

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA
ANABİLİM DALI**



**KOÇLARDA SPERMATOLOJİK
ÖZELLİKLER VE SPERMANIN
SAKLANABİLİRLİĞİ
ÜZERİNE L-ARJİNİN'İN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

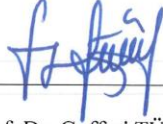
Arş. Gör. Şeyma ÖZER KAYA

2016

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Gaffari TÜRK

Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Seyfettin Gür



Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Seyfettin Gür



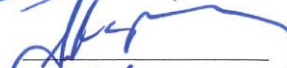
Prof. Dr. Ömer UÇAR



Prof. Dr. Mustafa SÖNMEZ



Prof. Dr. Abdurrauf YÜCE



Doç. Dr. Orhan AKMAN



TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam sũresince yardımlarını esirgemeyen doktora tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Seyfettin GÜR başta olmak üzere Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Gaffari TÜRK, Prof. Dr. Mustafa SÖNMEZ, Prof. Dr. Eşref DEMİRCİ ve Doç. Dr. Tanzer BOZKURT'a şükranlarımı sunarım.

Doktora tezimde Arginaz aktivitesinin belirlenmesi aşaması ve doktoramın tüm aşamalarında bana yardımlarını esirgemeyen F.Ü. Veteriner Fakũltesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda bulunan eşim Arş. Gör. Emre KAYA'ya teşekkür ederim.

Ayrıca, bu günlere gelmemde bana en büyük emeği ve desteği veren babam Prof. Dr. Edip ÖZER, annem Sergül ÖZER ve ablam Selin AYAZ'a teőekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

II.Onay Sayfası	II
III.Teşekkür	III
IV.İçindekiler	IV
V.Şekil Listesi	viii
VI.Tablo Listesi	ix
VII.Kısaltmalar	X
1. Özet	1
2. Abstract	3
3. Giriş	5
3.1. L-arjinin Nedir?	7
3.2. L-arjinin'in Sentezi, Metabolik Yolları ve Fonksiyonları	8
3.3. Koçlarda Üreme Organları	12
3.4. Koçlarda Spermatogenezis	14
3.5. L-arjinin'in Spermatogenezis Üzerine Etkisi	15
3.6. L-arjinin'in Seminal Plazma Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	16
3.7. L-arjinin'in NO ve Erektile Disfonksiyon Üzerine Etkisi	17
3.8. Parenteral ve Oral L-arjinin Uygulamalarının Spermatolojik Özellikler Üzerine Etkisi	19
3.8.1. Sperma Miktarı	19
3.8.2. Spermatozoon Motilitesi ve Yoğunluğu	19
3.8.3. Anormal Spermatozoon Oranı	23
3.9. Saklama Esnasında L-arjinin'in Sperma Üzerine Etkisi	23
3.9.1. Kısa Süreli (+4 °C) Saklama Esnasındaki Etkisi	23

3.9.2. Uzun Süreli (Dondurarak) Saklama Üzerine Etkisi	25
4. Gereç ve Yöntem	27
4.1. Gereç	27
4.2. Yöntem	27
4.2.1. Suni Vajenin Hazırlanması	28
4.2.2. Koçların Suni Vajene Alıştırılması ve Sperma Alınması	28
4.2.3. Koçların Ereksiyon Süresinin Belirlenmesi	28
4.2.4. <i>İn vivo</i> L-arjinin uygulanması (1. Aşama)	29
4.2.4.1. Rutin Sperma Muayeneleri	29
4.2.4.1.1. Miktar	29
4.2.4.1.2. Kitle Hareketi (Mass Aktivite)	29
4.2.4.1.3. Motilite	30
4.2.4.1.4. Yoğunluk	30
4.2.4.1.5. Morfolojik Muayene (Anormal Spermatozoon Oranı)	31
4.2.4.2. pH Değerinin Ölçümü	32
4.2.4.3. Hipoozmotik Swelling (HOS) Test	32
4.2.4.4. Arginaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	32
4.2.4.4.1. Seminal Plazmanın Elde Edilmesi	32
4.2.4.4.2. Arginaz Aktivitesinin Tayini	32
4.2.5. <i>İn Vitro</i> L-arjinin Uygulanması (2.Aşama)	33
4.2.5.1. Sperma Sulandırıcısının Hazırlanması	34
4.2.5.2. L-arjinin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	34
4.2.5.2.1 Kısa Süreli Saklamada Kullanılacak Olan Stok Solüsyonlar	34

4.2.5.2.2 Uzun Süreli Saklamada Kullanılacak Olan Stok Solüsyonlar	35
4.2.5.3. Spermanın Kısa Süreli (+4 °C) Saklanması	36
4.2.5.4. Spermanın Uzun Süreli (Dondurularak) Saklanması	36
4.2.5.4.1. Spermanın Dondurulma Aşamaları	37
4.2.5.4.1.1. Ön Sulandırma İşlemi ve Soğutma	37
4.2.5.4.1.2. Gliserolizasyon	37
4.2.5.4.1.3. Equilibrasyon	37
4.2.5.4.1.4. Spermanın Payetlere Çekilmesi	38
4.2.5.4.1.5. Spermanın Dondurulması	38
4.2.5.4.1.6. Dondurulmuş Spermanın Çözdürülmesi	38
4.2.6. İstatistiksel Analiz	39
5. Bulgular	40
5.1. <i>İn vivo</i> (1. aşama) bulgular	40
5.1.1. Ereksiyon Süresi	40
5.1.2. Sperma Miktarı	41
5.1.3. Sperma pH'sı	42
5.1.4. Spermanın Kitle Hareketi	43
5.1.5. Spermatozoon Motilitesi	44
5.1.6. Spermatozoon Yoğunluğu	45
5.1.7. Anormal Spermatozoon Oranı	46
5.1.8. Hipoosmotik Swelling (HOS) Test	47
5.1.9. Seminal Plazma Arginaz Aktivitesi	48
5.2. <i>İn Vitro</i> (2. aşama) Bulgular	49

5.2.1. Kontrol ve L-arjinin İlave Edilerek Kısa Süreli Saklanan Spermaların Motilite Değerleri	49
5.2.2. Kontrol ve L-arjinin İlave Edilerek Kısa Süreli Saklanan Spermaların Membran Bütünlüğü (HOS) Değerleri	52
5.2.3. Kontrol ve L-arjinin İlave Edilerek Kısa Süreli Saklanan Spermaların Seminal Plazma Arginaz Aktivite Değerleri	54
5.2.4. Spermanın Dondurulma Öncesi ve Dondurulup Çözdürüldükten Sonraki Motilite Değerleri	54
5.2.5. Spermanın Dondurulma Öncesi ve Dondurulup Çözdürüldükten Sonraki HOS Test Değerleri	56
5.2.6. Spermanın Dondurulma Öncesi ve Dondurulup Çözdürüldükten Sonraki Seminal Plazma Arginaz Aktiviteleri	58
6. Tartışma	60
6.1. L-arjinin'in <i>İn vivo</i> Etkisi	60
6.2. L-arginin'in <i>İn vitro</i> Etkisi	65
7. Kaynaklar	72
8. Özgeçmiş	84

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. L-arjinin'in Kimyasal Yapısı.....	7
Şekil 2. L-arjinin Enjeksiyonunun Koçların Ereksiyon Süresi Üzerine Etkisi.....	40
Şekil 3. L-arjinin Enjeksiyonunun Koçların Sperma Miktarı Üzerine Etkisi.....	41
Şekil 4. L-arjinin Enjeksiyonunun Koçların Sperma pH'sı Üzerine Etkisi.....	42
Şekil 5. L-arjinin Enjeksiyonunun Koçların Sperma Kitle Hareketi Üzerine Etkisi.....	43
Şekil 6. L-arjinin Enjeksiyonunun Koçların Spermatozoon Motilitesi Üzerine Etkisi.....	44
Şekil 7. L-arjinin Enjeksiyonunu Koçların Spermatozoon Yoğunluğu Üzerine Etkisi.....	45
Şekil 8. L-arjinin Enjeksiyonunun Koçların Anormal Spermatozoon Oranı Üzerine Etkisi.....	46
Şekil 9. L-arjinin Enjeksiyonunun Koçların Sperma HOS Test Değerleri Üzerine Etkisi.....	47
Şekil 10. L-arjinin Enjeksiyonunun Koçların Seminal Plazma Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	48
Şekil 11. Kontrol ve Farklı doz L-arjinin İçeren Koç Spermalarının Dondurulma Öncesi ve Dondurulup Çözdürüldükten Sonraki Motilite Değerleri.....	56
Şekil 12. Kontrol ve Farklı Doz L-arjinin İçeren Koç Spermalarının Dondurulma Öncesi ve Dondurulup Çözdürüldükten Sonraki HOS Test Değerleri.....	57
Şekil 13. Kontrol ve Farklı Doz L-arjinin İçeren Koç Spermalarının Dondurulma Öncesi ve Dondurulup Çözdürüldükten Sonraki Seminal Plazma Arginaz Aktivitesi Değerleri.....	59

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Tris + Yumurta Sarısı Sulandırıcısı.....	34
Tablo 2. +4 °C’de Bekletilen Kontrol ve L-arjinin İlave Edilmiş Koç Spermaların Motilite Değerleri.....	51
Tablo 3. +4 °C’de Bekletilen Kontrol ve L-arjinin İlave Edilmiş Koç Spermaların Hipoosmotik Swelling (HOS) Test Değerleri.....	53
Tablo 4. +4 °C’de Bekletilen Kontrol ve L-arjinin İlave Edilmiş Koç Spermaların Seminal Plazma Arginaz Aktiviteleri.....	55



KISALTMALAR

NO	: Nitrik Oksit
g	: Gram
kg	: Kilogram
LD	: Letal Doz
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
O₂⁻	: Süperoksit Anyon
ATP	: Adenozin Trifosfat
IU	: İnternasyonal Ünite
U	: Ünite
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
sGMP	: Siklik Guonozin Monofosfat
M	: Molar
mM	: Milimolar
°C	: Santigrat Derece
i.m.	: İntra Müsküler
µl	: Mikrolitre
cm	: Santimetre
HOS	: Hipoozmotik Swelling
TDMU	: Tiyosemikarbazit Diasetilmonoksim Üre
UV	: Ultraviyole

nm : Nanometre
ADH : Antidiüretik Hormon
ROS : Reaktif Oksijen Türleri



1. ÖZET

Bu çalışma, L-arjinin'in koçlarda bazı üreme parametreleri ve spermanın saklanabilirliği üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Çalışmanın 1. aşamasında 7 hafta boyunca gün aşırı 5 mg/kg dozunda L-arjinin enjeksiyonlarını müteakip koçların ereksiyon süreleri, spermatolojik özellikleri ve seminal plazma arginaz aktiviteleri incelendi. Çalışmanın 2. aşamasında ise sperma örneklerine 0,1, 0,5, 1, 5 ve 10 mM dozlarında *in vitro* L-arjinin ilave edildikten sonra örnekler kısa ve uzun süreli saklama işlemlerine tabi tutuldu.

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, L-arjinin'in i.m. enjeksiyonları ereksiyon süresi (3. haftadan sonra $p<0,01$) ve anormal spermatozoon oranında (sadece 2. haftada $p<0,01$) önemli azalmalara yol açarken, kitle hareketi ($p<0,01$), motilite ($p<0,05$, $p<0,01$), yoğunluk (3, 5, 6. haftalarda $p<0,01$) ve membran bütünlüğünde ise (3. haftadan sonra $p<0,05$, $p<0,01$) önemli artışlar sağladı.

+4 °C'de kısa süreli saklanan örnekler değerlendirildiğinde, 10 mM L-arjinin ilavesinin sperma örneklerinin motilitesini 12. saatten sonra, membran bütünlüğünü de 48. saatten sonra azalttığı ($p<0,05$), ancak 0,5 mM L-arjinin ilavesinin 24 ve 96. saatlerdeki arginaz aktivitesini arttırdığı, 10 mM'lık ilavesinin ise 24, 72 ve 96. saatlerde azalttığı gözlemlendi.

Dondurulup çözödürölen spermanın motilitesi 0,5 mM L-arjinin ilave edilen grupta kontrol grubuna göre yüksek, 10 mM grubunda düşük olarak tespit edilirken, membran bütünlüğü ise 0,5 mM grubunda yüksek bulundu ($p<0,01$). Seminal plazma arginaz aktivitesi yönünden 10 mM L-arjinin ilave edilmiş sperma örneklerinde önemli bir azalma ($p<0,01$) gözlemlendi.

Sonuç olarak, i.m. L-arjinin uygulamaları koçların ereksiyon süresini kısaltmakta ve spermanın kalite parametrelerinde artış sağlamaktadır. Spermaya *in vitro* katılan L-arjinin'in 10 mM'lık dozunun gerek kısa süreli gerekse uzun süreli saklama esnasında spermanın kalitesine zarar verdiği, ancak 0,5 mM'lık doz ilavesinin ise saklama esnasında spermaya faydalı olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: L-arjinin, Spermatolojik zellikler, Saklanabilirlik, Koç.



2. ABSTRACT

Effect of L_arginine on spermatological characteristics and semen storability in rams

This study was conducted to determine the effect of L-arginine on some reproductive parameters and semen storability in rams.

In the experiment 1, erection time, spermatological characteristics and seminal plasma arginase activities of rams were examined after injection of L-arginine at 5 mg / kg dose every other day for 7 weeks. In the experiment 2, the semen samples were subjected to short and long term storage process after in vitro addition of L-arginine at the doses of 0.1, 0.5, 1, 5 and 10 mM to samples.

When compared with the control group, i.m. L-arginine injections provided significant reductions in erection time (after the 3rd week, $p<0.01$) and abnormal spermatozoon rate (only at the 2nd week, $p<0.01$), but significant increments in mass activity ($p<0.01$), motility ($p<0.05$, $p<0.01$), concentration (at 3rd, 5th, 6th weeks, $p<0.01$) and membrane integrity (after the 3rd week, $p<0.05$, $p<0.01$).

When the samples stored in short term at + 4 °C were evaluated, it was observed that the addition of 10 mM L-arginine to semen samples decreased the motility after the 12nd h and membrane integrity after the 48th h ($p<0.05$), but the addition of 0.5 mM L-arginine increased the arginase activity at the 24th and 96th h and its 10 mM addition decreased this activity at the 24th, 72th and 96th h.

The motility of frozen - thawed semen was determined to be high in group added with 0.5 mM L-arginine and to be low in 10 mM group while the membrane integrity was found significantly high in the 0.5 mM group ($p<0.01$).

A significant reduction was observed in semen samples supplemented with 10 mM L-arginine in terms of arginase activity ($p < 0.01$).

In conclusion, i.m. application of L-arginine provides a shortening in the erection time and an increment in semen quality parameters of rams. It was concluded that the *in vitro* addition of 10 mM L-arginine to semen damages spermatozoon quality during both short- and long-term storage, but the addition of 0.5 mM dose to semen would be useful during storage.

Key words: L-arginine, spermatological characteristics, storability, ram.

3. GİRİŞ

Koyun yetiştiriciliği hayvansal üretim (et, süt, yün ve deri) yönünden ülkemiz ekonomisinde önemli bir yer tutmaktadır. Ülkemiz, 32.186.000 civarında koyun varlığı (1) ile hayvancılık sektöründe önemli bir yere sahiptir. Ancak, verim açısından istenen düzeye henüz ulaşamamıştır.

Son yıllarda, hızlı nüfus artışına karşılık sayıları azalan koyunlarımızın ıslah edilmesi ve verimlerinin artırılması kaçınılmaz bir zorunluluktur. Ancak, ıslah çalışmalarındaki yetersizlikler, döl verimi düşüklüğü, bakım ve besleme şartlarının yetersiz olması ve erken kuzu kesimi gibi nedenlerden dolayı koyunculukta yeterli gelişme sağlanamamıştır. Koyunculuk alanında biyoteknolojik yöntemlerden faydalanılarak verimi arttırmak ve yüksek verimli yavrular elde edip ırkların devamlılığını sağlamak için suni tohumlama, östrus senkronizasyonu, embriyo nakli, embriyoların dondurulması, ikizlik oranının artırılması, embriyoda veya spermada cinsiyet tayini gibi bir takım yöntemler gittikçe yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Günümüzde kullanılan bu tekniklerden en ekonomik, hızlı ve etkili olanı suni tohumlamadır. Doğal aşım nispetle suni tohumlama yöntemi üstün genotipik yapı ve verim özelliklerine sahip koçların spermasıyla kısa sürede daha fazla sayıda hayvanın tohumlanmasını sağlar. Evcil hayvanlarda suni tohumlama alanındaki ilk bilimsel çalışma İtalyan Fizyolog Lazzaro Spallanzani tarafından 1780 yılında köpekler üzerinde denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır (2). Bu araştırmacı, 1776 yılında köpek, aygır ve insan spermasını kar içerisinde sakladığında spermatozoonların ölmediğini ancak motilitenin geçici olarak kaybolduğunu, bu spermaların sıcaklığının tekrar yükseltilmesi durumunda ise hareketlerin yeniden başlayarak

spermatozoonların normal duruma geldiklerini gözlemlemiştir. Koyunlarda ise ilk başarılı suni tohumlama uygulamaları 1899 yılında Rus bilim insanı E. I. Ivanof tarafından yapılmıştır (3).

Saha şartlarında yapılan ilk suni tohumlama uygulamalarında, sperma alındıktan hemen sonra dişi genital kanala verilirdi. Ancak, taze spermanın bölgesel olarak taşınma zorluklarının bulunması, fertilitenin 2-3 günle sınırlı olması ve alınan ejakülatla fazla sayıda hayvanın tohumlanmasının istenmesi araştırmacıları spermanın daha uzun süreli saklanmasına yönlendirmiştir (4). Spermanın saklanmasıdaki temel yaklaşım spermatozoonların metabolizmasını yavaşlatmak ve hareket enerjilerini azaltarak yaşam sürelerini uzatmaktır. Yapılan araştırmalar sonucunda spermanın saklanması için iki yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan birincisi, spermanın sıcaklığını düşürmek vasıtasıyla spermatozoonların metabolizmasını yavaşlatarak sıvı şekilde kısa süreli saklaması, ikincisi ise 0°C'den daha düşük sıcaklıklarda spermanın dondurularak uzun süreli saklanması yöntemidir.

Spermanın saklanması sırasında, spermatozoon motilitesi ve membran bütünlüğünde değişen düzeylerde kayıplar ve DNA kırıklı spermatozoon oranında artışlar bunların sonucu olarakta fertiliten oranlarında düşmeler yaşanmaktadır (5).

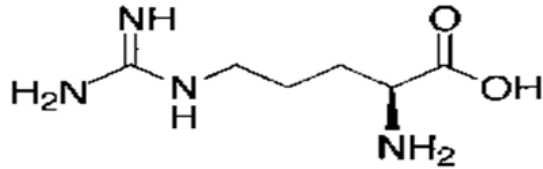
Koç sperması diğer türlere nazaran dondurulmaya karşı oldukça hassastır. Bu durumun temel nedeni, spermatozoon membranının önemli bir kısmını doymamış yağ asitlerinin (fosfolipitler) oluşturmasıdır. Buna bağlı olarak spermanın dondurulması sırasında yapılan soğutma işlemleri spermatozoon membranının geriye dönüşümsüz sıvı fazdan jel fazına geçmesine neden olmakta

ve membran içi enzimlerin kinetiğinde değişimlere yol açarak, çözdürme sonrası canlılığının azalmasına sebep olduğu görölmektedir (6, 7).

Proteinlerin yapı taşları olan aminoasitler hücreleri yapılandırır, dokuları onarır ve enzimlerin oluşturulmasından sorumludur. Proteinlerin parçalanarak aminoaside dönüşümü aminoasitlerin vücuttaki ilk işlevleridir. Bu dönüşümden sonra aminoasitler bulabildikleri her yerde nitrojen ile birleşerek vücudun kullanabileceği binlerce çeşit protein formunu alırlar. Vücutta uygun bir protein sentezi elde edebilmek için, bütün aminoasitlerin mutlaka aynı zamanda ve doğru miktarlarda bulunmaları gereklidir. Eğer bir aminoasit kullanılıyorsa, vücut için en uygun olan L- formlarının kullanılması gerekmektedir (8).

3.1. L-arjinin Nedir?

İlk olarak Hedin tarafından 1895'te bulunmuş olan arjinin, pozitif yüklü R gruplu bir aminoasittir. D ve L arjinin olarak var olan iki formdan, proteinlerde bulunanı L-arjinin'dir. L-arjinin, doğada bulunan proteinlerin yapısını oluşturan 20 aminoasitten biridir (Şekil 1). Sembolik kısaltması Arg veya R olan bu aminoasidin moleköl ağırlığı 210,66 g/mol ve moleköl formülü $C_6H_{14}N_4O_2.HCl$ 'dir (9).



Şekil 1. L-arjinin'in Kimyasal Yapısı

3.2. L-arjinin'in Sentezi, Metabolik Yolları ve Fonksiyonları

Vücutta L-arjinin (2 amino 5 guadinovalek asit) farklı kimyasal yollarla sentezlenir. Bunlar sitrülinden L-arjinin sentezi (ince bağırsak, böbrek ve karaciğerde), glutamattan L-arjinin sentezi ve proteinlerin yıkımından L-arjinin oluşumu şeklindedir (10, 11).

L-arjinin, enterositler tarafından ince bağırsak lumeninden alınarak aktif transportla emilir. Küçük bir kısmı enterositlerde metabolize olur ve burada protein sentezinde kullanılır. Metabolize olmamış kısım ise portal dolaşımla karaciğere taşınarak bir miktar daha metabolize olur. Karaciğerde metabolize olmamış L-arjinin, sistemik dolaşıma geçerek çeşitli dokulara dağılır ve farklı metabolik olaylara katılır. Glomeruler filtrasyona uğrayan L-arjinin'in büyük kısmı reabsorbe olur (12). L-arjinin oral yolla alındıktan yaklaşık 1-2 saat sonra plazmada en yüksek düzeyine ulaşır (13).

Vücutta L-arjinin, arginazla ornitin ve üreye katabolize olur. L-arjinin, hayvan hücrelerinde çeşitli dokularda farklı metabolik olaylara katılıp önemli bileşiklerin yapılarında yer alır. Hem protein sentezi, hem de glukoz ve glikojen oluşumu, nitrik oksit (NO), ornitin ve üre sentezi, kreatin, agmatin, glutamat, prolin ve poliaminlerin biyosentezinin yanı sıra bazı hormonların (insülin, prolaktin, glukagon, büyüme hormonu) sentezi ve antidiüretik hormonun (ADH) yapısında yer alır (8, 14, 15).

L-arjinin prokürsörü olan sitrulin'in sentezinin vücutta önemli bir kısmının ince bağırsaktaki epitel hücrelerde emildiği bildirilmiştir (16).

L-arjinin, nitrik oksit sentaz aracılığıyla sitrulin ve NO'ye, arginaz dekarboksilaz aracılığıyla L-agmatin'e, glisinamidinotrasferaz aracılığıyla

guadinoasetat'a dönüşür. Sonra guadinoasetat N-metiltransferaz aracılığıyla kreatin'e, arginaz aracılığıyla L-ornitin'e dönüşüp üre açığa çıkarılır. L-ornitin ise prolin ve glutama'ta dönüşür (17).

L-arjininden sentezlenen ornitin, poliamin sentezi için bir prekürsördür. Poliamin ise hücre proliferasyonu için gereklidir. Koç spermasının seminal plazmasında ve başta epididimis olmak üzere erkek üreme sisteminin diğer kısımlarında çeşitli poliaminler bulunur. Poliaminler (putresin, spermin, spermidin) hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan biyomoleküllerdir. Poliamin biyosentezinde arginaz başlangıç enzimi olup oluşan ornitin, ornitin dekarboksilaz enzimi ile putresin'e dönüşmekte, putresin de daha sonra spermin ve spermidin sentezine katılmaktadır (18, 19). L-arjinin de poliaminleri etkileyerek spermatozoon motilitesinde artışına neden olmaktadır (20).

Tüm vücut göz önünde bulundurulduğunda, L-arjinin sentezi böbrek-bağırsak ekseninde gerçekleşir. Bu bölgelerde, glutamin ve glutamattan sitrülün üreten ince bağırsak epitel hücreleri böbrek proksimal tübül hücreleriyle işbirliği içindedir. Böbrek hücreleri, sitrülün'i döngüden çıkarıp L-arjinine çevirir. Sonuç olarak, bağırsak ya da böbrek fonksiyonlarının zayıflaması endojen L-arjinin sentezini azaltır ve besinle alınması gereken miktarı artırır (21).

L-arjinin, vücutta üretilebilir ve doğrudan gıdayla alınması gerekmez. Ancak, biyosentetik döngüde yeterli miktarda L-arjinin üretilemez ve bir kısmı beslenme yoluyla alınmalıdır. İyi beslenmeyen ve bazı fiziksel sorunları olan bireylere L-arjinin içeren gıdalar tüketmeleri önerilir. L-arjinin'in yetişkinlerdeki günlük alımının 3-6 g arasında olduğu belirtilmiştir (22).

Domuzlarda kullanılan 2 g/kg dozundaki L-arjinin'in tolere edilebildiği ve herhangi bir yan etkisinin olmadığı bildirilmektedir (23). Sıçanlarda L-arjinin'in ağızdan alımda akut toksik değerinin (LD50) 16 g/kg olduğu rapor edilmiştir (24). Tsubuku ve ark. (25) yaptıkları çalışmada Spraque-Dawley sıçanların diyetlerine 13 hafta boyunca %1,25, %2,5 ve %5 L-arjinin kattıklarında herhangi bir yan etki oluşmadığını belirtmişlerdir.

Besinsel bir kaynak olarak L-arjinin'in uzun dönemli etkilerinin oluşumu istendiğinde oral yol tercih edilmelidir. Çünkü bu yolla yarı ömrü intravenöz veya intraarteryel uygulamaya göre daha uzundur. Günde 30 g'lık ilavelerin normal bireylerde çok iyi tolere edilebildiği gözlenmiştir. Duruma göre, 3-30 g arasındaki dozların kullanılmasında herhangi bir sakınca olmadığı ancak 40 g'dan daha fazla alınmasında çeşitli yan etkilerin olduğu belirtilmiştir (26).

Yüksek doz oral L-arjinin-HCl uygulamasının lizin, histidin gibi bağırsaktaki diğer aminoasitlerin emilimini bozarak aşırı NO üretimi diare, bulantı ve gastrointestinal rahatsızlıklar oluşturduğu bildirilmiştir (27).

Shao ve Hachocck (28) yaptıkları çalışmada insanlara intravenöz (çocuk 0,5 g, yetişkin 30 g) ve oral (9 g) uygulanan L-arjinin-HCl'nin uzun süreli kullanımlarda herhangi bir yan etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

L-arjinin çeşitli gıdalarda bulunur. Hayvansal kaynaklı olarak, süt ve süt ürünlerinde (yoğurt, peynir altı suyu proteinli içecekleri, beyaz peynir), sığır, tavuk ve hindi etinde, deniz ürünlerinde (ıstakoz, karides, salyangoz, tuna) değişen miktarlarda bulunur. Bitkisel kaynaklı olarak ise yüksek kaliteli bitkisel proteinlerde (soya) yüksek oranda L-arjinin bulunur. Ayrıca tahıllarda, buğday tohumu ve ununda, esmer buğday, yulaf unu ve kabuklu yemişlerde (hindistan

cevizi, ceviz, kaju, badem, fındık, fıstık), çekirdek ve bezelyede bulunur (29, 30). Ancak, çoğu memelinin sütünde (inek, insan, domuz) L-arjinin oranı düşüktür. Mateo ve ark. (31) yaptıkları bir çalışmada normal diyetlerdeki L-arjinin'in domuzların büyüme ve üreme performansı için yetersiz olduğunu bulmuşlardır.

Yeterli protein alımı yapan sağlıklı yetişkinlerde, beslenme ile yapılan günlük L-arjinin alımı fizyolojik ihtiyaçları karşılamada yeterlidir. Ancak, gelişmeleri için yüksek miktarlarda aminoasit gereksinimi olan büyüme dönemindeki çocuklar ve gençler için L-arjinin esansiyeldir. Ayrıca, çeşitli performans gerektiren yara, yanık, akut renal yetmezlik, vücut kütesinin ve vasküler hemodinamiğin korunması, sepsis, pulmoner hipertansiyon, intersitisyel sistit, HIV, AIDS, hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi durumlarda da L-arjinin'in dışarıdan besin destekleri veya intravenöz uygulama şeklinde alındığı bildirilmektedir (32, 33, 34).

L-arjinin alımının çeşitli performans artırıcı etkilerinin olduğu da gözlemlenmiştir. Vücutta dolaşan NO seviyesindeki artışa neden olma özellikleri sonucunda egzersiz kapasitesini artırma gibi ergojenik etkiler, büyüme hormonu salgısını tetikleyici özelliğinden ötürü kas protein sentezini artırıcı etkisi gibi yararları da bunlardan bazılarıdır (35).

L-arjinin'in antioksidan özelliği de vardır. Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit anyonlarını (O_2^-) etkili bir şekilde süpürmektedir. LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterolün aterogenez patogenezinde çok önemli olan okside-LDL'ye oksidasyonunu inhibe eder. Sonuçta okside-LDL oluşumunu inhibe eden L-arjinin, antiaterojenik etkiye de sahiptir (36, 37).

Teke spermasının fizyolojisinde ve hücre metabolizmasının arttırılmasında L-arjinin önemli bir rol oynar. Srivastava ve ark. (38) teke sperması üzerinde L-arjinin'in ve alfa-tokoferol'un lipid peroksidasyona karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

L-arjinin ilavelerinin başta kardiyovasküler sistem olmak üzere immun, endokrin ve kas iskelet sistemleri üzerinde olumlu etkileri vardır. Ayrıca, L-arjinin'in ürogenital sistem üzerindeki etkileri de çok fazladır. Hem erkek hem de kadınlarda seksüel fonksiyonda etkilidir. Kadınlarda NO üzerinden klitoral ve vajinal kan akımını arttırarak orgazmı kolaylaştırır. Erkeklerde ise genital bölgedeki kan akımını arttırmak suretiyle ereksiyon ve libido artışına sebep olmaktadır (39).

In vivo ve *in vitro* çalışmalar L-arjinin/NO yolunun aktivasyonundan sonra penis ereksiyonunun oluştuğunu kanıtlamıştır. Erektile disfonksiyonu olan hastalarda L-arjinin ilavelerinin seksüel işlevlerde düzelmeye neden olduğu görülmüştür. Günümüzde erektil disfonksiyonların, erkek infertilitesinin, spermatozoon sayısının azlığı (oligozoospermi) ve spermatozoon motilitesinin normalden düşük olması (astenospermi) durumlarının tedavilerinde L-arjinin ilaveleri umut verici olarak kullanılmaya başlanmıştır (40, 41, 42).

3.3. Koçlarda Üreme Organları

Koçlarda genital organların farklılaşması gebeliğin yaklaşık 35. günü başlamakta ve testisler fötüste 50. ile 60. günler civarında oluşmaktadır (43, 44, 45).

Koçlarda üreme organları, primer cinsiyet organları, erkek eklenti bezleri, kanallar ve dış genital organlar olmak üzere 4 grup halinde değerlendirilebilir. Testisler primer üreme organlarıdır. Erkek kuzularda testisler doğumda skrotuma inmiş durumdadır. Testisler spermatozoon üretimi ve hormon salgılanmasını sağlayarak üreme fonksiyonu ve davranışlarını düzenler. Bu organlar, kıvrımlı kanalların bulunduğu kese tarzında organlardır. Bu kanallarda spermatogenezis gerçekleşir. Kanallar içerisinde spermatogenezisin devamlılığıyla birlikte, spermatogoniumdan tamamen gelişimini tamamlamış spermatozoonlara kadar her aşamada hücreler bulunur. Spermatozoon gelişimi bu kanalcıkların duvarında başlar ve gelişim boyunca kanal lumenine doğru ilerlemeye devam eder. Bu duvarlar arasındaki Sertoli hücreleri spermatozoon gelişimi esnasında bu hücrelerin beslenmesini ve gelişimini desteklemektedir. Kanal lumenine ulaşan spermatozoonlar sıvı basıncı etkisiyle kanal boyunca hareket ederek epididimise geçer (43, 44).

Epididimis, testis üzerinde bulunan ve spermatozoon olgunlaşmasının meydana geldiği kanallardan oluşur. Epididimiste olgunlaşmaya uğramayan spermatozoon fertilizasyon yeteneğine sahip değildir. Bunun yanında epididimis spermatozoonların depolanması görevini de üstlenmektedir. Spermatozoonların normal olarak epididimisten göçü ortalama 13 gün sürmektedir (43).

Sertoli hücrelerinden ayrılarak tubulus seminiferus lümenine geçen spermatozoonlar rete testis aracılığı ile epididimise taşınırlar. Spermatozoonlar epididimal göç sırasında sitoplazmik damlacıklarını kaybeder, olgunlaşır ve motilite yeteneğini de bu geçiş esnasında kazanırlar (43).

Koçlarda eklenti bezleri olarak vesikula seminalis, prostat ve cowper bezi bulunmaktadır. Sperma seminal plazma ve spermatozoonlardan oluşur. Seminal plazma ise epididimis, duktus deferens, vesikula seminalis, prostat ve cowper bezlerinin salgıları bulunur. Bu sıvılar, ejakülat miktarında artış sağlayarak spermatozoonların dişi ve erkek üreme kanallarında hareket kabiliyetini arttırır (43).

Koç seminal plazmasında sitrik asit, ergotiyonin, fruktoz, gliserilfosforilkolin, sorbitol vardır. Bunların dışında az miktarlarda da askorbik asit, amino asitler, peptitler, proteinler, lipitler, yağ asitleri ve enzimler bulunur. Seminal plazma, koç spermalarının motilitesini ve yaşama kabiliyetini arttırır. Seminal plazma, belirli bir derecede spermatozoonların soğuk şokuna maruz kalma riskini azaltır ve membran hasarlarını önler (46, 47).

Medeiros ve ark. (48) spermanın sulandırılması veya dondurma işlemi sırasında hipertonic ortama maruz kaldığını ve seminal plazmanın membranlardan uzaklaşabildiğini ve seminal plazmadaki koruyucu maddelerin çoğunlukla proteinler olduğunu bildirmişlerdir.

Spermatozoon oluşumunu ve motilitesini arttıran L-arjinin ise seminal plazmada bulunur (40, 49).

3.4. Koçlarda Spermatogenezis

Spermatogenezis doğumdan sonra yaklaşık 80 ile 90 günlükken başlamakta ve 140-150 gün olduğunda ise spermatozoonlar ejakülatta görülebilmektedir (44, 45).

Koçlarda spermatogenezis beslenme ve bakım şartlarına bağı olarak ortalama 4. ayda başlamaktadır (50). Spermatogenezis koçlarda 46-49 gün kadar sürmektedir. Bu süreci ırk, yaş, sıcaklık, nem, bakım ve gün ışığının uzunluğu gibi çevre faktörlerinin etkilediği ve bu faktörlerin de spermatolojik özelliklerde büyük varyasyonlar oluşturduğu bildirilmektedir (51).

Koçlarda spermatogenezis yıl boyu devam etmekle birlikte, gün ışığının azalmaya başlaması epifizden (pineal bezden) melatonin salgısının arttırmakta bu da seksüel aktiviteyi önemli ölçüde uyarmaktadır. Erkek kuzuların ilk damızlıkta kullanılma yaşı, erken gelişen ırklarda 7-8 ay, geç gelişenler (bazı merinos türleri gibi) için 16-20 ay civarı olarak bildirilmektedir (50, 51).

3.5. L-arjinin'in Spermatogenezis Üzerine Etkisi

Spermatogenezis üzerinde çok değişik etkenler rol oynamaktadır. Ancak bütün bu faktörleri ortaya çıkarmak ve özellikle spermatogenezis üzerinde ters etki yapan nedenleri bulmak çok zor ve çoğu zaman olanak dışı olduğundan, tedavi büyük bir sorun olmaya devam etmektedir. Sebebi saptanamayan infertilite vakalarında hormonlar, androjenler, ilaç ve vitaminler uygulanmakta, ancak bunlardan alınan sonuçlar da çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Bunlara ilave olarak, son yıllarda alternatif uygulamalar içerisinde L-arjinin takviyesi de kullanılmaya başlanmış ve insanlarda yapılan L-arjinin uygulamalarından oldukça olumlu sonuçlar alındığına dair yayınlar yapılmaya başlanmıştır.

L-arjinin ise spermatogenezisin devam ettirilmesinde gerekli olup, nükleoproteinlerin yapısına girdiği ve spermatozoonlarda önemli bir nükleoprotein komponenti oluşturduğu bildirilmiştir. Spermatogenezisin hem

mitoz hem de mayoz bölünmesi sırasında çok miktarda nükleoproteine ihtiyacı vardır. Spermatozoon nükleoproteini ise L-arjinin bakımından çok zengindir (52).

L-arjininden yetersiz beslenmenin, emilimindeki bozukluğun ve anormal aktivitesinin dokulardaki metabolizmanın düzensizliğine, dolayısıyla mitozun bozulmasına neden olduğu belirtilmiştir (49). L-arjinin'in, adenozin trifosfat (ATP) sentezinden dolayı sperm motilitesini arttırdığı bilinmektedir (49,53,54). Eksikliği ise spermatogeneziste bozukluklara ve motilitenin azalmasına neden olur. Bu durumla L-arjinin eksikliği arasında bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür (55).

3.6. L-arjinin'in Seminal Plazma Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Arginaz enziminin koç üreme sisteminin tüm kısımlarında farklı seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. Üretranın mukozal katlarında >60 IU/mg protein, seminal sıvı ve bulboüretral bezde ise en az 9-10 ile 20-31 IU/mg protein arginaz aktivitesinin olduğu bildirilmiştir (56).

Memelilerde prostat, testis ve seminal plazmada, boğa (57) ve koçlarda ise (58) üreme sisteminin diğer kısımlarında ve epididimal spermatozoonlarda arginaz enzimi bulunmuştur.

Porembaska ve ark. (59) gerçekleştirdiği çalışmada boğa testis dokusunda arginaz enzim aktivitesinin 0,43 U/g olduğu gözlenmiştir. Günaydın ve ark. (60) koç testis dokusunda yaptıkları çalışmada arginaz enzim aktivitesinin varlığını kanıtlamış ve enzim aktivitesini gram dokuda 1,0 ünite bulmuşlardır.

Gür ve Kandemir (61) koçlarda spermatolojik özellikler ile seminal plazma arginaz aktivitesi arasındaki ilişkiyi belirlemek için yaptıkları bir

çalışmada ortalama sperma hacmini, kitle hareketini, spermatozoon yoğunluğunu, motilitesini, anormal spermatozoon oranını ve seminal plazma arginaz aktivitesini sırasıyla $0,98 \pm 0,02$ ml, $2,72 \pm 0,23$, $1,22 \pm 0,19 \times 10^9$ /ml, $60,37 \pm 4,34\%$, $5,08 \pm 0,52\%$ ve $0,61 \pm 0,20$ U/mg protein olarak bulmuşlardır.

Türk ve ark. (62) tekelerde spermatolojik özellikler ile seminal plazma arginaz aktivitesi arasındaki ilişkiyi belirlemek için yapmış oldukları çalışmada da sperma hacmini, sperma pH'sını, kitle hareketini, spermatozoon yoğunluğunu, motilitesini, anormal spermatozoon oranını ve seminal plazma arginaz aktivitesini sırasıyla $0,9 \pm 0,0$ ml, $7,4 \pm 0,1$, $2,4 \pm 0,2$, $1,6 \pm 0,3 \times 10^9$ /ml, $69,1 \pm 3,3\%$, $10,2 \pm 0,7\%$ ve $0,9 \pm 0,1$ U/mg protein olarak bulduklarını belirtmişlerdir.

Eskiocak ve ark. (63) spektrofotometrik yöntemle ölçtükleri seminal plazma arginaz aktivitesi ile stresli insanlarda sperm motilitesi ile arasında negatif bir ilişki olduğunu tespit etmişlerdir. Stresli olan ve olmayan insanlarda spermatozoon yoğunluğu, motilite ve seminal plazma arginaz aktivitesi sırasıyla $41,28 \pm 3,70$ ve $77,62 \pm 7,13 \times 10^6$ /mL, $8,79 \pm 1,66$ ve $20,86 \pm 1,63\%$, $0,12 \pm 0,01$ ve $0,22 \pm 0,01$ U/ml olarak bulunmuştur.

3.7. L-arjinin'in NO ve Erektile Disfonksiyon Üzerine Etkisi

L-arjinin'in temel rolü, NO sentezinde bir prekürsör olmasından kaynaklanmaktadır. L-arjinin endotel hücrelerinde NO aracılığı ile trombotik aktiviteyi, vazokonstriksiyonu ve düz kas hücre proliferasyonunu düzenleyerek yangı ve lezyon oluşumunu inhibe eder (64, 65).

NO için klasik bir reseptör bölgesi yoktur. Guanilil siklazın hem grubuna bağlanarak hücre için ikincil haberci molekül olarak çalışan siklik guanozin

monofosfat (sGMP)'in birikmesine yol açar. sGMP, miyozin hafif zincir kinazın defosforilasyonuna neden olur (66).

NO, nonadrenerjik-nonkolinerjik nörotransmisyon süresince endotelden salınır ve böylece kaslarda guanilil siklazı aktive ederek, sGMP seviyelerini artırıp vasküler düz kasta kalsiyum seviyelerini azaltarak düz kasların (korpüs kavernozum) gevşemesini sağlar ve buna bağlı olarak ereksiyonda önemli bir rol üstlenir (66, 67).

Chen ve ark. (40) 6 hafta boyunca düzenli olarak günlük oral 5 gr L-arjinin alan 29 erektil disfonksiyonlu erkeğin süreç sonunda 9 kişide erektil disfonksiyonun düzeldiğini gözlemlemiştir.

Klotz ve ark. (68) L-arjinin'in erektil disfonksiyon üzerine etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 2 hafta süreyle günde 3 kez 500 mg L-arjinin kullanan hastaların % 40'ında, geri kalanların ise 6 hafta boyunca kullanmaya devam ettiklerinde % 31'inde erektil disfonksiyonun düzeldiğini belirtmişlerdir.

Shah (69) günlük olarak 1,5 gr L-arjinin uyguladığı hastalarında ise erektil disfonksiyon üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını gözlemiştir.

Sukardi ve ark. (70) tavşanlarda yaptıkları çalışmada L-arjinin'in 100, 200 ve 300 mg/kg farklı dozlarını 4 hafta boyunca uygulamışlardır. Tavşanlara 200 mg/kg uygulanan L-arjinin'in NO konsantrasyonunu arttırdığı ve bu artışın kontrole göre spermatozoon sayısında % 25,5 oranında bir artışa neden olduğunu ve NO konsantrasyonu ile L-arjinin tüketimi arasında önemli bir pozitif ilişki ($r = 0,624$) olduğu öne sürülmüştür. NO konsantrasyonu ile spermatozoon sayısı

arasında pozitif bir ilişki ($r = 0,584$), motilitesi ile de negatif bir ilişki ($r = -0,775$) tespit edilmiştir.

3.8. Parenteral ve Oral L-arjinin Uygulamalarının Spermatolojik Özellikler Üzerine Etkisi

3.8.1. Sperma Miktarı

Koçlarda sperma üretimi 18 aylıktan 4 yaşına kadar gittikçe artmakta olup, bir ejakülattaki miktar 0,5 – 2,0 ml arasında değişmekle birlikte, ortalama 1 ml civarındadır (71, 72).

Ejakülat miktarı yönünden koçlarda bireysel farklılık görülebildiği gibi aynı bireyin değişik ejakülatları arasında da farklılık görülebilmektedir. Genel olarak yaş, mevsim, beslenme, sperma alan kişinin teknik becerisi, sperma alma yöntemi, sperma alma sıklığı, koçun mizacı ve kondisyonuna bağlı olarak sperma miktarı değişebilmektedir (73, 74).

Wu ve ark. (23) diyetlerine 30 gün boyunca % 1'lik L-arjinin-HCl katılan domuzların sperma hacminde herhangi bir değişikliğin gözlenmediğini ancak motilitede % 8, yoğunlukta da % 18 oranında artış sağlandığını bildirmişlerdir. Ayrıca seminal sıvıdaki L-arjinin, prolin, ornitin ve poliaminlerin konsantrasyonunun kontrol grubuna göre sırasıyla % 43, % 41, % 56 ve % 63 oranında motiliteyi arttığını belirtmişlerdir.

3.8.2. Spermatozoon Motilitesi ve Yoğunluğu

L-arjinin, fosforik asit şeklinde, ATP'nin yeniden sentezinde rol oynayarak normal spermatozoon motilitesi için enerji maddesi sağlanmasında yardımcı

olmaktadır. Ayrıca L-arjinin, kallikrein-kinin sisteminin yapısını oluşturan peptidlerin en önemli komponenti olmasından dolayı spermatozoon motilitesinde önemli rol oynamaktadır (52, 75). Ancak L-arjinin'in yüksek konsantrasyonlarının motilite üzerinde ters etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir (76, 77).

L-arjininuygulanan tavşan ve tekelerin spermatozoon motilitesinde önemli artışlar sağladığı bildirilmiş olup, bu olumlu etkinin spermatozoonlardaki ATP düzeylerinin L-arjinin'e bağlı olarak yükselmesi ve dolayısıyla glikolizis oranının artmasıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir (54, 78).

Spermatozoonların hareket biçimleri ve hızlarının hayvan türlerine göre değerlendirilmesi gerektiğini bildiren Tekin (77), koç ve teke ejakülatlarında spermatozoon motilitesinin % 90 civarında olduğunu belirtmektedir. Buna karşın, Merinos, Dağlıç ve Ramlıç ırklarında yaptıkları çalışmalarında motilite oranını, sırasıyla % 84,78, % 75,15 ve % 76,17 olarak bildirmektedir.

Spermanın viskozitesi, ejakülatın akışkanlığını ve kıvamını göstermektedir. Gökçen ve ark. (74) koç spermasında seminal plazma miktarının az, buna karşılık spermatozoon sayısının yüksek olmasından dolayı akışkanlığın az olduğunu bildirmektedir. Spermanın kıvamı yönünden muayene edilmesi ejakülattaki spermatozoon yoğunluğu hakkında bir fikir vermesi bakımından önem taşımaktadır.

Spermanın kullanılmasında ve değerlendirilmesinde ejakülat miktarı ve spermatozoon motilitesinin yanı sıra, çok önemli bir diğer spermatolojik özellik olan spermatozoon yoğunluğu, tohumlama dozunun ayarlanmasında ve spermanın sulandırılmasında çok büyük önem taşımaktadır (72, 74, 79). Evans ve Maxwell

(73) iyi kalitede bir koç spermasında $3,5 - 6,0 \times 10^9$ /ml spermatozoon olması gerektiğini bildirmişlerdir.

Akkaraman koçlarda spermatolojik özelliklerin mevsimsel olarak değiştiğini kaydeden Türk ve Demirci (80), ortalama olarak sperma miktarı (ml), spermatozoon motilitesi (%), spermatozoon yoğunluğu (10^9 /ml) ve anormal spermatozoon oranını (%) sırasıyla ilkbahar da $0,81 \pm 0,0$, $72,76 \pm 1,17$, $2,53 \pm 0,05$, $6,82 \pm 0,17$, yaz $0,73 \pm 0,04$, $67,32 \pm 0,96$, $2,33 \pm 0,07$, $8,96 \pm 0,50$, sonbahar $1,06 \pm 0,02$, $83,32 \pm 0,88$, $3,11 \pm 0,05$, $4,61 \pm 0,20$ ve kış aylarında ise $0,71 \pm 0,08$, $67,21 \pm 2,54$, $2,23 \pm 0,10$, $6,59 \pm 0,14$ olarak bulmuşlardır.

Holt ve Albanesi (81) yaptıkları çalışmada yetişkin erkeklere 9 gün boyunca L-arjinin'den eksik diyet uyguladıklarında spermatozoon sayısında yaklaşık % 90 azalma ve immotil spermatozoon oranında ise % 10 artış olduğunu gözlemişlerdir.

Sukardi ve ark. (70) oral 200 mg/kg L-arjinin uygulanan tavşanlarda spermatozoon sayısının kontrole göre % 25,5 oranında arttığını ve optimum dozun bu olduğunu bulmuşlardır.

Aydın ve ark. (79) L-arjinin uyguladıkları oligospermi ve astenospermili sıçanlarda uygulamayı müteakip spermatozoon sayı ve motilitesinde artışların gözlemlendiği belirtilmiştir.

Scibona ve ark. (82) insanlara L-arjinin'i oral yolla vererek yaptıkları çalışmada L-arjinin uygulamasının herhangi bir yan etki oluşturmaksızın spermatozoon sayı ve motilitesinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan diğerk bir çalıřmada spermatozoon motilitesi dűřűk olan 12 erkeğinin diyetlerine 0,001 M ve 0,004 M L-arjinin eklendiğinde motilitenin 0,004 M tűketen erkeklerde daha fazla arttıėı (% 81,6 ± 9,96) gűzlenmiřtir (83).

Schachter ve ark. (49) 178 oligospermili insana 2 ay sűreli L-arjinin uygulamak suretiyle 111 vakada (%62,3) spermatozoon sayı ve motilitesinde ۆnemli derecede artıř, 21 vakada (%12,3) ise hafif bir artıř olduėunu bulmuřlardır.

Schachter ve ark. (84) L-arjinin uygulamalarının sadece spermatogeneziste artışa neden olmadığı aynı zamanda bir fosforik asit gibi rol alan L-arjinin'in normal spermatozoon motilitesi için gerekli bir enerji kaynağı olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada oligospermi ve astenospermili 141 hastaya gűnlűk oral yolla 4 mg L-arjinin su içerisinde verildiğinde, spermatozoon motilite ve yoğunluğunda 83 hastada ۆnemli derecede, 24 hastada orta derecede bir artışın olurken, 34 hastada ise herhangi bir iyileşmenin olmadığı vurgulanmıştır.

Ratnasooriya ve ark. (75) yapmış oldukları çalışmada oral olarak 10 sıçana 100 mg/kg, 12 sıçana ise 200 mg/kg dozunda L-arjinin uygulamışlardır. L-arjinin uygulamalarının epididimal spermatozoon sayısında ve motilitesinde $p < 0,01$ dűzeyinde ۆnemli bir artışa sebep olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca doza bağlı olarak L-arjinin'in yűksek motiliteye sahip spermatozoonların motilitesini inhibe ettiği belirtilmiştir.

Tanimura (85) yaptıkları çalıřmada infertil insanlarda 6-8 hafta oral yolla 0,5 g/gűn dozunda uygulanan L-arjinin-HCl'nin spermatozoon sayı ve motilitesinde artıřa neden olduėunu gűstermiřlerdir.

3.8.3. Anormal Spermatozoon Oranı

Anormal yapılı pek çok spermatozoonun fertilizasyon yeteneğinin olmaması ve bazı kalıtsal kusurları taşıması bakımından spermatozoonun morfolojik yapısının incelenmesi ve anormal şekilli spermatozoon oranlarının belirlenmesi spermatolojik muayene açısından önem arz etmektedir (79). Evans ve Maxwell (73) %20'den fazla anormal spermatozoon oranına sahip spermaların suni tohumlama amacıyla kullanılmaması gerektiğini bildirmektedir.

Ratnasooriya ve ark. (75), 100 ve 200 mg/kg dozunda oral L-arjinin uygulamalarının sıçanların spermatozoon morfolojisinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığını iddia etmişlerdir.

Schachter ve ark. (84) diyetteki L-arjinin eksikliğinin spermatozoonların morfolojik yapısında anormaliye sebep olduğunu ileri sürmüştür. Öte yandan, L-arjinin metabolizmasında görevli olan arginaz enziminin koç (61) ve tekelerin (62) seminal plazmasındaki düzeyleri ile anormal spermatozoon oranları arasında negatif bir ilişkinin olduğu da bildirilmektedir.

3.9. Saklama Esnasında L-arjinin'in Sperma Üzerine Olan Etkisi

3.9.1. Kısa Süreli (+4°C) Saklama Esnasındaki Etkisi

Morales ve ark. (86) yapmış oldukları çalışmada astenospermlı gönüllü erkeklerden 10 sperma örneği aldıklarını, bu sperma örneklerine L-arginin'i *in vitro* ilave ederek spermatolojik özelliklerin etkisine baktıkları çalışmada spermatozoon motilitesinin arttığını belirtmişlerdir.

Hassanpour ve ark. (87) yaptıkları çalışmada koçların kauda epididimisinden aldıkları sperma örneklerini her bir örnekte 40 milyon

spermatozoon ve 200 µl hacim oluşturacak şekilde 5 gruba bölmüşlerdir. Bir grubu kontrol olarak ayırıp diğer gruplara L-arjinin'in farklı dozlarını (0,001, 0,01, 0,1 ve 1 mM) katarak inkubasyona bırakmışlardır. L-arjinin'in düşük (0,001, 0,01 ve 0,1 mM) konsantrasyonlarının spermatozoon motilitesini az etkilediğini, yüksek konsantrasyonlarının (1 mM) ise motiliteyi önemli düzeyde ($p<0,05$) azalttığını belirtmişlerdir.

O'Flaherty ve ark. (88) 1,25 mM'dan 30 mM'a kadar değişen konsantrasyonlardaki L-arjinin'i boğa spermasına ekleyip inkübasyona bırakmışlardır. Kontrolle kıyaslandığında 10 mM ve daha düşük dozlarının motiliteye herhangi bir etkisinin olmadığını, ancak 10 mM'dan daha yüksek dozlarda ise motilitenin azaldığını belirtmişlerdir.

Ratnasooriya ve ark. (75) yapmış oldukları çalışmada *in vitro* olarak spermaya katılan L-arjininin farklı dozlarının motilite üzerine etkisini inceledikleri çalışmada kontrol grubunda %80,37, 100 gr/ml L-arjinin uygulanan grupta %48,85, 250 gr/ml uygulanan grupta % 36,14, 750 gr/ml uygulananlarda ise % 14,83 oranında motilite bulmuşlardır. Kontrol grubuyla uygulama grupları karşılaştırıldığında $p<0,01$ düzeyinde fark olduğu gözlemlenmiştir.

Carvalho ve ark. (89), 3 aygırın her birinden 3'er ejakulat topladıklarını ve bu spermalara farklı dozlarda (0, 2, 5, 10, 20 mM) L-arjinin katarak 38 °C'de 0, 60, 120, 300 dakika inkubasyona bıraktıkları çalışmalarında, spermaların total motilitesinin 0, 2, 5 mM ile 10 mM karşılaştırıldığında, 10 mM dozda azaldığını 20 mM dozda ise bu azalmanın daha da arttığını bulmuşlardır.

Srivastava ve ark. (55), tekelerden elde edilen epididimal spermaya L-arjinin katarak spermatozoon membran bütünlüğü üzerine etkisini inceledikleri çalışmada L-arjinin'in spermatozoon membran bütünlüğünü koruduğunu, bu etkisini de L-arjinin'in antioksidan özelliğiyle NOS enzimini inhibe ederek ve plazma membranını lipit peroksidasyona karşı koruyarak ortaya koyduğunu belirtmişlerdir.

3.9.2. Uzun Süreli (Dondurarak) Saklama Üzerine Etkisi

Siddique ve Atreja (90) yapmış oldukları çalışmada Murrah Bufalo boğalarından alınan spermaların bir kısmı L-arjinin içermeyen, diğer bir kısmı da 1 mM L-arjinin içeren sulandırıcılarla sulandırıldıktan sonra dondurulup çözündürüldüğünü ve çözüm sonu motilitelerini sırasıyla % 32,33±1,45, % 38,33±1,66 olarak bildirmişlerdir. Öte yandan, çözüm sonu spermatozoon membran bütünlüğünün kontrol grubunda % 30,01±0,6, L-arjinin ilave edilen grupta ise %43,16±0,72 olarak bulunduğunu, dolayısıyla L-arjinin'in dondurulmuş-çözündürülmüş spermatozoonların membran bütünlüğü ve motiliteleri üzerine koruyucu bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Srivastava ve ark. (55) spermalara kattıkları farklı dozlardaki L-arjinin'in dondurup çözündürüldükten sonra membran bütünlüğü üzerine etkisine baktıkları çalışmada soğuk şoku, radyasyon gibi nedenlerle oluşan lipit peroksidasyon sonucu spermatozoon membranındaki yağ asit kompozisyonunun değiştiğini, dolayısıyla membranın yapı ve fonksiyonunun bozulduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada 20 mM L-arjinin ilave edilen grupta en yüksek düzeyde lipit

peroksidasyonun oluştuğu ve membran bütünlüğünün önemli derecede etkilendiği gözlemlenmiştir.

Yapılan literatür incelemesinde, L-arjinin ile ilgili bilimsel çalışmaların hayvanlara göre insanlar üzerinde daha fazla yoğunlaştığı, bu çalışmalarda da verilme şekli olarak daha çok oral uygulama yolunun tercih edildiği ve erkek üreme sistemi ile spermatolojik özellikler üzerine olumlu sonuçlarının olduğu bildirilmiştir. Ancak erkek hayvanlarda parenteral L-arjinin uygulamalarının spermatolojik parametreler üzerine etkisi ile ilgili daha az sayıda çalışma bulunmaktadır. Öte yandan, günümüzde halen koç spermasının dondurulabilmesindeki problemlerin tam anlamıyla aşılamamasından dolayı dondurma öncesi sulandırıcılara koruyucu özellikleri olan pek çok farklı katkı maddeleri katılmaktadır. Bu durumlar göz önünde bulundurularak mevcut çalışma hem i.m. L-arjinin enjeksiyonunun koçların ereksiyon süresi, seminal plazma arginaz aktivitesi ve bazı spermatolojik özellikleri (miktar, kitle hareketi, motilite, yoğunluk, anormal spermatozoon oranı ve plazma membran bütünlüğü) hem de *in vitro* olarak spermaya değişik dozlarda L-arjinin katılmasının spermanın kısa ve uzun süreli saklanabilirliği üzerine etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla yapıldı.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Gereç

Araştırmada hayvan materyali olarak 2-3 yaşlarında, klinik olarak sağlıklı, fertilitesi bilinen ve genital organ muayenesi sonucunda herhangi bir patolojik bulguya rastlanmayan 12 adet Akkaraman ırkı koç ve 1 adet koyun kullanıldı. Koçlar çalışma süresince Fırat Üniversitesi Hayvan Hastanesi Hospitalizasyon Ünitesinde barındırıldı.

4.2. Yöntem

Çalışmaya başlamadan önce Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı alındı (2013/10). Deneysel uygulamalar süresince hayvanlara konsantre ve kaliteli kaba yem verildi. İçme suyu ise *ad libitum* olarak sağlandı. Çalışmadan 2 ay önce koçlarda antiparaziter sağaltım yapıldı.

Sperma alma çalışmaları üreme sezonu içerisindeki Eylül 2014-Ocak 2015 ayları arasında gerçekleştirildi. Analizler Fırat Üniversitesi Hayvan Hastanesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalındaki Androloji Laboratuvar'ında gerçekleştirildi. Çalışmada hayvanların kontrol ve deneme grubuna ayrılması için ereksiyon süresi ve spermatolojik özelliklerine bakıldı ve 2 grupta dengeli olacak şekilde hayvanlar gruplara dağıtıldı.

Çalışma iki aşamalı olarak yürütüldü. Birinci aşamada koçlara *in vivo* kas içi L-arjinin uygulaması yapıldıktan sonra spermatolojik özellikleri ve seminal plazma arginaz düzeyleri incelendi. İkinci aşamada ise spermaya *in vitro* L-arjinin katıldıktan sonra kısa ve uzun süreli saklama işlemi uygulandı.

4.2.1. Suni Vajenin Hazırlanması

Sert kauçuk silindirin içine boru şeklinde ince kauçuk astar çekildikten sonra her iki ucu suni vajen silindirinin dış yüzeyine doğru geri katlanarak lastik bantlarla iyice tutturuldu. Bu suretle suni vajen silindiri ile suni vajen iç lastiği arasında kapalı bir bölme oluştu. İç astarı geçirilmiş suni vajen silindirinin bir ucuna lastik huni takılarak bantlarla sıkıca tespit edildi. Bu lastik huninin açıkta kalan dar ucuna da dereceli sperma toplama kadehi tutturuldu. Hazırlanan suni vajende tabii vajinada bulunması gereken üç özellik olan sıcaklık, basınç, kayganlık sağlandı.

4.2.2. Koçların Suni Vajene Alıştırılması ve Spermanın Alınması

Çalışmaya başlamadan önce, koçlardan ayrı bir padokta tutulup hormonal uygulamalarla ($PGF_{2\alpha}$ Dinoprost, Dinolytic, Pfizer, 4ml) kızgınlığa getirilen koyun kullanılarak 2 ay süreyle koçların libidosu uyarıldı ve suni vajene sperma vermeleri sağlandı. Alışım sürecinden sonra çalışma süresince her bir koçtan alınan sperma örnekleri 1. aşama için ayrı ayrı, 2. aşama için de *pooling* yapılarak çalışıldı.

4.2.3. Koçların Ereksiyon Süresinin Belirlenmesi

Sperma alınmadan önce koçlar koyunun yanına getirildi ve cinsel olarak uyarılmaları sağlandı. Koç bu esnada dişiyi koklayıp flehmen hareketi gösterdi. Flehmen hareketinden sonra koça hileli atlatmalar yaptırılarak cinsel uyarımın derecesi arttırıldı ve peniste tam bir ereksiyon oluşması sağlandı. Ereksiyon

süresi, koçun koyunun yanına gelişinden ereksiyon oluşuncaya kadarki süre olarak belirlendi ve “saniye” olarak kaydedildi.

4.2.4. *İn vivo* L-arjinin uygulanması (1. Aşama)

Kontrol grubunda kullanılmak üzere 6 baş koça spermatogenezis süresince (7 hafta), gün aşırı 1 ml plasebo serum fizyolojik kas içi uygulandı. Deneme grubundaki 6 baş koça ise 7 hafta boyunca gün aşırı 5 mg/kg dozunda L-arjinin kas içi enjekte edildi. Enjeksiyonlar devam ederken her bir koçtan haftada 1 kez sperma örnekleri alındı. Sperma alma işleminden önce kontrol ve deneme grubundaki her bir koçun ereksiyon süreleri belirlendi. Sperma toplama tüplerine alınan örnekler gerekli muayenelerin yapılması için laboratuvara götürülerek 37 °C’ye ayarlanmış benmariye yerleştirildi. Alınan her bir ejakülatın, rutin spermatolojik özellikleri (sperma miktarı, kitle hareketi, spermatozoon motilite ve yoğunluğu, anormal spermatozoon oranı, sperma pH’sı) ile plazma membran bütünlüğü ve arginaz enzim aktivitesi belirlendi.

4.2.4.1. Rutin Sperma Muayeneleri

4.2.4.1.1. Miktar

Sperma hacmi, dereceli sperma toplama kadehi üzerindeki ölçü çizgilerine göre okunarak “ml” olarak kaydedildi.

4.2.4.1.2. Kitle Hareketi (Mass-Aktivite)

Sıcaklığı 37 °C’ye ayarlanmış ısıtma tablasına yerleştirilen lam üzerine küçük bir damla taze sperma konuldu. Lam üzerine lamel kapatılmadan faz

kontrast mikroskopta 10x10'luk büyütmede kitle hareketi incelendi. Değerlendirme, güçlü hareketlere sahip spermatozoonların oluşturduğu, kaynama veya dalgaların girişimi şeklindeki hareketlerin oluş derecesi göz önüne alındı. üç farklı saha incelenerek 0 ile 5 arasında bir puan verildi (4, 43).

4.2.4.1.3. Motilite

Öncelikle sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış mikroskobun ısıtma tablasına temiz bir lam yerleştirilerek ısıtıldı. Sonra lam üzerine 0,5 ml tris sulandırıcısı ve üzerine 3µl taze sperma konularak sulandırıldı. Üzerine 45° eğimle lamel kapatıldı. Faz-kontrast mikroskop altında 10x40'luk büyütmede motilite belirlendi. Değerlendirme, ileri yönde ve güçlü hareket eden spermatozoonların, hareketsiz ve diğer hareket biçimlerini gösterenlere oranı şeklinde, en az 3 farklı sahada motilite oranlarının ortalaması alınarak yapıldı ve % 0-100 arasında değer verilerek kaydedildi (4, 43).

4.2.4.1.4. Yoğunluk

Spermatozoon yoğunluğu hemositometrik yöntem kullanılarak belirlendi (4, 91). Bu amaçla eritrosit sayımında kullanılan pipetin 0,5 çizgisine kadar sperma, 101 çizgisine kadar da % 2'lik eosin solüsyonu çekilerek 1:200 oranında sulandırma gerçekleştirildi. Daha sonra pipetin her iki ucu parmakla kapatılıp yatay konumda 30 cm'lik mesafede 100 defa şiddetle ileri geri sallanarak karışım sağlandı. Bu işlemi takiben ilk 5 damla pipetten dışarı atıldı. Daha önceden hazırlanmış Thoma lamı üzerine sayım alanını örtecek şekilde sulandırılmış sperma konuldu. Thoma lamı üzerinde spermatozoonların pasif hareketlerinin

durması için 5 dakika beklendi. Spermatozoonların sayımı 10x40'lık büyütmede Thoma lamında, köşelerdeki 4 ve ortadaki herhangi bir orta büyüklükteki kare olmak üzere toplam 5 orta büyüklükteki karede (toplam 80 küçük kare) bulunan spermatozoonlar sayıldı. Yoğunluğun hesaplanması aşağıdaki formülden yararlanılarak yapıldı.

$$\text{Spermatozoon Yoğunluğu (Sayı /ml)} = \frac{\text{Sayılan spermatozoon sayısı}}{\text{Sayılan küçük kare sayısı}} \times \text{Toplam Küçük Kare Sayısı (400)} \times \text{Thoma Lamının Derinliği (10)} \times \text{Sulandırma Oranı (200)} \times 1000$$

4.2.4.1.5. Morfolojik Muayene (Anormal Spermatozoon Oranı)

Sperma numunelerindeki anormal spermatozoon oranını tayin etmek için Çini mürekkebi kullanılarak frotiler hazırlandı. Spermatozoonların tek tek görülebilmesi için tüp içindeki 1 ml sodyum sitrat içerisine 1 damla sperma numunesi damlatılarak sulandırıldı. Isıtma tablası üzerindeki lama sulandırılmış spermadan bir damla konuldu. Üzerine de 1-2 damla Çini mürekkebi damlatılarak karışım sağlandı. İkinci bir lam yardımıyla sürme froti çekilip kısa sürede kurutuldu.

Her bir frotiden 400 spermatozoon mikroskobun 40'lık objektifinde incelendi. Anormal şekilli olanların oranı % olarak ifade edildi (4, 43).

4.2.4.2. pH Değerinin Ölçümü

Sperma numunelerinin pH değerleri, daha önce kalibre edilen dijital pH metre kullanılarak ölçüldü.

4.2.4.3. Hipoozmotik Swelling (HOS) Test

Spermatozoon plazma membran bütünlüğünün belirlenmesi için Hipoozmotik Swelling (HOS) test kullanıldı. HOS test'in yapılması için, 100 µl sperma, 900 µl 100 mOsmol fruktoz solüsyonu ile karıştırılarak 37 °C'deki su banyosunda 30 dakika bekletildi. Bu karışımdan yapılan frotiden, faz kontrast mikroskopun 10x40 büyütmesinde 200 adet spermatozoon incelendi. Şişmiş ve kıvrılmış kuyruğa sahip sağlam spermatozoonların oranı yüzde (%) olarak ifade edildi (92).

4.2.4.4. Arginaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

4.2.4.4.1. Seminal Plazmanın Elde Edilmesi

Sperma örnekleri 15000 g'de 13 dakika soğutmalı santrifüjle (+4 °C'de) santrifüj edildi. Elde edilen seminal plazmalar, arginaz aktivitesi tayin edilinceye kadar -20 °C'de saklandı.

4.2.4.4.2. Arginaz Aktivitesinin Tayini

Seminal plazma arginaz aktivitesi Gayer ve Dabich'in (93) belirttiği Thiosemicarbazide-Diacetyl-Monoxime-Urea (TDMU) metodunun bir modifikasyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi. Ölçümler iki kez tekrarlandı. Bu işlem için 0,1 ml seminal plazma 1/20 oranında 1 mM MnCl₂ ile

sulandırıldı ve 55 °C’de 12 dakika süreyle preinkübe edilerek enzim kaynağı olarak kullanıldı. 0,3 ml enzim kaynağı içeren tüpler 0,3 ml L-arjinin (120 mM, pH 9,5) ve 0,4 ml karbonat buffer (200 mM, pH 9,5) 37 °C’de 10 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon periyodunun sonunda, tüplere 3 ml asit ayracı ilave edildi. Reaksiyon durdurularak, daha sonra 10 dakika kaynar su banyosunda tutulan tüplere 2 ml renk ayracı ilave edildi. Tüpler daha sonra kaynar su banyosundan alınıp soğutulup 520 nm’de absorbansları kaydedildi.

Protein yoğunluğu Lowry ve ark. (94)’nın metodu kullanılarak belirlendi. Kısaca 1 ml alkali bakır ayracı içeren tüplere 0,1 ml süpernatant örnekler ilave edilerek karıştırılıp oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edildi. Daha sonra Folin ve Ciocalteunun fenol ayracı tüplere ilave edilip karıştırıldı. 55 °C’de 5 dakika süreyle inkübe edildi. Örneklerin absorbansı Shidmadzu UV 240 spektrofotometre kullanılarak 650 nm’de kaydedildi. Sonuçlar daha sonra U/mg protein olarak verildi.

4.2.5. *İn Vitro* L-arjinin Uygulanması (2.Aşama)

Çalışmanın 1. aşaması bitirildikten sonra koçlar 1 hafta süreyle dinlendirildi. Bu arada çalışmada kullandığımız L-arjinin dozları (10mM, 5 mM, 1mM, 0,5mM, 0,1mM) ön çalışma sonucunda belirlendi. Daha sonra çalışmanın 1. aşamasında kullanılan 6 koçtan 5 hafta süreyle haftada bir kez sperma örnekleri alındı. Haftalık olarak alınan ejakülatlar 37 °C’de pooling yapıldıktan sonra 2 eşit kısma ayrılarak kısa ve uzun süreli saklama protokollerine tabi tutuldu.

4.2.5.1. Sperma Sulandırıcısının Hazırlanması

Spermayı sulandırmak amacıyla Tris - Yumurta sarısı sulandırıcısı kullanıldı (Tablo 1). Sperma alınmadan 1 saat önce tartılarak hazırlanmış olan tris, glikoz ve sitrik asit 40-50 °C'ye kadar ısıtılmış olan 50 ml distile su içerisinde çözdürüldü. Daha sonra sıcaklığı 37 °C'ye düşürüldü. Günlük olarak alınan taze yumurtaların akı sarısından filtre kağıdı yardımıyla ayrıldıktan sonra hazırlanan solüsyona 15 ml yumurta sarısı ilave edilerek, karışıma 100.000 IU penisilin G ve 100 mg streptomisin eklendi ve hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan ön sulandırıcı 37 °C'deki su banyosuna konuldu.

Tablo 1. Tris + Yumurta Sarısı Sulandırıcısı

Madde	Miktar
Tris (hydroxymetyl aminomethane) (Merck 1.10695.0250)	3,63 g
Glikoz (Merck 1.08337.0250)	0,50 g
Sitrik asit monohidrat (Sigma C-2404)	1,99 g
Yumurta Sarısı	15,00 ml
Distile su	100,00 ml

4.2.5.2. L-arjinin'in Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

4.2.5.2.1 Kısa Süreli Saklamada Kullanılacak Olan Stok Solüsyonlar

- 1. Stok Solüsyonu (20 mM):** 0,42 gr L-arjinin tartılıp 100 ml distile suda çözdürülerek 20 mM'lık 1. stok solüsyon hazırlandı.
- 2. Stok Solüsyonu (10 mM):** 1. stok solüsyondan 50 ml alınıp distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak 10 mM'lık 2. stok solüsyon hazırlandı.

3. **Stok Solüsyonu (2 mM):** 0,042 gr L-arjinin tartılıp 100 ml distile suda çözdürülerek 2 mM'lık 3. stok solüsyon hazırlandı..
4. **Stok Solüsyonu (1 mM):** 3. stok solüsyondan 50 ml alınıp distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak 1 mM'lık 4. stok solüsyon hazırlandı.
5. **Stok Solüsyonu (0,2 mM):** 0,0042 gr L-arjinin tartılıp 100 ml distile suda çözdürülerek 0,2 mM'lık 5. stok solüsyon hazırlandı.

4.2.5.2.2 Uzun Süreli Saklamada Kullanılacak Olan Stok Solüsyonlar

1. **Stok Solüsyonu (20 mM):** Bir beher glass içerisine 0,42 gr L-arjinin üzerine 10 ml gliserol ilave edilip distile suyla 100 ml'ye tamamlanarak %10 gliserol ihtiva eden 20mM'lık L-arjinin'li 1. stok solüsyon hazırlandı.
2. **Stok Solüsyonu (10 mM):** Bir beher glass içerisine 0,21 gr L-arjinin üzerine 10 ml gliserol ilave edilip distile suyla 100 ml'ye tamamlanarak %10 gliserol ihtiva eden 10mM'lık L-arjinin'li 2. stok solüsyon hazırlandı.
3. **Stok Solüsyonu (2 mM):** Bir beher glass içerisine 0,042 gr L-arjinin üzerine 10 ml gliserol ilave edilip distile suyla 100 ml'ye tamamlanarak %10 gliserol ihtiva eden 2mM'lık L-arjinin'li 3. stok solüsyon hazırlandı.
4. **Stok Solüsyonu (1 mM):** Bir beher glass içerisine 0,021 gr L-arjinin üzerine 10 ml gliserol ilave edilip distile suyla 100 ml'ye tamamlanarak %10 gliserol ihtiva eden 1mM'lık L-arjinin'li 4. stok solüsyon hazırlandı.
5. **Stok Solüsyonu (0,2 mM):** Bir beher glass içerisine 0,0042 gr L-arjinin üzerine 10 ml gliserol ilave edilip distile suyla 100 ml'ye tamamlanarak %10 gliserol ihtiva eden 0,2mM'lık L-arjinin'li 5. stok solüsyonu hazırlandı.

4.2.5.3. Spermmanın Kısa Süreli (+4°C) Saklanması

Pooling yapıldıktan sonra 2 eşit kısma ayrılan spermmanın birinci kısmı, kısa süreli saklanmak amacıyla kullanıldı. Bu amaçla mililitrede 400 milyon motil spermatozoon olacak şekilde Tris - Yumurta sarısı sulandırıcısıyla sulandırılıp 6 eşit gruba ayrıldı. Grup 1 kontrol amacıyla tutulurken diğer gruplara sırasıyla son hacimde 0,1 mM (2. grup), 0,5 mM (3. grup), 1 mM (4. grup), 5 mM (5. grup) ve 10 mM (6. grup) L-arginin olacak şekilde stok solüsyonları ilave edildi. Örnekler +4 °C'de bekletilerek 0, 12, 24. saatlerde ve daha sonra da 24 saat aralıklarla motilitesi tükeninceye kadar motilite, membran bütünlüğü ve arginaz aktivitesi kontrolleri yapıldı.

4.2.5.4. Spermmanın Uzun Süreli (Dondurularak) Saklanması

Uzun süreli saklama amacıyla kullanılacak 2. kısım *pooling* yapılmış sperma ise, yine mililitrede 400 milyon motil spermatozoon olacak şekilde Tris - Yumurta sarısı sulandırıcısıyla sulandırılıp 6 eşit gruba ayrıldı. Grup 1 kontrol amacıyla tutulup diğer gruplara sırasıyla son hacimde 0,1 mM (2. grup), 0,5 mM (3. grup), 1 mM (4. grup), 5 mM (5. grup) ve 10 mM (6. grup) L-arginin olacak şekilde stok solüsyonları ilaveleri yapıldıktan sonra rutin dondurma işlemlerine tabi tutuldu. Dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların motilite, membran bütünlüğü ve arginaz aktivitesi kontrolleri yapıldı.

4.2.5.4.1. Spermanın Dondurulma Aşamaları

4.2.5.4.1.1. Ön Sulandırma İşlemi ve Soğutma

Pooling yapılmış spermanın 2. kısmı 37 °C'de mililitrede 400 milyon motil spermatozoon olacak şekilde toplam sulandırıcının yarısı ile ön sulandırmaya tabi tutulup 6 eşit gruba ayrıldı. Grup 1 kontrol amacıyla tutulup diğer gruplara sırasıyla son hacimde 0,1 mM (2. grup), 0,5 mM (3. grup), 1 mM (4. grup), 5 mM (5. grup) ve 10 mM (6. grup) L-arjinin olacak şekilde stok solüsyonları ilave edildi. Sulandırılmış ve L-arjinin ilavesi yapılmış sperma içeren tüpler sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış su dolu kaplar içerisine daldırılıp soğutma kabinine bırakılarak sıcaklığının yaklaşık 2 saat içerisinde soğutma kabininde 4 °C'ye düşmesi sağlandı.

4.2.5.4.1.2. Gliserolizasyon

Ön sulandırılması yapılmış ve sıcaklığı 4 °C'ye düşürülmüş kontrol grubu ile L-arjinin ilave edilmiş %10 oranında gliserol içeren toplam sulandırıcının diğer yarısı ile son sulandırma işlemine tabi tutuldu. Her bir grup için ayrılan ön sulandırılması yapılmış spermalara 15 dakika aralıklarla L-arjinin ilave edilmiş %10 oranında gliserol içeren sulandırıcı damla damla eklenerek gliserolizasyon işlemi tamamlandı.

4.2.5.4.1.3. Equilibrasyon

Sulandırılmış ve gliserolizasyon işlemi tamamlanmış olan spermalar +4 °C'de 4 saat bekletilerek equilibrasyona tabi tutuldu.

4.2.5.4.1.4. Spermmanın Payetlere Çekilmesi

Equilibrazyona tabi tutulan sperma örnekleri farklı renklerdeki 0,25 ml'lik payetlere çekilerek uçları polivinil alkol tozu ile kapatıldı.

4.2.5.4.1.5. Spermmanın Dondurulması

Hazırlanmış olan payetler, 7 cm derinliğinde sıvı azot içeren bir strafor kab (26 x 17 x 14 cm) içerisinde yüzen, orta kısmı çıkarılmış ve üst tarafı boydan boya madeni kafes teli ile kaplanmış dikdörtgen şeklindeki sert strafor blok (18 x 12 x 5 cm) üzerine bir sıra halinde yerleştirildi. Strafor kutunun kapağı kapatılarak payetler içerisindeki spermaların sıvı azot buharında (-120 °C) 10 dakika bekletilerek dondurulması sağlandı. Bu sürenin sonunda strafor blok üzerindeki payetler, strafor kaptaki sıvı azot içine bırakıldı. Payetler sıvı azot içerisinde, gobletlere yerleştirilerek sıvı azot tankına (-196 °C) aktarıldı.

4.2.5.4.1.6. Dondurulmuş Spermmanın Çözdürülmesi

Spermaların dondurulması sonucu spermatolojik özelliklerinin belirlenmesi için her bir gruba ait payetler dondurma işleminden yaklaşık 24 saat sonra 38 °C'deki su içerisinde 25 saniye bekletilerek çözdürüldü.

Çözdürülen sperma örneklerinde spermatozoon motilitesi, membran bütünlüğü ve arginaz aktivitesi belirlenerek sonuçlar kaydedildi.

4.2.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler ortalama ve standart hata (\pm SEM) değerleri olarak sunuldu. Verilerin istatistiksel karşılaştırmaları için SPSS (22.0, Chicago, IL, USA) istatistik programı kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel açıdan önemli kabul edildi.

In vivo ve *in vitro* çalışmadan elde edilen verilerin normal dağılım gösterip göstermediklerini tespit etmek için Shapiro-Wilk normallik analizi yapıldı. Bu testin sonucuna göre değerlerin normal dağılım gösterdiği gözlemlendi için daha sonraki veri analizlerinde parametrik testler kullanıldı.

In vivo çalışmada kontrol ve deneme grubu arasındaki farklılıkları belirlemek için bağımsız t testi (independent sample t test), her bir gruptaki haftalık farklılıkları belirlemek için de bağımlı t testi (paired sample t test) yapıldı.

In vitro çalışmanın kısa süreli sperma saklanması esnasında kontrol ve farklı doz L-arjinin ilave edilmiş gruplardaki motilite, membran bütünlüğü ve arginaz aktiviteleri üzerindeki zamana bağlı etkilerin karşılaştırılmasında tekrarlı ölçümler için, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ikili karşılaştırmalarda ise *post hoc* Duncan testi uygulandı.

In vitro çalışmanın sperma dondurulma aşamasında dondurma öncesi ile sonrası motilite, membran bütünlüğü ve arginaz aktivitelerini karşılaştırmak için bağımlı t testi, hem dondurma öncesi hem de dondurma sonrası kontrol ile L-arjinin farklı doz uygulamalarının etkisini belirlemek için ise önce tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonrasında *post hoc* Duncan testi kullanıldı.

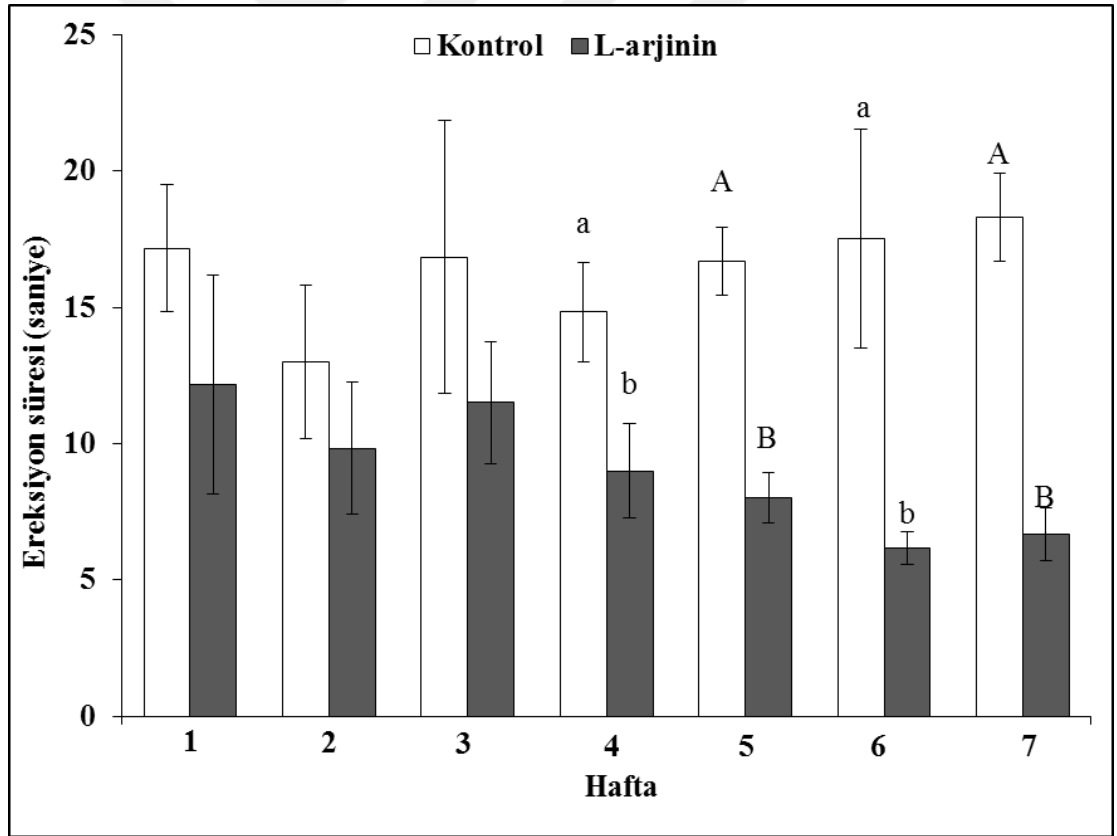
5. BULGULAR

5.1. *İn vivo* (1. aşama) bulgular

5.1.1. Ereksiyon Süresi

Kontrol ve L-arjinin uygulanan koçlarda 7 hafta boyunca sperma alma esnasındaki ereksiyon süreleri Şekil 2’de gösterilmektedir.

L-arjinin enjeksiyonlarının 4 ve 6. ($p<0,01$) ile 5 ve 7. ($p<0,05$) haftalardaki ereksiyon sürelerini kontrol grubuna göre önemli derecede kısalttığı gözlemlendi.



Şekil 2. L-Arjinin Enjeksiyonunun Koçların Ereksiyon Süresi Üzerine Etkisi.

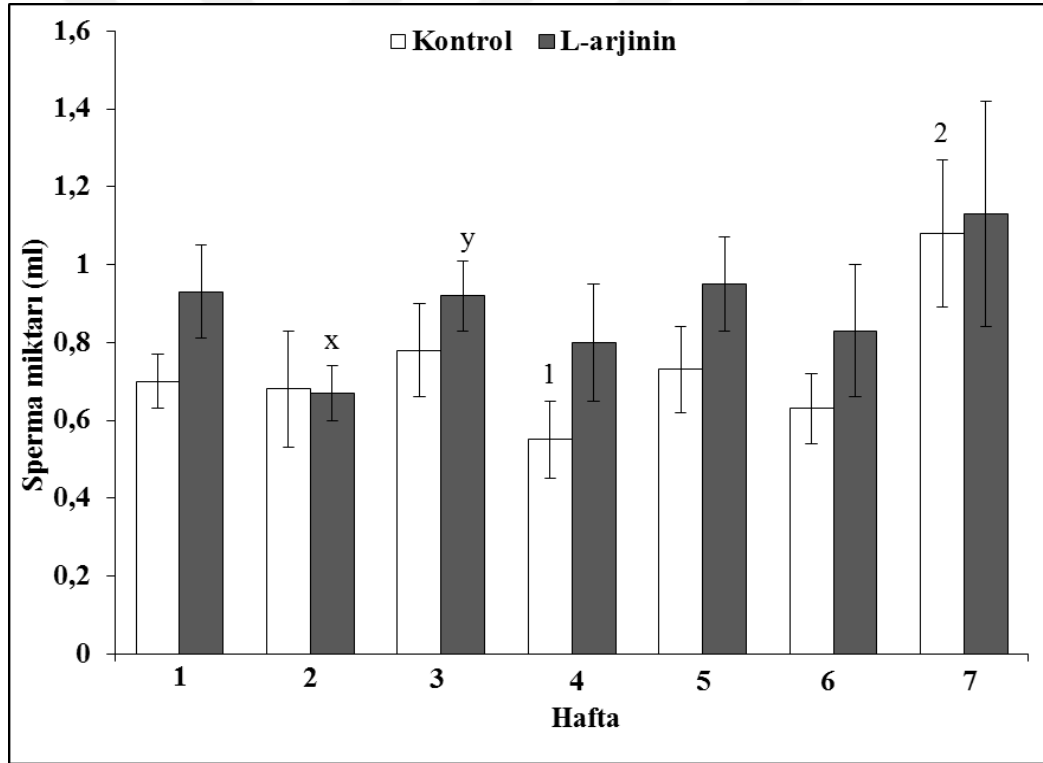
A, B: Gruplar arası farklılıkları $p<0,01$ düzeyinde göstermektedir.

a, b: Gruplar arası farklılıkları $p<0,05$ düzeyinde göstermektedir.

5.1.2. Sperma Miktarı

Kontrol ve L-arjinin uygulanan koçların 7 haftalık sperma miktarları Şekil 3'te gösterilmektedir.

Gruplar arasında sperma miktarı açısından önemli bir fark bulunamamıştır. Haftalara göre sperma miktarı açısından kontrol grubu karşılaştırıldığında 4 ile 7. haftalar arasında önemli bir farklılık ($p<0,05$) tespit edildi. L-arjinin grubu içerisinde sperma miktarı açısından 2 ile 3. haftalar arasında önemli bir farklılık ($p<0,05$) tespit edildi.



Şekil 3. L-arjinin Enjeksiyonunun Koçların Sperma Miktarı Üzerine Etkisi.

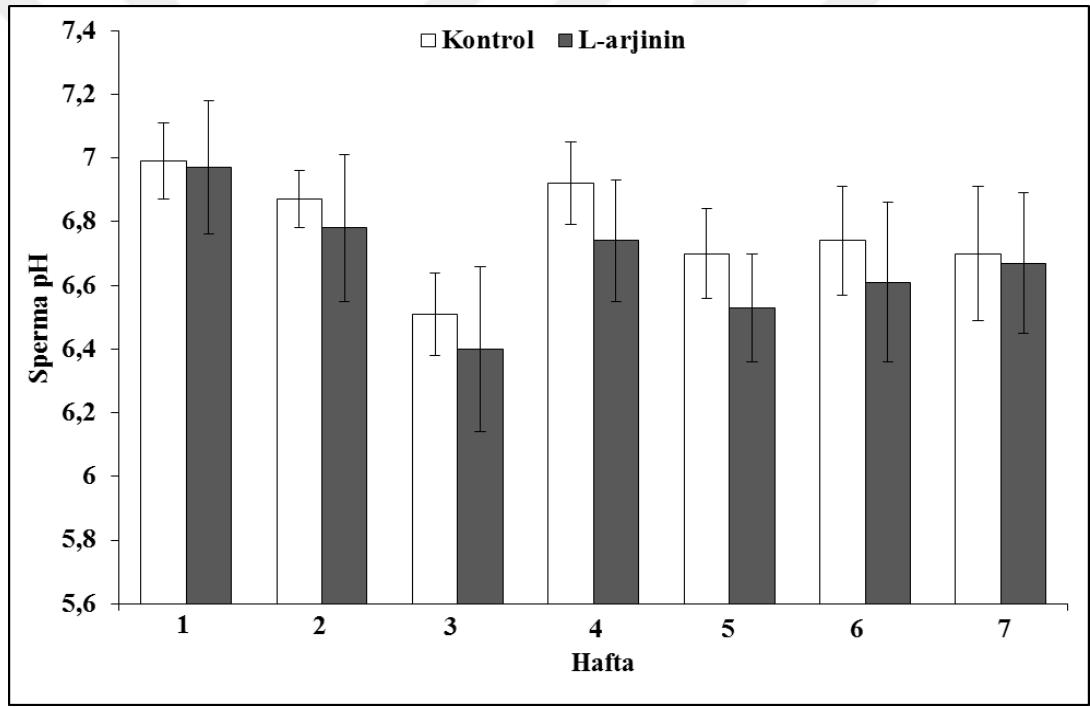
1, 2: Kontrol grubunun zamanlar arası farklılığı gösterilmiştir ($p<0,05$).

x, y: L-arjinin grubunun zamanlar arası farklılığı gösterilmiştir ($p<0,05$).

5.1.3. Sperma pH'sı

Kontrol ve uygulama grubu koçlardan elde edilen spermaların haftalık sperma pH değerleri Şekil 4'te verilmiştir.

L-arjinin uygulamalarının Şekil 4'te görüldüğü gibi kontrol grubuna göre sperma pH değerlerini düşürdüğü görülmüş, bu düşüşün istatistiki olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kontrol ve L-arjinin grupları ve zamanlar arasında önemli bir fark bulunamamıştır.

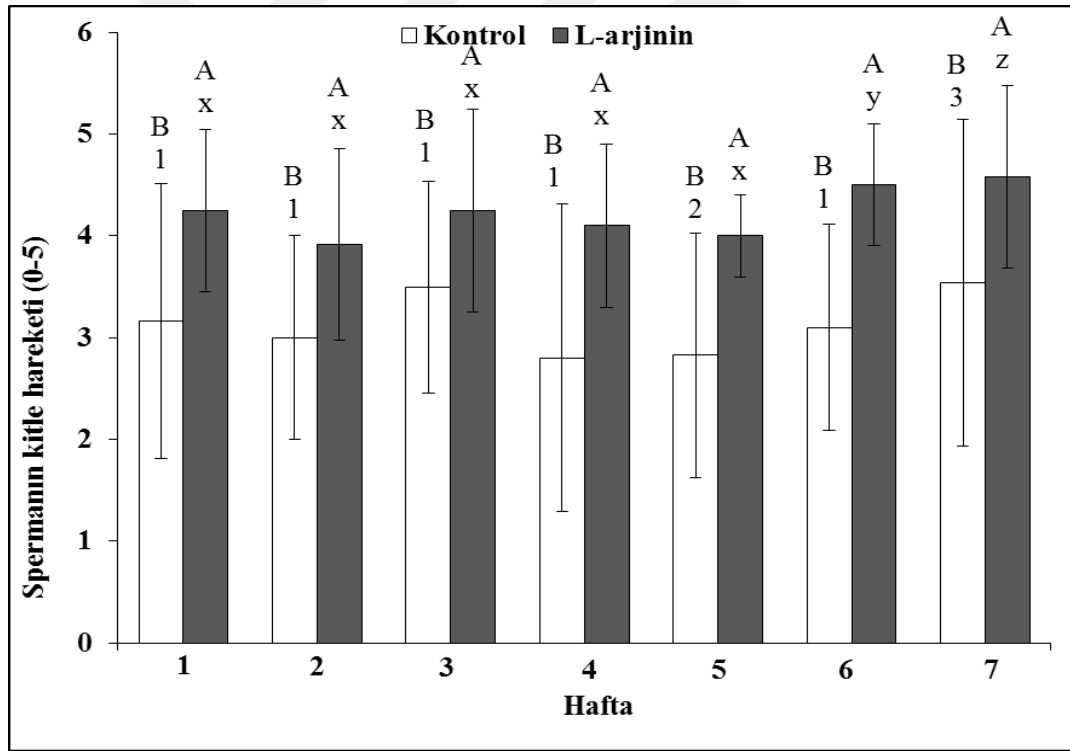


Şekil 4. L-arjinin Enjeksiyonunun Koçların Sperma pH'sı Üzerine Etkisi.

5.1.4. Spermmanın Kitle Hareketi

Koçlardan elde edilen spermaların kontrol ve uygulama grubundaki haftalık sperma kitle hareket değerleri Şekil 5'te gösterilmiştir.

Tüm haftalarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deneme grubunda $p < 0,01$ düzeyinde istatistiki olarak önemli bir artış bulunmuştur. Kontrol grubunda 1, 2, 3, 4, 6. haftalar ile 5, 7. hafta ve 5 ile 7. hafta arasında $p < 0,05$ düzeyinde önemli farklılıklar tespit edildi. Deneme grubunda 1, 2, 3, 4, 5. haftalar ile 6, 7. hafta ve 6 ile 7. hafta arasında $p < 0,05$ düzeyindeki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur.



Şekil 5. L-arginin Enjeksiyonunun Koçların Sperma Kitle Hareketi Üzerine Etkisi.

A, B: Gruplar arası farklılıkları göstermektedir ($p < 0,01$).

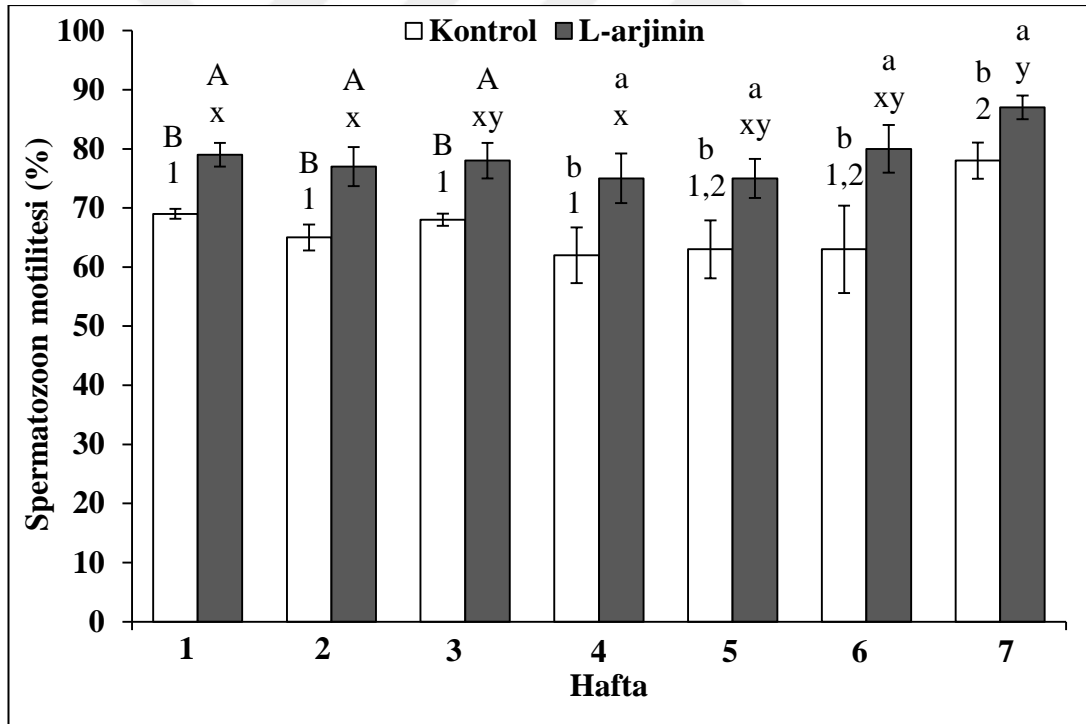
1, 2, 3: Kontrol grubu içerisinde haftalar arasındaki farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

x, y, z: L-arginin grupları içerisinde haftalar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

5.1.5. Spermatozoon Motilitesi

Kontrol ve L-arjinin gruplarındaki haftalık spermatozoon motilite değerleri Şekil 6’da gösterilmektedir.

L-arjinin uygulaması kontrol ile karşılaştırıldığında 1, 2, 3. haftalarda $p < 0,01$ düzeyinde, 4, 5, 6, 7. haftalarda ise $p < 0,05$ düzeyinde önemli bir artış sağlamıştır. Kontrol grubunda 1, 2, 3, 4. haftalar ile 7. hafta arasındaki fark $p < 0,05$ düzeyinde önemliyken 5, 6, 7. haftalar arasındaki farklılıklar önemsiz bulunmuştur. Deneme grubunda ise 1, 2, 4. haftalar ile 7. hafta arasında fark $p < 0,05$ düzeyinde önemliyken 3, 5, 6, 7. haftalar arasındaki farklılıklar önemsizdir.



Şekil 6. L-arjinin Enjeksiyonunun Koçların Spermatozoon Motilitesi Üzerine Etkisi.

A, B: Gruplar arası farklılıkları göstermektedir ($p < 0,01$).

a, b: Gruplar arası farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

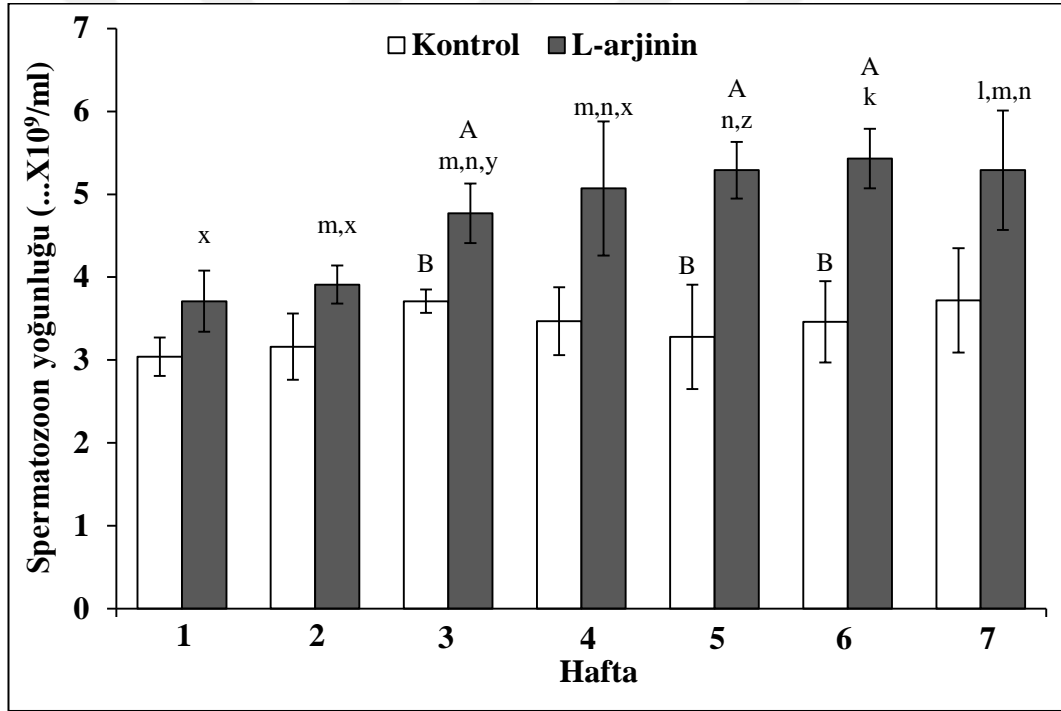
1, 2: Kontrol grubu içerisinde haftalar arasındaki farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

x, y: L-arjinin grupları içerisinde haftalar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

5.1.6. Spermatozoon Yoğunluğu

Kontrol ve L-arjinin gruplarındaki haftalık spermatozoon yoğunluk değerleri Şekil 7'de gösterilmektedir.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deneme grubunda 3, 5, 6. haftalarda $p < 0,01$ düzeyinde önemli bir artış gözlemlendi. Kontrol grubu içerisinde haftalar arasında önemli farklılık bulunmamıştır. L-arjinin grubu içerisinde 1. hafta ile 3, 5, 6, 7. haftalar, 2 ile 5, 6. hafta ve 3 ile 6. hafta arasında önemli farklılıklar ($p < 0,01$) tespit edildi.



Şekil 7. L-arjinin Enjeksiyonunu Koçların Spermatozoon Yoğunluğu Üzerine Etkisi.

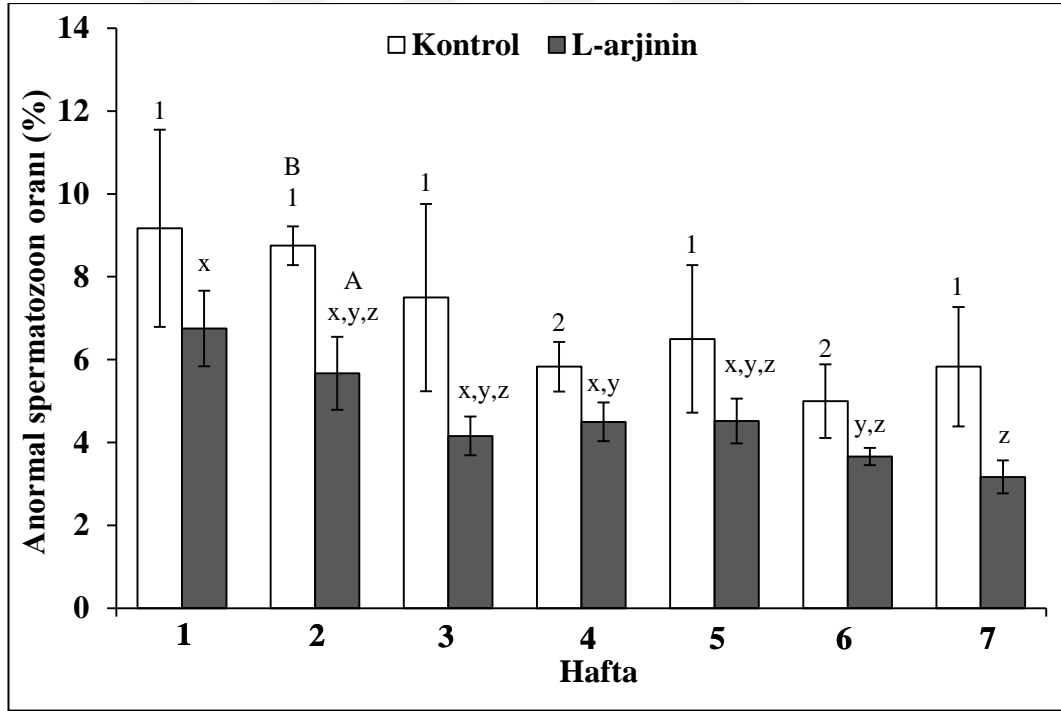
A, B: Gruplar arası farklılıkları göstermektedir ($p < 0,01$).

k, l, m, n, x, y, z: L-arjinin grupları içerisinde haftalar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p < 0,01$).

5.1.7. Anormal Spermatozoon Oranı

Kontrol ve L-arjinin gruplarındaki haftalık anormal spermatozoon oranı değerleri Şekil 8’de gösterilmektedir.

L-arjinin uygulamasının anormal spermatozoon oranını kontrol grubuna göre azalttığı şekilde görülmektedir. Ancak 2. hafta dışındaki azalmaların istatistiki olarak önemsiz olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu içerisinde anormal spermatozoon oranı açısından 4 ve 6. haftada bulunan değerler ile diğer haftalardaki değerler arasında önemli farklılıklar tespit edildi ($p<0,01$). L-arjinin grubu içerisinde anormal sperm oranı açısından 1 ile 6,7. haftalar ve 4 ile 7. haftalar arasında önemli farklılıklar ($p<0,01$) tespit edildi.



Şekil 8. L-arjinin Enjeksiyonunun Koçların Anormal Spermatozoon Oranı Üzerine Etkisi.

A, B: Gruplar arası farklılık gösterilmiştir ($p<0,01$).

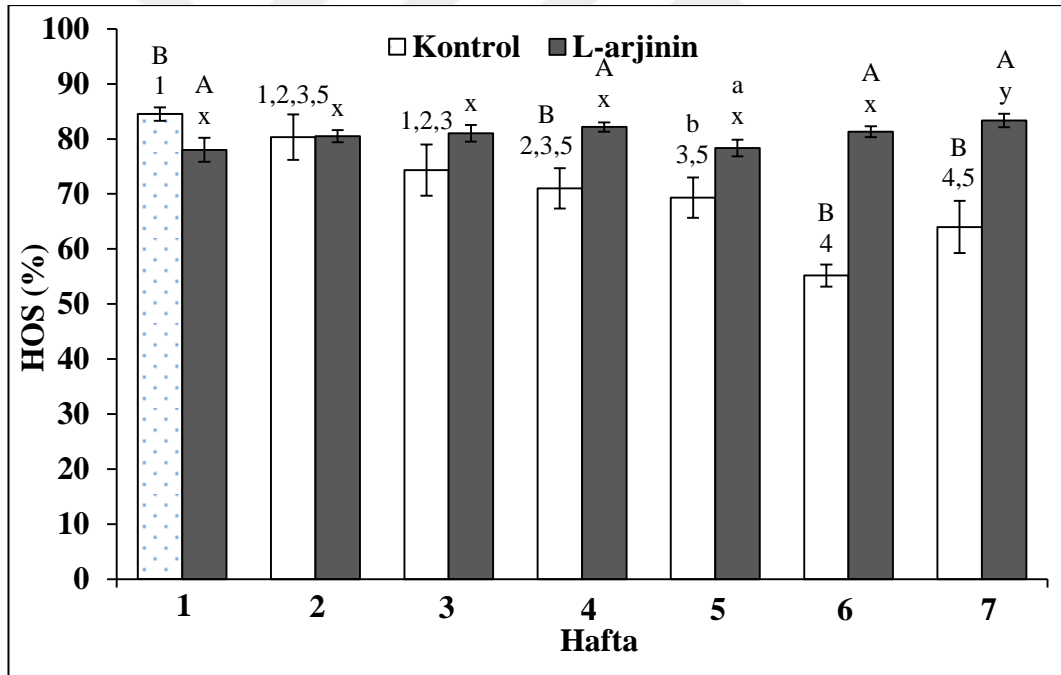
1, 2: Kontrol grubunun zamanlar arası farklılığı gösterilmiştir ($p<0,01$).

x, y, z: L-arjinin grubunun zamanlar arası farklılığı gösterilmiştir ($p<0,01$).

5.1.8. Hipoosmotik Swelling (HOS) Test

Kontrol ve L-arjinin gruplarındaki haftalık sperma HOS test değerleri Şekil 9’da gösterilmektedir.

L-arjinin uygulamalarının sperm membran bütünlüğünü (1. hafta hariç) artırdığı gözlenirken, bu artışın 2 ve 3. hafta dışında istatistiki olarak önemli ($p<0,01$, $p<0,05$) olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubu içerisinde sperma HOS test açısından 1 ile 4, 5, 6, 7. hafta ve 2 ile 6. hafta ve 3 ile 6,7. hafta ve 4 ile 6. hafta ve 5 ile 6. hafta arasında ($p<0,05$) düzeyinde önemli farklılıklar tespit edildi. L-arjinin grubu içerisinde sperma HOS test açısından 1, 2, 3, 4, 5, 6. hafta ile 7. hafta arasında önemli farklılık ($p<0,05$) tespit edildi.



Şekil 9. L-arjinin Enjeksiyonunun Koçların Sperma HOS Test Değerleri Üzerine Etkisi.

A, B: Gruplar arası farklılık gösterilmiştir ($p<0,01$).

a, b: Gruplar arası farklılık gösterilmiştir ($p<0,05$).

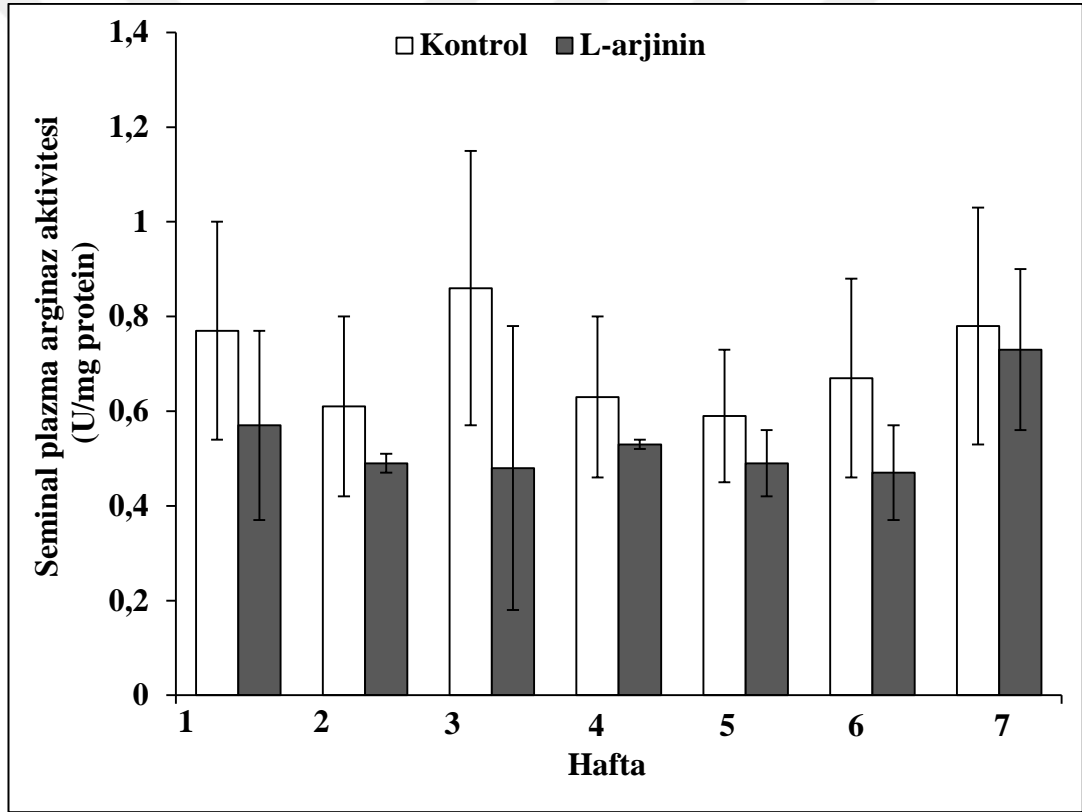
1, 2, 3, 4, 5: Kontrol grubunun zamanlar arası farklılığı gösterilmiştir ($p<0,05$).

x, y: L-arjinin grubunun zamanlar arası farklılığı gösterilmiştir ($p<0,05$).

5.1.9. Seminal Plazma Arginaz Aktivitesi

Kontrol ve L-arjinin gruplarındaki haftalık seminal plazma arginaz aktivitesi Şekil 10’da gösterilmektedir.

L-arjinin uygulamalarının şekilde de gösterildiği gibi kontrol grubuna göre seminal plazma arginaz aktivitesi değerlerini düşürdüğü görülmüş, bu düşüşün istatistiki olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, hem kontrol hem de deneme grubu içerisinde haftalar arasında da önemli bir fark bulunamamıştır.



Şekil 10. L-arjinin Enjeksiyonunun Koçların Seminal Plazma Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.

5.2. *İn Vitro* (2. aşama) Bulgular

5.2.1. Kontrol ve L-arjinin İlave Edilerek Kısa Süreli Saklanan Spermaların Motilite Değerleri

+4°C’de soğutma kabininde bekletilen kontrol ve farklı doz L-arjinin katılan sperma örneklerinin zamana göre (ortalama \pm SEM) motilite değerleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

L-arjinin’in 0,1, 0,5, 1 ve 5 mM’lık dozlarının tüm zaman dilimlerinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında motilite üzerine istatistiki olarak herhangi bir önemli etkisinin olmadığı görülmüştür. Ancak 10 mM L-arjinin ilavesi 12, 24 ve 120. saatlerde kontrol grubuna göre motiliteyi önemli derecede azaltmıştır ($p<0.05$).

10 mM L-arjinin ilavesi 12 ve 24. saatlerde L-arjinin’in diğer dozları ile karşılaştırıldığında motilitede önemli derecede azalmaya sebep olmuştur ($p<0,05$). 10 mM L-arjinin ilavesi 48. saatte L-arjinin’in 0,1, 0,5, 1 mM dozları ile karşılaştırıldığında motiliteyi önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde 120. saatte 10 mM L-arjinin ilavesi 0,1 ve 0,5 mM dozlara göre de önemli derecede azalmaya sebep olmuştur.

Tüm gruplarda grup içi zamana göre motilitede belirli bir azalma tespit edilmiştir. Kontrol, L-arjinin’in 0,1, 0,5, 1, ve 5 mM grupları kendi içerisinde zamana göre karşılaştırıldığında 48. saatten itibaren önemli azalmalar gözlenmiştir. Ancak L-arjinin 10 mM uygulanan grupta 12. saatten itibaren motilitede azalmalar belirlenmiştir.

Aynı gruptaki zaman dilimleri karşılaştırıldığında zamana göre motilitede belirli bir azalmanın olduğu gözlenmiştir. Ancak L-arjinin'in 1 ve 10 mM dozlarında istatistiki bir önem tespit edilememiştir.



Tablo 2. +4 °C’de Bekletilen Kontrol ve L-arjinin İlave Edilmiş Koç Spermaların Motilite Değerleri.

Gruplar	Zaman (saat)						
	0	12	24	48	72	96	120
Kontrol	90,0±0,0 ^a	90,0±0,0 ^{Aa}	90,0±0,0 ^{Aa}	72,0±4,9 ^{ABb}	58,0±5,8 ^c	34,0±5,1 ^d	10,0±3,2 ^{Ae}
L-arjinin 0,1mM	90,0±0,0 ^a	90,0±0,0 ^{Aa}	90,0±0,0 ^{Aa}	82,0±2,0 ^{Ab}	56,0±4,0 ^c	32,0±5,8 ^d	10,0±3,2 ^{Ae}
L-arjinin 0,5 mM	90,0±0,0 ^a	90,0±0,0 ^{Aa}	90,0±0,0 ^{Aa}	80,0±5,5 ^{Ab}	52,0±6,6 ^c	28,0±5,8 ^d	10,0±3,2 ^{Ae}
L-arjinin 1 mM	90,0±0,0 ^a	90,0±0,0 ^{Aa}	90,0±0,0 ^{Aa}	78,0±3,7 ^{Ab}	50,0±10,5 ^c	24,0±6,0 ^d	8,0±3,7 ^{ABe}
L-arjinin 5 mM	90,0±0,0 ^a	90,0±0,0 ^{Aa}	90,0±0,0 ^{Aa}	74,0±2,5 ^{ABb}	52,0±8,0 ^c	18,0±3,7 ^d	4,0±2,4 ^{ABe}
L-arjinin 10 mM	88,0±2,0 ^a	86,0±2,4 ^{Bab}	78,0±2,0 ^{Bb}	64,0±2,5 ^{Bc}	40,0±3,2 ^d	20,0±5,5 ^c	0,0±0,0 ^{Bf}

A, B: Herbir zaman diliminde gruplar arasındaki önemli farklılığı göstermektedir (p<0,05).

a, b, c, d, e, f: Herbir grupta zaman dilimleri arasındaki önemli farklılığı göstermektedir (p<0,01).

5.2.2. Kontrol ve L-arjinin İlave Edilerek Kısa Süreli Saklanan Spermaların Membran Bütünlüğü (HOS) Değerleri

+4°C’de soğutma kabiniinde bekletilen kontrol ve farklı doz L-arjinin katılan sperma örneklerinin zamana göre (ortalama \pm SEM) HOS test değerleri Tablo 3’de gösterilmiştir.

Spermaya 10 mM L-arjinin ilavesinin 72. saatten itibaren hem kontrol hem de diğer L-arjinin gruplarına göre HOS değerlerini önemli düzeyde azalttığı ($p<0,05$) buna rağmen diğer dozların etkisiz kaldığı gözlenmiştir.

Kontrol grubu içerisinde 0, 12, 24, 48. saatleri ile 72, 96, 120. saatleri arasındaki fark istatistiki olarak $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

0,1 ve 0,5 mM L-arjinin ilave edilen gruplarda 0, 12, 24, 48 ve 72 saatlerdeki değerler ile hem 96. hem de 120. saatler arasında ve 96 ile de 120. saatler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

1 mM L-arjinin ilave edilen grupta 0, 12, 24. saatler ile 48, 72, 96, 120. saatler arasında, 48 ile 72, 96, 120. saatler arasında ve 72 ile 120. saatler arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

5 mM L-arjinin ilave edilen grupta 0 ile 48,72, 96,120. saatler arasında, 12, 24 ile 72, 96, 120. saatler arasında ve 48 ile 120. saatler arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

10 mM L-arginin ilave edilen grupta 0, 12, 24, 48. saatleri ile 72, 96, 120. saatler arasındaki fark istatistiki olarak $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Tablo 3. +4 °C’de Bekletilen Kontrol ve L-arjinin İlave Edilmiş Koç Spermaların Hipoosmotik Swelling (HOS) Test Değerleri.

Gruplar	Zaman (saat)						
	0	12	24	48	72	96	120
Kontrol	78,4±3,1 ^a	77,8±3,1 ^a	79,2±3,8 ^a	74,0±3,9 ^a	66,2±3,4 ^{Bbcd}	58,0±4,2 ^{Bcd}	52,0±2,9 ^{Bd}
L-arjinin 0,1mM	80,8±3,2 ^a	75,0±2,4 ^a	78,6±3,1 ^a	72,6±1,7 ^a	68,6±2,6 ^{Ba}	62,2±2,3 ^{Bb}	52,6±1,1 ^{Bc}
L-arjinin 0,5 mM	79,4±4,3 ^a	72,0±2,8 ^a	76,4±4,5 ^a	71,8±3,0 ^a	68,4±0,7 ^{Ba}	62,6±1,1 ^{Bb}	53,4±1,2 ^{Bc}
L-arjinin 1 mM	78,2±4,0 ^a	74,8±2,3 ^a	77,4±3,4 ^a	71,2±2,4 ^b	65,4±1,5 ^{Bc}	60,0±2,5 ^{Bcd}	52,2±0,9 ^{Bd}
L-arjinin 5 mM	79,2±3,6 ^a	76,0±2,7 ^{ab}	75,4±3,1 ^{ab}	71,0±3,3 ^{bc}	68,4±1,3 ^{Bc}	62,4±2,2 ^{Bcd}	56,8±1,2 ^{Bd}
L-arjinin 10 mM	77,2±1,6 ^a	75,4±2,2 ^a	73,8±2,8 ^a	73,8±2,9 ^a	52,4±2,6 ^{Abcd}	50,4±3,5 ^{Acdd}	46,6±3,1 ^{Ad}

A, B: Gruplar arası farklılığı göstermektedir (p<0,05).

a, b, c, d: Herbir grupta zaman dilimleri arasındaki önemli farklılığı göstermektedir (p<0,05).

5.2.3. Kontrol ve L-arjinin İlave Edilerek Kısa Süreli Saklanan Spermaların Seminal Plazma Arginaz Aktivite Değerleri

+4 °C’de bekletilen kontrol ve farklı doz L-arjinin katılan sperma örneklerinin zamana göre (ortalama \pm SEM) arginaz aktivite değerleri Tablo 4’te gösterilmiştir.

0,5 mM L-arjinin ilavesi 24. saatte 10 mM grubuna göre 96. saatte ise hem 5 mM hem de 10 mM grubuna göre arginaz aktivitesinde önemli derecede artışa neden olmuştur ($p<0,05$). Ancak 10 mM L-arjinin ilave edilen grubun 72. saatteki arginaz aktivitesinde kontrol grubuna göre azalmaya sebep olmuştur ($p<0,05$).

5.2.4. Spermanın Dondurulma Öncesi ve Dondurulup Çözdürüldükten Sonraki Motilite Değerleri

Kontrol ve farklı dozlarda L-arjinin’in spermaya ilavesini müteakip dondurulmadan önce ve dondurulup çözdürüldükten sonraki motilite değerleri Şekil 11’de gösterilmiştir.

Dondurulma öncesi spermatozoon motilitesi açısından 10 mM L-arjinin eklenen grupta diğer gruplara göre $p<0,01$ düzeyinde önemli bir azalma bulunmuştur.

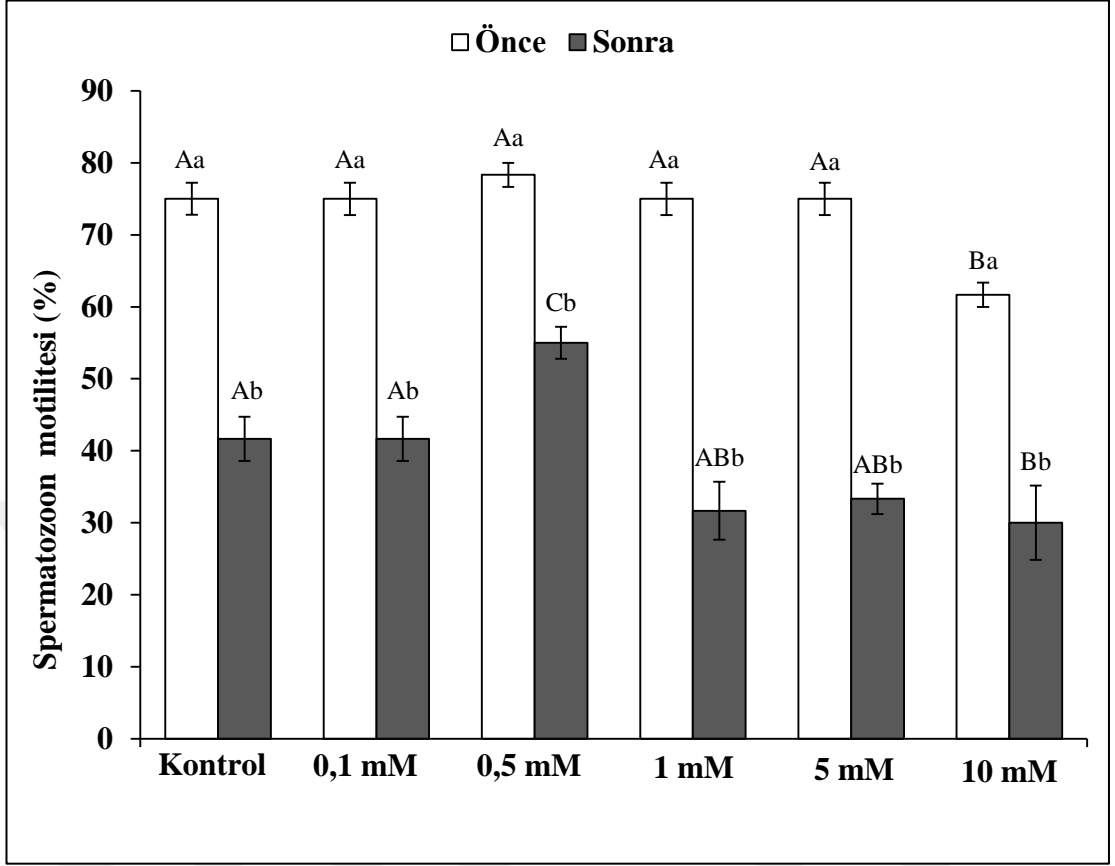
Çözdürme sonrası 0,5 mM L-arjinin eklenen grubun spermatozoon motilitesi diğer gruplara göre önemli düzeyde yüksek ($p<0,01$) ve 1 mM L-arjinin eklenen grupta ise kontrol, 0,1 mM ve 0,5 mM gruplarına göre önemli derecede düşük ($p<0,01$) olduğu belirlenmiştir.

Her bir grup için spermanın dondurulma öncesi ve dondurulup çözdürüldükten sonraki spermatozoon motiliteleri arasında tespit edilen farklılıklar istatistiki açıdan önemli bulundu ($p<0,01$).

Tablo 4. +4 °C’de Bekletilen Kontrol ve L-arjinin İlave Edilmiş Koç Spermaların Seminal Plazma Arginaz Aktiviteleri.

Gruplar	Zaman (saat)						
	0	12	24	48	72	96	120
Kontrol	0,30±0,05	0,29±0,06	0,32±0,04 ^{AB}	0,34±0,04	0,40±0,08 ^B	0,31±0,03 ^{AB}	0,15±0,04
L-arjinin 0,1mM	0,28±0,03	0,26±0,02	0,27±0,03 ^{AB}	0,40±0,05	0,37±0,06 ^{AB}	0,28±0,05 ^{AB}	0,15±0,02
L-arjinin 0,5 mM	0,29±0,03	0,27±0,04	0,44±0,03 ^B	0,40±0,05	0,37±0,05 ^{AB}	0,42±0,06 ^B	0,14±0,02
L-arjinin 1 mM	0,32±0,04	0,32±0,04	0,39±0,05 ^{AB}	0,33±0,06	0,29±0,03 ^{AB}	0,34±0,05 ^{AB}	0,18±0,05
L-arjinin 5 mM	0,39±0,09	0,33±0,03	0,35±0,05 ^{AB}	0,34±0,05	0,31±0,05 ^{AB}	0,23±0,05 ^A	0,12±0,01
L-arjinin 10 mM	0,35±0,03	0,35±0,03	0,26±0,03 ^A	0,32±0,04	0,21±0,02 ^A	0,20±0,03 ^A	0,08±0,01

A, B: Herbir zaman diliminde gruplar arasındaki önemli farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 11. Kontrol ve Farklı doz L-arjinin İçeren Koç Spermalarının Dondurulma Öncesi ve Dondurulup Çözdürüldükten Sonraki Motilite Değerleri.

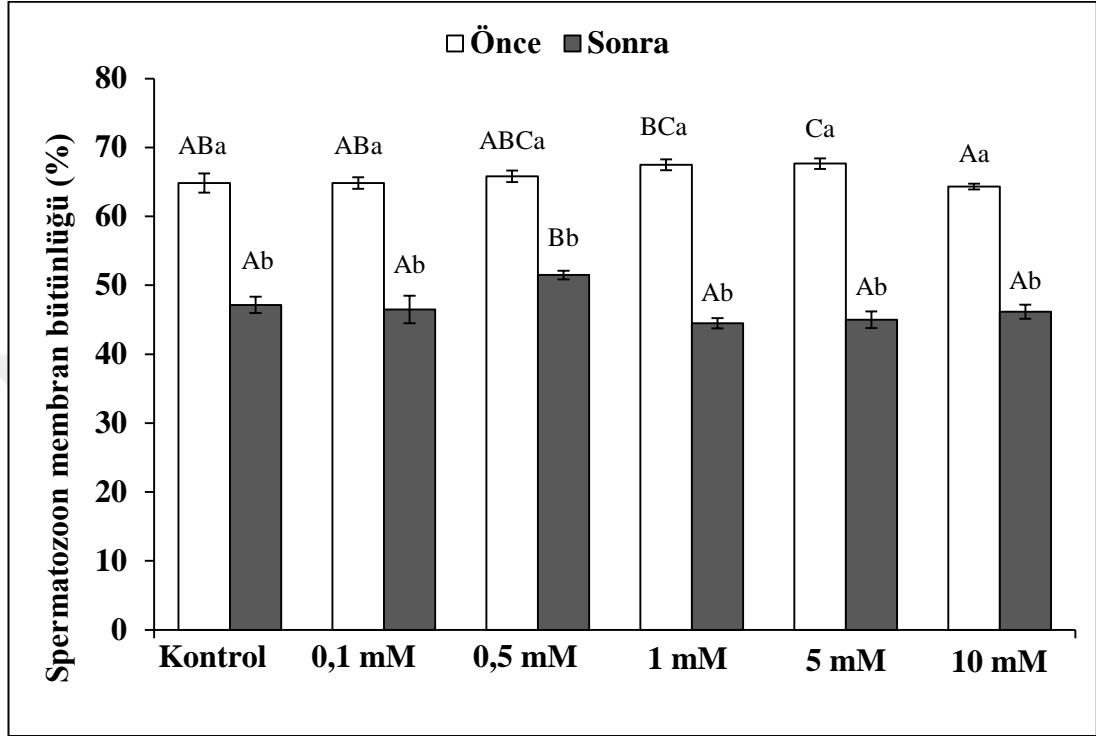
A, B, C: Gruplar arası farklılığı göstermektedir ($p < 0,01$).

a, b: Herbir grup için dondurulma öncesi ve sonrası farklılığı göstermektedir ($p < 0,01$).

5.2.5. Spermının Dondurulma Öncesi ve Dondurulup Çözdürüldükten Sonraki HOS Test Değerleri

Kontrol ve farklı dozlarda L-arjinin'in spermaya ilavesini müteakip dondurulmadan önce ve dondurulup çözdürüldükten sonraki HOS test değerleri Şekil 12'de gösterilmiştir.

Dondurulma öncesi spermatozoon membran bütünlüğü açısından 5 mM L-arjinin eklenen grup ile kontrol ($p<0,05$), 0,1 ve 10 mM ($p<0,01$) L-arjinin eklenen gruplar arasında önemli farklılıklar bulunmuştur.



Şekil 12. Kontrol ve Farklı Doz L-arjinin İçeren Koç Spermalarının Dondurulma Öncesi ve Dondurulup Çözdürüldükten Sonraki HOS Test Değerleri.

A, B, C: Gruplar arası farklılığı göstermektedir ($p<0,05$, $p<0,01$).

a, b: Her bir grup için dondurulma öncesi ve sonrası farklılığı göstermektedir ($p<0,01$).

Dondurulma sonrası spermatozoon membran bütünlüğü açısından 0,5 mM L-arjinin eklenen grubun HOS değeri diğer gruplara göre önemli düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,01$).

Her bir grup için spermanın dondurulma öncesi ve dondurulup çözdürüldükten sonraki spermatozoon membran bütünlükleri arasında tespit edilen farklılıklar istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,01$).

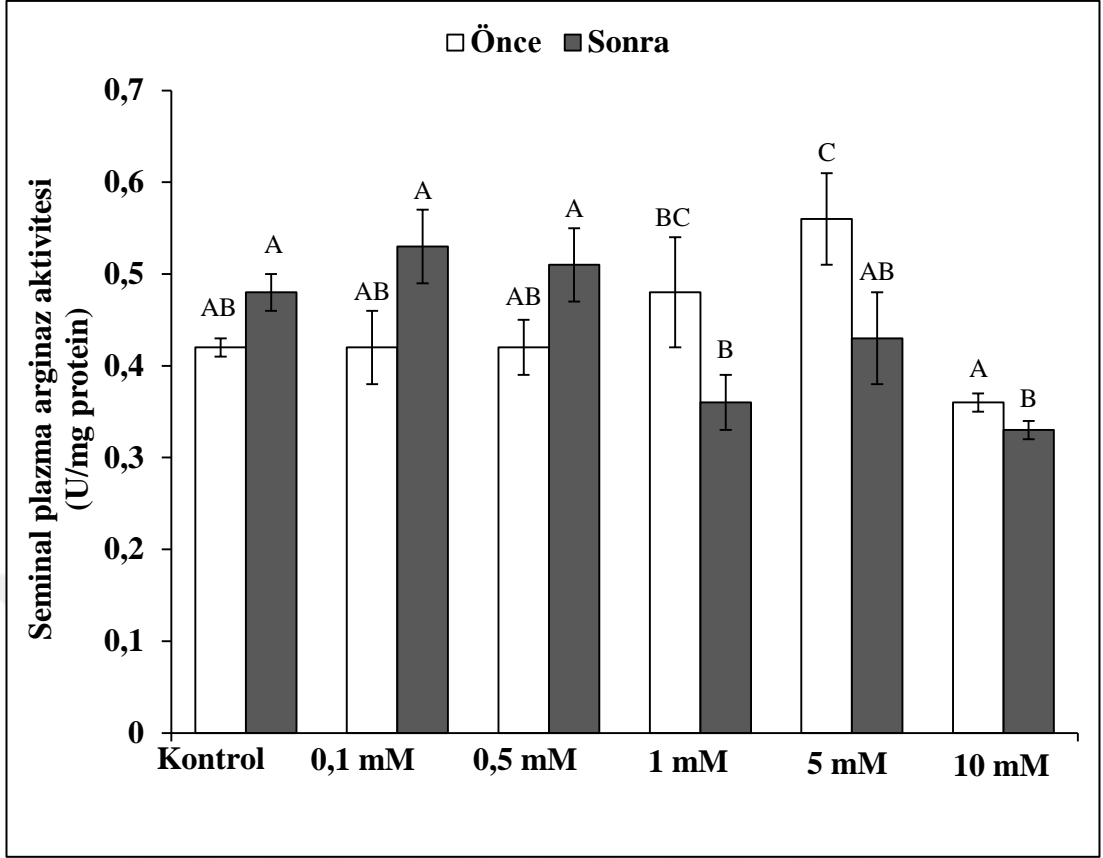
5.2.6. Spermanın Dondurulma Öncesi ve Dondurulup Çözdürüldükten Sonraki Seminal Plazma Arginaz Aktiviteleri

Kontrol ve farklı dozlarda L-arjinin'in spermaya ilavesini müteakip dondurulmadan önce ve dondurulup çözdürüldükten sonraki seminal plazma arginaz aktiviteleri Şekil 13'te gösterilmiştir.

Dondurulma öncesi 5 mM L-arjinin eklenen grubun seminal plazma arginaz aktivitesi 1 mM'lık grup hariç diğer gruplara göre $p<0,01$ düzeyinde önemli bir artış gösterdi. Dondurma öncesi en düşük arginaz aktivitesi 10 mM grubunda tespit edilirken istatistiki açıdan önem 10 mM ile 1, 5 mM'lık gruplar arasında tespit edilmiştir ($p<0,01$).

Dondurulma sonrası 1 ve 10 mM L-arjinin eklenen grubun seminal plazma arginaz enzim aktivitesi değerleri, kontrol, 0,1, 0,5 gruplarına göre önemli düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,05$).

Her bir grup için spermanın dondurulma öncesi ve dondurulup çözdürüldükten sonraki seminal plazma arginaz aktiviteleri arasında istatistiki açıdan önemli bir fark tespit edilememiştir.



Şekil 13. Kontrol ve Farklı Doz L-arginin İçeren Koç Spermalarının Dondurulma Öncesi ve Dondurulup Çözdürüldükten Sonraki Seminal Plazma Arginaz Aktivitesi Değerleri.

A, B, C: Gruplar arası farklılığı göstermektedir ($p < 0,01$, $p < 0,05$).

6. TARTIŞMA

6.1. L-arjinin'in *İn vivo* Etkisi

L-arjinin'in temel rolü NO sentezinde bir prekürsör olmasından kaynaklanır. L-arjinin endotel hücrelerinde NO aracılığı ile vazokonstriksiyon ve düz kas hücresi proliferasyonunu düzenler (64, 65).

NO, nonadrenerjik-nonkolinerjik nörotransmisyon süresince endotelden salınır ve böylece kaslarda guanilil siklazı aktive ederek siklik guanozin monofosfat (sGMP) seviyelerini artırıp vasküler düz kasta kalsiyum seviyelerini azaltarak düz kasların (korpus kavernozum) gevşemesini sağlar ve buna bağlı olarak ereksiyonda önemli bir rol üstlenir (66, 67).

Koçlara 5 mg/kg dozunda gün aşırı 7 hafta süreyle L-arjinin'in i.m. olarak uygulandığı bu çalışmada *plasebo* 1 ml serum fizyolojik enjekte edilen kontrol grubu koçlara göre ereksiyon süresini önemli derecede azalttığı belirlenmiştir.

Chen ve ark (40), 50 erektil disfonksiyonlu erkekte yaptıkları çalışmada 6 hafta süreyle *plasebo* 4 ml serum fizyolojik uygulanan 17 hastanın ikisinde, günlük 5 gr oral L-arjinin verilen 29 hastanın dokuzunda ereksiyon problemlerinin düzeldiğini gözlemlemişlerdir. Klotz ve ark. (68) L-arjinin'in erektil disfonksiyon üzerine etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 2 hafta süreyle günde 3 kez 500 mg L-arjinin kullanan hastaların %40'ında, geri kalanların ise 6 hafta boyunca kullanmaya devam ettiklerinde %31'inde erektil disfonksiyonun düzeldiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada sağlıklı koçlarda penisin erekte olması için geçen süreyi kısaltan L-arjinin ile ilgili tespit edilen bu sonuç önceki çalışmaları (40, 68) destekler niteliktedir. Kontrol grubuna göre L-arjinin uygulanan koçlarda penisin daha erken erekte olmasının nedeni, L-arjinin'in NO

düzeyleri üzerinden penis kaslarını gevşeterek daha fazla kan akımının gitmesine yol açması ile açıklanabilir.

Mevcut çalışmada 7 hafta süreyle L-arjinin uygulanarak elde edilen sperma miktarı kontrol grubunda elde edilen sperma miktarından yüksek bulunmuş, ancak bu yükseklik istatistiki açıdan önemsiz olarak değerlendirilmiştir. Wu ve ark. (23) domuzlarda yaptıkları çalışmada diyetlere 30 gün boyunca kattıkları % 1'lik L-arjinin-HCl'ün sperma miktarı üzerine istatistiki olarak anlamlı bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Bu sonuç mevcut çalışmada elde edilen bulguyla örtüşmektedir.

Spermada kitle hareketinin bir ölçütü de spermatozoon motilitesi ve yoğunluğunun iyi olmasıdır. Bu özelliklerden her biri ya da ikisinin düşük olması kitle hareketini (mass aktivite) doğrudan etkilemektedir. Bu çalışmada, L-arjinin uygulanan deneme grubu koçlardan elde edilen spermanın kitle hareketinin kontrol grubuna göre arttığını, bu artışın yapılan istatistiki analiz sonucu $p < 0,01$ düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur. L-arjinin'in spermanın kitle hareketini nasıl etkilediğine dair herhangi bir bilimsel çalışmaya rastlanmaması bu çalışmada elde edilen verilerin ilk olması bakımından önem arz etmektedir. Söz konusu büyük olasılıkla L-arjinin uygulaması sonucu spermatozoon motilitesi ve yoğunluğunda tespit edilen bir artışın yansıması ile izah edilebilir.

Holt ve Albanesi (81) yaptıkları çalışmada yetişkin erkeklere 9 gün boyunca L-arjininden eksik diyet uyguladıklarında immotil spermatozoon oranında % 10 artış bulduklarını, Tanimura (85) ise 6-8 hafta oral yolla 0,5 g/gün L-arjinin uyguladıkları infertil insanlarda spermatozoon motilitesinde artışların meydana geldiğini belirlemişlerdir. L-arjinin uygulanan oligospermi ve

astenospermili sıçanlar (75) ve insanlarda (82) spermatozoon motilitesinin arttığı belirtilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada spermatozoon motilitesi düşük olan 12 erkeğin diyetlerine katılan farklı L-arjinin oranlarından 0,004 M'lık dozun spermatozoon motilitesinde artış sağladığı öne sürülmüştür (83). Schachter ve ark. (49) oligospermili 178 insana 2 ay süreyle L-arjinin uyguladıklarında, spermatozoon motilitesinde 111 vakada ileri derecede, 21 vakada ise hafif derecede artış tespit ettiklerini, yine Schachter ve ark. (84) bir başka çalışmalarında, 141 oligospermi ve astenospermili hastaya L-arjinin verdiklerinde 83 hastada spermatozoon motilitesinde ileri derecede, 24 hastada orta derecede bir artış, 34 hastada da herhangi bir iyileşmenin meydana gelmediğini bildirmişlerdir. Ratnasooriya ve ark. (75) sıçanlara gavaj yoluyla L-arjinin'in farklı dozlarını verdiklerini ve bunun epididimal spermatozoon motilitesinde önemli bir artışa sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada L-arjinini koçlara 5 mg/kg dozunda i.m. olarak 7 hafta süreyle uyguladığımızda elde ettiğimiz spermaların motilitesinde kontrol grubuna göre önemli bir artış bulunmuştur. Çalışmalarda da görüldüğü gibi L-arjinin eksikliğinin spermatozoon motilitesinde bir düşüşe L-arjinin uygulamalarının (çalışmamızda olduğu gibi) ise spermatozoon motilitesinde bir artışa sebep olduğu görülmektedir. L-arjinin enjeksiyonu sonucu poliaminlerin etkilenmesi bu çalışmada gözlenen motilite artışlarının mekanizması olarak gösterilebilir.

L-arjininden sentezlenen ornitin, poliamin sentezi için bir prokürsördür. Poliamin ise hücre proliferasyonu için gereklidir. Poliaminler (putresin, spermin, spermidin) hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan biyomoleküllerdir

(18, 19). Öte yandan literatürlerde L-arjinin'in spermatogenezisin gelişiminde gerekli olduğu belirtilmektedir. Çünkü L-arjinin, nükleoproteinlerin yapısına girmekte ve spermatozoonlarda önemli bir nükleoprotein komponenti olarak bulunmaktadır. Spermatogenezisin hem mitoz hem mayoz bölünmesi sırasında çok miktarda nükleoproteine ihtiyacı vardır (52).

Suikardi ve ark. (70) tavşanlara oral yolla 200 mg/kg L-arjinin uyguladıkları çalışmada spermatozoon sayısının kontrole göre %25,5 oranında arttığını belirtmişlerdir. Oligospermi ve astenospermili sıçanlar (75) ve insanlara (49)

L-arjinin uygulamasını müteakip spermatozoon sayısında artışlar şekillendiği bildirilmiştir. Scibona ve ark. (82) insanlara oral L-arjinin uygulamasının herhangi bir yan etki oluşturmaksızın spermatozoon sayısında artış meydana getirdiğini rapor etmişlerdir. Tanimura (85), infertil insanlarda 6-8 hafta oral yolla uygulanan L-arjinin'in spermatozoon sayısında artışa neden olduğunu göstermiştir. Holt ve Albanesi (81) 9 gün boyunca L-arjininden eksik diyetle beslenen erkeklerde spermatozoon sayısında yaklaşık % 90 azalma olduğunu belirtmişlerdir. Ratnasooriya ve ark. (75) yapmış oldukları çalışmada sıçanlara oral olarak farklı dozlarda uyguladıkları L-arjinin'in epididimal spermatozoon sayısında önemli bir artışa sebep olduğunu belirtmiştir.

Çalışmamızda L-arjinin uygulanan koçlardan elde edilen spermatozoon yoğunluğunun kontrol grubu koçlardan alınan spermatozoon yoğunluğuna göre artış gösterdiği ancak kontrol ve L-arjinin grupları arasında 3, 5, 6. haftalardaki artışın istatistiki olarak önemli olduğu bulunmuştur. Bu artışın diğer araştırmacıların elde ettikleri spermatozoon yoğunluğundaki artışa benzer olduğu gözlenmiştir. Ancak bizim çalışmamızda uygulama materyalinin koç, uygulama

şeklinin parenteral (i.m.) olması diğer çalışmalarda ise materyalin insan veya sıçan, uygulama yolunun ise oral olması farklılığı oluşturmaktadır. Bu çalışmada parenteral yolla L-arjinin uygulamasıyla spermatozoon yoğunluğunda görülen artışlara muhtemel sebep olarak L-arjinin enjeksiyonu sonucu poliamin sentezinin indüklenmesi ve spermatogenezisin stimülasyonu gösterilebilir.

Ratnasooriya ve ark. (75) 100 ve 200 mg/kg dozunda oral L-arjinin uygulamalarının sıçanların spermatozoon morfolojisinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığını, buna karşın Schachter ve ark. (84) ise diyetteki L-arjinin eksikliğinin spermatozoonların morfolojik yapısında anormaliye sebep olduğunu ileri sürmüştür. Yapmış olduğumuz çalışmada L-arjinin uygulamasının anormal spermatozoon oranını azalttığı ve 2. haftadaki azalışın önemli olduğu görülmüştür. Araştırmacıların yaptığı çalışmaların sonucunun bizim çalışma sonucumuza benzer olduğu görülmüştür. Mevcut çalışmada düşük düzeyde olsa da anormal spermatozoon oranında gözlenen azalmalar, spermatozoon çekirdeğindeki nükleoproteinlerin egzogen L-arjinin tarafından katde değer ölçüde desteklenmesiyle spermatogenezis esnasında şekillenebilen sağlam morfolojik yapılı spermatozoonların normalden daha fazla şekillenmesi ile izah edilebilir.

L-arjinin'in koçlara i.m. enjeksiyonu sonucu elde edilen sperma örnekleri spermatozoon membran bütünlüğü açısından değerlendirildiğinde, L-arjinin'in artışlar sağladığı gözlenmiş ve bu artışın 7 haftalık periyot içinde 2 ve 3. haftalar dışında istatistiki olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). Bu parametre ile ilgili herhangi bir türde daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak L-arjinin'in lipit peroksidasyona karşı koruyucu etkisi olduğu, NOS enziminin inhibe edilmesiyle de membran bütünlüğünü koruduğu belirtilmektedir (55).

Öte yandan bu çalışmada 7 hafta boyunca gün aşırı i.m. L-arginin uygulamasını müteakip spermatolojik parametrelerde kontrol grubuna göre gözlenen olumlu değişikliklerin bir nedeni olarakta L-arginin'in lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisinin olması gösterilebilir.

Çalışmamızdaki kontrol ve L-arginin uygulanan koçlardan elde edilen sperma örnekleri karşılaştırıldığında pH değerleri ve arginaz aktivitesi açısından önemli bir fark bulunamamıştır. Dolayısıyla, bu çalışma sonuçlarına göre i.m. L-arginin enjeksiyonlarının sperma pH'sı ve seminal plazma arginaz aktivitesi üzerinde olumlu ya da olumsuz herhangi bir etkisinin olmadığı ileri sürülmüştür.

6.2. L-arginin'in İnvitro Etkisi

Düşük sıcaklıkta sıvı olarak saklama, dondurma ve hatta çözündürme gibi spermaya uygulanan kriyoprezervasyon işlemleri, buz kristalleri oluşumu, soğuk şok ve ozmotik hasara bağlı zararlara bağlı olarak spermatozoonlarda motilite ve canlılık kaybı, biyokimyasal değişimler ve sonuç olarak fertilizasyon kayıplarına neden olmaktadır (95). Bu işlemler aynı zamanda spermada oksidatif strese neden olarak hücre membranına zarar vermektedir (96). Bilindiği gibi, oksidatif stres spermatozoon membranında lipitleri peroksidasyona uğratarak hücre zarına zarar vermektedir. Oksidatif stresin lipitleri perokside etme mekanizması ise reaktif oksijen türlerinin üretimine (ROS) bağlıdır. Fizyolojik düzeydeki ROS olgunlaşma, kapasitasyon, hiperaktivasyon, akrozom reaksiyonu ve spermatozoon-oosit füzyonu gibi spermatozoonların normal fonksiyonları için gerekliyken, kriyoprezervasyon gibi aşırı ROS üretimine neden olan durumlarda spermatogenezde aksama, spermatozoon motilitesi ve sayısında azalma, anormal

spermatozoon oranında artış, membran bütünlüğünde bozulma ve fertilizasyon bozuklukları gözlenmektedir (97). Bazı çalışmalarda spermaya karnitin, glutamin (98) albümin ve sistein (99) gibi amino asitler katılarak kriyoprezervasyon esnasında spermatozoonda meydana gelen motilite kayıpları ve membran bozuklukları önlenmeye çalışılmış ve bu maddelerin koruyucu etkilerinin olduğu da öne sürülmüştür. Bir aminoasit olan L-arjinin'in lipit peroksidasyonu önlediği ve antioksidan savunma mekanizmasını desteklediği bu etkisini de NO aracılığıyla ve ROS'un azaltılmasıyla ortaya koyduğu bildirilmektedir (100). Buna karşın Adams ve ark. (101) ise L-arjinin'in antioksidan etkisinin zayıf veya olmadığını ileri sürmektedir.

Hossanpour ve ark. (87) L-arjinin'in farklı dozlarını kattıkları koç sperma örneklerini inkübasyona bıraktıklarında L-arjinin'in düşük konsantrasyonlarının spermatozoon motilitesini az etkilediğini, yüksek konsantrasyonlarının ise motiliteyi istatistiki olarak önemli derecede azalttığını belirtmişlerdir. O'Flaherty ve ark. (88) L-arjinin farklı dozlarını boğa spermasına katarak inkübasyona bıraktıklarını ve kontrolle kıyasladıklarında 10 mM ve aşağı dozlarının motiliteye herhangi bir etkisinin olmadığını ancak 10 mM'dan yüksek dozlarının spermatozoon motilitesini azalttığını belirtmişlerdir. Ratnasooriya ve ark. (75) *in vitro* olarak spermaya farklı dozlarda katılan L-arjinin'in motilite üzerine etkisini inceledikleri çalışmada doz yükseldikçe motilitenin düştüğünü belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada astenospermili hastalardan elde edilen 10 sperma örneğine L-arjinin *in vitro* ilave edildiğinde spermatozoon motilitesinin arttığı belirlenmiştir (86). Carvalho ve ark. (89) farklı dozlarda (0, 2, 5, 10, 20 mM) L-arjinin ilave edilerek farklı sürelerde inkübasyona bıraktıkları aygır

spermalarında 20 mM L-arjinin ilave edilen grupta motiliteyi en düşük bulduklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada L-arjinin'in farklı dozlarının (0,1, 0,5, 1, 5, 10 mM) katıldıktan sonra +4 °C'de saklanan sperma örneklerinde 10 mM ilave edilen grubun spermatozoon motilitesi 12. saatten itibaren kontrol ve diğer L-arjinin dozlarının ilave edildiği gruplara göre önemli derecede düşük bulunmuş, diğer dozlarının ise olumlu ya da olumsuz etkileri gözlenmemiştir. 10 mM L-arjinin katarak +4 °C'de saklanan sperma örneğindeki spermatozoon motilitesinin 12. saatten sonra önemli derecede düşüş göstermesi bu dozun fizyolojik dozların üstünde olması ve toksik etki yapmasından kaynaklanmış olabilir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular Morales ve ark. (86)'nın tespit ettikleri sonuçlar dışında diğer pek çok araştırmacının sonuçları ile benzerlik göstermektedir (79, 87, 88). Morales ve ark. (86)'nın bulguları ile mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar arasındaki çelişki, çalışmalarda kullanılan türlerin farklılığına, türlerin hasta veya sağlıklı olmasına ve sulandırıcının etkisine bağlı olabilir.

Yaptığımız çalışmada +4 °C'de saklanan ve farklı doz L-arjinin ilave edilen sperma örneklerinin spermatozoon membran bütünlüklerinde meydana gelen kayıp tablo 3'te de görüldüğü gibi 10 mM L-arjinin ilave edilerek saklanan örneklerde kontrol ve diğer gruplara göre 48. saatten önemli bulunmuştur. Buna karşın L-arjinin'in diğer dozlarının spermatozoon membran bütünlüğü üzerine olumlu ya da olumsuz herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. L-arjinin'in farklı dozlarının kısa süreli saklanan spermaların membran bütünlüğü üzerine etkileri ile ilgili bir başka çalışmaya rastlanmamıştır. 10 mM L-arjinin katılan grupta

48. saatten sonra membran bütünlüğünde gözlenen bu olumsuz etki, bu dozun spermatozoonlar üzerindeki toksisitesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Arginaz aktivitesinin koç üreme sisteminin tüm kısımlarında farklı seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. Epididimal spermatozoonlarda (58), testis dokusunda (60), seminal sıvı ve bulboüretal bezde arginaz enziminin belli seviyelerde olduğu belirtilmiştir (56). Gür ve ark. (61) koç seminal plazmasında arginaz aktivitesini 0,61 U/mg protein, Türk ve ark. (62), teke seminal plazmasında arginaz aktivitesini 0,9 U/mg protein olarak bulduklarını, her iki çalışmada da arginaz aktivitesiyle spermatozoon motilitesi arasında pozitif bir ilişki olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada spermaya 10 mM L-arjinin eklenen grubun seminal plazma arginaz aktivitesi kontrol ve diğer gruplara göre 0 ve 12. saat hariç genel anlamda daha düşük tespit edilmesine rağmen sadece 72. saatteki değer kontrole göre istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Arginaz enzimi ile spermatozoon motilitesi arasında pozitif bir ilişki olduğunun belirtildiği çalışmalar (61, 62) ile mevcut çalışmada elde edilen 10 mM'lık doza ait bulgular arasında benzerlik görülmüştür. Çünkü bu çalışmada kısa süreli saklama boyunca 10 mM L-arjinin eklenen grubun spermatozoon motilitesi ve seminal plazma arginaz aktivitesi düşmüştür. L-arjinin ilave edilerek kısa süreli saklama sonucu arginaz aktivitesini belirleyen bir başka çalışmaya rastlanmamasına rağmen, bu çalışmada 10 mM L-arjinin ilavesini müteakip seminal plazma arginaz aktivitesinde meydana gelen düşüş, spermaya katılan L-arjinin'in yüksek dozda olması ve arginazın da bu yüksek miktarla reaksiyona girmesi için çok fazla tüketilmesine bağlı olabilir.

Siddique ve Atreja (90) kontrol ve 1 mM L-arjinin ilave ederek dondurdukları Murrah Bufalo spermasının dondurulup çözdürüldükten sonraki spermatozoon motilitesini sırasıyla %32,33 ve %38,33 olarak belirlemiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada tek doz L-arjinin değil de 5 farklı L-arjinin dozu spermaya ilave edilmiş ve dondurulup çözdürüldükten sonra en yüksek motilite 0,5 mM L-arjinin ilave edilen grupta bulunmuştur. Ayrıca 10 mM eklenen grupta elde edilen motilitenin, diğer gruplardan istatistiki olarak daha düşük bulunduğu tespit edilmiştir. 10 mM L-arjinin ilave edilen grupta spermanın dondurulup-çözdürüldükten sonra motilitesinin düşmesi bu dozun toksik düzeyde olduğunun bir göstergesi olabilir. Bu çalışmada 0,5 mM'lık L-arjinin ilavesinden sonra dondurulmuş-çözdürülmüş spermanın motilitesinden elde edilen olumlu sonuç Siddique ve Atreja (90)'nın sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada dondurma öncesi ve sonrası 10 mM L-arjinin eklenen grubun spermatozoon membran bütünlüğünün diğer gruplara göre daha düşük bulunduğu belirlenmiştir. Dondurulup çözdürüldükten sonra spermatozoon membran bütünlüğü 0,5 mM L-arjinin ilave edilen grupta kontrol ve diğer gruplara göre önemli derecede daha yüksek bulunmuştur. 1 mM L-arjinin ilave edilmiş ve herhangi bir katkı maddesi katılmamış Murrah Bufalo spermasının dondurulup çözdürüldükten sonraki spermatozoon membran bütünlüğü değerleri sırasıyla L-arjinin grubunda %43,16 ve kontrol grubunda da %30,01 olarak bulunmuş (90) olup bu durum, mevcut çalışmanın sonuçları ile uyum göstermektedir. Bu çalışmada 0,5 mM L-arjinin ilave edilmiş ve dondurulup-çözdürülmüş spermalardan en iyi spermatozoon membran bütünlüğü sonucunun

elde edilmesi, L-arjinin'in spermanın dondurulması esnasında membran lipitlerini peroksidasyona karşı koruyucu etkisiyle açıklanabilir.

Bu çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece 5 mM L-arjinin ilavesi dondurulma öncesi seminal plazma arginaz aktivitesinde önemli derecede bir artış oluşturduğu, buna rağmen dondurulma sonrası 1 ve 10 mM L-arjinin eklenen gruptaki seminal plazma arginaz aktiviteleri kontrol, 0,1 ve 0,5 mM'lık gruplara göre istatistiki olarak daha düşük bulunmuştur. Bu konuda yapılan benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada dondurulmuş-çözdürülmüş spermalara ait seminal plazma arginaz aktivitesi ile ilgili tespit edilen artış ve azalışların mekanizması tarafımızdan tam olarak izah edilememiş olup konuyla ilgili daha detaylı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Her bir grup için spermanın dondurulma öncesi ve dondurulup çözdürüldükten sonraki seminal plazma arginaz aktiviteleri arasında istatistiki açıdan önemli bir fark tespit edilememiştir. Bu durum için muhtemel açıklama, enzimlerin en iyi çalıştığı sıcaklığın 30-35 °C olması, 0 °C ve altındaki sıcaklıklarda ise yapısı bozulmamasına rağmen etkinlik gösterememesi olabilir (102).

Sonuç olarak, 7 hafta boyunca haftalık parenteral yolla 5 mg/kg L-arjinin uygulamalarının koçların ereksiyon süresini (penisin ereksiyona geçme süresi) kısalttığı, spermanın kitle hareketi, spermatozoon motilitesi ile yoğunluğunu artırdığı, anormal spermatozoon oranını düşürdüğü ve spermatozoon membran bütünlüğünü koruduğu, buna karşın sperma miktarı, pH'sı ve seminal plazma arginaz aktivitesini etkilemediği belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmanın sonuçlarına göre spermaya *in vitro* katılan L-arjinin'in 10 mM'lık dozunun gerek kısa süreli

gerekse uzun süreli saklama esnasında spermanın kalitesine zarar verdiği ancak 0,5 mM'lık doz ilavesinin ise saklama esnasında spermaya katılmasının faydalı olacağı kanaatine varılmıştır.



7. KAYNAKLAR

1. Türkiye İstatistik Kurumu. "Hayvansal Üretim İstatistikleri". Ankara: Türkiye İstatistik Kurumu., [http// www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr). Erişim: 26.02.2015.
2. Spallanzani L. Opuscoli di Fisica Animale, a Vegetabil. Op. II. Oservazioni e sperienze intorno ai vermicalli spermatici dell'uomo e degli animali. (Presso la Societa' Tipographica: Nodena.), 1976.
3. Özkoca A. Çiftlik Hayvanlarında Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. İ.Ü. Vet. Fak. Yay. 1984.
4. Bearden HJ, Fuquay JW. Applied Animal Reproduction. 3rd Ed. Englwood Cliffs, New Jersey. 1992.
5. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. Anim Reprod Sci 2000; 62(1): 77-111.
6. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod Fert and Develop 1995; 7: 871-891.
7. Bailey JL, A Morrie, N Cormier. Semen cryopreservation: success and persistent in farm species. Canadian Journal of Animal Science 2003; 83:393-401.
8. Gökçek İ. "L-Arginin aminoasidi". [https://www. bitkisiltedavi. net/forum/ baslik/l-arginin aminoasidi](https://www.bitkisiltedavi.net/forum/baslik/l-arginin-aminoasidi). Erişim: 26.02.2016.
9. Yılmaz M. Arginin Metabolizması. Adnan Menderes Üniversitesi Biyokimya A.D. Yayını Ders Notu: 2005.
10. Onat T, Emerk K, Sözman EY. İnsan Biyokimyası, Ankara, Palme Yayıncılık, 2002.

11. Soeters PB, Hallemeesch MM, Bruins MJ. Quantitative in vivo assessment of arginine utilization and nitric oxide production in endotoxemia. *Am J Surgery* 2002; 183: 480-8.
12. Morris SM. Recent advances in arginine metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7: 45-51.
13. Tangphao O, Grossmann M, Chalon S. Pharmacokinetics of intravenous and oral L-arginin in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 47: 261-266.
14. Reyes AA, Karl IE, Klahr S. Role of arginine in health and in renal disease. *Am. J. Physiol.* 1994; 267: 331-346.
15. Barış N, Turgan N, Ersöz B. Argininin tıpsal biyokimyadaki önemi .*Türk Klinik Biyokimya Derg* 2004; 2(2): 83-90.
16. Flynn NE, Meininger CJ, Haynes TE, Wu G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2002; 56(9): 427-438.
17. Guoyao WU, Morris SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*, 1998; 336(1): 1-17.
18. Pegg AE, Mccann P. Polyamine metabolism and function in mammalian cells and protozoans. *Isı Atlas of Sci Biochem* 1988; 11-18.
19. Pegg AE, Mccann P. Polyamine Metabolism and Function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1982; 12: 212-221.
20. Melendrez CS, Ruttle JL, Hallford DM, Chaudhry PS, Casillas ER. Polyamines in ejaculated ram spermatozoa and their relationship with sperm motility. *J Androl* 1992; 13: 293-296.

21. Facebook. Arginin Nedir? Ne İşe Yarar. www.facebook.com/notes/vucut-gelistirme-natural-body-building-fitness-l-arginine-nedir-ne-ise-yarar. Erişim: 24.02.2016.
22. Visek WJ. Arginine needs, physiological state and usual diets. A revaluation. *J Nutr* 1986; 116: 36-46.
23. Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Jobgen WS, Kim SW, Lassala A, Li P, Matis JH, Meininger CJ, Spencer TE. Pharmacokinetics and safety of arginine supplementation in animals. *J Nutr* 2007; 137: 1673-1680.
24. Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., L-Arginine. Bio-Chemicals Business Unit, Tokyo, Japan. 2005. https://euroland.com/pdf/J-P-KY4/AR_ENG_2004_2005.pdf Erişim:18.03.2016
25. Tsubuku S, Hatayama K, Mawatari K, Smriga M, Kimura T. Thirteen-week oral toxicity study of L-glutamine in rats. *Int J Toxicol* 2004; 23: 107-112.
26. Hardy G, Hardy I, McElroy B, Nutraceuticals: a pharmaceutical viewpoint: I. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5: 671-677.
27. Cooke JP, Mont-Reynaud R, Tsao PS, Maxwell AJ. Nitric oxide and vascular disease. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric oxide: biology and pathology*. New York: Academic Press; 2000. p. 759-783.
28. Shao A, Hathcock JN. Risk assessment for the amino acids taurine, L-glutamine and L-arginine. *Regul Toxicol Pharmacol* 2008; 50: 376-399.
29. Wu G, Bazer FW, Davis TA. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino acids* 2009; 37(1): 153-168.

30. Çiftçi H. Erkek cinsel sağlığı için doğal afrodisyaklar; Natural aphrodisiacs for male sexual health. Harran Univ Tıp Fak Derg 2011; 8(3): 108-112.
31. Mateo RD, Wu G, Moon HK et al. Effects of dietary arginine supplementation during gestation and lactation on the performance of lactating primiparous sows and nursing piglets. J Anim Sci 2008; 86:827-835.
32. Mohamed z. Gad Anti-aging effects of L-arginine Journal of advanced research 2010; 1: 169-177.
33. Lind DS. Arginine and cancer. The Journal of Nutrition, 2004; 134(10): 2837-2841.
34. Wilmore D. Enteral and parenteral arginine supplementation to improve medical outcomes in hospitalized patients. J Nutr 2004; 134: 2863-2867.
35. Paddon-Jones D, Borsheim E, Wolfe RR. Potential ergogenic effects of arginine and creatine supplementation. J Nutr 2004; 134: 2888-2894.
36. Nagase S, Takemura K, Ueda A. A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D-or L-arginine. Biochem Biophys Res Commun 1997; 233: 150-153.
37. Vergnani L, Hatik S, Ricci F. Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production: key role of L-arginine availability. Circulation 2000; 101: 1261-1266.
38. Srivastava S. Desai P, Couthinho E, Govil G. Protective effect of L-arginine against lipid peroxidation in goat epididymal spermatozoa, Physiol Chem Phys Med NMR 2000; 32: 127-135.

- 39.** Marthol H, Hilz MJ. Female sexual dysfunction: a systematic overview of classification, pathophysiology, diagnosis and treatment. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2004; 72(3): 121-135.
- 40.** Chen J, Wollman Y, Chernichovsky T, et al. Effect of oral administration of high-dose nitric oxide donor L-arginine in men with organic erectile dysfunction: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *BJU International* 1999; 83: 269-273.
- 41.** Appleton J. Arginine: clinical potential of a semi-essential amino acids. *Altern Med Rev* 2002; 7: 512–522.
- 42.** Colgan M. *Optimum Sports Nutrition: Your Competitive Edge*. 1993; 427-429.
- 43.** Hafez ESE. *Physiology of Reproduction. Reproduction in Farm Animals*. Philadelphia: Lea & Febiger. 1987; 85-128.
- 44.** Yarney AT, Sanford ML, Palmer MW. Pubertal development of ram lambs: body weight and testicular size measurements as indicators of postpuerperal reproductive function. *Can J Anim Sci* 1990; 70:139-147.
- 45.** Kaymakçı M, Sönmez R. *Koyun Yetiştiriciliği*. Hasad Yayıncılık, Hayvancılık Serisi 3, İstanbul. 1992.
- 46.** Ollero M, Cebrian-Perez JA, and Muino-Blanco T. Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma. *J Androl* 1997; 18: (6), 732-739.
- 47.** Barrios B, Perez-Pe R, Gallego M, Tato A, Osada J and Muino-Blanco T. Seminal plasma proteins revert the cold shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod*, 2000; 63: 1531-1537.

- 48.** Medeiros CMO, Forell F, Oliverira ATD and Rodriques JL. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology*. 2002; 57: 327-344.
- 49.** Schachter A, Goldman JA, Zuckerman Z. Treatment of oligospermia with the aminoacid arginine. *J Urology* 1973; 110: 311-313.
- 50.** Ak K. Spermının Saklanması. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'î Tohumlama. Masa Üstü Yayıncılık. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını ders notu: 1996.
- 51.** Saleh İA. Seasonal variations in semen quality of local and crossbred rams raised in the United Arab Emirates. *Anim Reprod Sci* 1997; 49(2-3): 161-167.
- 52.** Altınışık M. "Protein ve aminoasit metabolizması." <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-2-13>). Erişim tarihi: 20.02.2016
- 53.** Keller DW, Polakoski KL. L-Arginine stimulation of human sperm motility in-vitro. *Biol Reprod* 1975; 13:154 –160.
- 54.** Arginine activates glycolysis of goat epididymal spermatozoa:An NMR-Study Patel AB, Srivastava S, Phadke RS, Govil G. *Biophysical Journal* Volume 75 September 1998; 1522-1528
- 55.** 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. *Biol Reprod* 2006; 74: 954-958.
- 56.** Razmi N, Jelodar GA, Nazifi S, Dehghani A. Arginase status in ram reproductive system. *J Appl Anim Res* 2004; 26: 57-59.
- 57.** Razmi N, Jelodar GA, Nazifi S, Dehghani A. Arginase status in cattle reproductive system. *Vet Arhiv* 2005; 75, 31-38.

58. Mendez JD, Martinez I. Arginase activity in ram epididymal/ejaculated spermatozoa. 1995; 7: 131-136.
59. Porembaska Z, Nadolska-Lutyk J, Grabon W. Arginase in bull testis. *Acta Biochimica Polonica*, 1990; 37(3): 377-384.
60. Günaydın MB, Gölgeli MH, Kantar B. ‘‘Koç Testis Arjinazı: İzolasyon ve Özelliklerinin Belirlenmesi’’. [http:// tip.baskent.edu.tr /kw/upload/600/dosyalar/cg/sempozyum/ogrsmpzsnm12/12.1.pdf](http://tip.baskent.edu.tr/kw/upload/600/dosyalar/cg/sempozyum/ogrsmpzsnm12/12.1.pdf) Erişim: 21.01.2016.
61. Gür S, Kandemir FM. Relationships between seminal plasma arginase activity and spermatological parameters in rams. *Andrologia*, 2012; 44(2): 86-91.
62. Türk G, Gür S, Kandemir FM, Sönmez M. Relationship between seminal plasma arginase activity and semen quality in Saanen bucks. *Small Ruminant Research*, 2011; 97(1): 83-87.
63. Eskiocak S, Gözen AS, Taşkıran A, Kılıç AS, Eskiocak M, Gülen S. Effect of psychological stress on the l-arginine-nitric oxide pathway and semen quality. *Brazil. Jour. of Med. and Biol. Res.* 2006; 39:581-588.
64. Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD. L. Arginine. *Biomed Pharmacother.* 2002; 56: 439–445.
65. Maxwell AJ, Cooke JP. Cardiovascular effect of Larginine. *Curr Opin in Nephrol and Hypertens* 1998; 7: 63-70.
66. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitricoxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Reviews* 1991; 43:109-141.
67. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10. Baskı, Ankara: Hacettepe-Taş. Kitapçılık Ltd. Sti., 2002.

68. Klotz T, Mathers MJ, Braun M, Bloch W, Engelmann U. Effectiveness of oral L-arginine in first line treatment of erectile dysfunction in a controlled crossover study. *Urol Int* 1999; 63: 220-223.
69. Shah J. Herbal treatments for erectile dysfunction. *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*. 2009; 66-80.
70. Sukardi S, Yaakub H, Ganabadi S, Cheng LH. Effects of l-arginine on the reproductive system of male rabbits. *Mal J Nutr* 2006; 12(2): 201-211.
71. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 1995; 37: 185-249.
72. Sevinç A. Dölerme ve Suni Tohumlama. F.Ü. Vet. Fak. Yayın No: 12. Elazığ. 1977.
73. Evans G, Maxwell WMC. Salamons' Artificial Insemination of Sheep and Goats. No. Ed. 2. Butterworths, Wellington, New Zealand, 1987.
74. Gökçen H.. Koyunlarda sun'i tohumlama. In: Aytuğ CN. (Editör). *Koyun-Keçi Hastalık ve Yetiştiriciliği*. Teknografik Matbaası, İstanbul. 1990; 485-501.
75. Ratnasooriya WD, Dharmasiri MG. L-Arginine, the substrate of nitric oxide synthase, inhibits fertility of male rats. *Asian J Androl* 2001; 3: 97-103.
76. Radany EW, Atherton RW, Forrester IT. Arginine uptake by rabbit spermatozoa. *Arch Biochem Biophys* 1981; 210: 770-774.
77. Tekin N. Examinations of the male reproduction organs. In: Alaçam E. (Editor) *Theriogenology*, Nurol Press, Ankara. 1990; 53-67.

- 78.** Cupps PT, McGowan B, Rahlman FD, Reddon RA, Weir CW. Seasonal changes in the semen of ram lambs: reproductive hormone concentrations as indicators of postpubertal reproductive function. *Can J Anim Sci* 1990; 70:149-157.
- 79.** Aydın S, İnci O, Alagol B. The role of arginine in domethacin and kallikrein in the treatment of oligospermia. *Int Urol Nephrol* 1995; 27: 199-202.
- 80.** Türk G, Demirci E. Akkaraman koçların serum testosteron düzeylerinde ve spermatogenesisindeki mevsime bağlı değişikliklerin araştırılması I. Spermatolojik özelliklerle testosteron miktarı arasındaki ilişki. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 2005; 19(1): 21-27.
- 81.** Holt LE, Albanesi AA. Observation of amino acids deficiencies in man. *Transaction of The Association of American Physicians*. 1944; 58: 143-156.
- 82.** Scibona M, Meschini P, Capparelli S. L-arginine and male infertility. *Minerva Urol Nefrol* 1994; 46: 251-253.
- 83.** Keller DW, Polakoski KL. L-arginine stimulation of human sperm motility in vitro. *Biology of Reproduction*, 1975; 13(2): 154-157.
- 84.** Schachter A, Friedman S, Goldman JA, Eckerling B. Treatment of oligospermia with the amino acid arginine. *Int. J. of gynaecol. obstetr: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 1973; 11(5): 206.
- 85.** Tanimura J. Studies on arginine in human semen. II. The effects of medication with arginine-HCl on male infertility. *Bull Osaka Med Sch*. 1967; 13:84-89.
- 86.** Morales ME1, Rico G, Bravo C, Tapia R, Alvarez C, Méndez JD. *Ginecol Obstet Mex*. Progressive motility increase caused by L-arginine and

- polyamines in sperm from patients with idiopathic and diabetic asthenozoospermia. 2003; 71: 297-303.
- 87.** Hassanpour H, Teshfam M, Goodarzi AK, Tajik P, Mirshokraei P. In vitro effects of l-arginine on motion parameters in ram epididymal sperm. *Comparative clinical pathology*, 2010; 19(4), 351-355.
- 88.** O'Flaherty C, Rodriguez P, Srivastava S. L-arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2004; 1674(2): 215-221.
- 89.** Carvalho HF, Silva DF, Andrade AFC, Caldas-Bussiere MC, Celeghini ECC, Alonso MA, Arruda RP. Effect of different L-arginine concentrations on motility patterns and hyperactivation in cryopreserved equine sperm. *Jour. of Equi. Vet. Sci.* 2012; 32(8): 480-481.
- 90.** 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(1): 147-153.
- 91.** Demirci E. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama ve Androloji. F.Ü. Vet. Fak. Ders Notları No: 45, Elazığ. 2000.
- 92.** Söderquist L, Madrid-Bury N, Rodriguez-Martinez H: Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology*. 1997;48: 1115-1125.
- 93.** Geyer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem* 1971; 39: 412-417.

- 94.** Lowry OH, Rosenbroug NJ, Farr A, Randall LJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265–275.
- 95.** Salamon S, Maxwell WM. Frozen storage of ram semen: II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.* 1995; 38: 1-36.
- 96.** 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.
- 97.** Türk G. Reaktif oksijen türlerinin spermatozoon fonksiyonları üzerindeki fizyolojik ve patolojik etkileri. *Turkey Clinic Journal of Reproduction and Artificial Insemination-Special Topics*, 2015; 1 (3): 26-34.
- 98.** Sarıözkan S, Özdamar S, Türk G, Cantürk F, Yay A. In vitro effects of L-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality, plasma membrane integrity and DNA damage of rabbit sperm during liquid-storage. *Cryobiology*, 2014; 68: 349-353.
- 99.** Uysal O, Bucak MN. Effect of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen thawed ram semen. *Acta Vet Brno*, 2007; 76: 383-390.
- 100.** Shan L, Wang B, Gao G, Cao W, Zhang Y. L-Arginine supplementation improves antioxidant defenses through L-arginine/nitric oxide pathways in exercised rats. *J Appl Physiol*, 2013; 115(8):1146-55.

- 101.** Adams MR, Phu CV, Stocker R, Celermajer DS. Lack of antioxidant activity of the antiatherogenic compound L-arginine. *Atherosclerosis*, 1999; 146(2): 329-335.
- 102.** Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodvel VW. Harper'in Biyokimyası. Çevirenler: Menteş G, Ersöz B. Barış Kitabevi: İstanbul, 1990.



8. ÖZGEÇMİŞ

19 Mayıs 1987 tarihinde Elazığ'da doğdum. İlkokulu Elazığ Evren Paşa da, Ortaokul ve Liseyi Elazığ Anadolu Lisesi'nde okudum. 2004 yılında girdiğim Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni 2009 yılında bitirerek mezun oldum. 2009 yılı Ekim ayında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen doktora öğrencisi olarak görevime devam etmekteyim. Evli ve bir çocuk annesiyim.

Arş. Gör. Şeyma ÖZER KAYA