermatozoa oranı ve yüksek mitokondriyal aktiviteli spermatozoa oranı değerlendirildi.



Resim 1: Spermatolojik parametrelerin değerlendirildiği floresan mikroskop odası.

3.8.1.1. Spermatozoaların Motilitesinin Değerlendirilmesi

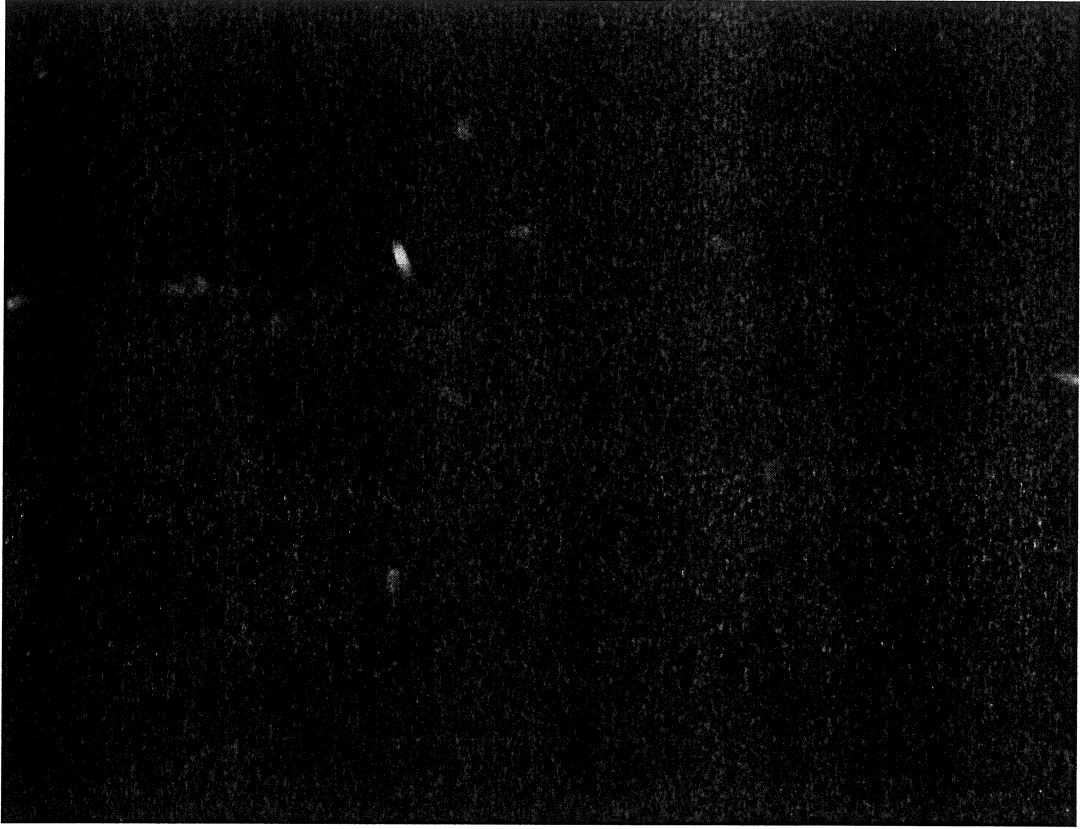
Dondurulan semen çözündürüldükten sonra; 37°C'lik ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskobunda lam üzerine pipet yardımıyla bir damla damlatılarak en az 4 değişik sahada bakılıp ve dört değer in ortalaması alınarak x400'lük büyütmede progresif motil spermatozoaların diğer spermatozoalara oranı (%) olarak değerlendirildi.

3.8.1.2. Spermatozoaların Canlılığının Değerlendirilmesi

Dondurulup çözödürölen spermatozoa canlılığının tespit etmek için SYBR-14 ve PI boyları kullanılarak floresan boyama metodu uygulandı. -20°C'de bekletilen stok halindeki floresan boylar, kullanıma hazır hale getirilmeleri için 37°C'lik su banyosunda çözödüröldü. Canlı spermatozoa oranı analizinin tüm aşamaları, floresan boyların olumsuz etkilenmemesi için karanlık bir odada yapıldı.

Semen içeren payetler 37°C'lik su banyosuna atılarak 25-30 saniye içerisinde çözdürüldü ve çözdürülen semen 37°C'lik su banyosunda bekletilen PBS ile 1:2 oranında (1 birim semen, 2 birim PBS) sulandırıldı. PBS ile sulandırılan numunenin 30 µl'si 37°C'lik su banyosunda bekletilen ependorfa aktarıldı. Sonra spermatozoaların boyanması için içerisinde semen bulunduran ependorfa; ilk önce 6 µl SYBR-14 katıldı ve sonra 2.5µl PI katıldı ve boyaların homojen karışması sağlandı. 15 dakika kadar bu şekilde 37°C'lik su banyosunda bekletildikten sonra, spermatozoa hareketlerini durdurmak ve böylelikle floresan mikroskopta incelemeye hazır hale getirmek için 10µl hancock solüsyonu katıldı.

Değerlendirme, floresan mikroskopta x400'lük büyütme ile yapıldı. Canlı spermatozoa oranı, en az 200 spermatozoa sayılarak değerlendirildi. Baş kısımları yeşil renkte boyananlar canlı (plazma membranı sağlam) spermatozoalar olarak, kırmızı renkte boyananlar ise ölü (plazma membranı hasarlı) spermatozoalar olarak değerlendirildi.



Resim 2: Spermalarda ölü-canlı spermatozoa oranının SYBR/PI boyama tekniği ile değerlendirilmesi. Baş kısmı yeşil floresan verenler, canlı spermatozoayı; baş kısmı kırmızı floresan veren hücreler, ölü spermatozoayı göstermektedir.

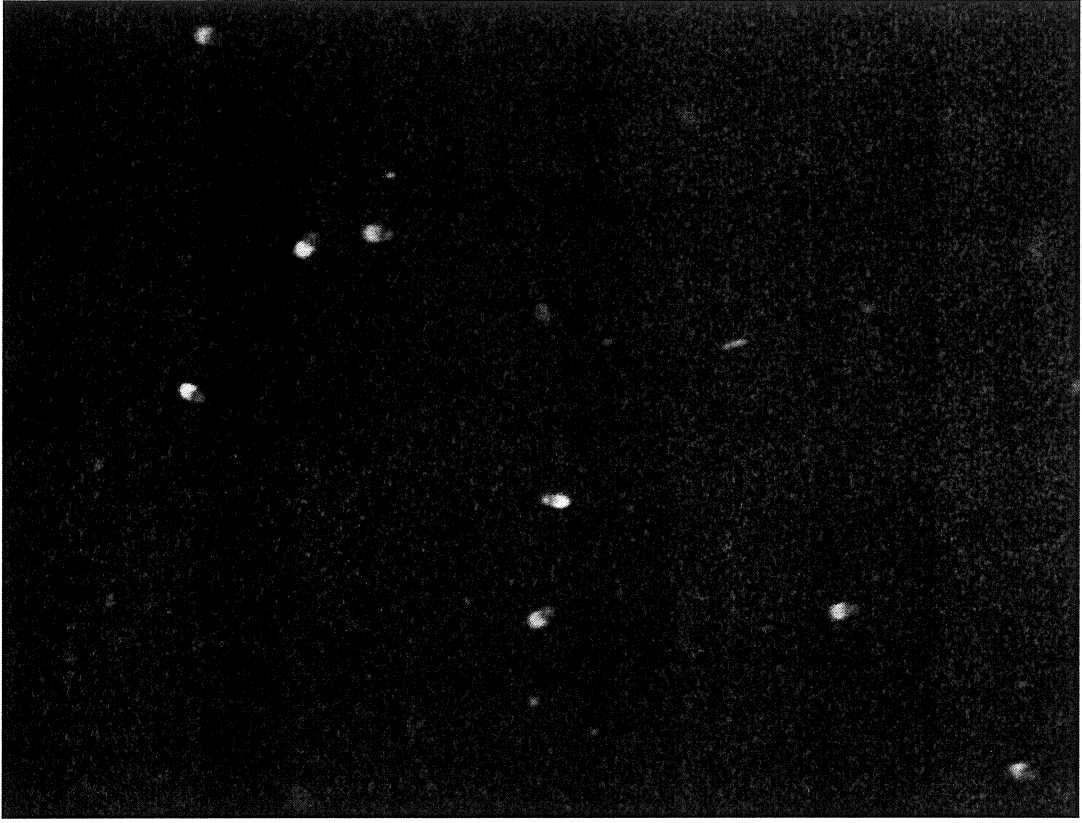
3.8.1.3. Spermatozoların Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Dondurulup-çözdürülen akrozom bütünlüğü sağlam spermatozoa oranını tespit etmek için FITCH-PNA ve PI boyaları kullanarak floresan boyama metodu uygulandı. -20°C'de bekletilen stok halindeki boyalar, kullanıma hazır hale getirilmeleri için 37°C'lik su banyosunda çözdürüldü. Sağlam akrozomlu spermatozoa oranı analizinin tüm aşamaları, floresan boyaların olumsuz etkilenmemesi için karanlık bir odada yapıldı.

İçerisinde semen bulunan payetler 37°C'lik su banyosuna atılarak içerisindeki semen 25-30 saniye içerisinde çözdürüldü ve çözdürülen semen 37°C'lik su banyosunda bekletilen PBS ile 1:2 oranında (1 birim numune, 2 birim PBS)

sulandırıldı. PBS ile sulandırılan numunenin 60µl'si 37°C'lik su banyosunda bekletilen ependorfa aktarıldı. Sonra spermatozoaların boyanması için içerisinde semen bulunduran ependorfa; ilk önce 6 µl FITCH-PNA katıldı ve sonra 2.5 µl. PI katıldı ve boyaların homojen karışması sağlandı. 15 dakika kadar bu şekilde 37°C'lik su banyosunda bekletildikten sonra, spermatozoa hareketlerini durdurmak ve böylelikle floresan mikroskopta incelemeye hazır hale getirmek için 10 µl Hancock solüsyonu katıldı.

Değerlendirme, floresan mikroskopta x400'lük büyütme ile yapıldı. Sağlam akrozumlu spermatozoa oranı, en az 200 spermatozoa sayarak değerlendirildi. Akrozomu yeşil renkte olanlar hasarlı akrozoma sahip spermatozoalar, akrozomu yeşil renkte olmayan ya da kırmızı renkte olanlar ise sağlam akrozoma sahip spermatozoalar olarak değerlendirildi.



Resim 3: Spermalarda akrozom bütünlüğünün FITCH-PNA/PI boyama tekniği ile değerlendirilmesi. Akrozom kısımları yeşil floresan veren hücreler, hasarlı akrozoma sahip spermatozoayı; akrozom kısımları yeşil floresan vermeyen ya da kırmızı floresan hücreler, sağlam akrozomu olan spermatozoayı göstermektedir.

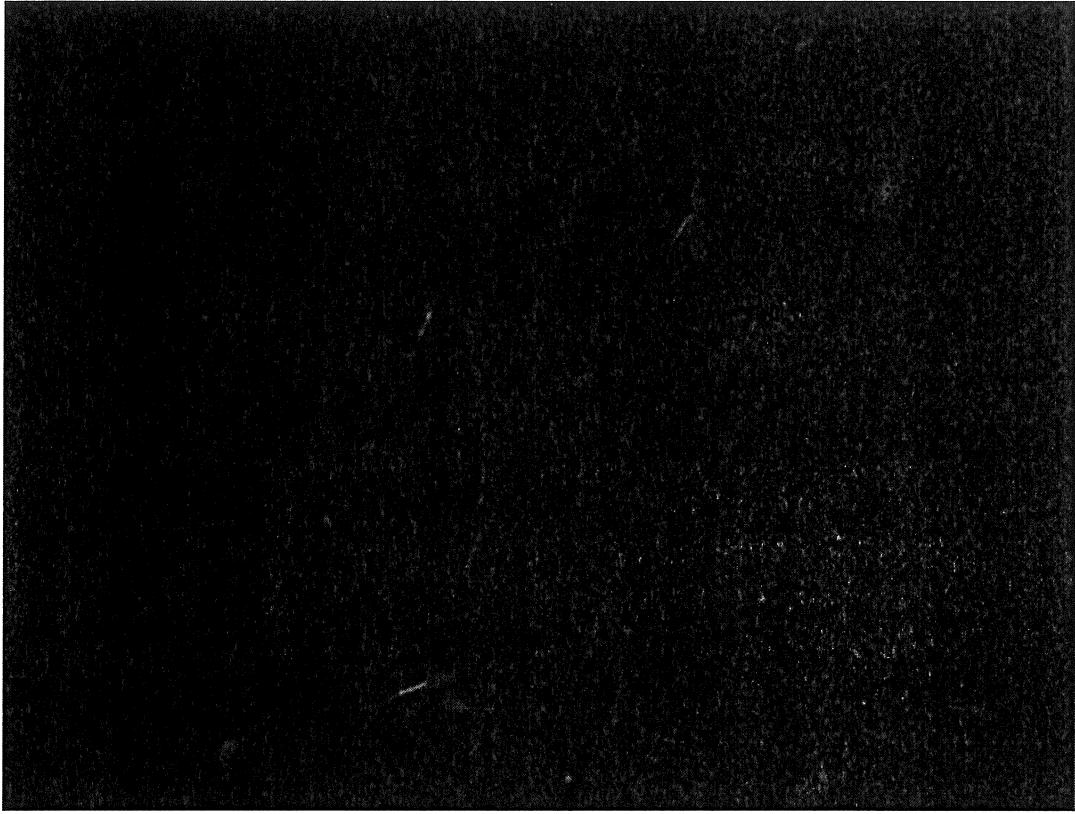
3.8.1.4. Spermatozoların Mitokondriyal Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Dondurulup çözödürölen semende yüksek mitokondriyal aktiviteye sahip spermatozoa oranını tespit etmek için JC-1 ve PI boyaları kullanarak floresan boyama metodu uygulandı. -20°C’de bekletilen stok halindeki boyalar, kullanıma hazır hale getirilmeleri için 37°C’lik su banyosunda çözödüröldü. Yüksek mitokondriyal aktiviteye sahip spermatozoa oranı analizinin tüm aşamaları, floresan boyaların olumsuz etkilenmemesi için karanlık bir odada yapıldı.

İçerisinde semen bulunan payetler 37°C’lik su banyosuna atılarak 25-30 saniye içerisinde semen çözödüröldü ve çözödürölen semen 37°C’lik su banyosunda bekletilen

PBS ile 1:2 oranında (1 birim numune, 2 birim PBS) sulandırıldı. PBS ile sulandırılan numunenin 300µl'si 37°C'lik su banyosunda bekletilen ependorfa aktarıldı. Sonra spermatozoaların boyanması için içerisinde semen bulunduran ependorfa; ilk önce 2.5µl JC-1 katıldı ve sonra 2.5µl PI katıldı ve boyaların homojen karışması sağlandı. 15 dakika kadar bu şekilde 37°C'lik su banyosunda bekletildikten sonra, spermatozoa hareketlerini durdurmak ve böylelikle floresan mikroskopta incelemeye hazır hale getirmek için 10µl Hancock solüsyonu katıldı.

Değerlendirme, floresan mikroskopta x400'lük büyütme ile yapıldı. Yüksek mitokondriyal aktiviteli spermatozoa oranı, en az 200 spermatozoa sayarak değerlendirildi. Gövdesi turuncu renkte olanlar yüksek mitokondriyal aktiviteye sahip spermatozoalar, yeşil renkte olanlar düşük mitokondriyal aktiviteye sahip spermatozoalar ve renksiz olanlar ise mitokondriyal aktiviteye sahip olmayan spermatozoalar olarak değerlendirildi.



Resim 4: Spermatozoalarda mitokondriyal aktivitenin JC-1/PI boyama tekniği ile değerlendirilmesi. Gövde kısmı turuncu floresan veren hücreler, yüksek mitokondriyal aktivite gösteren spermatozoayı; gövde kısmı yeşil floresan veren hücreler, düşük mitokondriyal aktivite gösteren spermatozoayı; gövde kısmı floresan vermeyen hücreler, mitokondriyal aktivite göstermeyen spermatozoayı göstermektedir.

3.8.2. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

İçerisinde semen bulunduran payetler 37°C'lik su banyosunda 25-30 saniye içerisinde zdrlerek semenin zdrlmesi sağlandı. zdrlen semende semen ile spermatozoaları birbirlerinden ayırmak için, oda sıcaklığında 10 dakika süre içerisinde 1500 devirde santrifüj uygulandı ve spermatozoaların dibe çökmesi sağlandı. Dipteki spermatozoalar PBS ile 3 kez yıkandı ve PBS ile 0.5 ml.ye tamamlandı. Spermatozoaların parçalanmasını sağlamak amacıyla sperm süspansiyonu, içerisinde buz kalıpları bulunduran sonikasyon cihazında buz kalıbının üzerine konuldu ve 10 sn. süre içerisinde sonikasyon uygulandı. Her uygulamanın

sonunda 30 sn. kadar buz kalıbıyla temas ettirmek suretiyle işlem 6 kez tekrarlandı. Sonikasyon uygulaması sonrası numune iki kısma ayrıldı. Ayrılan bir kısım lipid peroksidasyon analizi içindi, diğer kısım ise diğer biyokimyasal analizlerin yapılması içindi. Lipid peroksidasyon analizi için, 120µl homojenat alınıp üzerine 10µl 0.5 mM butil hidroksi toluen (BHT) ilave edilip karıştırıldı ve analiz yapılncaya dek -86 °C’de bekletildi. Kalan homojenat +4°C’de 8000 devirde 15 dakika kadar santrifüj edildi ve süpernatantlar antioksidan kapasite ve total redükte glutatyon analizleri için -86°C’de saklandı.



Resim 5: Spermatozoaların parçalanmasında kullanılan sonikasyon cihazı

3.8.2.1. Lipid Peroksidasyon (LPO) Ürünlerinin Analizi

Lipid peroksidasyon ürünleri düzeyi, lipid peroksidasyon kiti ile belirlendi.

Analiz, 45°C’de N-metil-2-fenilindol adlı kromojen maddenin malondialdehit (MDA) ve lipid peroksidasyon ürünlerinden birisi olan 4-hidroksialkenal ile reaksiyonuna dayanmaktadır. Bir mol MDA veya 4-hidroksialkenal, 2 molekül N-metil-2-fenilindol ile asetonitril içinde reaksiyona girmekte ve 586 nm.de dayanıklı bir kromofor meydana getirmektedir. Sonuçlar 10^9 spermatozoa/ml için μ mol olarak ortaya konuldu.

3.8.2.2. Total Redükte Glutasyon (GSH) Düzeyinin Analizi

Metod, kromoforik tion oluşumu temeline dayanmaktadır. Numune tamponlanır ve okside glutasyonu (GSSG) redükte duruma (GSH) getirmek için tris (2-karboksietil) fosfin eklenir. Numuneye 4-kloro-1-metil-7-triflorometil-quinolinyum metilsülfat adlı kromojen eklenir. Baz ilavesiyle pH’nin 13’ü geçmesine dayanılarak; GSH-tioetere spesifik β -eliminasyon, kromoforik tion bileşiği ortaya çıkartır. Toplam GSH düzeyi, spektrofotometri ile 420 nm.de ölçüldü ve bulgular 10^9 spermatozoa/ml için μ mol olarak ortaya konuldu.

3.8.2.3. Total Antioksidan Kapasite Analizi

Metod, numunede bulunan tüm antioksidanların kombine etkisiyle Cu^{+2} ’nın Cu^{+} ’ya redüksiyonu temeline dayanmaktadır. Kromojenik reagent olan Bathocuproine (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolin) 490 nm.de maksimum absorbansa sahip olan Cu^{+} ile 2:1 oranında selektif kompleks oluşturur. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için ürik asit konsantrasyonunun standardı kullanıldı. Total antioksidan potansiyeli, spektrofotometri ile 490nm.de ölçüldü ve bulgular 10^9 spermatozoa/ml için mmol olarak ortaya konuldu.

3.9. Bulguların İstatiksel Analizi

Çalışma 6 kez tekrarlandı ve bulgular, ortalama olarak alındı. İstatiksel analiz, İstatistik programı olarak SPSS 15.0 for Windows software Social Sciences Version kullanıldı. İstatiksel analizlerde farklı grupların karşılaştırılmasında varyans analizi (ANOVA), aralarında önemli farklılık bulunan ikiden fazla grubu karşılaştırmak için Duncan çoklu aralık testi uygulandı. Farklılığın $p < 0.05$ olması, önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Dondurulup Çözdürülen Semende Spermatolojik Parametrelerin Analizi

Spermatolojik parametre olarak; motil spermatozoa oranı, canlı spermatozoa oranı, akrozom bütünlüğü sağlam olan spermatozoa oranı ve yüksek mitokondriyal aktiviteli spermatozoa oranı değerlendirildi. Motil spermatozoa analizi faz-kontrast mikroskobunda, diğer spermatolojik parametreler ise floresan mikroskopta analiz edildi.

4.1.1. Spermatozoaların Motilitesinin Analizi

Tablo 1: Dondurulup çözdürülen semende ortalama spermatozoa motilitesi

Gruplar	Çözdürme sonu ortalama motilite (%) (ortalama $\pm$ standart sapma (SD))
Kontrol	19 $\pm$ 10.24 ^a
Arjinin	30 $\pm$ 9.35 ^{ab}
Ellajik asit	26 $\pm$ 10.83 ^{ab}
Metionin	28 $\pm$ 10.36 ^{ab}
Sisteamin	35 $\pm$ 6.12 ^b
P	*
^a : Düzeyi düşüktür. ^{ab} : Düzeyi istatistiksel açıdan; ‘ ^a ’ya göre önemli olmamak kaydıyla yüksektir, ‘ ^b ’ye göre ise önemli olmamak kaydıyla düşüktür. ^b : Düzeyi istatistiksel açıdan; ‘ ^a ’ya göre önemli olmak kaydıyla yüksektir, ‘ ^{ab} ’ye göre ise önemli olmamak kaydıyla yüksektir. (* p < 0.05)	

Motil spermatozoa oranını kontrol (%19.00) grubuna kıyasla; arjinin (%30.00), ellajik asit (%26.00) ve metionin (%28.00) gruplarında önemsiz düzeyde yüksek, sisteamin (%35.00) grubunda ise önemli düzeyde yüksek tespit ettik. Arjinin grubunda (%30.00); kontrol grubuna (%19.00) göre önemsiz düzeyde yüksek, ellajik asit (%26.00) ve metionin (%28.00) gruplarıyla istatistiksel açıdan aynı, sisteamin grubuna (%35.00) göre ise önemsiz düzeyde tespit ettik. Ellajik asit grubunda (%26.00); kontrol grubuna (%19.00) göre önemsiz düzeyde yüksek, arjinin (%30.00) ve metionin (%28.00) grubuyla istatistiksel açıdan aynı, sisteamin (%35.00) grubuna göre ise önemsiz düzeyde düşük tespit ettik. Metionin (%28.00) grubunda; kontrol grubuna (%19.00) göre önemsiz düzeyde yüksek, ellajik asit (%26.00) ve arjinin (%30.00) grubuyla istatistiksel açıdan aynı, sisteamin (%35.00) grubuna göre önemsiz düzeyde düşük tespit ettik. Sisteamin (%35.00) grubunda; kontrole (%19.00) göre önemli düzeyde yüksek, arjinin (%30.00), ellajik asit (%26.00) ve metionin (%28.00) gruplarına göre önemsiz düzeyde yüksek tespit ettik.

4.1.2. Spermatozoların Canlılığının Analizi

Tablo 2: Dondurulup-çözdürülen semende ortalama canlı spermatozoa oranı

Gruplar	Çözüm sonu ortalama spermatozoa canlılığı (%) (ortalama $\pm$ standart sapma (SD))
Kontrol	24.98 $\pm$ 3.08
Arjinin	25.42 $\pm$ 7.67
Ellajik asit	25.68 $\pm$ 9.51
Metionin	26.68 $\pm$ 8.52
Sisteamin	31.80 $\pm$ 7.76
P	*
(* p < 0.05)	

Canlı spermatozoa oranını kontrol grubuna (% 24.98) kıyasla; arjinin grubunda (% 25.42), ellajik asit grubunda (% 25.68), metionin grubunda (% 26.68) ve sisteamin grubunda (%31.80) istatistiksel açıdan aynıydı. Antioksidan grupları arasındaki canlı spermatozoa oranı da istatistiksel açıdan aynı idi.

4.1.3. Spermatozoaların Akrozom Bütünlüğünün Analizi

Tablo 3: Dondurulup-çözdürülen semende akrozom bütünlüğü sağlam spermatozoaların oranı

Gruplar	Çözüm sonu ortalama akrozom bütünlüğü (%) (ortalama $\pm$ standart sapma (SD))
Kontrol	26.06 $\pm$ 10.93
Arjinin	36.82 $\pm$ 9.76
Ellajik asit	25.52 $\pm$ 2.84
Metionin	27.98 $\pm$ 7.29
Sisteamin	33.60 $\pm$ 8.01
P	*
(* p < 0.05)	

Akrozom bütünlüğü korunmuş (akrozomu sağlam) spermatozoa oranını kontrol grubu (%26.06) kıyasla; ellajik asit grubunda (%25.52); metionin grubunda (%27.98), sisteamin grubunda (%33.60) ve arjinin grubunda (%36.82) istatistiksel açıdan aynı düzeyde tespit ettik. Antioksidan grupları arasındaki sağlam akrozomlu spermatozoa oranı da istatistiksel açıdan aynı idi.

4.1.4. Spermatozoaların Mitokondriyal Aktivitesinin Analizi

Tablo 4: Dondurulup-çözdürülen semende mitokondriyal aktivitesi yüksek spermatozoaların oranı

Gruplar	Çözüm sonu ortalama yüksek mitokondriyal aktivite (%) (ortalama $\pm$ standart sapma (SD))
Kontrol	16.52 $\pm$ 4.45 ^{ab}
Arjinin	22.46 $\pm$ 8.08 ^b
Ellajik asit	6.36 $\pm$ 6.08 ^a
Metionin	16.36 $\pm$ 5.67 ^{ab}
Sisteamin	26.18 $\pm$ 7.50 ^b
P	*
^a : Düzeyi düşüktür. ^{ab} : Düzeyi istatistiksel açıdan; ^a ya göre önemli olmamak kaydıyla yüksektir, ^b ye göre ise önemli olmamak kaydıyla düşüktür. ^b : Düzeyi istatistiksel açıdan; ^a ya göre önemli olmak kaydıyla yüksektir, ^{ab} ye göre ise önemli olmamak kaydıyla yüksektir. (* p < 0.05)	

Yüksek mitokondriyal aktiviteli spermatozoa oranını kontrol grubuna (%16.52) kıyasla; ellajik asit grubunda (%6.36) önemsiz düzeyde düşük, metionin grubunda (%16.36) istatistiksel açıdan aynı, arjinin grubunda (%22.46) ve sisteamin grubunda (%26.18) önemsiz düzeyde yüksek tespit ettik. Arjinin grubunda (%22.46); ellajik asit grubuna (%6.36) göre önemli düzeyde yüksek, metionin grubuna (%16.36) ve kontrol grubuna (%16.52) göre önemsiz düzeyde yüksek, sisteamin grubuyla (%26.18) istatistiksel açıdan aynı düzeyde yüksek mitokondriyal aktiviteli spermatozoa oranı tespit ettik. Ellajik asit grubunda (%6.36); metionin grubuna (%16.36) ve kontrol grubuna (%16.52) göre önemsiz düzeyde düşük, arjinin grubuna (%22.46) ve sisteamin grubuna (%26.18) göre önemli düzeyde düşük mitokondriyal aktivitesi yüksek spermatozoa oranı tespit ettik. Metionin grubunda (%16.36); ellajik asit grubuna (%6.36) göre önemsiz düzeyde yüksek, kontrol grubuyla (%16.52)

istatistiksel açıdan aynı, arjinin grubuna (%22.46) ve sisteamin grubuna (%26.18) göre önemsiz düzeyde düşük mitokondriyal aktivitesi yüksek spermatozoa oranı tespit ettik. Sisteamin grubunda; ellajik asit grubuna (%6.36) göre önemli düzeyde yüksek, kontrol grubuna (%16.52) ve metionin grubuna (%16.36) göre önemsiz düzeyde yüksek, arjinin grubuyla (%22.46) istatistiksel açıdan aynı düzeyde yüksek mitokondriyal aktiviteli spermatozoa oranı tespit ettik.

4.2. Dondurulup Çözdürülen Semende Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Oksidatif stres parametreleri olarak; MDA, total redükte glutatyon ve total antioksidan kapasite düzeyleri spektrofotometre ile analiz edildi.

4.2.1. Lipid Peroksidasyon (LPO) Ürünlerinin Analizi

Tablo 5: Semen in dondurulup-çözdürülmesi sonrası ortalama lipid peroksidasyon düzeyi

Gruplar	Çözüm sonu ortalama MDA düzeyi ($\mu\text{M} \times 10^9$ spermatozoa) (ortalama $\pm$ standart sapma)
Kontrol	203.9 $\pm$ 68.2
Arjinin	169.4 $\pm$ 45.89
Ellajik asit	219.3 $\pm$ 46.9
Metionin	202.3 $\pm$ 75.7
Sisteamin	222 $\pm$ 86.3
P	*
(* p < 0.05)	

MDA düzeyini kontrol grubuna (203.9 $\mu\text{M} \times 10^9$ spermatozoa) kıyasla; arjinin grubunda (169.4 $\mu\text{M} \times 10^9$ spermatozoa), metionin grubunda (202.3 $\mu\text{M} \times 10^9$ spermatozoa), ellajik asit grubunda (219.3 $\mu\text{M} \times 10^9$ spermatozoa) ve sisteamin grubunda (222 $\mu\text{M} \times 10^9$ spermatozoa) istatistiksel açıdan aynı düzeyde tespit ettik. Antioksidan gruplar arasında MDA düzeyi istatistiksel açıdan aynı idi.

4.2.2. Total Redükte Glutasyon (GSH) Düzeyinin Analizi

Tablo 6: Semen in dondurulup-çözdürülmesi sonrası ortalama total redükte glutasyon düzeyi

Gruplar	Çözüm sonu ortalama total redükte glutasyon (GSH) düzeyi (mMx10 ⁹ spermatozoa) (ortalama ± standart sapma)
Kontrol	2.6 ± 0.77 ^b
Arjinin	2.4 ± 0.23 ^b
Ellajik asit	1.8 ± 0.4 ^a
Metionin	2.7 ± 0.28 ^b
Sisteamin	2.6 ± 0.74 ^b
P	*
^a : Düzeyi düşüktür. ^b : Düzeyi istatistiksel açıdan; “ ^a ”ya göre önemli olmak kaydıyla yüksektir. (*p < 0.05)	

Total redükte glutasyon düzeyini kontrol grubuna (2.6 mMx10⁹ spermatozoa) kıyasla; ellajik asit grubunda (1.8 mMx10⁹ spermatozoa) önemli düzeyde düşük; arjinin grubu (2.4 mMx10⁹ spermatozoa), sisteamin grubu (2.6 mMx10⁹ spermatozoa) ve metionin grubuyla (2.7 mMx10⁹ spermatozoa) istatistiksel açıdan aynı tespit ettik. Arjinin grubunda (2.4 mMx10⁹ spermatozoa); ellajik asit (1.8 mMx10⁹ spermatozoa) grubuna göre önemli düzeyde yüksek; kontrol grubu (2.6 mMx10⁹ spermatozoa), sisteamin grubu (2.6 mMx10⁹ spermatozoa) ve metionin grubuyla (2.7 mMx10⁹ spermatozoa) istatistiksel açıdan aynı düzeyde total redükte glutasyon konsantrasyonu tespit ettik. Ellajik asit grubunda (1.8 mMx10⁹ spermatozoa); arjinin grubuna (2.4 mMx10⁹ spermatozoa), kontrol grubuna (2.6 mMx10⁹ spermatozoa), sisteamin grubuna (2.6 mMx10⁹ spermatozoa) ve metionin grubuna (2.7 mMx10⁹ spermatozoa) göre önemli düzeyde düşük total redükte glutasyon konsantrasyonu

tespit ettik. Metionin grubunda ($2.7 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa); ellajik asit grubuna ($1.8 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) göre önemli düzeyde yüksek; arjinin grubu ($2.4 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa), kontrol grubu ($2.6 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) ve sisteamin grubuyla ($2.6 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) istatistiksel açıdan aynı düzeyde total redükte glutatyon konsantrasyonu tespit ettik. Sisteamin grubunda ($2.6 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa); ellajik asit grubuna ($1.8 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) göre önemli ölçüde yüksek; arjinin grubu ($2.4 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa), kontrol grubu ($2.6 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) ve metionin grubuyla ($2.7 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) istatistiksel açıdan aynı düzeyde total redükte glutatyon konsantrasyonu tespit ettik.

4.2.3. Total Antioksidan Kapasite Analizi

Tablo 7: Semen dondurulup-çözdürülmesi sonrası ortalama total antioksidan kapasite

Gruplar	Çözüm sonu ortalama total antioksidan düzeyi ($\text{mM} \times 10^9$ spermatozoa) (ortalama $\pm$ standart sapma)
Kontrol	111.2 ± 19.5^{ab}
Arjinin	102.1 ± 27.5^{ab}
Ellajik asit	89.7 ± 28.4^a
Metionin	125.3 ± 24.7^b
Sisteamin	118.2 ± 19.9^{ab}
P	*
^a : Düzeyi düşüktür. ^{ab} : Düzeyi istatistiksel açıdan; ^a ya göre önemli olmamak kaydıyla yüksektir, ^b ye göre ise önemli olmamak kaydıyla düşüktür. ^b : Düzeyi istatistiksel açıdan; ^a ya göre önemli olmak kaydıyla yüksektir, ^{ab} ye göre ise önemli olmamak kaydıyla yüksektir. (* $p < 0.05$)	

Total antioksidan kapasiteyi kontrol grubuna ($111.2 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) kıyasla; ellajik asit grubuna ($89.7 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) göre önemsiz düzeyde

yüksek, arjinin grubu ($102.1 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) ve sisteamin grubuyla ($118.2 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) istatistiksel açıdan aynı, metionin grubuna ($125.3 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) göre düşük düzeyde tespit ettik. Arjinin grubunda ($102.1 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa); ellajik asit grubuna ($89.7 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) göre önemsiz düzeyde yüksek, kontrol grubu ($111.2 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) ve sisteamin grubuyla ($118.2 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) hemen hemen aynı, metionin grubuna ($125.3 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) göre önemsiz düzeyde düşük total antioksidan kapasite düzeyi tespit ettik. Ellajik asit grubunda ($89.7 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa); kontrol ($111.2 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa), arjinin ($102.1 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) ve sisteamin grubuna ($118.2 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) göre önemsiz düzeyde düşük; metionin grubuna ($125.3 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) göre önemli düzeyde düşük total antioksidan kapasite düzeyi tespit ettik. Metionin grubunda ($125.3 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa); ellajik asit grubuna ($89.7 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) göre önemli düzeyde yüksek; kontrol grubuna ($111.2 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa), arjinin grubuna ($102.1 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) ve sisteamin grubuna ($118.2 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) göre önemsiz düzeyde yüksek total antioksidan kapasite düzeyi tespit ettik. Sisteamin grubunda ($118.2 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa); ellajik asit grubuna ($89.7 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) göre önemsiz düzeyde yüksek, kontrol grubu ($111.2 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) ve arjinin grubuyla ($102.1 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) istatistiksel açıdan aynı, metionin grubuna ($125.3 \text{ mM} \times 10^9$ spermatozoa) göre önemsiz düzeyde düşük total antioksidan düzeyi tespit ettik.

5.TARTIŞMA

Ülkemizde infertilite özellikle de erkek infertilitesi açısından ciddi sosyal ve kültürel sıkıntı olarak yaşanmaktadır. Benzer şekilde tıbbi veya sosyal sebepler yüzünden kişilerin spermelerini dondurup daha sonra istedikleri zaman baba olabilmek isteklerinde ve ihtiyaçlarında son teknik gelişmelere paralel olarak ciddi artışlar olmaktadır. Bu nedenle tüp bebek merkezlerinde son yıllarda sperm kalitesini arttırmak ve sperm kriyoprezervasyon işleminde maksimum etkinliği elde edebilmek amacıyla yapılan çalışmalar hız ve önem kazanmaktadır.

Son yıllarda bölgemiz olan Hatay/Antakya yöresinde daha da belirgin olmak üzere sperm kriyoprezervasyonu için hasta taleplerinde bir artış izlenmektedir. Spermatolojik fonksiyonları sağlıklı ve çocuk sahibi olmayı düşünen, ancak gonadotoksik kemoterapi tedavisi alacak veya gonadları etkileyen tümörle karşı karşıya kalmış bireyler; tedavileri sonrası fertilizasyon yeteneklerini korumak ya da farklı sosyal sebepler nedeniyle, semenlerinin kriyoprezerve edilmesi amacıyla tüp-bebek merkezlerine daha sık oranda başvurmaya başlamışlardır. Bu sebeplerden dolayı, semen kriyoprezervasyonunun etkinliğinin artırılmasının gerektiği açıktır.

İnsan spermatozoasının plazma membranında kolesterol/fosfolipid oranı yüksektir. Tavşan spermatozoasının plazma membranında da diğer çiftlik hayvanları türlerine kıyasla kolesterol/fosfolipid oranı yüksektir. Plazma membranında kolesterol/fosfolipid oranının yüksek olması, kriyoprezervasyon hasarına karşı spermatozoayı nispeten dirençli kılar (2). İnsan spermatozoası ile tavşan spermatozoası arasındaki bu benzerlikten yola çıkarak, tavşan semeninde yapılacak kriyoprezervasyonun etkinliği ortaya konulduğunda, insan semen kriyoprezervasyonunun etkinliğinin artırılmasına kapı aralayacağına inanarak bu çalışmayı planladık.

Semenin dondurulması, soğuk şokuna ve oksidatif strese yol açmakta ve spermatozoanın plazma membranı üzerinde kalıcı hasarlara neden olmaktadır. Semen sulandırılması ve dondurulması seminal plazmada ve spermatozoada antioksidan seviyelerinin düşmesine neden olduğundan, dondurulan semen oksidatif strese duyarlı hale gelir. spermatozoanın plazma membranı ve akrozomu, dondurulma esnasında gelişen soğuk şokundan ilk etkilenen yerlerdir (119, 120). Spermatozoadaki membran yapıları (plazma membranı, dış akrozomal membran ve mitokondri membranı), dondurma ve çözündürme işlemine karşı son derece duyarlıdır. Membran yapıları akıcı mozaik tarzında düzenlenmiş olup, protein, glikoprotein ve glikolipitlerle bezenmiş iki sıralı fosfolipit katmanından ibarettir. Bu yapıların termodinamik özellikte ve % 65-70 oranında doymamış fosfolipitlerden ibaret olması; soğutulmaları süresince irriversibl olarak sıvı fazdan jel fazına geçmelerine neden olmaktadır (121, 122). Gelişen faz değişimi, membranda yer alan enzimlerin kinetiğinde değişime neden olarak çözündürülme sonrasında canlılığı azaltmaktadır. Bu değişimlerin sonucu stabilizasyon bozulur ve hücrede soğuk şoku hasarı meydana gelir (31).

Soğutma, dondurma ve çözündürme esnasında ortaya çıkan osmotik basınçtaki ve sıcaklıktaki değişiklikler; spermatozoanın plazma membranlarında lipid kompozisyonunu, kalsiyum akışını, membran geçirgenliğini ve bütünlüğünü etkileyerek mekanik strese sebep olmaktadır (119, 120). Plazma membranlarındaki dejenerasyona bağlı olarak spermatozoada katyon kaybı ve antioksidan enzim kaybı oluşmaktadır (123). Böylelikle hücre membranlarının kalsiyum geçirgenliği bozulmakta, spermatozoanın metabolik aktivitesi ve fonksiyonları (motilite, canlılık, membran bütünlüğü vb.) kalıcı şekilde olumsuz etkilenmektedir (124, 125). Dolayısıyla düşük motiliteye sahip spermatozoa dişi genital kanalında kolay ilerleyememekte ve in-vivo kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon gibi aşamalar olumsuz etkilenmektedir (121, 126).

Semenin dondurulması-çözdürülmesi esnasında oluşan membran lipid faz değişimi, osmotik-mekanik stres ve ortamdaki serbest oksijen temelinde gelişen lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikalleri (ROS); membranlarda denatürasyona, hücre organellerinde yapısal deformasyonlara, DNA'da kırılmalara ve hücresel lizise neden olmaktadır. Lipid peroksidasyon ürünleri; büyük oranda membran yapılarındaki doymamış yağ asitlerinden, az miktarda da membrandaki glikolipitlerden, fosfolipitlerden ve kolesterolden köken almaktadır.

Semenin dondurulması-çözdürülmesi sırasında oluşan ROS, endojen antioksidan savunma sisteminin etkinliğini azaltarak fertilitiyi olumsuz etkilemektedir. ROS'un düşük konsantrasyonları; hiperaktivasyon, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi spermatozoanın fizyolojik süreçlerinde önemli rol alır. Ancak, yüksek miktarda üretilmesi spermatolojik fonksiyonları olumsuz yönde etkilemektedir (3).

Serbest oksijen radikallerinin toksik etkilerine karşı koymak için, spermatozoa ve seminal plazma birtakım antioksidanlar içermektedir. Bu antioksidanların bir kısmı enzim (CAT, SOD, GPx) vasfındadır, bir kısmı ROS ürünlerini temizleyicidir (albumin, taurin, vitamin E gibi), bir kısmı ise zincir reaksiyonlarını kırıcı (vitamin E, vitamin C, ürik asit, tiol bileşikler gibi) özelliğindedir (66, 67). Fakat bu antioksidan sisteminin kapasitesi, ROS ürünlerinin olası toksik etkilerine ve oksidatif hasara karşı koymada yeterli değildir (6). Spermatozoanın antioksidan kapasitesinin düşük olması, plazma membranının doymamış yağ asitlerince zengin olması, DNA tamir yetisinin yetersiz olması gibi nedenlerden dolayı spermatozoa; dondurmanın ve çözdürmenin meydana getirdiği hasarları önlemede yetersiz kalır (7). Bu nedenle spermatozoadaki dondurma ve çözdürme esnasında meydana gelebilecek olan hasarları minimize etmek için; semen sulandırıcılarına koruyucu ve antioksidan özellikli maddeler eklenmektedir. Literatüre baktığımızda tavşan semenini dondurma ve çözdürmeden kaynaklanan hasara karşı korumaya ilişkin; çok az sayıda çalışma yapılmıştır ve antioksidan

etkinlikleri kanıtlanmış olan arjinin, ellajik asit, metionin ve sisteaminin kullanıldığı hiçbir çalışma yapılmamıştır. Bu sebeplerden dolayı bu çalışmamızda bu konu üzerine yöneldik ve antioksidan olarak arjinin, ellajik asit, metionin ve sisteamini tercih ettik.

Arjinin, spermatogenezise aktif olarak katılır. Spermatozoa motilitesinin stimüle edilmesinde önemli rol üstlenir. Spermatozoada glikoliz hızını arttırarak ATP üretimini arttırır. Savunma ve hücrel immünitenin modüle edilmesinde anahtar rol üstlenir. L-arjininin spermatozoa üzerine etkisi, primer olarak NO üretimi aracılığı ile olduğu bildirilmektedir (96). L-arjinin, keçi spermatozoasını lipid peroksidasyona karşı korumaktadır (127). Tüm bu özellikler arjininin, kriyoprotektif bir ajan olabileceğini desteklemektedir.

Ellajik asit; doğal fenolik bir bileşiktir. Kuvvetli bir antioksidandır, antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklere de sahiptir (112). Tüm bunlar ellajik asitin, kriyoprotektif ajan olabileceğini düşündürdü.

Metionin; hücreleri oksidatif hasardan korur ve detoksifikasyonda önemli rol oynar, şelatları dokulardan uzaklaştırır (107). Ayrıca metioninin önemli bir etkisi de serbest oksijen radikallerinin redüksiyonunda önemli rol oynamasıdır (108). Tüm bu özellikler metioninin, oksidatif stres altındaki hücre ve dokuların oksidasyondan korunması için antioksidan sistemi olarak görev yaptığını göstermektedir.

Sisteamin, kimyasal olarak trietanolamin (β -markaptoetilamin) yapısında olup, vücutta sisteinin dekarboksilasyonu ile oluşmaktadır. Sisteine dönüşerek glutatyonun yapısına girer, böylelikle hücre savunma sisteminde rol oynar (102). Bu özelliği, sisteaminin spermatozoadaki antioksidan kapasiteyi arttırabileceğini desteklemektedir.

Bu çalışmada; tavşan semeni dondurmadan önce sulandırıcıya 5 mM dozunda katılan arjinin, ellajik asit, metionin ve sisteaminin dondurulup çözödürölen tavşan semeninde spermatolojik ve oksidatif stres parametreleri üzerine etkilerini değöerlendirdik.

Çalışmamızda spermatolojik parametre olarak; faz-kontrast mikroskopunda motil spermatozoa oranını ve floresan mikroskopta canlı spermatozoaların oranını, sağlam akrozomlu spermatozoaların oranını ve yüksek mitokondriyal aktiviteye sahip spermatozoaların oranını değerlendirdik.

Spermatozoanın motilite oranı, faz-kontrast mikroskopunda kolaylıkla değerlendirilebilen bir parametredir. Semende dört farklı hareket paternine sahip spermatozoa vardır: Hareketsiz ya immotil spermatozoa, yerinde hareketli spermatozoa, ileriye doğru yavaş hareket eden spermatozoa ve ileriye doğru hızlı hareket eden spermatozoa (128). Çalışmalarda motilite oranı, semen numunesinde ileriye doğru düzgün doğrusal hareket eden spermatozoaların diğer spermatozoalara oranı olarak tanımlanmaktadır. Spermatozoa motilitesi ile fertilizasyon arasında pozitif bir ilişki vardır (129).

Çalışmamızda semeni dondurup-çözdürme sonunda motil spermatozoa oranı değerlendirildiğinde; kontrol grubuna göre (%19.00) tüm antioksidan grupları ile çözüm sonunda daha yüksek motil spermatozoa oranı tespit edildi. Kontrol grubuna göre artış; ellajik asit (%26.00), metionin (%28.00) ve arjinin (%30.00) gruplarında önemsiz düzeyde iken, sisteamin grubunda (%35.00) önemli düzeyde idi. Elde ettiğimiz en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranı (%35.00); Kozdrowski ve arkadaşlarının elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%14.20), Vidues de Castro ve Cortell'in elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%16.2), Safaa ve arkadaşlarının elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%18.10), Jimenez ve arkadaşlarının elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%20.2) ve Rosato ve arkadaşlarının elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%24) yüksekti (40, 45, 55, 130, 131). Elde ettiğimiz en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranı (%35.00), Vidues de Castro ve arkadaşlarının elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranı (%35.00) ile aynı idi (57). Elde ettiğimiz en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranı (%35.00); Iaffaldano ve arkadaşlarının (2012) elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından

(%35.38), Si ve arkadaşlarının elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%36.3), Kahiwazaki ve arkadaşlarının (2006) elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%37.80), Arriola ve Foote'nin (2001) elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%38), Bamba ve arkadaşlarının (1990) elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%38.7), Moce ve arkadaşlarının (2010) elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranı (%40.00), Chen ve arkadaşlarının (1989) elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%40), Chen ve arkadaşlarının (1989) elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%40), Graham ve Dalimata'nın (1997) elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%46), Hanada ve Nagase'nin (1980) elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%53.00), Vicente ve Vidues de Castro'nun (1996) elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%53.00), Vicente ve arkadaşlarının (2003) elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%54) ve Vidues de Castro ve Vicente'nin (1996) elde ettiği en yüksek çözüm sonu motil spermatozoa oranından (%57) düşüktü (47, 53, 39, 51, 44, 132, 133, 134, 50, 46, 135, 52, 48). Diğer araştırmacıların bulgularıyla bizim bulgularımız arasındaki farklılık; kullanılan antioksidan ve sulandırıcı, uygulanan ekilibrasyon zamanı ve çözündürme sıcaklığı arasındaki farklılıklardan kaynaklanabilir. Dondurulup-çözdürülen tavşan semeninde %57 ile en yüksek spermatozoa motilite oranı elde eden Vidues de Castro ve Vicente (1996) yaptıkları çalışmada; 250 mM tris (tris-[hidroksimetilaminometan]), 83 mM sitrik asit, 3.5 M DMSO, 0.1 M süktroz, 1000 U/L penisilin ve 1000 µgr/ml streptomisin içeren sulandırıcı ile oda sıcaklığında semeni 1:1 oranında dilüe etmişler ve 0.25 ml.lik payetlere dilüe semeni aspire etmişler. Sonra payetleri 30 dakikalığına 5°C'de ekilibre etmişler. Daha sonra 15 dakikalığına -30°C'de bekletmişler ve sıvı nitrojene atmışlar. En sonunda, payetleri 40°C'de 15 sn.nin sonunda çözdürmüşler (48).

Dondurup-çözdürme esnasında spermatozoanın primer etkilenen yerlerinden birisi plazma membranıdır (1). Plazma membranının poliansatüre yağ asitlerince

zengin olması spermatozoayı, dondurup-çözdürme esnasında meydana gelen oksidasyona duyarlılaştırır. Oksidasyon ise spermatozoanın plazma membran bütünlüğünü bozar (7). Plazma membran bütünlüğü hasarlanmış olan spermatozoanın ölü, hasarlanmamış olanın ise canlı olduğu kabul edilmektedir. Plazma membran bütünlüğü birçok şekilde değerlendirilebilir. Plazma membran bütünlüğü; vizüel olarak, florometrik olarak ve flow sitometri ile değerlendirilebilir.

Vizüel gözlemlerde spermatozoanın plazma membranı, ışık ya da floresan mikroskop ile değerlendirilebilir. Bunun için; hipoosmotik şişme testi (HOST testi) yapılabilir, kuru semen yaymalarında eozin-nigrosin ya da eozin anilin boyaması yapılabilir, PI boyası ile karboksifloressein asetat (CFDA) boyasının kombinasyonu yapılabilir, PI boyası ile SYBR-14 boyasının kombinasyonu yapılabilir.

Florometri metodunda ise, semen numunesinde membranı sağlam hücrelerin oranı indirekt yolla değerlendirilmektedir. Bu teknikte; hasarlı membrana sahip hücrelerin DNA'sına bağlanarak bu membranı hasarlı hücrelerin floresan yaymasına neden olan ethidyum bromid, diamidino-fenilindol dihidroklorid (DAPI) ya da Hoechst 33258 gibi membranı normal şartlarda membranı geçemeyen floresan proplarlar semene eklenir. Sonrasında numune, sadece ölü hücrelerin floresan vermesini sağlayan florometri ile değerlendirilir. Daha sonra tüm hücrelere geçebilen digitonin eklenir ve numune ikinci kez değerlendirilir. En sonunda ilk analizin floresan yoğunluğunun ikinci analizdeki floresan yoğunluğa oranı, numunedeki ölü hücrelerin oranını ortaya çıkarır.

Flow sitometri metodunda; CFDA ile PI boyalarının kombinasyonu ya da SYBR-14 ile PI boyalarının kombinasyonu kullanılarak semen numunesindeki membranı sağlam hücrelerin oranı direkt olarak tespit edilebilir (136).

Yaptığımız çalışmada canlı spermatozoaların oranını değerlendirmek için, Çoyan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı örnek alarak SYBR-14 ile PI boyası ikilisini kullanarak floresan mikroskopta değerlendirdik (137). SYBR-14, membranı sağlam olan ya da olmayan tüm hücrelerin nükleusundaki DNA'ya bağlanan

membranı geçebilir özelliğe sahip yeşil floresan veren bir proptur. PI; plazma membranı hasarlı olan hücrelerine nükleusuna girebilen, ancak sağlam plazma membranını geçemeyen nitelikteki kırmızı floresan veren bir proptur. SYBR-14 ve PI kombinasyon halinde kullanıldığında; plazma membranı sağlam ise sadece SYBR-14 hücre içerisine girer ve yeşil floresan verirken, plazma membranı hasarlı ise hem SYBR-14 hem de PI hücre içerisine girer ve hücre kırmızıya ya da kırmızı-turuncuya boyanır (136).

Çalışmamızda dondurulup-çözdürülen semende canlı spermatozoa oranı yönünden değerlendirildiğinde, gruplar arasında fark yoktu. Canlı spermatozoa oranı; kontrol grubunda %24.98, arjinin grubunda %25.68, metionin grubunda %26.68 ve sisteamin grubunda %31.8 idi. Elde ettiğimiz en yüksek çözüm sonu canlı spermatozoa oranı (%31.8); Safaa ve arkadaşlarının (2012) elde ettiği en yüksek çözüm sonu canlı spermatozoa oranından (%18.43), Jimenez ve arkadaşlarının (2006) elde ettiği en yüksek çözüm sonu canlı spermatozoa oranından (%27.6), Vidues de Castro ve Cortell'in (2008) elde ettiği en yüksek çözüm sonu canlı spermatozoa oranından (%30.9) yüksekti (130, 131, 45). Elde ettiğimiz en yüksek çözüm sonu canlı spermatozoa oranı (%31.8); Rosato ve arkadaşlarının (2012) elde ettiği en yüksek çözüm sonu canlı spermatozoa oranından (%41.00), Chen ve arkadaşlarının (1989) elde ettiği en yüksek çözüm sonu canlı spermatozoa oranından (%44), Iaffaldano ve arkadaşlarının (2012) elde ettiği en yüksek çözüm sonu canlı spermatozoa oranından (%47.09), Polgar ve arkadaşlarının elde ettiği en yüksek çözüm sonu canlı spermatozoa oranından (%54) ve Graham ve Dalimata'nın (1997) bulduğu en yüksek çözüm sonu canlı spermatozoa oranından (%54) düşüktü (55, 134, 47, 50, 138). Diğer araştırmacıların bulgularıyla bizim bulgularımız arasındaki farklılık; kullanılan antioksidan ve sulandırıcı, uygulanan ekilibasyon zamanı ve çözündürme sıcaklığı arasındaki farklılıklardan kaynaklanabilir. Dondurulup-çözdürülen tavşan semeninde %54 ile en yüksek spermatozoa motilite oranı elde eden Graham ve Dalimata (1997) yaptıkları çalışmada; % 0.5 metilsellüloz ilave edilmiş asetamid ve trehaloz katılmış modifiye yumurta sarılı HEPES ile 1:6

oranında sulandırmışlar, 2 saat kadar 5°C'ye soğutmuşlar, sonrasında dilüe semeni 0.5 ml.lik payetlere aspire etmişler. Daha sonra sıvı nitrojenin 10 cm. üzerindeki buharda (-40°C ila -50°C'ye tekabül etmektedir.) dondurmuşlar ve sıvı nitrojene atmışlar. 7 gün sonra, 37°C'de 30 saniyede çözdürmüşler.

Akrozom, spermatozoa başının üçte ikilik ön kısmında yer alan nükleusu kep şeklinde çevreleyen yapıdır. İç membranı ve dış membranı vardır. Hyalürinidaz, akrozin ve diğer başka hidrolitik enzimler ihtiva eder. Bu enzimler; akrozom reaksiyonu süresince dış akrozomal membran plazma membranı ile kaynaştığında, zona pellusidanın lizisinde ve oositin korona radiatasına penetrasyonunda elzemdir (139). Akrozom bütünlüğü ile fertilite arasında orta düzeyde pozitif korelasyon olduğu tespit edilmiştir (130). Akrozom bütünlüğünün değerlendirmek için; kongo red ve %3'lük brilliant kretil mavisi kullanarak ışık mikroskobunda inceleme yapılabilmeyle birlikte akrozomal membranların ya da matriksin glikokonjugatlarıyla etkileşime giren peanut agglutinin, konkanavalin-A, pisum sativum agglutinin ve ricinus agglutinin gibi lektinler kullanarak floresan mikroskopta inceleme yapılabilir. *Arachis hypogaea* (peanut) ile konjuge floressein izotiosiyanat (FITCH-PNA) ile PI boyasının kombinasyonu kullanarak floresan mikroskopta inceleme yapılarak akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi günümüzde yaygındır. Ancak bununla birlikte normalde var olan yarım ay şekilli apikal kenarın olup-olmadığına bakılarak da akrozom bütünlüğü değerlendirilebilir. Bunun için numune; %2'lik glüteraldehit solüsyonunda fikse edilip diferansiyel interferans kontrast mikroskobunda ya da %0.4 formaldehit içeren %2.9'luk trisodyum sitrat dihidrat içeren formal sitrat solüsyonu ile 1:2 oranında dilüe edilerek faz kontrast mikroskobunda değerlendirilebilir (53, 136, 130, 44).

Yaptığımız çalışmada sağlam akrozomlu spermatozoaların oranını değerlendirmek için Çoyan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı örnek alarak FITCH-PNA ile PI boyası ikilisini kullanarak floresan mikroskopta değerlendirdik. Akrozomu sağlam olan spermatozoaların akrozomları kırmızı, akrozomu hasarlanmış olan spermatozoaların akrozomu yeşil floresans vermektedir (137).

Çalışmamızda dondurup-çözdürme sonunda sağlam akrozomlu spermatozoa oranı açısından değerlendirildiğinde; gruplar arasında istatistiksel açıdan fark yoktu. Dondurup çözdürülen semende sağlam akrozomlu spermatozoa oranı; kontrol grubunda %26.06, ellajik asit grubunda %25.52, metionin grubunda %27.98, sisteamin grubunda %33.60 ve arjinin grubunda %36.82 idi. Elde ettiğimiz en yüksek sağlam akrozomlu spermatozoa oranı (% 36.82); Iaffaldano ve ark.nın (2012) elde ettiği en yüksek sağlam akrozomlu spermatozoa oranından (%33.32) yüksekti (47). Elde ettiğimiz en yüksek sağlam akrozomlu spermatozoa oranı (%36.82); Safaa ve ark.nın (2012) elde ettiği en yüksek sağlam akrozomlu spermatozoa oranından (%38.47), Si ve ark.nın (2006) elde ettiği en yüksek sağlam akrozomlu spermatozoa oranından (%38.5), Kozdrowski ve ark.nın (2009) elde ettiği en yüksek sağlam akrozomlu spermatozoa oranından (%40.64), Rosato ve ark.nın (2012) elde ettiği en yüksek sağlam akrozomlu spermatozoa oranından (%54.0), Chen ve ark.nın (1989) elde ettiği en yüksek sağlam akrozomlu spermatozoa oranından (%54), Vicente ve ark.nın (2003) elde ettiği en yüksek sağlam akrozomlu spermatozoa oranından (%64), Vidues de Castro ve Vicente'nin (1996) elde ettiği en yüksek sağlam akrozomlu spermatozoa oranından (%64), Vicente ve Castro'nun (1996) elde ettiği en yüksek sağlam akrozomlu spermatozoa oranından (%70) ve Bamba ve ark.nın (1990) elde ettiği en yüksek sağlam akrozomlu spermatozoa oranından (% 72.0) düşüktü (130, 53, 40, 55, 134, 52, 48, 135, 44). Diğer araştırmacıların bulgularıyla bizim bulgularımız arasındaki farklılık; kullanılan antioksidan ve sulandırıcı, uygulanan ekilibrasyon zamanı, çözdürme sıcaklığı ve akrozom bütünlüğünü değerlendirmek için uygulanan metodlar arasındaki farklılıklardan kaynaklanabilir. Dondurulup-çözdürülen tavşan semeninde %72 ile en yüksek sağlam akrozomlu spermatozoa oranı elde eden Bamba ve ark. yaptıkları çalışmada; BF5 dilüentine (1.2 gr N-Tris (hidroksimetil) metil-2-aminometan sülfonik asit, 3.2 gr glukoz, 10 mg. Debakain sülfat içermektedir), 0.5 ml. OEP ve 100 ml. başına 20 mg. yumurta sarısı ve %6 oranında DMSO ekleyerek sulandırıcı-A'yı hazırlamışlar ve semeni 1:1 oranında sulandırıcı-A ile dilüe etmişler. Dilüe semen numunesini 2 saat kadar 5°C'de bekletmişler ve sonrasında sulandırıcı-B (sulandırıcı-A + %3

gliserol) ile dilüe etmişler ve kuru buz üzerinde pelet formunda dondurmuşlar. Çözümü 37°C'de yapmışlar ve normal akrozom oranını değerlendirmeden önce çözdürdükten sonra 1:2 oranında BTS medyumunu (100 ml. başına 3.7 gr. glukoz, 0.6 gr. trisodyum sitrat dihirat, 0.125 g NaHCO₃, 0.125 gr. disodyum EDTA ve 0.075 KCl içermektedir) ile dilüe etmişler (44).

Mitokondriyal yapılar, spermatozoaların orta kısmında yerleşik halde bulunmakta ve spermatozoalara progresif motilitelerini ve zona pellusidayı geçmelerini sağlayan kuyruk flamanları için gereken ATP enerjisini üretmektedir (140). Bu nedenle, spermatozoa motilitesi ve fertilitesi ile mitokondriyal aktivite arasında pozitif bir ilişkinin olduğu belirtilmektedir. Başarılı bir fertilizasyon işleminde de mitokondriyal aktivitenin yüksek olması gerekmektedir (129). Bu aktivitenin belirlenmesinde rhodamin 123 ve JC-1 gibi floresan boyalar kullanılmakta, fakat yüksek ya da düşük mitokondriyal aktivite arasındaki farklılığı en iyi yansıtan JC-1 boyası ile yapılan boyama tekniği olduğu bildirilmektedir (141). Dondurma işlemi öncesine göre, dondurma-çözdürme işlemi sonrası yüksek mitokondriyal aktiviteli spermatozoa oranı düşmekte ve bu süreçte ortamda gelişen oksidatif stres ve ROS ürünleri de etkin olmaktadır (142, 143). Mitokondride gelişen dondurma ve oksidatif stre nedenli hasarlar, kaspaz 3 ve sitokrom-c gibi apoptotik faktörlerin salınımına bağlanmaktadır (144).

Çalışmamızda dondurulup-çözdürülen semende değerlendirilen yüksek mitokondriyal aktiviteli spermatozoa oranı; kontrol grubuna (%16.52) göre ellajik asit grubunda (%6.36) önemsiz düzeyde düşük, metionin grubunda (%16.36) istatistiksel açıdan aynı, arjinin grubunda (%22.46) ve sisteamin grubunda (%26.18) önemsiz düzeyde yüksek idi. Arjinin grubunda (%22.46) ve sisteamin grubunda (%26.18) tespit edilen yüksek mitokondriyal aktiviteli spermatozoa oranı, ellajik asit grubunda (%6.36) elde edilene kıyasla önemli düzeyde yüksekti. Elde ettiğimiz en yüksek mitokondriyal aktivitesi yüksek spermatozoa oranı, Jimenez ve arkadaşlarının (2006) elde ettiği en yüksek yüksek mitokondriyal aktiviteli spermatozoa oranı (% 22.10) yüksekti (131). Jimenez ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bizim

çalışmamızdan farklı olarak; semeni oda sıcaklığında ve 1:1 oranında dilüe etmişler, nihai DMSO konsantrasyonunu %12.4 olarak ayarlamışlar, antioksidan olarak bir gruba 0.5 mM GSH başka bir gruba 0.5 mM GSSG eklemişler, çözündürme işlemini 42°C’de 12 saniyede yapmışlar. Yüksek mitokondriyal aktiviteye sahip spermatozoa oranı açısından bizim çalışmamız ile Jimenez ve arkadaşlarının çalışması arasındaki farklılık; dilüsyonun yapılma oranı, dilüsyonun yapıldığı sıcaklık, DMSO konsantrasyonu, kullanılan antioksidanlar ve çözündürmenin yapıldığı sıcaklık ve süredeki farklılıklardan kaynaklanabilir.

Yaptığımız çalışmayı biyokimyasal parametrelerle destekleyerek, antioksidanların ne denli etkinlikleri olduğunu daha net ortaya koymayı amaçladık. Biyokimyasal parametreler olarak; lipid peroksidasyon düzeyini, total redükte glutatyon düzeyini ve total antioksidan kapasiteyi spektrofotometri ile değerlendirdik.

Spermatozoanın poliansatüre yağ asitlerinden zengin olması, spermatozoayı lipid peroksidasyona duyarlılaştırır. Dondurulup çözündürülme esnasında ROS’lar membrandaki poliansatüre yağ asitlerine saldırır ve lipid peroksidasyon adı verilen kimyasal reaksiyonlar kaskadına neden olur. Lipid peroksidasyonun son ürünlerinden birisi malondialdehittir (MDA). Spektrofotometre ile MDA ölçümü, spermatozoadaki peroksidatif hasarın derecesinin değerlendirilmesinde günümüzde yaygın kullanılmaktadır. Yakın geçmişte spermatozoadaki peroksidatif hasarın değerlendirilmesinde BOIPY (581/591) adı verilen prop da kullanılmıştır (77).

Yaptığımız çalışmada lipid peroksidasyon düzeyini değerlendirmek için Bucak ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmayı örnek alarak MDA düzeyini spektrofotometre ile 586 nm.de $\mu\text{mol} \times 10^9$ spermatozoa olarak ölçtük (111).

Çalışmamızda dondurup-çözündürme sonunda MDA düzeyi yönünden değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel açıdan fark yoktu. MDA düzeyi; kontrol grubunda $203.9 \mu\text{mol} \times 10^9$ spermatozoa, arjinin asit grubunda $169.4 \mu\text{mol} \times 10^9$ spermatozoa, metionin grubunda $202.3 \mu\text{mol} \times 10^9$ spermatozoa, ellajik asit grubunda

219.4 μ molx10⁹ spermatozoa ve sisteamin grubunda 222 μ molx10⁹ spermatozoa tespit edildi. Yinghe ve Cao'nun yaptıkları çalışmada elde ettikleri en düşük MDA düzeyi 1.74nmol/ml idi. Yinghe ve Cao, MDA düzeyini hangi yöntemle tespit ettiklerini belirtmedikleri için; yaptığımız çalışma ile kıyaslamak mümkün olmadı. Çalışmamızda antioksidanlarla lipid peroksidasyonun önemli ölçüde önlenemediğinin ortaya konulması hatta çoğunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek MDA düzeyinin elde edilmesi, şaşırtıcı oldu. Antioksidanların dondurulup-çözdürülen tavşan spermatozoasını lipid peroksidasyona karşı koruyamadığı bulgusu, Srivastava ve arkadaşlarının (2000) arjininin keçi epididimis spermatozoasında lipid peroksidasyona karşı koruyucu olduğu tespitiyle, Patra ve arkadaşlarının (2005) arsenin ile indüklenen oksidatif hasara karşı metioninin koruyucu olduğu tespitiyle, Türk ve arkadaşlarının (2011) sisplatinle testiste ortaya çıkan lipid peroksidasyonu ellajik asitin önlediği tespitiyle ve Doğan ve arkadaşlarının (2013) 3-metilkolantren ile indüklenen fibrosarkomaya karşı sisteaminin antioksidatif ve antimutajenik etkiyle koruma sağladığının tespitiyle çelişmektedir (127, 145, 146, 102). Ancak elde ettiğimiz bulgular; Bucak ve arkadaşlarının (2007) dondurulup-çözdürülen koç semeninde sulandırıcıya katılan 5mM sisteaminin lipid peroksidasyonu koruyamadığını tespitiyle, Çoyan ve arkadaşlarının (2010) 5°C'de tutulduktan bir süre sonra değerlendirilen koç semeninde sulandırıcıya katılan metioninin lipid peroksidasyonu koruyamadığını tespitiyle uyumlu idi (103, 109). Kullandığımız antioksidanların tavşan spermatozoasını lipid peroksidasyona karşı korumaları için; bu antioksidanların semen sulandırıcısına 5mM konsantrasyonun dışında başka konsantrasyonlarda katılması gerektiğini ve uyguladığımız dondurup-çözdürme metodunun modifiye edilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Maalesef ki, antioksidanların dondurulup-çözdürülmüş tavşan spermatozoasını lipid peroksidasyona karşı korumadaki etkinliğini araştırarak araştırma yok denecek azdır. Bu sebeple, antioksidan kullanımıyla dondurup-çözdürülen tavşan semeninde lipid peroksidasyona karşı başka çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır.

Semen; ROS temizleyiciliği görevi yapan SOD, CAT ve GPx gibi birtakım

enzimatik ve glutatyon gibi non-enzimatik antioksidanlar içermektedir. Ortamda ROS üretimi ile eliminasyonu arasında bir denge oluşmakta, ROS'un hücreler üzerindeki olumsuz etkileri azaltılmaya çalışılmaktadır. Fakat spermanın dondurulması-çözdürülmesi; ROS üretimini arttırırken, ortamdaki antioksidan kapasiteyi azaltmaktadır (109).

CAT; hidrojen peroksit ile süperoksit radikalini detoksifiye edilmesinde ve NADPH oksidazın salınımının engellenmesinde görev almaktadır. Bu görevleri nedeniyle spermatozoa fonksiyonlarına olumlu katkılar yapmaktadır (147). Ortamda bulunan ya da ortama ilave edilen CAT, lipid peroksidasyon sonucu oluşan süperoksit ve hidrojen peroksitin neden olduğu kapasitasyon ve akrozom reaksiyonuna olumsuz etki yapan membranlardaki trozin fosforilasyonunun indüksiyonunu engelleyerek sperm-oosit füzyonuna olumlu katkı yapmaktadır (79). Katalazın katıldığı bu tüm tepkimelerde demir, bakır ve selenyum gibi elementler kofaktör olarak görev yapmaktadır (78).

SOD; İki süperoksit radikalini hidrojen peroksite dönüştüren reaksiyonu katalizler. Reaksiyon şu şekildedir: $(2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2)$. O_2 radikallerini tutarak veya onları daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek etkisini gösterir, bir başka ifadeyle toplayıcı tarzda etkinlik gösterir (74).

Süperoksit dismutaz; sitozolik bakır/çinko-SOD, intramitokondriyal mangan-SOD ve ekstrasellüler bakır/çinko-SOD olmak üzere üç izoforma sahiptir. Bu izoform yapılar epididimal kökenli olup; spermatozoa sitozolünden ve mitokondriyal yapılarından süperoksit anyon ve hidroksil radikallerini uzaklaştırıp, hücrel redoks homeostazisini koruyarak oksidatif stresi engellemeye çalışırlar (4,80). Spermatozoayı lipoperoksidatif saldırıya karşı koruma noktasında; reproduktif sistemin diğer savunma sistemlerine ait SOD'nin katkısı, spermatozoal SOD'nin kakısına nazaran daha büyüktür. Bununla birlikte savunma sistemine katkı bakımından spermatozoal SOD için; sitozolik formunun payı mitokondriyal formuna kıyasla daha çoktur.

GPx; H_2O_2 'yi de kapsayan çeşitli peroksitlerden peroksil radikallerini uzaklaştırıldığı ve elektron donörü olarak glutatyonun kullanıldığı reaksiyonu katalizleyen selenyum ihtiva eden enzimdir (75). Reaksiyon şu şekildedir: ($2\text{ GSH} + H_2O_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{ H}_2\text{O}$). Oksijen radikallerini tutarak veya onları daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek etkisini gösterir, bir başka ifadeyle toplayıcı tarzda etkinlik gösterir (74). GPx ailesi; primer sekanslarına, lokalizasyonlarına ve substrat özgünlüklerine göre 5 sınıfa (GPx 1,2,3,4,5) ayrılırlar. GPx1, hücrenin sitozolünde yer alıp; testis, epididimis, prostat ve seminal veziküllerde bulunur. GPx3, ekstrasellüler ortamda bulunmakta olup; epididimis ve vaz deferenste bulunmaktadır. GPx4, epididimdeki spermatozoanın baş ve orta parçasında bulunur. GPx5, epididim sıvısında ve spermatozoada lokalizedir (72).

Glutatyon, oksidatif strese karşı savunma amacıyla hücreler tarafından hızlıca kullanılabilen redükte edici gücün doğal rezervuarıdır. Oksidatif strese karşı koruyucu etkinliği, $-SH$ grubunun varlığından ileri gelmektedir (81). Glutatyon, glutatyon peroksidaz enziminin H_2O_2 'yi detoksifiye ettiği reaksiyonda rol alır (74). Yaptığımız çalışmada total redükte glutatyon düzeyini değerlendirmek için, Bucak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı örnek alarak spektrofotometre ile 420nm.de $mM \times 10^9$ spermatozoa olarak ölçtük (111).

Çalışmamızda dondurup-çözdürme sonunda total redükte glutatyon düzeyi yönünden değerlendirildiğinde ellajik asit grubuna grubuna ($1.8mM \times 10^9$ spermatozoa) kıyasla; arjinin grubundaki ($2.4mM \times 10^9$ spermatozoa), kontrol grubundaki ($2.6mM \times 10^9$ spermatozoa), sisteamin grubundaki ($2.6mM \times 10^9$ spermatozoa) ve metionin grubundaki ($2.7mM \times 10^9$ spermatozoa) total redükte glutatyon düzeyi önemli ölçüde yüksekti. Ellajik asit grubu haricindeki grupların arasında total redükte glutatyon düzeyi açısından önemli farklılık yoktu. Çalışmamızda özellikle glutatyona dönüşerek de antioksidan etkinlik gösteren metionin ve sisteamin başta olmak üzere antioksidanlar ile semenin dondurulup-çözdürülmesinin sonrasında total redükte glutatyonun artacağını beklemiştik. Bu yüzden elde ettiğimiz bulgular beklediğimiz bulgular değildi. Ancak elde ettiğimiz

bulgular; Bucak ve arkadaşlarının (2009) dondurulup-çözdürülen koç semeninde sulandırıcıya katılan 5mM sisteaminin total redükte glutatyon düzeyini arttırmadığı tespitiyle uyumlu idi (103). Elde ettiğimiz bulgular; kullandığımız antioksidanlarla dondurup-çözdürme sonrasında total redükte glutatyon düzeyini arttırmak için, bu antioksidanların semen sulandırıcısına 5mM konsantrasyonun dışında başka konsantrasyonlarda katılması gerektiğini ve uyguladığımız dondurup-çözdürme metodunun modifiye edilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Maalesef literatür taramalarına göre, antioksidanların dondurulup-çözdürülmüş tavşan semeninde total redükte glutatyon ölçümünü değerlendiren çalışma yapılmamıştır. Bu sebeple, antioksidan kullanımıyla dondurulup-çözdürülen tavşan semeninde total redükte glutatyon düzeyinin ölçüldüğü çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır.

Spermatozoanın antioksidan kapasitesinin düşük olması, plazma membranının doymamış yağ asitlerince zengin olması, DNA tamir yetisinin yetersiz olması gibi nedenlerden dolayı; spermatozoa dondurmanın ve çözdürmenin meydana getirdiği hasarları önlemede yetersiz kalır (7). Bu nedenle spermatozoadaki dondurma ve çözdürme esnasında meydana gelebilecek olan hasarları minimize etmek için; semen sulandırıcılarına koruyucu ve antioksidan özellikli maddeler eklenmektedir. Semen sulandırıcısına antioksidan eklendikten sonra semenin total antioksidan kapasitesi artırılmış olur. Yaptığımız çalışmada total antioksidan kapasiteyi değerlendirmek için, Bucak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı örnek alarak spektrofotometre ile 490 nm.de $mM \times 10^9$ spermatozoa olarak ölçtük (111).

Çalışmamızda semenin dondurulup-çözdürülmesi sonrası total antioksidan potansiyeli; ellajik asit grubuna grubuna ($89.7mM \times 10^9$ spermatozoa) kıyasla; metionin grubunda ($125.3mM \times 10^9$ spermatozoa) önemli düzeyde artış tespit etmişken, arjinin grubunda ($102.1mM \times 10^9$ spermatozoa), kontrol grubunda ($111.2mM \times 10^9$ spermatozoa) ve sisteamin grubunda ($118.2mM \times 10^9$ spermatozoa) önemsiz düzeyde artış tespit edildi. Metionin grubunda ($125.3mM \times 10^9$ spermatozoa) tespit edilen total antioksidan kapasite düzeyi; arjinin grubunda ($102.1mM \times 10^9$ spermatozoa) sisteamin grubunda ($118.2mM \times 10^9$ spermatozoa) ve kontrol grubunda

($111.2\text{mM} \times 10^9$ spermatozoa) elde edilen düzeye kıyasla önemsiz düzeyde yüksekti. Arjinin grubu ($102.1\text{mM} \times 10^9$ spermatozoa), sisteamin grubu ($118.2\text{mM} \times 10^9$ spermatozoa) ve kontrol grubunda ($111.2\text{mM} \times 10^9$ spermatozoa) tespit edilen total antioksidan düzeyleri arasında istatistiksel açıdan farklılık yoktu. Çalışmamızda antioksidanların semenin dondurulup-çözdürülmesi sonrası kontrole kıyasla antioksidan kapasiteyi arttıracakını beklemiştik. Bu yüzden elde ettiğimiz bulgular beklediğimiz bulgular değildi. Elde ettiğimiz bulgular; Bucak ve arkadaşlarının (2010) dondurulup çözdürülen boğa semeninde sulandırıcıya katılan 2.5mM ve 7.5mM metioninin total antioksidan kapasiteyi kontrole kıyasla arttırdığının tespitiyle çelişmektedir. Bucak ve arkadaşları, yaptıkları bu çalışmada 2.5mM metioninin 7.5mM metionine kıyasla, önemsiz olsa da daha yüksek düzeyde total antioksidan kapasiteyi arttırdığını bildirmişlerdir; ki bu bilgi sulandırıcıya katılan antioksidan konsantrasyonları arasında çok önemli farklılık olmadığına bile total antioksidan kapasite açısından önemli farklılıklar olabileceğini desteklemektedir. Bucak ve arkadaşları bahsedilen çalışmada; 2.5mM metioninin 2.5 mM karnitine göre total antioksidan kapasiteyi önemli ölçüde arttırdığını bildirmişlerdir, ki bu bilgi sulandırıcıya katılan farklı antioksidanların total antioksidan kapasite üzerine katkılarının farklı olabileceğini desteklemektedir (111). Bizim çalışmamızda kontrole grubuna kıyasla ellajik asit grubunda total antioksidan kapasitenin önemsiz de olsa düşük düzeyde olması şaşırtıcıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılmış bu çalışma kapsamında; dondurma öncesi Beyaz Yeni Zellanda tavşanının semen sulandırıcısına ilave edilen antioksidanların, semen dondurulup çözündürüldükten sonra spermatolojik ve oksidatif stres parametreleri üzerine etkileri araştırıldı. Literatür taramalarına göre tavşan spermasının dondurulmasında kullanmış olduğumuz antioksidanlardan arjinin, ellajik asit, metionin ve sisteaminin ilk defa kullanılmış olması ve dondurulup-çözündürülen tavşan spermasında incelediğimiz biyokimyasal parametrelerin bu denli çok yönlü olmuş olması çalışmayı önemli kılan etmenlerdi.

Spermatozoanın kalite tayininde ikili floresan boyama tekniklerinin yaklaşık on yıldır kullanılmakta ya da adaptasyonlarının sağlanması üzerinde çalışılıyor olması, çalışmamızın da bu yöne kanalize olmasını sağlamıştır. Antioksidanların spermatozoa üzerindeki etkilerinin araştırılmasında şimdiye kadar kullanılan konvansiyonel metodlar yerini; daha objektif sonuçlar veren biyokimyasal metodlara (LPO ve antioksidan kapasite ölçümleri), floresan boyama metodlarına ve bilgisayar destekli motilite analizlerine bırakmıştır.

Fakat yapılan çalışmalar sayıca çok azdır ve bahsedilen metod ve analizlerin hepsini içermemektedir. Bunun altında yatan temel neden, floresan boyama tekniklerinin ve biyokimyasal ölçüm tekniklerinin spermatozoalara tam olarak adapte edilememesiydi. Antioksidan ve LPO ölçümlerinde karşılaşılan temel sorun; spermatozoa hücre membranlarının, somatik hücrelerden farklı olarak parçalanamaması ve buna bağlı olarak da enzim analizlerinde sorunların oluşmasıydı. Bu çalışmada spermatozoaların parçalanması tekniklerinin adaptasyonu yapılmış ve numuneler analiz öncesi hazır hale getirilmiştir.

Spermatozoanın antioksidan kapasitesinin düşük olması, plazma membranının

doymamış yağ asitlerince zengin olması ve DNA tamir yetisinin yetersiz olması gibi nedenlerden dolayı spermatozoa; dondurmanın ve çözündürmenin meydana getirdiği hasarlara karşı duyarlıdır (7). Bu nedenle dondurma-çözündürmenin spermatozoada meydana getireceği olası zararlı etkileri önleyebilmek için semen sulandırıcısına antioksidan etkinlikleri kanıtlanmış olan arjinin, ellajik asit, metionin ve sisteamini 5 mM dozda ekledik.

Spermatozoa motilitesin açısından kontrol grubuna (%19.00) nazaran antioksidan gruplarında daha yüksekti. Kontrol grubuna göre motilitedeki yükseklik; 5mM ellajik asit (%26.00), 5mM metionin (%28.00) ve 5mM arjinin (%30.00) gruplarında önemsiz düzeyde iken, 5mM sisteamin grubunda (%35.00) önemli düzeyde idi. Motilite oranı açısından antioksidan gruplar arasında önemli farklılık yoktu. Canlı spermatozoa oranını kontrol grubuna (%24.98) kıyasla; arjinin grubunda (%25.42), ellajik asit grubunda (%25.68), metionin grubunda (%26.68) ve sisteamin grubunda (%31.80) istatistiksel açıdan aynıydı. Antioksidan grupları arasındaki canlı spermatozoa oranı da istatistiksel açıdan aynı idi. Akrozom bütünlüğü korunmuş (akrozomu sağlam) spermatozoa oranını kontrol grubu (%26.06) kıyasla; ellajik asit grubunda (%25.52); metionin grubunda (%27.98), sisteamin grubunda (%33.60) ve arjinin grubunda (%36.82) istatistiksel açıdan aynı düzeyde tespit ettik. Antioksidan grupları arasındaki sağlam akrozomlu spermatozoa oranı da istatistiksel açıdan aynı idi. Yüksek mitokondriyal aktiviteli spermatozoa oranını kontrol grubuna (%16.52) kıyasla; ellajik asit grubunda (%6.36) önemsiz düzeyde düşük, metionin grubunda (%16.36) istatistiksel açıdan aynı, arjinin grubunda (%22.46) ve sisteamin grubunda (%26.18) önemsiz düzeyde yüksek tespit ettik. Arjinin ve sisteamin gruplarında; ellajik asit grubuna göre önemli düzeyde yüksek, kontrol ve metionin gruplarına göre önemsiz düzeyde yüksek mitokondriyal aktivitesi yüksek spermatozoa oranı tespit edildi. Yüksek mitokondriyal aktiviteli spermatozoa oranı açısından, arjinin ile sisteamin grupları arasında istatistiksel açıdan fark yoktu. MDA düzeyini kontrol grubuna ($203.9\mu\text{M} \times 10^9$ spermatozoa) kıyasla; arjinin grubunda ($169.4\mu\text{M} \times 10^9$ spermatozoa), metionin grubunda ($202.3\mu\text{M} \times 10^9$ spermatozoa), ellajik asit grubunda ($219.3\mu\text{M} \times 10^9$ spermatozoa) ve sisteamin grubunda ($222\mu\text{M} \times 10^9$ spermatozoa) istatistiksel açıdan

aynı düzeyde tespit ettik. Antioksidan gruplar arasında MDA düzeyi istatistiksel açıdan aynı idi. Total antioksidan kapasiteyi kontrol grubuna ($111.2\text{mM} \times 10^9$ spermatozoa) kıyasla; ellajik asit grubuna ($89.7\text{mM} \times 10^9$ spermatozoa) göre önemsiz düzeyde yüksek, arjinin grubu ($102.1\text{mM} \times 10^9$ spermatozoa) ve sisteamin grubuyla ($118.2\text{mM} \times 10^9$ spermatozoa) istatistiksel açıdan aynı, metionin grubuna ($125.3\text{mM} \times 10^9$ spermatozoa) göre düşük düzeyde tespit ettik. Metionin grubundaki total antioksidan kapasite; ellajik asit grubuna göre önemli ölçüde yüksek, diğer gruplara kıyasla önemsiz düzeyde yüksek tespit edildi. Kontrol, arjinin ve sisteamin grupları arasında total antioksidan kapasite istatistiksel açıdan aynı idi. Kontrol, arjinin ve sisteamin gruplarındaki total antioksidan kapasite, ellajik asit grubuna kıyasla önemsiz düzeyde yüksekti. Total redükte glutasyon düzeyini ellajik asit grubuna ($1.8\text{mM} \times 10^9$ spermatozoa) kıyasla diğer gruplarda önemli ölçüde yüksek tespit ettik. Kontrol grubu ($2.6\text{mM} \times 10^9$ spermatozoa) arjinin grubu ($2.4\text{mM} \times 10^9$ spermatozoa), sisteamin grubu ($2.6\text{mM} \times 10^9$ spermatozoa) ve metionin grupları arasında ($2.7\text{mM} \times 10^9$ spermatozoa) total antioksidan kapasite istatistiksel açıdan aynı tespit edildi.

Literatür taramalarında antioksidan etkinliğin bu denli kapsamlı parametrelerle araştırıldığına dair verilere rastlanmadığından, konuyla ilgili başka çalışmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca yapılacak in-vitro muayene parametrelerinin, in-vitro/in-vivo fertilité parametreleriyle de desteklenmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Bailey J, Morrier A, Cormier N. Semen cryopreservation: Success and persistent problems in farm species. *Canadian Journal of Animal Science*. 2003;83(3):393-401.
2. Moce E, Vicente JS. Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Animal Reproduction Science*. 2009;110:1-24.
3. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, Fertility and Development*. 2004;16(5):581-8.
4. Alvarez JG, Storey BT. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation. *Biology of Reproduction*. 1983;28:1129-36.
5. Jeulin C, Soufir JC, Laval-Martim D, Calvayrac R. Gamete Research. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. 1989;24(2):185-96.
6. Taylor CT. Antioxidants and reactive oxygen species in human infertility. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2001;10(4):189-98.
7. Lanzafame FM, La Vignera S, Vicari E, Calogero AE. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*. 2009;19(5):638-59.

8. Keskin O. Dondurulmuş tavşan spermalarında akrozom morfolojisi ve döl verimi üzerine çalışmalar. Doktora tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 1992.
9. Çakır A, Bozkurt EÜ, Düzler A. Tavşan, kobay ve sığanda testisin şekli, konumu ve testis epididimis ilişkisi. Ankara Univ Vet Fak Derg. 2001;48:129-32.
10. Gondos B, Renston RH, Conner LA. Ultrastructure of germ cells and sertoli cells in the postnatal rabbit testis. American Journal of Anatomy. 1973;136(4):427-39.
11. Gondos B, Renston RH, Goldstein DA. Postnatal differentiation of leydig cells in the rabbit testis. American Journal of Anatomy. 1976;145(2):167-81.
12. Jones R, Hamilton DW, Fawcett DW. Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. American Journal of Anatomy. 1979;156(3):373-400.
13. Kürtül İ, Özgel Ö, Dursun N, Bozkurt EÜ. Morphology of the accessory sex glands and their arterial vascularization in New Zeland rabbits. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 2001;7(1):95-9.
14. Swierstra EE, Foote RH. Cytology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit. J Reprod Fertil. 1963;5:309-22.
15. Swierstra EE, Foote RH. Duration of spermatogenesis and spermatozoan transport in the rabbit based on cytological changes, DNA synthesis and labeling with tritiated thymidine. American Journal of Anatomy. 1965;116(2):401-11.

16. Amann RP, Lamibiase JT. The male rabbit. III. Determination of daily sperm production sperm production by means of testicular homogenates. *Journal of Animal Science*. 1969;3:369-74.
17. Castellini C. Semen production and management of rabbit bucks. İtalya: 9th World Rabbit Congress;2008.
18. Boiti C, Castellini C, Besenfelder U, Theau-Clément M, Liguori L, Renieri T, Pizzi F. Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. *World Rabbit Science*. 2005;13:71-91.
19. Öztemel S, Doğan İ, Soylu MK. Beyaz Yeni Zellenda ırkı tavşanların kimi spermatolojik özellikleri. *Uludağ Univ J Fac Vet Med*. 2003;22:69-73.
20. Macari M, Machado CR. Sexual maturity in rabbits defined by the physical and chemical characteristics of the semen. *Laboratory animals*. 1978;12(1):37-9.
21. Castellini C, Besenfelder U, Pizzi F, Theau-Clement M, Vicente JS, Renier T. Developments in the investigation of rabbit semen and buck management. In: Maertens L, Coudert P, editors. *Recent advances in rabbit sciences*. Belgium: ILVO press; 2006. p. 53-67.
22. Gliozzi TM, Zaniboni L, Maldjian A, Luzi F, Maertens L, Cerolini S. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. *Theriogenology*. 2009;71:910-9.
23. Curry MR, Redding BJ, Watson PF. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa. *Cryobiology*. 1995;32:175-81.
24. Agarwall A, Singh A. The role of sperm chromatin integrity and DNA damage on male infertility. *The Open Reproductive Science Journal*. 2011;3:65-71.

25. Evans G, Maxwell WMC. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. 2nd ed. Sidney: Butterworths; 1987.
26. Hafez ESE. Reproductive behaviour: Reproduction in Farm Animals. Lea and Febiger, Philadelphia. 1962.
27. England GC. Cryopreservation of dog semen. J Reprod Fert Suppl. 1993;47:243-55.
28. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H, Parkinson TJ. Veterinary Reproduction and Obstetrics. 7th Edt. 1996. p: 621-54.
29. Herman HA, Mitchell J, Doak GA. The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle. 8th Edt: Interstate Publishers, Inc, Danville, Illinois. 1987. p: 3-137.
30. Trimeche A, Anton M, Renard P, Gandemer G, Tainturier D. Quail Egg Yolk: A Novel Cryoprotectant for the Freeze Preservation of Poitou Jackass Sperm. Cryobiology. 1997;34:385-93.
31. Holt WT. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction. 2000.62:3-22.
32. Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. Mol Reprod Dev. 2006;73:1338-44.
33. Rosato MP, Iaffaldano N. Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standart vapor freezing and vitrification. Theriogenology. 2013;79:508-16.

34. Bucak MN, Tekin N. Kriyoprotektantlar ve eşey hücrelerinin dondurulmasında kriyoprotektif etki. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2007;54(1):67-72.
35. Sanmartin-Suarez C, Soto-Otero R, Sanchez-Sellero I, Mendez-Alvarez E. Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidant. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 2011;63:209-15.
36. Tsuzuki Y, Duran DH, Sawamizu M, Ashiwaza K, Fujihara N. The effects of dimethyl-sulfoxide on the in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes and the subsequent development. Asian-Aus J Anim Sci. 1998;11:307-10.
37. Gao DY, Crister JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. Ilar Journal. 200;41(4):187-96.
38. McWilliams RB, Gibbons WE, Leibo SP. Osmotic and physiological responses zygotes and human oocytes to mono-and disaccharides. Human Reproduction. 1995;10(5):1163-71.
39. Kashiwazaki N, Okuda Y, Seita Y, Hisamatsu S, Sonoki S, Shino M, Inomata T. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White rabbit spermatozoa. Journal of Reproduction and Development. 2006;52(4):511-6.
40. Kozdrowski R, Dubiel A, Naszczyk-Nowak A. Comparison of acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of European Brown Hare (*Lepus euroaeus*) spermatozoa. Journal of Reproduction and Development. 2009;55:45-9.
41. Rosato MP, Iaffaldano N. Effect of chilling temperature on the long-term survival of rabbit spermatozoa held either in a tris-based or a jellified extender. Reprod Dom Anim. 2011;46:301-8.

42. O'Shea T, Wales RG. Further studies of the deep freezing of rabbit spermatozoa in reconstituted skim milk powder. *Aust J biol Sci.* 1969;22:709-19.
43. Roca J, Martinez S, Vazquez JM, Lucas X, Parrilla I, Martinez EA. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15 °C. *Animal Reproduction Science.* 2000;64:103-12.
44. Bamba K, Adams CE. Freezing rabbit semen by the use of BF5 diluent. *Laboratory Animals.* 1990;24:172-5.
45. Vidues de Castro MP, Cortell C. Effect of gelatin addition to freezing extender on rabbit semen parameters and reproductive performance. In Italy: 9th World Rabbit Congress. 2008.
46. Hanada A, Nagase H. Cryoprotective effects of some amids on rabbit spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1980;60:247-52.
47. Iaffaldano N, Di Lorio M, Rosato MP. The cryoprotectant used, its concentration and the equilibration time are critical for the succesfull cryopreservation of rabbit sperm: Dimethylacetamide versus dimethylsulfoxide. *Theriogenology.* 2012;78:1381-9.
48. Vidues de Castro MP, Vicente JS. A simple method for freezing rabbit semen with successful results on fertility and prolificity. *Animal Reproduction Science.* 1996;44:195-201.
49. Sarıözkan S, Türk G, Cantürk F, Yay A, Eken A, Akçay A. The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. *Cryobiology.* 2013;67:1-6.

50. Graham JK, Dalimata AM. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*. 1997;48:831-41.
51. Arriola J, Foote RH. Accessory sperm as an indication of fertilizing ability of rabbit spermatozoa frozen in egg yolk-acetamide with detergent. *Journal of Andrology*. 2001;22(3):458-63.
52. Moce, E., Vicente JS, Lavara, R. Effect of freezing-thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. *Theriogenology*. 2003;60:115-23.
53. Si W, Hildebrandt TB, Reid C, Krieg R, Ji W, Fassbender M, Hermes R. The successful double cryopreservation of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) semen in large volume using the directional freezing technique with reduced concentration of cryoprotectant. *Theriogenology*. 2006;65:788-98.
54. Sariözkan S, Cantürk F, Yay A, Akçay A. The effect of different storage temperature on sperm parameters and DNA damage in liquid stored New Zealand rabbit spermatozoa. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*. 2012;18(3):475-80.
55. Rosato MP, Di Iorio M, Manchisi A, Gambacorta M, Petrosino G, Centoducati G, Santacroce MP, Iaffaldano N. In vitro survival and lipid peroxidation status of rabbit spermatozoa after both chilled and frozen storage in lycopene enriched extenders. *Livestock Science*. 2012;146:199-202.
56. Moce E, Vicente JS. Effect of cooling and freezing, the two first steps of a freezing protocol, on the fertilizing ability of the rabbit sperm. *Reprod Nutr Dev*. 2002;42:189-96.

57. Vidues de Castro MP, Moce E, Vicente JS, Marco-Jimenez F, Lavara R. In vitro evaluation of in vivo fertilizing ability of frozen rabbit semen. *Reprod Dom Anim.* 2005;40:136-40.
58. Moce E, Lavara R, Vicente JS. Effect of an asynchrony between ovulation and insemination on the results obtained after insemination with fresh or frozen sperm in rabbits. *Anim Reprod Sci.* 2003;75:107-18.
59. Chen Y, Foote RH. Survival of rabbit spermatozoa frozen and thawed at different rates with and without seeding. *Anim Reprod Sci.* 1994;35:131-43.
60. Aksoy M, Akman O, Lehimcioğlu NC, Erdem H. Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Animal Reproduction Science.* 2010;120(1):166-72.
61. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology.* 2002;57(1):327-44.
62. Leibo SP, Brandley L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Gagnon (Ed), *The Male Gamet.* Cache River Press, St Louis. 1999. p. 502-15.
63. Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophysics.* 1990;14:53-92.
64. Songsasen N, Leibo SP. Cryopreservation of mouse spermatozoa. Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa. *Cryobiology.* 1997;35:240-54.
65. Morris GJ, Acton E. Controlled ice nucleation in cryopreservation - A review. *Cryobiology.* 2013;66(2):85-92.

66. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2nd Ed. In: Oxford, Clarendon Press. 1989.
67. Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Bioscience. 1996;1:78-86.
68. Kulaksız R. Farklı antioksidanlar eklenmiş sulandırıcılarla dondurulmuş Saanen tekesi spermasının in vitro değerlendirilmesi. Doktora Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2009.
69. Yıldız S. Koç spermasının farklı antioksidanlar içeren sulandırıcılarla kısa süreli +5°C’de saklanması, Doktora Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2004.
70. Ömür AD, Sezon içinde ve sezon dışında koç spermasının dondurulmasında antioksidanların etkisi. Doktora Tezi. Konya: Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2009.
71. de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. Reviews of Reproduction. 1997;2:48-54.
72. Peris S. Semen cryopreservation facilitates DNA damage: Relationship between DNA stability and fertility in vivo. Doktora tezi. France; 2008.
73. Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reproduction, Fertility and Development 1995;7(4):659-68.
74. Adam B, Yiğitoğlu R. UTS Biyokimya&Klinik Biyokimya. Ankara: Atlas Yayıncılık. 2003.
75. Hammadeh ME, Flippas A, Hamad MF. Reactive oxygen species and antioxidant in seminal plasma and their impact on male fertility. Fertility and Sterility. 2009;3(3):87-110.

76. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*. 2011.
77. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2008;59(1):2-11.
78. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*. 1997;324:1-18.
79. Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, Van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci*. 1995;108:2017-25.
80. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978;201:875-80.
81. Lubarda Z. The role of glutathione in mammalian gametes; reproductive biology. *Reproductive Biology*. 2005;5(1):5-17.
82. Upreti GC, Jensen K, Munday R, Duganzich DM, Vishwanath R, Smith JF. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Animal Reproduction Science*. 1998;51:275-87.
83. Powell SR. The antioxidant properties of zinc. *The Journal of Nutrition*. 2000;130:1447-54.
84. Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *Journal of Cell Science*. 1998;111:654-6.
85. de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reproduction*. 1995;10(1):15-21.

86. Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C. Nitric Oxide Regulates Human Sperm Capacitation and Protein-Tyrosine Phosphorylation In Vitro. *Biology of Reproduction*. 1999;61(3):575-81.
87. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *Journal of Andrology*. 1995;16(5):424-31.
88. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. 2008;59(1):2-11.
89. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, JA Zieschang, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*. 2009;24(9):2061-70.
90. Bucak MN, Ateşşahin A, Yüce A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*. 2008;75:128-34.
91. Yousef MI, Kamel KI, El-Guendi MI, El-Demerdash FM. An in vitro study on reproductive toxicity of aluminium chloride on rabbit sperm: The protective role of some antioxidants. *Toxicology*. 2007;239:213-23.
92. Castellini C, Lattaioli P, Bosco AD, Beghelli D. Effect of supranutritional level of dietary α -tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen. *Theriogenology*. 2002;58:1723-32.
93. Ata A, Hatipoğlu FS, Yıldız Gülay O, Gülay MS. Protective Role of Ascorbic Acid on Subacute Sperm Toxicity in Male New Zealand White Rabbits Treated with Endosulfan. *Drug and Chemical Toxicology*. 2007;30:181–195.
94. Alvarez JG, Storey BT. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biology of Reproduction*. 1983;29:548-55.

95. Salem MH, Kamel KI , Yousef MI , Hassan GA, EL-Nouty FD. Protective role of ascorbic acid to enhance semen quality of rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B1. *Toxicology*. 2001;162:209–18.
96. Srivastava S, Desai P, Coutinho E, Govil G. Mechanism of action of L-arginine on the vitality of spermatozoa is primarily through increased biosynthesis of nitric oxide. *Biology of Reproduction*. 2006;74:954-58.
97. O’Flaherty C, Rodriguez P, Srivastava S. L-arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004;1674:215-21.
98. Siddique RA, Atreja SK. Effect of L-Arginine and spermine-NONOate on motility, viability, membrane integrity and lipid peroxidation of Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Livestock Science*. 2013;153:147-53.
99. Radony EW, Atherton RW. Arginine induced stimulation of rabbit sperm motility. *Archives of Andrology*. 1981;7:351-5.
100. Keller DW, Polakoski KL. L-arginine stimulation of human sperm motility in vitro. *Biology of Reproduction*. 1975;13:154-7.
101. Srivastava S. Synergistic protection of L-arginine and vitamin E on lipid peroxidation of asthenospermic patients. *International Journal of Fertility and Sterility*. 2008;2(2):60-5.
102. Doğan A, Aksu P, Erdağ D, Bayezıt M, Doğan E, Özcan K. Farelerde 3-metilkolantren ile indüklenen fibrosarkoma üzerine sisteaminin etkileri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2013;19(1):7-12.
103. Bucak MN, Ateşşahin A, Ömer Varışlı, Yüce A, Tekin N, Akçay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*. 2007;67:1060-7.

104. Cirit U, Bağış H, Demir K, Ağca C, Pabuccuoğlu, Varışlı Ö, Clifford-Rathertf C, Ağca Y. Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose and cysteamine on ram semen. *Animal Reproduction Science*. 2013;139:38-44.
105. Bucak MN, Tuncer PB, Sarıozkan S, Ulutas PA, Çoyan K, Başpınar N, Özkalp B. Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. *Research in Veterinary Science*. 2009;87:468-72.
106. de Matos DG, Gasparini B, Pasqualini SR, Thompson JG. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*. 2002;57:1443-51.
107. Patra RC, Swarup D, Dwivedi SK. Antioxidant effects of alpha tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology*. 2001;162:81-8.
108. Liu F, Hindupur J, Nguyen JL, Ruf KJ, Zhu J, Schieler JL, Bonham CC, Wood KV, Davisson VJ, Rochet JC. Methionine sulfoxide reductase A protects dopaminergic cells from Parkinson' disease-related insults. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(3):242-55.
109. Çoyan K, Başpınar N, Bucak MN, Akalın PP, Ataman MB, Ömür AD, Güngör Ş, Küçükğünay S, Özkalp B, Sarıözkan S. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Research in Veterinary Science*. 2010;89:426-31.
110. Tuncer PB, Bucak MN, Sarıözkan S, Sakin F, Yeni D, Cigerci İH, Ateşşahin A, Avdatek F, Gündoğan M, Büyükleblebici O. The effect of raffinose and methionine on frozen-thawed Angora buck (*Capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. *Cryobiology*. 2010;61:89-93.

111. Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Başpınar N, Taşpınar M, Çoyan K, Bilgili A, Akalın PP, Büyükleblebici S, Aydos S, Ilgaz S, Sunguroğlu A, Öztuna D. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*. 2010;61:248-53.
112. Edderkaoui M, Odinkova I, Ohno I, Gukovsky I, Go VL, Pandol SJ, Gukovskaya AS. Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor kappa in pancreatic cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14(23):3672-80.
113. Khanduja KL, Gandhi RK, Pathania V, Syal N. Prevention of N-Nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 1999;37:313-8.
114. Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(7):2200-6.
115. Özkaya A, Çelik S, Yüce A, Şahin Z, Yılmaz Ö. The effects of ellagic acid on some biochemical parameters in the liver of rats against oxidative stress induced by aluminum. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2010;16(2):263-8.
116. Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Çeribaşı AO, Yüce A. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertility and Sterility*. 2008;89(5):1474-81.
117. Çeribaşı AO, Sakin F, Sönmez M, Ateşşahin A. Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2012;64(7-8):717-24.

118. Tokeshi I, Yoshimoto T, Muto N, Nakamura S, Ashiwaza K, Nakada T, Tatemoto H. Antihyaluronidase action of ellagic acid affectively prevents polyspermy as a result of suppression of the acrosome reaction induced by sperm-zona interaction during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. 2007;53(4):755-64.
119. Hammerstedt RH, Graham K, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl*. 1990;11:73-88.
120. Noiles EE, Bailey J, Storey BT. Temperature dependence of the water permeability, L_p , of murine sperm shows a discontinuity between 4°C and 0°C. *Cryobiology*. 1995;32:220-38.
121. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*. 1995;7:871-91.
122. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*. 2000;60:481-92.
123. Harrison RAP, White IG. Glycolytic enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplet of bull, boar, and ram, and their leakage after shock. *J Reprod Fertil*. 1972;30:105-15.
124. Robertson L, Bailey JL, Buhr MM. Effects of cold shock and phospholipase A2 on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes. *Mol Reprod Dev*. 1990;26:143-9.
125. White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. *Reprod Fertil Dev*. 1993;5:639-58.

126. Zhao Y, Buhr MM. Cryopreservation extenders affect calcium flux in bovine spermatozoa during a temperature challenge. *J Androl.* 1995;16:278-85.
127. Srivastava S, Desai P, Coutinho E, Govil G. Protective effect of L-arginine against lipid peroxidation in goat epididymal spermatozoa. *Physio Chem Phys Med NMR.* 2000;32:127-65.
128. Çıray HN. Sperm Elde edilmesi. Yardımla Üreme Laboratuvarı. Ankara:Birim Tasarım; 2003. p. 25.
129. Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility and fertility potential. *Asian Journal of Andrology.* 2002;4:97-103.
130. Safaa HM, Lavara R, Vidues de Castro MP, Elsayed DAA, Mehaisen GMK, Marco-Jimenez F, Vicente JS. Effect of different freezing extenders on semen quality, fertility and prolificacy in two selected lines of rabbit bucks. In: *Egypt: World Rabbit Science Association.* 2012.
131. Marco-Jimenez F, Lavara R, Vicente JS, Vidues de Castro MP. Cryopreservation of rabbit spermatozoa with freezing media supplemented with reduced and oxidised glutathione. *Cryoletters.* 2006;27(4):261-8.
132. Moce E, Lavara R, Vicente JS. Effect of cooling rate to 5°C, straw size and farm on fertilizing ability of cryopreserved rabbit sperm. *Reprod Dom Anim.* 2010;45:1-7.
133. Chen Y, Yang X, Foote RH. Timed Breeding of Rabbits with Fresh and Frozen-Thawed Semen and Evidence of Acrosome Alteration Following Freezing and Thawing. *Animal Reproduction Science.* 1989;18:35-41.

134. Chen Y, Li J, Simkin ME, Yang X, Foote RH. Fertility of fresh and frozen rabbit semen inseminated at different times is indicative of male differences in capacitation time. *Biology of Reproduction*. 1989;41:848-53.
135. Vicente JS, Viudes de Castro MP. A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen. *Reprod Nutr Dev*. 1996;36:485-92.
136. Graham JK, Moce E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*. 2005;64:492-504.
137. Çoyan K, Başpınar N, Bucak MN, Akalın PP. Effects of cysteine and ergothionine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. *Cryobiology*. 2011;63:1-6.
138. Polgar ZS, Virag GY, Baranyai B, Bodo SZ, Kovacs A, Gocza E. Evaluation of effects of cryopreservation on rabbit spermatozoa membranes with trypan blue-giemsa staining.. In: Mexico: 8th World Rabbit Congress. 2004.
139. Pesch S, Bergmann M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*. 2006;37(7):597-617.
140. O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod*. 2002;17:704-9.
141. Garner DL, Thomas CA. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol Reprod Dev*. 1999;53:222-9.
142. Gille L, Nohl H. The ubiquinol/bc1 redox couple regulates mitochondrial oxygen radical formation. *Arch Biochem Biophys*. 2001;388:34-8.

143. Cummins JM, Jequier AM, Kan R. Molecular biology of human male infertility: Links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. *Mol Reprod Dev.* 1994;37:345-62.
144. Martin G, Sobido O, Durand P, Levy R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod.* 2004;71:28-37.
145. Nandi D, Patra RC, Swarup D. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Theriogenology.* 2005;211:26-35.
146. Türk G, Çeribaşı AO, Şahna E, Ateşşahin A. Lycopene and ellagic acid prevent testicular apoptosis induced by cisplatin. *Phytomedicine.* 2011;18:356-61.
147. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: Levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl.* 1993;16:183-8.

8. ÖZGEÇMİŞ

Metin Er, 1983 yılında Samsun'un Bafra ilçesinde doğdu. 2001 yılında İstanbul Ahmet Rasim Lisesi'ni, 2008 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'ni bitirdi. 2009 yılında araştırma görevlisi olarak Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya başladı ve halen üniversitedeki görevine devam etmektedir.

