



T.C.

MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EPİDİDYMAL BOĞA SPERMASININ +4°C'DE SIVI OLARAK
SAKLANMASINDA TRİS-CITRIC ACID YUMURTA SARISI
SULANDIRICISINA L-CYSTEINE VE CATALASE İLAVE
EDİLMESİNİN *İN-VİTRO* OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Alime MERDAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LABORATUVAR ve DENEY HAYVANLARI (DİSİPLİNLERARASI)
ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ayhan ATA

BURDUR- 2017

T.C.

MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EPİDİDYMAL BOĞA SPERMASININ +4°C'DE SIVI OLARAK
SAKLANMASINDA TRİS-CITRIC ACID YUMURTA SARISI
SULANDIRICISINA L-CYSTEINE VE CATALASE İLAVE
EDİLMESİNİN *İN-VİTRO* OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Alime MERDAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LABORATUVAR ve DENEY HAYVANLARI (DİSİPLİNLERARASI)

ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ayhan ATA

Bu Araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0382-YL-16 proje numarası ile desteklenmiştir

BURDUR- 2017

TEZİN KABUL ve ONAY SAYFASI

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Alime MERDAN tarafından Prof.Dr.Ayhan ATA yönetiminde hazırlanan "Epididymal Boğa Spermalarının +4°C'de Sıvı Olarak Saklanması Tris-Citric Acid Yumurta Sarısı Sulandırıcısına L-cysteine ve Catalase İlave Edilmesinin İn-Vitro Olarak Değerlendirilmesi" başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından Laboratuvar ve Deney Hayvanları Anabilim Dalında (Yüksek Lisans/Doktora Tezi) olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15.12.2017

İmza
Prof.Dr. Özlem ÖZMEN
Patoloji Anabilim Dalı
Başkan

İmza
Prof.Dr. Ayhan ATA
Dölerme ve Suni Tohumlama
Anabilim Dalı
Jüri

İmza
Prof.Dr. İlker SERİN
Dölerme ve Suni Tohumlama
Anabilim Dalı
Jüri

ONAY

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu 12/01/2018 Tarih ve 3 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. M. Doğa TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca sahip olduğum bilgi birikimini, desteğini esirgemeyen, babacan tavrıyla her zorluğu kolaylaştıran ve ‘olmaz, yapılamaz’ kelimelerini lügatımdan kaldırtan insan istedikten sonra yapılamayacak hiç birşeyin olmadığını öğreten danışmanım Prof. Dr. Ayhan ATA’ya yaptığı katkılardan dolayı teşekkür ederim.

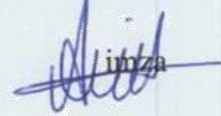
Tez çalışmam, laboratuvar çalışmalarım ve sonrasındaki istatistiki değerlendirme aşamalarında benden yardımlarını esirgemeyen Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Şükrü GÜNGÖR’e ve akademik tecrübelerini aktarmaktan çekinmeyen Yrd. Doç. Dr. Muhammed Enes İNANÇ’a gösterdikleri sabır ve özveri için teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimimin başından sonuna kadar karşılaştığım her problemde ve attığım her adımda yanımda olduklarını bildiğim abim Prof. Dr. Kürşat ÖZDAŞLI ve ablam Yrd. Doç. Dr. Esmem ÖZDAŞLI’ya teşekkür ederim. Ayrıca bugüne kadar hayatın her anında bana destek olduklarını bildiğim yüzüne baktığımda her derdimi unuttuğum annem Aliye MERDAN’a maddi ve manevi arkamdaki koca çınar babam Ahmet MERDAN’a ve tüm destekleri ve yardımları için minnettar olduğum kardeşlerim Mehmet Fatih MERDAN ve Serdarhan MERDAN’a sonsuz teşekkür ederim.

BEYAN

'Epididymal Boğa Spermalarının +4°C'de Sıvı Olarak Saklanması Tris-Citric Acid Yumurta Sarısı Sulandırıcısına L-Cysteine ve Catalase İlave Edilmesinin İn-Vitro Olarak Değerlendirilmesi' başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tasarlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi bu tez çalışması için elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumları kullanırken kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı yine bu tezin çalışması ve yazımı esnasında patenet ve telif haklarını ihlal edici bir davranışta bulunmadığımı saygılarımla beyan ederim.

15.12.2017
Tarih


imza

Alime MERDAN

ONAY


imza

Prof. Dr. Ayhan ATA

Danışman

İÇİNDEKİLER

SAYFA

TEZİN KABUL ve ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Boğalardan Sperma Alma Yöntemleri.....	3
2.1.1. Epididimal Sperma Alma Yöntemleri.....	4
2.2. Sperma Sulandırıcıları	5
2.3. Sperma Sulandırıcılarında Aranılan Özellikler	5
2.4. Boğa Sperma Sulandırıcıları	6
2.5. Sperma Sulandırıcılarına Eklenen Antioksidanların Yapısı	7
2.5.1. Serbest Radikaller	7
2.5.2. Oksidatif Stres.....	8
2.5.3. Antioksidanlar	9
2.5.3.1. Katalaz Enzimi	11
2.5.3.2. L-Sistein Aminoasiti	12
2.5.3.3. Katalaz ve L-Sistein İle İlgili Son Yıllarda Yapılan Çalışmalar	14
2.6. Spermanın Saklanması.....	17
2.6.1. Kısa Süreli Saklama (+4°C'de Saklamak)	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Gereç	18
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. Epididimal Spermaların Elde Edilmesi.....	18
3.2.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışı.....	20
3.2.2.1. Kontrol Grubu Solüsyonu	21
3.2.2.2. Grup 1 Solüsyonunun Hazırlanışı	24

3.2.2.3. Grup 2 Solüsyonunun Hazırlanışı	24
3.2.2.4. Grup 3 Solüsyonunun Hazırlanışı	24
3.2.2.5. Grup 4 Solüsyonunun Hazırlanışı	24
3.2.2.6. Grup 5 Solüsyonunun Hazırlanışı	24
3.2.2.7. Grup 6 Solüsyonunun Hazırlanışı	24
3.2.3. Spermatojik Değerlendirme Parametreleri.....	25
3.2.3.1. Motilite.....	26
3.2.3.2. Ölü-Canlı Spermatozoa Oranı.....	26
3.2.3.3. Anormal Spermatozoa Oranı (Morfoloji)	27
3.2.3.4. Spermatozoa Membran Bütünlüğü (Hipo Osmotik Swelling (HOS) Test)	27
4. BULGULAR	28
4.1. Motilite.....	28
4.2. Ölü- Canlı Spermatozoa Oranı.....	30
4.3. Anormal Spermatozoa Oranı	32
4.4. Spermatozoa Membran Bütünlüğü- Hipo Osmotik Swelling Test (HOST)	34
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	38
7. KAYNAKLAR	40
8. ÖZGEÇMİŞ.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Mezbahada kesimi yapılan boğalardan alınan testisler	4
Şekil 2.2. Çalışmaların yürütüldüğü Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Laboratuvarlarında sperma sulandırıcıları hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler.....	5
Şekil 2.3. Laboratuvarda hazırladığımız boğa sperma sulandırıcısı (yumurta sarısı eklenmiş çalışma ve kontrol grubu spermalar)	6
Şekil 3.1. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda mezbahadan alınan testislerden epididimal sperma elde edilmesi.	19
Şekil 3.2. Deneylerde sperma sulandırmada kullanılmak üzere hazırlanmış ana stok solüsyonlar.	20
Şekil 3.3. Sperma sulandırıcısı hazırlamak için gerekli temel bileşenler; Tris, sitrik asit, glikoz.	21
Şekil 3.4. Dulbecco's Phosphate Buffer Solüsyonu hazırlamak için gerekli olan kimyasallar ve antibiyotikler.....	23
Şekil 3.5. Sperma sulandırmada kullanılan stok solüsyonun hazırlanması	25
Şekil 3.6. Laboratuvarda motilite değerlendirmesi yaparken kullanılan ısıtma tablalı faz kontrast mikroskop	26
Şekil 4.1. Çalışmada elde edilen verilerle oluşturulan motilite değerleri sütun grafiği	28
Şekil 4.2. Çalışmada elde edilen verilerle oluşturulan ölü-canlı spermatozoa sütun grafiği	30
Şekil 4.3. Çalışmada morfoloji testi ile elde edilen verilerden oluşturulan sütun grafiği	32
Şekil 4.4. Çalışmada elde edilen spermatozoa membran bütünlüğü verileriyle oluşturulan sütun grafiği	34

TABLolar DİZİNİ

SAYFA

Tablo 2.1. Sık karşılaşılan radikaller, simgeleri ve işlevleri.	8
Tablo 2.2. Bazı antioksidanlar.	11
Tablo 3.1. Deney grupları ve ilave edilen antioksidanlar.	20
Tablo 3.2. Sperma sulandırma da kullanılan ana stok solüsyon içeriği	21
Tablo 3.3. Dulbecco' s Phospate Buffer A Solüsyonunun Hazırlanışı	22
Tablo 3.4. Dulbecco' s Phospate Buffer B Solüsyonu Hazırlanışı	22
Tablo 4.1. Çalışmada elde edilen motilite verilerinin istatistiki sonuç tablosu.	29
Tablo 4.2. Çalışmanın eosin boyama testi ile elde edilen spermatozoa verilerinin istatistiki tablosu	31
Tablo 4.3. Çalışmada incelenen spermaların morfolojik olarak normal- anormal sperma oranı tablosu	33
Tablo 4.4. Çalışmada sulandırılmış spermaya uygulanan hipo-osmotik swelling istatistiki tablosu	35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ASC	Alanin, Serin, Sistein taşıma sistemi
ATP	Adenozin trifosfat
AIDS	Kazanılmış bağışıklık sistemi yetersizliği sendromu
CASA	Bilgisayar destekli sperm analizi
CAT	Katalaz
DMA	Dimetil asetamit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
D-PBS	Dulbecco's fosfat buffer solüsyonu
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GRD	Glutasyon reduktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSH- P_x	Glutasyon peroksidaz
GST	Glutasyon S-transferaz
HOST	Hipo osmotik swelling test
NADP	Nikotin Adenin Dinükleotit Fosfat
-SH	Sülfhidril grubu
SOD	Süperoksit dismutaz
TEY	Tris yumurta sarısı sperma sulandırıcısı

T. C.

MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

Epididymal Boğa Spermalarının +4°C’de Sıvı Olarak Saklanması Tris-Citric Acid Yumurta Sarısı Sulandırıcısına L- Cysteine ve Catalase İlave Edilmesinin *İn-Vitro* Olarak Değerlendirilmesi

Alime MERDAN

Laboratuvar ve Deney Hayvanları (Disiplinlerarası) Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ayhan ATA

BURDUR – 2017

ÖZET

Bu çalışmada epididimal boğa spermalarının +4°C’de sıvı olarak saklanmasında tris-sitrik asit yumurta sarısı sulandırıcısına l-sistein ve katalaz ilave edilmesinin *in-vitro* ortamda etkisi araştırıldı. Çalışmada hayvanların genetik kaynaklarını korunmak ve epididimal spermaların hayvan yetiştiriciliğinde verimin yükseltilmesi amacıyla kullanılabilmesi için spermaların uzun süre saklanabilmesinde l-sistein ve katalazın etkilerini araştırmak amaçlandı. Bu amaçla Burdur Güç Birliği mezbahasında kesimi yapılan sağlıklı boğalardan alınan testisler Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı kliniğine getirildi. Epididimal spermalar Dulbecco’s Phospate Buffer Work (D-PBS Work) solüsyonu içine bırakıldı %60 ve üzeri motiliteye sahip epididimal spermalar çalışmada kullanıldı. Epididimal spermalar tris-sitrik asit yumurta sarısı sulandırıcısına 1 mM ve 2 mM l-sistein, 20 µg/ml ve 50 µg/ml katalaz eklenerek oluşturulan 7 grupta +4°C’de saklandı.

Bu sulandırıcılardaki spermalar 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde sırası ile motilite oranı, ölü-canlı spermatozoa oranı (eosin testi), anormal spermatozoa oranı (morfoloji) ve spermatozoa membran bütünlüğü (Hipo osmotik swelling testi) testlerine tabii tutuldu. Sonuçlar istatistiki olarak değerlendirildi.

Sonuç olarak; kontrol grubuna göre diğer gruplarda tüm parametrelerde istatistiksel olarak çok yüksek düzeyde ($p<0.001$) ve yüksek düzeyde ($p<0.05$) farklılık elde edildi. Çalışma sonuçlarına göre hem katalaz hem de l-sistein kullanılmasının yararlı ve gerekli olduğu istatistiksel olarak belirlendi. Gruplar arasında tüm parametrelerde istatistiksel olarak en önemli farklılık 1 mM l-sistein içeren deney grubunda elde edildi.

Anahtar Kelimeler: Epididimal sperma, Antioksidan, Tris-sitrik asit, katalaz, l-sistein.

T.C.

MEHMET AKIF ERSOY UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCE

Master of Science Thesis

***In Vitro* Evaluation of Liquid Stored Epididymal Bull Semen at +4°C Diluted
with Tris-Citric Acid Egg Yolk Extender Supplemented L-Cysteine and
Catalase**

Alime MERDAN

Department of Laboratory and Experimental Animals

Supervisor

Prof. Dr. Ayhan ATA

BURDUR – 2017

ABSTRACT

In this study, *in vitro* evaluation of liquid stored epididymal bull semen at +4°C diluted with tris-citric acid egg yolk extender supplemented l-cysteine and catalase was investigated. The purpose of this study was to investigate the effects of l-cysteine and catalase on the preservation of epididymal sperms for a long time in order to protect the genetic resources of animals and to increase the productivity of epididymal sperms in animal breeding. For this purpose, the testes taken from the healthy bulls slaughtered in Burdur Güç Birliği slaughterhouse were brought to the clinic of Mehmet Akif Ersoy University Department of Reproduction and Artificial Insemination. Epididymal bull sperm were placed in a Dulbecco's Phosphate Buffer Work (D-PBS Work) solution and epididymal spermatozoa with a motility of 60% were used in the study. Epididymal sperm were stored at +4°C in 7 groups formed by adding 1 mM and 2 mM l-cysteine, 20 µg/ml and 50 µg/ml catalase to tris-citric acid egg yolk diluent.

The epididymal spermatozoa in these diluents were subjected to the tests of motility ratio, dead-live spermatozoa ratio (eosin test), abnormal spermatozoa ratio (morphology) and spermatozoa membrane integrity test (Hypo osmotic swelling test) at 0, 24, 48, 72, 96 and 120 hours. The results were evaluated statistically.

As a result; statistically significant very high level ($p < 0.001$) and high level ($p < 0,05$) in all groups according to the control group was obtained. According to the results of the study, it was statistically determined that both catalase and l-cysteine were useful and necessary. Statistically significant differences in all parameters between groups were obtained in the experimental group containing 1 mM l-cysteine.

Key words: Epididymal sperm, Antioxidant, l-cysteine, catalase, Tris-citric acid.

1. GİRİŞ

Suni tohumlama işlemlerinin ekonomik ve pratik olarak uygulamalarının gerçekleştirilebilmesi amaçlanmaktadır. Suni tohumlama uygulamalarında karşılaşılabilecek en önemli problemlerin başında spermanın saklanması gelmektedir (64). Son dönemlerde suni tohumlama çalışmalarında spermanın kısa ya da uzun süre saklanabilmesindeki sorunlar çözüme kavuşturulmaya çalışılmaktadır. Sevinç ve Hafs (1961); çalışmalarında sağlıklı boğalardan alınan spermaların bir-iki gün içerisinde kullanılmayacaksa saklanabilmesi için dondurma tekniğinin uygulanması gerektiğini bildirmektedir. 1961 yılında Sevinç ve Hafs yaptıkları çalışmalarında dondurma tekniğinin spermanın saklanması için pahalı bir seçim olduğunu belirtmişlerdir (64). Suni tohumlama uygulamaları genellikle dondurmuş sperma kullanılması ile gerçekleştirilmektedir ancak kısa süreli saklama yollarının geliştirilmesi çalışmalarında devam etmektedir. Bu yol avantaja çevrilerek yetiştiriciye farklı sayıda boğa spermasını seçme olanağı sunulabilmektedir. Bir başka avantajı ise verimli ırkların gamet hücrelerinin, spermalarının şehirler, ülkeler ve kıtalar arası transferinin kolay ve sorunsuz olmasıdır (40).

Spermanın gerek +4°C'de saklanmasında gerek de dondurulması esnasında çeşitli sulandırıcılar kullanılmaktadır. Bu sulandırıcılar in-vitro ortamlarda yumurta sarısı, süt ve süt tozu gibi maddeler katılarak yapılabilmektedir (46). Bu sulandırıcıların amaçlarından biri spermanın hacim olarak artırılmasıdır. Spermatozoonların canlılığını daha uzun süre devam ettirebilmek içinde sulandırıcılar kullanılır. Sperma sulandırıcılarında basit şekerler gibi enerji veren maddeler bulunduğundan spermatozoonların canlılığını uzun süre koruyabilmelerine yardımcı olurlar (64). Ayrıca spermalara sulandırma esnasında eklenen antioksidanlar da spermatozoonların plazma membranındaki proteinleri koruyarak spermatozoonların daha uzun süre canlı kalabilmesini sağlamaktadır (69). Spermatozoonları ani ısı değişikliklerinden koruyabilmek ve çeşitli bakterilerin spermatozoonlara zarar vermesini önlemek için de sperma sulandırıcılarına eklenen antioksidanlar önemli yer tutmaktadır. Eklenen antioksidanlarla spermatozoa çok daha uzun süre potansiyel fertilesini koruyabilmektedir (39).

Boğa sperma sulandırıcılarında 1950 yılına kadar yumurta sarısı-sodyum sitrat sulandırıcıları yaygın olarak kullanılmaktaydı. 1954 yılında Barker ve arkadaşlarının çalışmalarıyla sperma sulandırıcılarına eklenen yumurta sarısı-sodyum sitrat, tris, süt, süt tozu ve gliserol gibi maddelerde günümüzde kullanılmaya devam etmektedir (13, 29). Üretimleri fazla olan suni tohumlama laboratuvarlarında daha çok hazır ticari sulandırıcılar kullanılmaktadır. Genelde kullanılan ticari sperma sulandırıcıları da Tris, Andromed, Bioxcell, Biociphos, Laciphos ve Caprogen şeklinde sıralayabiliriz (40).

Sperma sulandırıcılarında: uygun osmotik basınç, besi ortamı, metabolik artıkları absorbe edebilme ve spermatozoonları soğuğun zararlı etkisinden koruyabilme gibi özellikler aranır. 26-32°C arası ısıda sulandırılan boğa sperması fertilitte özelliklerini kaybetmeksizin 72 saate kadar +4°C'de saklanıp tohumlamada kullanılabilir (13).

Bu tez çalışmasında epididimal boğa spermasının +4°C'de sıvı olarak saklanmasında sperma sulandırıcısı olan tris- sitrik asit yumurta sarısı içerisine l-sistein ve katalaz ilavesinin *in-vitro* ortamda etkisi araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Boğalardan Sperma Alma Yöntemleri

Spermanın elde edilmesi; suni tohumlama çalışmalarında kullanılacak spermanın beklenmedik hayvan ölümleri gibi durumlarda genetik materyalinden yararlanabilmek adına hayvanlardan sağlıklı bir şekilde alınabilmesinin yoludur. Bu şekilde alınan spermalar hazırlanarak tohumlama işlemlerinde kullanılmaktadır (61). Yetiştiricilerin sperma isteklerine cevap verebilmek ya da genetik üstünlüğü bulunan boğaların spermalarını yetiştiricilere sunabilmek için (77), yetiştiricinin talebini zamanında karşılayabilmek adına boğalardan belli zaman aralıklarında sürekli olarak alınan spermalar kullanılmakta ve dondurulmaktadır (64).

Kullanılacak spermanın laboratuvarında hazırlanabilmesi, saklanabilmesi, dondurulabilmesi ve sahadaki suni tohumlama uygulamalarından olumlu sonuçların elde edilebilmesi, çalışmaların ilk ve en önemli aşamasını oluşturan spermaların boğalardan sağlıklı bir şekilde alınabilmesine bağlıdır (40).

Bunun için aşağıdaki esaslara özenle dikkat edilmelidir:

- a. Suni tohumlama için boğalardan spermanın tamamı alınmalıdır, bu spermaların kontamine edilmesine, idrar, gaita gibi maddelerle kirlenmesine izin verilmemelidir.
- b. Suni yolla alınan spermanın özellikleri, tabii yolla ejaküle edilen spermanın yapısına benzer olmalıdır.
- c. Spermatozoonların fertilité kabiliyetleri, sperma almaya bağlı olarak etkilenmemelidir.
- d. Sperma alma yöntemlerine ve alma sıklığına bağlı olarak boğanın sağlık durumunu kesinlikle bozulmamalı ve spermatogenesis de zarar görmemelidir.

Sperma alma işlemi farklı şekil ve yöntemlerle gerçekleşebilmektedir. Sperma alma yöntemlerinin başında suni vajina ile sperma alma gelmektedir. Bunun yanında epididimal spermanın alınması, prezervatif, vajinaya aşımından önce sünger koyma, mastürbasyon, masaj ve elektro-ejakulasyon yollarında sperma alma yöntemleri arasındadır (40).

2.1.1. Epididimal Sperma Alma Yöntemleri

Epididimal spermaların elde edilmesindeki amaç; ani hayvan ölümleri veya diğer yöntemler ile spermanın alınmadığı durumlarda genetik özelliklerinden yararlanabilmek için kauda epididimisteki spermatozoonların elde edilmesidir. Bu yöntem hayvanın ölümden hemen sonra genetik kaynaklarından yaralanarak genetik özelliklerini yavrularına aktarabilmesinin en iyi yoludur (42). Bununla birlikte boğalardan elde edilen epididimal spermanın kalitesi, ejaküle edilmiş spermadan daha düşük olmaktadır. Epididimal spermalar ejaküle edilmiş spermalardan plazma membranında bulunan protein çeşidiyle (47) ve spermatozoonların hareket karakterleriyle farklıdır (30). Epididimal spermalar epididimisin kauda kısmından direk olarak alınan spermalardır. Epididimal spermalar, kastrasyon sonrasında boğadan alınan testislerden yıkanarak toplanan spermalar olduğu gibi canlı boğaların epididimislerinden kanül yardımıyla da toplanabilmektedirler (5, 22, 27, 32, 39, 45, 70). Yıkama işlemi vas deferens kanalına doğru takılan dişli sonda ile yapılırken kauda epididimisten toplama kabına geriye akma metoduyla toplanabilmektedir. İkinci metotta ise kauda epididimis kesilip süzülerek izole edilip epididimal sperma elde edilir (5, 6). Canlı boğaya cerrahi işlem uygulayarak küçük bir tüp vas deferens kanalına yerleştirilerek spermatozoalar toplanabilmektedir (22).



Şekil 2.1. Mezbahada kesimi yapılan boğalardan alınan testisler

2.2. Sperma Sulandırıcıları

Spermatozoonların canlılığını sürdürebilmesi için spermaları dış ve iç etkenlere karşı koruyan, hacmini istediğimiz oranlarda tutabilmemizi sağlayan ve spermaların fertilite kabiliyetlerine olumsuz etki etmeyen antioksidanlarla geliştirilebilen sıvı besi ortamlarına sperma sulandırıcıları adı verilmektedir. Spermatozoonları *in vitro* ortamlarda inceleyebilmek, ihtiyaç dahilinde spermanın +4°C'de saklanabilmesi ya da dondurulabilmesi için spermaların sulandırılması gerekmektedir (59).



Şekil 2.2. Çalışmaların yürütüldüğü Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Laboratuvarlarında sperma sulandırıcıları hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler.

2.3. Sperma Sulandırıcılarında Aranılan Özellikler

Sperma sulandırıcıları hazırlarken dikkat edilmesi gereken temel özellikler şunlardır (40, 59):

- Sperma sulandırıcısının osmotik basıncı kanın osmotik basıncına eşit olmalıdır. Bu eşitlik sperma sulandırıcılarına eklenen maddelerle (yumurta sarısı, gliserol vs) sağlanmaya çalışılmaktadır.
- Sperma sulandırıcıları, spermatozoonların canlılığını sürdürebilmeleri için gerekli olan mineral maddeleri taşımalıdır.

- Spermatozoonların enerji gereksinimini karşılayabilecek glikoz ya da fruktoz gibi maddeleri içermelidir.
- Çevredeki ani ısı değişimlerine karşı spermatozoonları koruyan kryoprotektif maddeler (gliserol, dimetil sülfoksit (DMSO), dimetil asetat (DMA) etilen glikol) bulunmalıdır.
- Spermatozoonların metabolik artıklarını elimine edebilen (buffer, tris, vs) maddeler bulunmalıdır.
- Sperma sulandırıcıları spermatozoonların gerek plazma membran bütünlüğünü, gerek de akrozom membran bütünlüğünü ve yapısını koruyabilmelidir.
- Bakteri kontaminasyonunun kontrolü ve diğer mikroorganizma etkenleri için antibiyotikler içermelidir.

2.4. Boğa Sperma Sulandırıcıları

Boğa sperma sulandırıcıları olarak yumurta sarısı-sodyum sitrat sulandırıcısı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra inek sütünün de sperma sulandırıcısı olabileceğine dair Çekoslovakya da bir rapor yayınlanmıştır. Yayınlanan raporla birlikte günümüzde boğa sperma sulandırıcısı olarak yumurta sarısı-sodyum sitrat, tris, süt ve süt tozu gibi değişik sulandırıcılar kullanılmaktadır. Suni tohumlama alanında seri üretime geçmiş olan laboratuvarlarda, ticari sperma sulandırıcıları kullanılmaktadır (29, 40).



Şekil 2.3. Laboratuvarda hazırladığımız boğa sperma sulandırıcısı (yumurta sarısı eklenmiş çalışma ve kontrol grubu spermalar)

2.5. Sperma Sulandırıcılarına Eklenen Antioksidanların Yapısı

2.5.1. Serbest Radikaller

Oksijen, hücrede enerji üretimi sırasında kullanılan ve canlıların hayatlarını idame ettirebilmesi için zorunlu bir moleküldür. Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin birçoğu oksijen ile ilişki halindedir. Serbest radikaller enerji üretimi işlemlerinin bir nevi atık ve zararlı doğal yan ürünü olmakla beraber, yüksek düzeyde reaktif içeren maddelerdir (1, 55).

Serbest radikallerin en çok ortaya çıktığı haller elektron transferinin gerçekleştiği durumlardır. Ayrıca atomik veya moleküler yörüngesinde reaktif olan serbest radikaller, çiftleşmemiş elektron bulunduran kimyasal ürünlerdendir (3).

Günümüzde gerçekleştirilen araştırmalara (1, 3) göre; erkek üreme sisteminin yapısal problemleri, erkek eklenti bez enfeksiyonları, anormal spermatozoa yapısı, spermatozoanın epididimiste veya geçişi esnasında kanalda uzun süre kalması ve yaşam şekli gibi faktörlerinin yanı sıra sigara, radyasyon, çevre kirliliği, ilaçlar gibi nedenler serbest radikallerin aşırı miktarlarda bulunmasına sebep olmaktadır. Ayrıca bu serbest radikallerin aşırı miktarda bulunması spermanın kalitesini ve işlevini olumsuz yönde etkilediği bildirilmektedir (37, 65). Bu oksidan maddelerin organizmada mitokondriyal, sitoplazmik ve ekstrasellüler formlarını içeren süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzim sistemlerinin; seruloplazmin, transferin, indirgenmiş glutatyon (GSH), metiyonin, vitamin A, C, E gibi antioksidan maddeler tarafından yıkımının gerçekleştiği görülmüştür (12). Sık karşılaşılan serbest radikaller Tablo 2.1.'de verilmiştir (24).

Tablo 2.1. Sık karşılaşılan radikaller, simgeleri ve işlevleri.

RADİKALLER	SİMGELERİ	İŞLEVLERİ
Hidrojen	H	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	O ₂	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH	En toksik oksijen metaboliti
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Reaktivitesi düşük, hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	O ₂	Güçlü oksijen formu, eşlenmemiş elektronu yok
Perhidroksi radikal	HO ₂	Lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikal	ROO	Lipidlere lokalize olur
Triklorometil	CCl ₃	Karaciğerde üretilir
Tiyol radikali	RS	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içerir
Alkoksil	RO	Oksijen metaboliti
Nitrojen dioksit	NO ₂	NO'in oksijenle reaksiyonuyla üretilir
Nitrojen oksit	NO	L-arjinin aminoasitlerinden üretilir

2.5.2. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen atomlarının kimyasal olaylarda ve metabolik oluşumlarda hücre içi veya hücre dışında olduğu durumlara oksidatif stres denilir. Bir başka deyişle serbest radikaller, hücre membran proteinlerinin parçalanmasıyla hücre ölümünün gerçekleşmesini ve bağışıklık sistemi hücreleri yok olmasıyla bağışıklık sisteminin çalışmasının bozulmasına sebep olmaktadır. Bu şekilde meydana gelen çeşitli stres şekillerinin oluşumunu hızlandırdığı ve lipid peroksidasyonlarına neden olan reaktif oksijen ürünlerinin vücutta oluşturdukları oksidatif hasara da "oksidatif stres" adı verilmektedir (72).

Vücutta enerji oluşum aktivitelerinin doğal yan ürünü olan serbest radikaller, organizmalarda doğuştan olan önemli bir mekanizmayla, oksidan-antioksidan dengesini ayarlamaya çalışır (9). Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki doğal olarak ayarlanan dengenin oksidanların artışıyla bozulması, organizmadaki membran lipidleri, proteinler ve DNA gibi hücrenin önemli yaşamsal yapılarında işleyişin bozulmasına ve canlıda patolojik olayların ortaya çıkmasına ve hücrenin işlevini yerine getirememesine yol açar (25).

Antioksidan özelliği taşıyan maddeler, serbest radikalleri çevresinde barındırmama, radikal üreten kimyasal tepkimeleri sonlandırma, reaksiyon hızını olumsuz yönde etkileme, oluşabilecek moleküler hasarı düzeltme, hücreselel enzim kayıplarını önleme, endojen antioksidan miktarını artırma mekanizmalarıyla birlikte koordine bir şekilde çalışarak oksidan-antioksidan dengesini sağlar (24).

Organizmaya beklenmedik şekilde ve fazla miktarda oksijen girişı, epinefrin gibi katekolaminlerin sentezinde meydana gelen artış, laktik asit, laktat dehidrogenaz, kreatin fosfokinaz gibi parçalayıcı enzim olaylarının artması ile hamilelik, yaşlılık gibi fizyolojik durumlarda ve kimyasal madde kirliliğinin çok yoğun olduğu ortamlarda uzun süre yaşama, stres düzeyi, sigara ve alkol gibi zararlı madde kullanımı oksidan-antioksidan dengesini sekteye uğratmaktadır. Belirttiğimiz bu nedenlerle antioksidan savunma sistemi eksiklikleri veya savunma duvarının yıkılması durumlarında, hassas oksidan-antioksidan dengesi oksidanlardan yana kayabilir. Bu durum serbest radikallerin oluşumunun artışından ya da antioksidan aktivitesinin yetersizliğinden meydana gelebilir (24). Ayrıca fiziksel ve kimyasal atıklar, herbisitler, X-ışınları, ilaçlar, güneş ışınları, hatta yiyeceklerin içerdiği bazı bileşikler de serbest radikal oluşumuna sebep olabilmektedir (2). Serbest radikallerin hasarlarının başında; lipid peroksidasyonları, proteinler arası di-sülfit bağı oluşumu ve DNA hasarları olduğu belirtilmektedir (30, 72). Ayrıca oksidatif stresin Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, karaciğer hastalıkları, orak hücre anemisi, AIDS, kanser, inme, diabet ve kalp krizi gibi hastalıklara yol açabileceği belirtilmektedir (78).

2.5.3. Antioksidanlar

Dış yörüngesinde eşlenmemiş elektron bulunduran kısa ömürlü reaktif atom ve moleküller serbest radikal olarak, enzimatik ve enzimsel olmayan yapılardan oluşan, radikal ve zararlı reaksiyonlarını önlemeye çalışan maddeler antioksidan olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller ve reaktif maddeler ile bu maddeleri üreten tüm faktörler oksidan olarak tanımlanır. Bir canlının içerdiği oksidan madde miktarı o canlının oksidasyon düzeyini belirlemektedir (24).

Organizmalarda serbest radikallerin önemli hasarlara sebep olduğu bilinmektedir. Bu hasarların önlenmesi için savunma mekanizmaları bulunmaktadır ve bu mekanizmalar ‘antioksidan savunma sistemleri’ olarak isimlendirilmektedirler. Antioksidan savunma sistemleri, intrasellüler ve ekstrasellüler yapıdadır. Serbest radikallerin hemen hepsi antioksidan savunma sistemlerinden kaçarak etkilerini sürdürebilirler (35, 66). Antioksidan savunma sistemlerini enzimatik olarak glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon reduktaz (GRD), süperoksit-dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve enzimatik olmayanlar ise hipotaurin, askorbat, ürat, prüvat, vitamin E, taurin gibi maddeler oluşturmaktadır (14, 53).

Antioksidanlar başlıca iki yapıda incelenmektedir:

- Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzim yapısında olmayanlar ve enzim yapısında olanlar olmak üzere iki gruptan oluşurlar. Enzim yapısında olan endojen antioksidanlar (19): katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon S-transferazlar (GST), glutatyon peroksidaz (GSH-GPx), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz olarak bilinirken (67) enzim yapısında olmayan antioksidanlar ise; melatonin, transferrin, seruloplazmin, miyogloblin, ferritin, hemogloblin, bilirubin, sistein, glutatyon, metiyonin, ürat, albümin ve laktoferrin’dir (70).

- Eksojen Antioksidanlar

Eksojen olarak bilinen antioksidanlar dışarıdan farklı yollarla alınan: α - tokoferol (vitamin E), askorbik asit (vitamin C), β -karoten, ksantin, folik asit (folat), oksidaz, mannitol, barbitüratlar, albümin, demir şelatörleri’dir (35, 36). Genellikle kullanılan antioksidanların isimleri ve görevleri Tablo 2.2. de gösterilmektedir (10):

Tablo 2.2. Bazı antioksidanlar.

ANTIÖKSİDANLAR	GÖREVLERİ
Süperoksit dismutaz	Süperoksidin parçalanmasını sağlar
Katalaz	Konsantrasyonu fazla olan H ₂ O ₂ 'i parçalanmasını sağlar
Glutatyon peroksidaz	Düşük konsantrasyondaki H ₂ O ₂ 'i yok eder
L- sistein	Organik bileşiklerin indirgenmesini sağlar
Vitamin E	Membran lipidlerinde çözünerek peroksidasyon zincirini kırar
Koenzim Q	Mitokondriyal enerji metabolizmasında antioksidan olarak görev yapar
β karoten	Singlet oksijen oluşumunu engeller
Askorbik Asit	OH'i parçalar ve oksidasyonu önler
Transferin	Fenton reaksiyonunu inhibe eder
Laktoferrin	Demir iyonlarının bağlanmasını sağlar, savunma mekanizmasını güçlendirir
Haptoglobinler	Hemoglobini bağlar
Hemopeksin	Serbest hem gruplarını bağlar
Albümin	HOCI radikalini toplar
Serüloplazmin	Süperoksit radikalini nötralize eder
Bilirubin	Peroksil radikalini toplar
Ürik asit	Metal bağlayıcıdır
Glikoz	OH radikalini giderir
Glutatyon	GSH hormonredoks substratı olarak görev yapar
Sitokrom oksidaz	İndirgenme reaksiyonlarındaki oluşabilecek reaktif türleri durdurur

2.5.3.1. Katalaz Enzimi

Katalaz enzimi; 1901 yılında Loew tarafından sığır karaciğerinden elde edilip hidrojen peroksidi (H₂O₂) parçalayan enzim olarak dünyaya tanıtılmıştır (73). Katalaz enziminin yapısı tek işlevli tetramer yapıya sahiptir. Tetramer yapının her alt birimi ortasına gömülü ya da yüzeyinde bir Niktoinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Hidrojen (NADPH) içerir (16).

NADPH katalitik aktivite için gerekli olmayıp, katalaz enzimini H₂O₂'nin substratının oksidasyonundan koruduğu belirtilmiştir. Hemoprotein olan katalaz enziminin molekül ağırlığı 250 kDa'dur. Yapısında dört hem grubu içeren hemoproteindir (17).

Hidrojen peroksit oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda oluşan katalitik tepkimeyle hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırmaktadır. Hidrojen peroksit oluşum hızının düşük olduğu durumlarda ise peroksidatif etki göstermektedir. Enzimler arasında en yüksek katalitik dönüşüm hızına sahip olan katalaz enziminin aktif olabilmesi için demir iyonları gereklidir (56).

Katalaz enzimi en çok peroksizomlarda bulunmakla birlikte endoplazmik retikulum ve sitosolde de bulunmaktadır. Katalaz enzim aktivitesi karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksek miktarda bulunmaktadır (74). Katalaz enzimi bir molekül H_2O_2 'den elektron alarak, aldığı elektronu oksitlerken katalazda redüklenir. Bir diğer molekül H_2O_2 'e elektron vererek onu indirger ve kendisi oksitlenerek tepkimeye girmeden önceki halini alır (23, 44).

Biyolojik olay ve tepkimelerde antioksidanlar, genellikle non-enzimatik, enzimatik ve yardımcı enzimler olarak sınıflandırılabilir. Enzimatik antioksidanların başında gelen katalaz, glutatyon, süperoksit dismutaz ve hemoprotein peroksidazlar gibi hidroperoksidazlar doğada yaygın olarak dağılmışlardır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise vitamin E ve askorbik asit (Vitamin C)'dir. Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen metabolitlerinin verdiği zararı önlemede görev alırlar (25, 35, 54, 56, 79).

Ayrıca oksidatif stresin erkek infertilitesindeki önemi, ilk olarak 1943 yılında aerobik şartlarda inkübe edilen insan spermatozoonlarının hareketliliği üzerine çalışan İskoçya'lı bilim insanı androlog John MacLeod'un ortama katalaz enzimi eklemesi ile spermatozoa hareketliliğinin arttığını gözlemlemesi üzerine katalaz enziminin olumlu etkilerinin varlığı gösterilmiştir (52).

2.5.3.2. L-Sistein Aminoasiti

Aminoasitler; proteinlerin en küçük yapı taşları olmakla beraber moleküllerinde $-NH_2$ ve karboksil ($-COOH$) grubu içeren bileşiklerdir. Canlı organizmalarda protein sentezinde görev alan aminoasitler D ve L olmak üzere iki formda bulunur. Doğal olan ve hemen her canlıda bulunan 'L' formudur. 'D' formu aminoasitler sadece bakterilerin hücre duvarlarında bulunmaktadır (4, 31).

Protein oluşumunda görev alan ve doğal olarak bulunan 20 esansiyel aminoasit vardır. Esansiyel amino asitler; glisin, alanin, valin, lösin, izolösin, sistein, metiyonin, aspartik asit, glutamik asit, asparagin, glutamin, serin, lizin, arjinin ve triptofan'dır. Bunun yanında bir de protein sentezine katılmayan ancak biyolojik öneme sahip esansiyel olmayan aminoasitler vardır. Bunlar: alanin, taurin, bütirik asit, homosistein, homoserin ve kreatin'dir (4, 31). L-sistein aminoasiti doğal aminoasitlerden olup, serbest sülfhidril grubu (-SH) grubu içeren bir aminoasittir. Hücrede protein sentezine katılan metiyonin ve serin aminoasitlerinden oluşan tripeptit yapıda olan l-sistein aminoasiti, glutatyon'un fonksiyonel -SH grubunu bulundurmaktadır (33). L-sistein aminoasitinin yapısını oluşturan sülfhidril grubu metiyonin aminoasitinden, karbon iskeletide serin aminoasitinden gelmektedir (18). Vitamin B₆, B₁₂ ve folat, l-sistein sentezini düzenleyen pek çok reaksiyonda yer alır. Homosistein ve metiyonin aminoasitlerinin birbirine dönüşümü çok hızlı gerçekleşir. Hücrede metiyonin aminoasidinin artış göstermesiyle, homosistein aminoasiti sistatyonin sayesinde l-sistein aminoasidine katalizlenir (80). Hücresel ortamda metiyonin aminoasidinin varlığı l-sistein aminoasidinin varlığını belirtmektedir. L-sistein aminoasiti, bütün hücrelerin sitozolünde redükte glutatyon (GSH) sentezine katılan bir aminoasittir (50).

Olgunlaşmış insan eritrosit hücreleri sitoplazma, mitokondri gibi hücre organellerini ve enzimlerini kaybettikleri için protein sentezi yapamazlar. Fakat eritrositler çeşitli kimyasal maddelerin parçalanmasında rol alan redükte glutatyon (GSH)'nu çok fazla miktarlarda içermektedirler (51). Hücre içerisine alınan l-sistein aminoasidi, oksidatif stres ve çeşitli toksik ajanlara karşı hücreleri koruyan GSH'nun oluşum hızını belirler ve hücre içi konsantrasyonunun dengede tutulmasında rol oynar (15). L-sistein aminoasiti, hücre içi antioksidan olarak da görev yapar. L-sistein aminoasidi vücuttaki toksik maddeleri temizler ve karsinojenlerin detoksifikasyonu sağlayarak hücreleri korur. L-sistein aminoasidi vücudumuzu üstlendiği görevleri ile radyasyonun zararlı etkilerinden korur, bununla birlikte beyin ve karaciğer gibi organları sigara ve alkolün zararlarından da korumaktadır. L-sistein aminoasidinin solunum kanalında mukusu parçalama özelliği olduğundan genellikle bronşit, amfizem ve tüberküloz tedavisinde yararlanılan bir aminoasittir (9).

Son dönemde yapılan araştırmalar, oksidasyon sonucu büyük moleküllerde geri dönüşü mümkün olmayan hasarlar meydana geldiğini ve uyarı mekanizmalarında da hasarların oluştuğunu göstermektedir. Daha çok l-sistein aminoasidinin içerdiği tiyollerini hedef alan oksidasyonun, enzimlerin, reseptörlerin, iyon kanallarının, taşıyıcılar ve transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonları için tehdit oluşturduğu gözlenmektedir (41).

L-sistein aminoasiti, memeli canlıların sistemlerinde normalin üstündeki konsantrasyonlarda toksik bir etki meydana getirdiğinden ortamdaki hızlıca otooksidasyon yoluyla uzaklaştırılır. Bu sayede plazmada düşük konsantrasyonlarda tutulması sağlanmış olur (41). L-sistein aminoasidinin hücre içerisine alınımı, genelde sodyum (Na^+) iyonunun ve adenozin tri fosfat (ATP)'a bağımlı alanin, serin, sistein taşıma sistemi (ASC) ve Na^+ iyonundan bağımsız taşıyıcı sistemler tarafından gerçekleştirilmektedir (60). Sodyum iyonuna bağlanmadan anyonik özellik gösteren l-glutamat ve l-sistein amino asitlerinin değişimine anyonik aminoasit taşıyıcı sistem, sitokiyometri ile aracılık eder. Sistein kalıntılarının polipeptid zincirine katılması sonucu NADP bağımlı sistein redüktaz ile oksidasyon sonucu oluşur (57).

2.5.3.3. Katalaz ve L-sistein İle İlgili Son Yıllarda Yapılan Çalışmalar

Öğretmen ve arkadaşları (2015) çalışmalarında sperma dondurma işlemleri esnasında meydana gelebilecek hücre hasarlarını korumak ya da engellemekte aminoasitlerin ne kadar biyolojik öneme sahip olduğunu araştırmışlardır. Çalışmalarında sazanların dondurulup çözölen spermasına sisteinin spermatozoa motilitesi ve oluşan DNA hasarlarına etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Farklı sistein konsantrasyonları içeren sulandırıcılarla sulandırılan sazan spermalarını kullanarak 10 sperma dondurmuşlardır. Sperma örneklerini 1/9 oranında sulandırmışlardır. Sulandırmadan sonra 0,25 ml'lik payetlere aspire etmişler ve sıvı nitrojen tankına depolamışlardır. DNA hasar değerlendirilmesi dondurulmuş-çözölmüş spermalarda gerçekleştirilmiştir. Sonuçta sistein konsantrasyonları arttıkça motilite oranı arttığı ve sazanlarda sperma alma dönemi boyunca oluşan DNA hasarları azalmıştır. Dondurulan spermalarda elde edilen en iyi sonucun 20 mM'lık sistein içeren sulandırıcı ile sulandırılan spermalarda olduğunu gözlemlemişlerdir (58).

Çözülen spermalarda ise en yüksek motilite ve verim oranı 20 mM'lık sistein içeren sulandırıcı grubu olduğunu söylemektedirler. Sulandırıcıya eklenen sistein ile verim ve yumurtadan çıkma oranı artış gösterirken, DNA hasarlarında azalma göstermiştir. Sonuç olarak Öğretmen ve arkadaşları sisteinin motilite, üretim ve DNA hasarlarına olan etkisini pozitif bulmuşlar ve sulandırıcıya eklenebileceğini göstermişlerdir (58).

Lee ve arkadaşları (2014) Kore'nin yerli ırk boğalarından aldıkları spermaları l-sistein ve katalaz ekledikleri sulandırıcılar ile dondurup çözdükten sonra spermadaki karakteristik değişimi incelemişlerdir. Suni vajina yöntemiyle aldıkları boğa spermalarını kullanmışlardır. L-sistein ve katalazın birlikte eklendiği sperma sulandırıcısı motilite parametresinde kontrol grubuna göre önemli ölçüde farklılık gözlemlenmiştir. Akrozom hasarları gösteren sperma gruplarında ise l-sistein eklenen sulandırıcıda bu hasarın en az olduğunu göstermişlerdir. Üstelik l-sistein grubunda kontrol grubuna göre spermatozoonların mitokondri seviyesi daha yüksek bulunmuştur. Hidrojen peroksit seviyesi dondurulup çözülmüş l-sistein'li sperma gruplarında diğerlerine göre daha az olmuştur. Glutasyon seviyesi ise l-sistein eklenen sulandırıcıda diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak Kore yerli ırk boğalarından alınan spermaları dondururken oluşabilecek hasarların l-sistein ve katalaz ilavesinin plazma membranını koruyarak engelleyebildiği, özellikle de l-sisteinin spermanın dondurulması boyunca mitokondri ve akrozom bütünlüğünü sağlayarak koruyucu bir kalkan oluşturduğu bildirilmektedir (48).

Ansari ve arkadaşları (2011) çalışmalarında tris-sitrik asit solüsyonu içine l-sistein ilave edilmiş sperma sulandırıcısında dondurulup çözülen Sahiwal ırkı boğa spermalarının kalitesini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada peş peşe iki ejakülatın üç Sahiwal ırkı boğadan suni vajina yöntemiyle üç hafta aralıklarla alınarak tekrarlandığı belirtilmektedir. Sperma numuneleri tris-sitrik asit sulandırıcısına l-sistein ilave edilerek sulandırılmıştır. +4°C'de 2 saat sulandırıcıda bekletilen sperma 4 saat ekilibrasyona tabii tutulmuştur. Sıvı azot buharında 10 dakika bekletilmiş ve daha sonra sıvı azot içerisinde saklanmıştır. 24 saatlik dondurma işleminden sonra 37°C'de 30 saniyede çözdürülen spermalar motilite, canlılık, plazma membran bütünlüğü ve akrozomal bütünlük testlerine tabii tutulmuştur (8).

Konsantrasyon miktarı fazla olan l-sistein gruplarını içeren sulandırıcıların konsantrasyonları düşük l-sistein içeren sulandırıcılara göre daha yüksek sperma motilitesi, canlılığı, plazma membran geçirgenliği ve akrozomal geçirgenliği oranları değerleri verdiği bildirilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda l-sistein içeren tris-sitrik asit sulandırıcısının Sahiwal ırkı boğalardan alınan spermalarının kalitesinin daha iyi olmasına yardımcı olduğunu bildirmektedirler (8).

Çoyan ve arkadaşları (2011) yaptığı çalışma ile sistein ve ergotiyoneinin antioksidanları eklenmiş sperma sulandırıcılarının dondurulup çözüldükten sonra spermatolojik parametrelere, lipid peroksidasyonuna ve antioksidan aktivitelerine etkisini değerlendirmişlerdir. Spermalar 5 baş yetişkin Merinos koçlarından alınmıştır. Sperma örnekleri tris-base sulandırıcısında l-sistein, ergotiyonein ve hiç antioksidan konulmadan oluşturulan gruplarda +5°C'de soğutulmuş 0.25 ml'lik payetlerde dondurulmuştur. Donan örnekler teker teker 37°C'de 20 saniye su banyosunda çözdürülerek değerlendirilmiştir. Ergotiyonein antioksidanı eklenen sulandırıcıda subjektif motilite artış göstermiş ve spermaların düzgün doğrusal hızı (VSL) ve kıvrılma hızı (VCL) kontrol grubuna nazaran dondurulup çözüldüğünde daha yüksek değer göstermiştir. Ergotiyoneinin 3 farklı dozunda progressif motilite ve spermaların ortalama hareket hız (VAP) değerlerinde kontrol grubuna nazaran yüksek oranlar elde etmişlerdir. Sistein ve ergotiyonein antioksidanları içeren sulandırıcılarda spermanın başının sapma hareketi (ALH) değerinde yüksek oranlar saptamışlardır. Sistein ve ergotiyonein antioksidanlı sperma sulandırıcılarının 3 farklı dozunda kontrol grubuna kıyasla yüksek değerler vermiştir. Bilgisayar yardımı ile sperma analiz programında (CASA) ölçülen motiliteye nazaran antioksidan eklenenlerde önemli farklılıklar sağlanmamıştır. Spermaların plazma membran geçirgenliği sadece sistein içeren sulandırıcı grubu koruyucu etki sağlamıştır. Kontrol grubuna göre spermaların mitokondriyal aktivite %'leri sistein içeren sulandırıcılarda arttığı görülmüştür. Spermatozoa akrozom bütünlüğünde gruplar arasında önemli bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir. Katalaz (CAT) aktivitesi sadece sistein 1 mM içeren sulandırıcıda artmıştır. Kontrol grubuna göre katalaz aktivitesi 2 ve 4 mM sisteinde artış eğilimi göstermiştir. Fakat bu artış istatistikî açıdan önemli görülmemiştir.

Süperoksitdismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPX) antioksidanlarının eklenmesinde önemli etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Çalışmada sonuç bulgularına göre sperma sulandırıcılarına ergotiyonein eklenmesi, motilite, plazma membran geçirgenliği, canlılık ve akrozomal geçirgenlik sorunlarına büyük yarar sağladığı görülmüştür (20).

Kaeoket ve arkadaşları (2010) spermatozoa membranında lipit peroksidasyonuna neden olan oksijen türleriyle ilişkili dondurarak saklamaya duyarlı ve sıklıkla azalmış spermatozoa üretiminin fertilite ile ilişkisini göstermeye çalışmışlardır. Bu çalışmada domuz spermalarını dondurabilmek için gerekli olan en uygun l-sistein konsantrasyonunu belirlemenin amaçlandığı bildirilmektedir. Bu çalışmada 12 domuzdan elde edilen spermaların motilitesi ve morfolojisi tespit edilmiştir. Alınan spermalar 4 gruba ayrılmış laktoz-yumurta sarısı (LYS) ile santrifüj edilerek pellet yöntemi ile dondurulan spermalara farklı konsantrasyonlarda l-sistein ilave edilmiştir. İlk grup kontrol grubu, ikincisi 5 mmol l-sistein, üçüncüsü 10 mmol l-sistein ve dördüncüsü ise 15 mmol l-sistein ilave edilerek oluşturulmuştur. Dondurma işleminden sonra progressif motilite, SYBR-14/EthD-I kullanılarak canlılık, FITC-PNA/EthD-I kullanılarak akrozom bütünlüğü değerlendirilmiştir. Progressif motilite, canlılık ve akrozom bütünlüğü 2 grupta önemli değerler göstermiştir. 10 mmol l-sistein içeren grupta progressif motilite, canlılık ve akrozomal bütünlük parametrelerinin en yüksek değeri görülmüştür. Çalışmanın sonucunda 5 mmol ya da 10 mmol l-sistein içeren LYS sulandırıcısı dondurulup çözülen domuz spermalarında en iyi değerleri verdiği bildirilmektedirler (43).

2.6. Spermının Saklanması

2.6.1. Kısa Süreli Saklama (+4°C’de Saklamak)

Spermının saklanmasında ilk dikkat edilecek husus sperma sulandırıcısının işlevidir. Bu yüzden sperma sulandırıcılarında; uygun osmotik basınç, besi ortamı, metabolik artıkları absorbe edebilme ve spermaları soğğun zararlı etkisinden koruyabilme gibi özellikler aranır. 26-32°C arası ısıda sulandırılan boğa spermaları fertilite özelliklerini kaybetmeden 72. saate kadar +4°C’de saklanıp tohumlamada kullanılabilir (64).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışmada Burdur ili Güç Birliği Mezbahasından temin edilen epididimislerden kesit alınarak elde edilen epididimal boğa spermaları kullanıldı. Çalışma sürecinde Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurul (190/09.05.2016) kararlarına uyulmuştur. Çalışma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

Spermaların +4°C'de saklanması için tris-sitrik asit yumurta sarısı sperma sulandırıcısı baz alınıp l-sistein ve katalaz eklenerek oluşturulan altı grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Alınan epididimal spermalar Eppendorf tüpler kullanılarak yedi eşit gruba bölünüp bir tohumlama dozu olan 1 ml'de 20×10^6 motil spermatozoa olacak şekilde sulandırıldı. Her grup spermatozoa motilite, ölü-canlı, morfoloji ve hipo osmotik swelling testlere tabii tutularak veriler kaydedildi. Çalışma sonunda gruplardan elde edilen veriler "tek yönlü varyans analizi" "One Way ANOVA" testinin 'TUKEY' parametresine göre istatistiki açıdan değerlendirildi.

3.2.1. Epididimal Spermaların Elde Edilmesi

Bu tez çalışması Burdur ili Güç Birliği Mezbahası'nda kesilen boğalara ait epididimisler kullanılarak spermatolojik muayene yapılacağı tasarlanarak, en az beş deneme yapılacak şekilde planlandı. Çalışmada ise toplam 11 deneme yapıldı. Bu denemelerden elde edilen değerlerin ortalaması hesaplandı. Ortalamaya en yakın değerlerin elde edildiği beş denemeden elde edilen veriler istatistiki değerlendirmeye tabii tutuldu. Her denemede Güç Birliği Mezbahası'nda kesilmiş en az üç baş boğanın epididimisleri kullanıldı. Mezbahadan alınan epididimislerin kauda kısmından parçalar alınarak bir petri kutusuna koyuldu ve ozmotik basıncı önceden bilinen (270 mOsm) Dulbecco's Phosphate Buffer (D-PBS) + 4,5 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) D-PBS Work medyumuna üzerine ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dk boyunca spermatozoa difüzyonu sağlandı (34).

Difüzyon sonrasında D-PBS Work solüsyonuna geçmiş epididimal spermatozoa, solüsyon içerisindeki epididimis parçaları ayıklanarak petri kutusundan Eppendorf tüplere konuldu. Elde edilen bu spermatozoaların konsantrasyonu 500×10^6 olacak şekilde D-PBS Work ile sulandırıldı, spermatozoaların konsantrasyonları ayarlanıp %60 motilite ve üstü gösteren numuneler kontrol ve çalışma gruplarında kullanmak üzere (1 ile 7 arası grup numaraları verilerek) Eppendorf tüplere alındı. Eppendorf tüplere tohumlama dozu (1 ml'de 20×10^6) spermatozoa koyularak tris-sitrik asit yumurta sarısı (Tris-Citric Acid Egg Yolk: TEY) sulandırıcısı ile kontrol ve çalışma grupları oluşturuldu. Bu yedi grup buzdolabında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanarak 24 saatte bir 120. saate kadar *in-vitro* ortamda spermatolojik muayenesi yapıldı (49, 63).



Şekil 3.1. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda mezbahadan alınan testislerden epididimal sperma elde edilmesi.

3.2.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışı

Çalışma için toplam 7 grup oluşturuldu. Kontrol grubu solüsyonu hazırlanırken Lopes ve arkadaşları (2015)'nin yaptığı çalışmanın değerleri esas alındı. Lopes ve arkadaşları (2015)'da çalışmalarında Rota ve arkadaşları (1998)'nin yaptığı çalışmada kullandıkları solüsyon miktarlarını esas almışlardır. Bu çalışmada Lopes ve arkadaşları (2015), Rota ve arkadaşları (1998)'nin yaptıkları çalışmalardaki değerleri kullanıldı (49, 63). Çalışmada kullanılan deney grupları için hazırlanan stok solüsyonlar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.1. Deney grupları ve ilave edilen antioksidanlar.

Numaraları	Gruplar
1	Tris ^a -sitrik asit ^b + YS + katalaz ^c (20 µg/ml) (GRUP-1)
2	Tris-sitrik asit + YS + katalaz (50 µg/ml) (GRUP-2)
3	Tris-sitrik asit + YS + l-sistein ^d (1 mM) (GRUP-3)
4	Tris-sitrik asit + YS + l-sistein (2 mM) (GRUP-4)
5	Tris-sitrik asit + YS + katalaz (20 µg/ml)+ l-sistein (1 mM) (GRUP-5)
6	Tris-sitrik asit + YS + katalaz (50 µg/ml)+ l-sistein (2 mM) (GRUP-6)
7	Tris-sitrik asit + Yumurta sarısı (KONTROL GRUBU)



Şekil 3.2. Deneylerde sperma sulandırmada kullanılmak üzere hazırlanmış ana stok solüsyonlar.

a: Tris (T 6791 Trizma Base, Sigma), b: Sitrik asit (C0706 Sigma)

c: Katalaz (C40 Sigma), d: L-Sistein (C7352 Sigma)

3.2.2.1. Kontrol Grubu Solüsyonu

Aşağıdaki tabloda ‘tris-sitrik asit sperma sulandırıcısı’ hazırlamak için belirtilen miktarlarda tris, sitrik asit ve glikoz terazide tartılıp mezüre konuldu. Üzerini 500 ml’ye tamamlamak için de-iyonize su ilave edilip manyetik karıştırıcı (Janke& Kunkel Ikamag) yardımıyla çözünmesi sağlandı. Çözünen solüsyon saklanacağı şişeye alınıp üzerine tabloda belirtilen miktarlarda antibiyotikler ilave edildi. Böylece ana stok solüsyon hazırlandı. Bu stok solüsyona yumurta sarısı denemenin yapılacağı gün taze olarak ilave edildi.

Tablo 3.2. Sperma sulandırmada kullanılan ana stok solüsyon içeriği

	100 ml distile su
Tris	2,4 g
Sitrik Asit	1,4 g
Glikoz ^e	0,8 g
Na-Benzylpenicilin ^f	0,06 g
Streptomycin sulphate ^g	0,1 g
Yumurta sarısı ^h	% 20



Şekil 3.3. Sperma sulandırıcısı hazırlamak için gerekli temel bileşenler; Tris, sitrik asit, glikoz.

e: Glikoz (143140.1211 D (+) glikoz, PRS Pancreac), f: Na-Benzylpenicilin (Pfizer)

g: Streptomycin sulphate (049727012-2, İ.E.Ulagay İlaç Sanayi), h: Yumurta sarısı (Tavuk yumurtası, Özkan Yumurta, Burdur)

Dulbecco's Phosphate Buffer Work (D-PBS Work) Solüsyonu Hazırlanması

•D-PBS A Solüsyonu Hazırlanması

Çalışmada epididimal spermalar mezbahadan laboratuvara getirildikten sonra 37°C'de laboratuvarında ilk olarak Dulbecco's Phosphate Buffer Work solüsyonu içine konuldu. Bu solüsyonu hazırlamak için D-PBS A+ D-PBS B + BSA= D-PBS Work işlemleri gerçekleştirildi. Hafez'in (2000) bildirdiği değerler esas alınarak hazırlandı (34).

Tablo 3.3. Dulbecco' s Phosphate Buffer A Solüsyonunun Hazırlanışı

	20 mililitre için
CaCl ₂ .2H ₂ O ¹	0,0132 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O ^j	0,0121 gr

• D-PBS B Solüsyonu Hazırlanması

Bu D-PBS solüsyonlarını ayrı ayrı hazırladıktan sonra, D-PBS A solüsyonundan 1ml koyup, D-PBS B solüsyonundan 4 ml koyularak üzerine 4,5 mg/ml BSA ^p ekleyerek D-PBS Work solüsyonu çalışma için hazırlandı.

Tablo 3.4. Dulbecco' s Phosphate Buffer B Solüsyonu Hazırlanışı

	80 mililitre için
NaCl ^k	0,800 gr
KCl ^l	0,20 gr
Na ₂ HPO ₄ ^m	0,115gr
KH ₂ PO ₄ ⁿ	0,020 gr
Glikoz ^e	0,100 gr
Streptomycine Sulfate ^g	0,050 gr
Na pyruvate ^o	0,360 gr
K penicilin ^f	10,000 IU

i: CaCl₂.2H₂O (C 7902 Sigma), j: MgSO₄.7H₂O (M 2643 Sigma)

k: NaCl (1.06404 Merck), l: KCl (1.04935, Merck), m: Na₂HPO₄ (S9638, Sigma)

n: KH₂PO₄ (1.05101, Merck), o: Na pyruvate (P5280, Sigma)

p: Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V, (A 9647, Sigma)



Şekil 3.4. Dulbecco's Phosphate Buffer Solüsyonu hazırlamak için gerekli olan kimyasallar ve antibiyotikler.

Katalaz

Çalışmada kullanılan katalaz içeren sulandırıcılar için 20 µg/ml ve 50 µg/ml'lik sulandırıcılar hazırlandı (Grup 1, 2, 5, 6).

L-sistein

Çalışmada kullanılan bir diğer antioksidan olan l-sistein içeren sulandırıcılar için 1 mM ve 2 mM'lık l-sistein hazırlandı (Grup 3, 4, 5, 6).

3.2.2.2. Grup 1 Solüsyonunun Hazırlanışı

Hazırlanan ana stok solüsyonunu kontrol grubu solüsyonu olarak kullanıldı. Bunun üzerine kontrol grubu solüsyonu baz alınarak içerisine 20 µg/ml'lik katalaz ilave ederek Grup 1 solüsyonu hazırlandı. Manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözdürüldü. Antibiyotikler ilave edilerek 500 ml'lik cam şişelerde +4°C'de saklandı.

3.2.2.3. Grup 2 Solüsyonunun Hazırlanışı

Kontrol grubu solüsyonu üzerine 50 µg/ml'lik katalaz ilave edilerek Grup 2 solüsyonu hazırlandı.

3.2.2.4. Grup 3 Solüsyonunun Hazırlanışı

Kontrol solüsyonu üzerine 1 mM l-sistein ilave edilerek Grup 3 solüsyonu hazırlandı.

3.2.2.5. Grup 4 Solüsyonunun Hazırlanışı

Kontrol solüsyonu üzerine 2 mM l-sistein ilave ederek Grup 4 solüsyonu hazırlandı.

3.2.2.6. Grup 5 Solüsyonunun Hazırlanışı

Kontrol solüsyonu üzerine 20 µg/ml katalaz ve 1 mM l-sistein ilave ederek Grup 5 solüsyonu hazırlandı.

3.2.2.7. Grup 6 Solüsyonunun Hazırlanışı

Kontrol solüsyonu üzerine 50 µg/ml katalaz ve 2 mM l-sistein ilave edilerek Grup 6 solüsyonu hazırlandı.



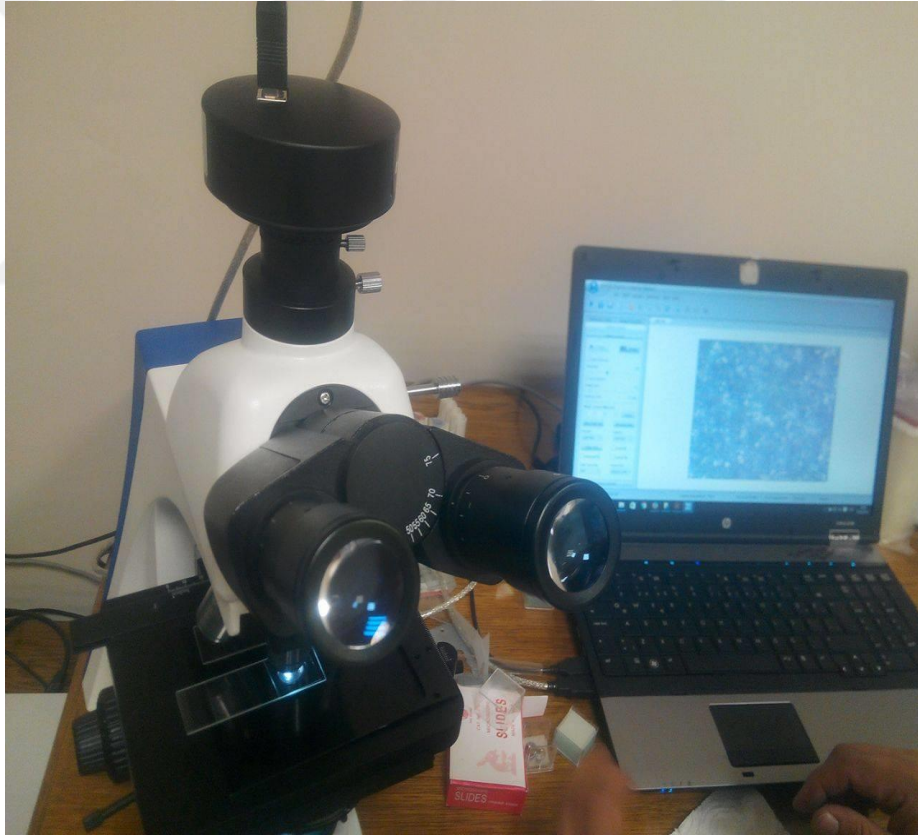
Şekil 3.5. Sperma sulandırma için kullanılan stok solüsyonun hazırlanması

3.2.3. Spermatozojik Değerlendirme Parametreleri

Bu çalışmada 11 deneme yapıldı ve her denemede 3 boğadan alınan testislerden elde edilen epididimal boğa sperması kullanılarak oluşturulan grupların motilite (%), ölü-canlı spermatozoa oranı (%), anormal spermatozoa oranı (morfoloji %) ve membran bütünlüğüne sahip sperma oranı (%) belirlendi (11, 21, 62).

3.2.3.1. Motilite

Motilite değerlendirmesi yzde olarak, orta bzytme (40X) sahip ısıtma tablalı faz kontrast mikroskop (Nikon E600) kullanılarak sbjektif olarak yapıldı. Kısaca sperma rnekleri tris-sitrik asit yumurta sarısı (TEY) sulandırıcısı ile 37,8°C derecede 20 kat sulandırıldı. Lam faz kontrast mikroskoba yerleştirilerek 37,8°C dereceye ısınması beklendikten sonra kzyk bir damla sulandırılmış spermadan alınarak lam üzerine konup lamel ile kapatılıp 400 bzytmede yzde olarak motilite tahmini yapıldı (62). Motilitenin belirlenmesinde en az yk mikroskop alanında sayım yapılıp bir ynde dzygyn doğrusal hareket eden spermatozoaların yzde oranlarının ortalaması alınarak verilere kaydedildi. Bu değerde istatistiki verilerde motilite değeri olarak kullanıldı.



şekil 3.6. Laboratuvarında motilite değerlendirmesi yaparken kullanılan ısıtma tablalı faz kontrast mikroskop

3.2.3.2. Ölü-Canlı Spermatozoa Oranı

Ölü ve canlı spermatozoa oranı eosin-nigrosin boyama yöntemi kullanılarak yapıldı. Yani 100 µl sperma 900 µl %1'lik eosin Y solüsyonu ve 100 µl %10'luk nigrosin solüsyonu ile karıştırıldı. Bu karışımdan bir damla alıp temiz mikroskop lamına damlatılarak smear yapıldı. Bu yöntemle hazırlanan sürme preparatlar mikroskop altında 40X büyütmede 400 spermatozoon sayılarak değerlendirildi. Canlı ve ölü spermatozoa oranı % olarak belirlenip kaydedildi. Preparatların değerlendirilmesinde; baş kısmı boya almamış spermatozoonlar canlı, baş kısmı boya almış (pembe) olanlar ise ölü olarak değerlendirildi (62).

3.2.3.3. Anormal Spermatozoa Oranı (Morfoloji)

Sperma numunelerinde anormal spermatozoa oranı sıvı tespit yöntemi yani Hancock solüsyonu kullanılarak saptandı (38). Çalışmada 0,5 ml Hancock solüsyonu içeren kapaklı Eppendorf tüpü içerisine bir damla sperma numunesi damlatılarak fiksasyon sağlandı. Anormal spermatozoa oranının belirlenmesinde; Hancock solüsyonunda tespit edilen sperma numunesinden temiz bir lam üzerine damlatılarak spermanın üzerine lamel kapatıldı. Daha sonra daldırma objektif altında (100X) en az 400 spermatozoa incelenmesi sonunda anormal yapı sergileyen spesifik morfolojik bozukluklar kaydedilerek anormal spermatozoa oranı % olarak belirlendi (11).

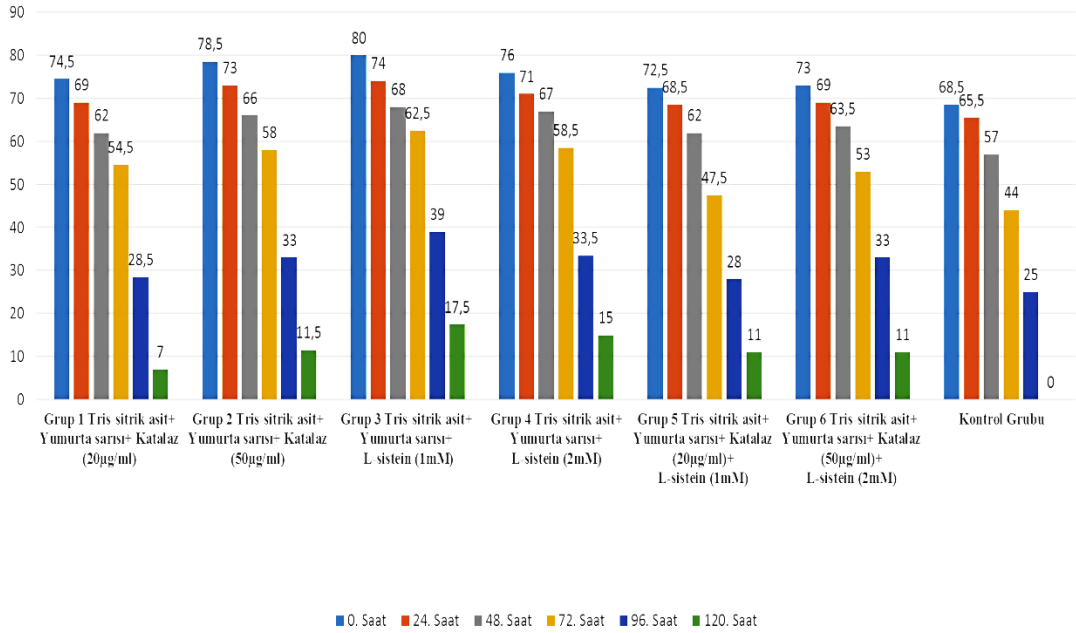
3.2.3.4. Spermatozoa Membran Bütünlüğü (Hipo Osmotik Swelling (HOS) Test)

Numunelerdeki spermatozoa membran fonksiyonel bütünlüğünün belirlenmesi amacıyla Hipo Osmotik Swelling test uygulandı. HOS testi yapılması için 100 µl sperma, 900 µl 100 mOsmol fruktoz solüsyonu ile karıştırıldı (68). +37°C'deki su banyosunda 30 dakika bekletilip lam üzerine karışımdan 1 damla konup üzerine lamel kapatılıp faz kontrast mikroskopta 200 adet spermatozoa sayıldı (75). Kuyruğu kıvrılan ve şişen spermatozoa oranı % olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Motilite

Çalışma içerisinde 11 tekrar yapıldı. Ortalama değerlere en yakın olan beş değer istatistiki değerlendirmede kullanıldı. Tablo 4.1.'de motilite değerleri verilmiştir. İstatistiksel olarak epididimal spermatozoanın motilite değeri yönünden 0-120. saatler arasında elde edilen değerlerde çok yüksek değerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). Ayrıca 0. saatte tüm grupların ortalamalarında farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir. 24. saatte grup 2 ve grup 3 verilerinde diğer gruplardan farklı harf taşıyan gruplar arasında önemli farklılık vardır. 48. saatte ise sadece grup 3 yani 1 mM l-sistein diğer gruplara göre aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir. 72. saatte de grup 3'de diğer gruplara göre istatistiki önemlilik vardır. 96. saatte grup 2, grup 3 ve grup 6 diğer gruplara göre farklı harf taşıyanlar ile gruplar arası fark istatistiki olarak önemli olarak bulundu. 120. saatte aynı satırda daha yüksek değerler olmasına rağmen grup 1 ve grup 3 değerleri taşıdıkları farklı harf ile istatistiki açıdan aradaki farkın önemli olduğu görüldü.



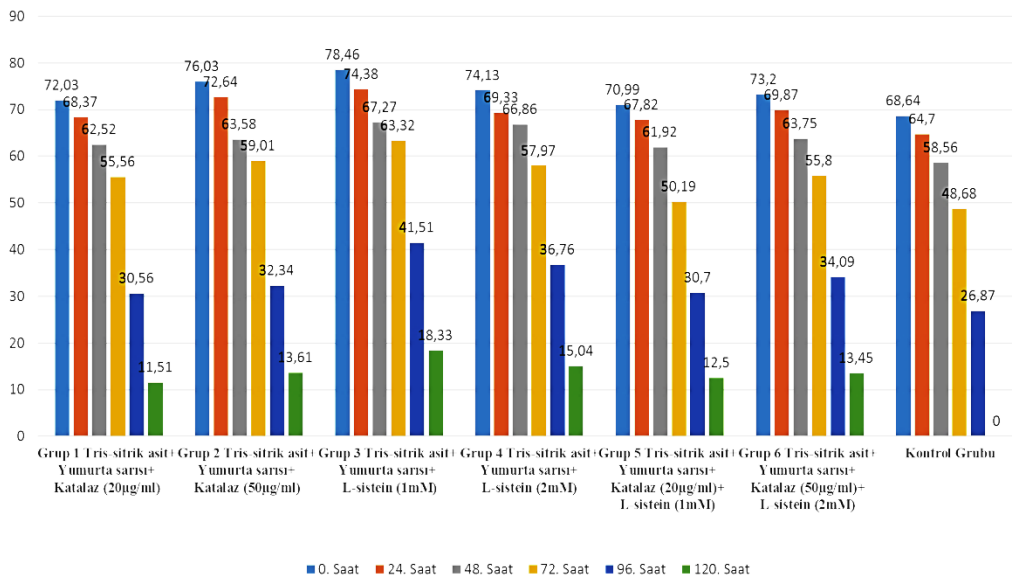
Şekil 4.1. Çalışmada elde edilen verilerle oluşturulan motilite değerleri sütun grafiği

Tablo 4.1. Çalışmada elde edilen motilite verilerinin istatistiki sonuç tablosu

<i>MOTİLİTE</i>								
GRUP ZAMAN	1	2	3	4	5	6	7	P<0,05
	Tris-sitrik asit + Yumurta sarısı+ Katalaz (20µg/ml)	Tris-sitrik asit + Yumurta sarısı+ Katalaz (50µg/ml)	Tris-sitrik asit + Yumurta sarısı + L-sistein (1mM)	Tris-sitrik asit + Yumurta sarısı+ L-sistein (2mM)	Tris-sitrik asit + Yumurta sarısı+ Katalaz (20µg/ml) + L-sistein (1mM)	Tris-sitrik asit + Yumurta sarısı+ Katalaz (50µg/ml) + L-sistein (2mM)	Kontrol	
0. Saat	74,50 ^{bc} ±1,22	78,50 ^{cd} ±0,61	80,00 ^d ±1,12	76,00 ^{bcd} ±1,00	72,50 ^{ab} ±1,12	73,00 ^b ±0,50	68,50 ^a ±0,61	0,000
24. Saat	69,00 ^{ab} ±1,50	73,00 ^c ±0,94	74,00 ^c ±0,61	71,00 ^{bc} ±0,61	68,50 ^{ab} ±0,61	69,00 ^{ab} ±0,61	65,50 ^a ±0,94	0,000
48. Saat	62,00 ^{ab} ±1,84	66,00 ^{bc} ±1,50	68,50 ^c ±1,50	67,00 ^{bc} ±0,50	62,00 ^{ab} ±0,50	63,50 ^{bc} ±0,61	57,00 ^a ±1,84	0,000
72. Saat	54,50 ^{bc} ±1,84	58,00 ^{cd} ±2,00	62,50 ^d ±2,50	58,50 ^{cd} ±1,87	47,50 ^{ab} ±0,00	53,00 ^{bc} ±0,94	44,00 ^a ±1,50	0,000
96. Saat	28,50 ^{ab} ±0,61	33,00 ^b ±0,94	39,00 ^c ±1,00	33,50 ^{bc} ±2,45	28,00 ^{ab} ±0,94	33,00 ^b ±0,94	25,00 ^a ±1,37	0,000
120. Saat	7,00 ^b ±0,50	11,50 ^{bcd} ±1,00	17,50 ^d ±2,50	15,00 ^{cd} ±1,37	11,00 ^{bc} ±1,50	11,00 ^{bc} ±1,70	0,00 ^a ±0,00	0,000

4.2. Ölü- Canlı Spermatozoa Oranı

Boğalardan elde edilen epididimal spermatozonlardan tris- sitrik asit yumurta sarısı sulandırıcısında farklı miktarlarda bulunan antioksidanların içinde canlılığını koruyabilen spermatozoa oranını boyama tekniğiyle değerlendirildi. Eosin-nigrosin boyama tekniğini kullanarak canlı spermatozoa baş kısmının renksiz kalmasıyla ayırt edilebilirken, ölü spermatozoa baş kısmının pembeye boyanması ile ayırt edildi. Tablo 4.2.'de elde edilen verilere göre 0, 24, 96 ve 120. saatlerde ölü- canlı spermatozoa oranları çok yüksek düzeyde istatistiki olarak anlamlı fark göstermiştir ($p<0.001$). 48 ve 72. saattlerde çalışmada elde edilen veriler karşısında istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı fark vardır ($p<0.05$). 0. saatte ölçümüne başlanan canlı spermalarda grup 3 hem sayısal olarak hemde taşıdığı harf ile belirtildiği gibi diğer gruplara göre istatistiki açıdan önemli sonuç veririrken, 24. saatte grup 1 ve grup 3 önemli değerler vermektedir. 48. saate ise grup 3 ve grup 4 yani sadece l-sistein içeren gruplarda istatistiksel farklılık belirlenmiştir. 72. saatte ise grup 3 istatistiksel olarak önemlilik göstermektedir. 96. saatte grup 3 yani 1 mM l-sistein ve grup 6, 50 µg/ml katalaz + 2 mM l-sistein içeren solüsyonlarda canlı spermatozoa oranı taşıdıkları farklı harf ile gösterildiği gibi diğer gruplara göre istatistiki açıdan önemli fark vardır. 120. saatte ise aynı satırda farklılık olmadığından eosin-nigrosin testinde gruplar arasında istatistiki fark önemli değildir.



Şekil 4.2. Çalışmada elde edilen verilerle oluşturulan ölü-canlı spermatozoa sütun grafiği

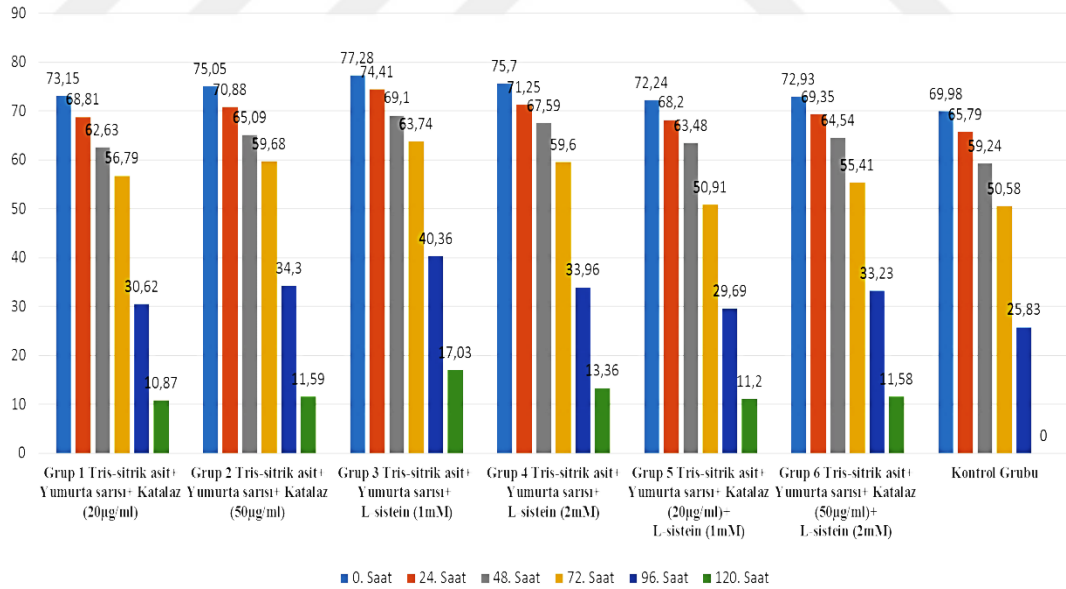
Tablo 4.2. Çalışmanın eosin boyama testi ile elde edilen spermatozoa verilerinin istatistiki tablosu

ÖLÜ-CANLI TESTİ								
GRUP ZAMAN	1	2	3	4	5	6	7	P<0,05
	Tris-sitrik asit +Yumurta sarısı+ Katalaz (20µg/ml)	Tris-sitrik asit + Yumurta sarısı+ Katalaz (50µg/ml)	Tris-sitrik asit + Yumurta sarısı+L-sistein (1mM)	Tris-sitrik asit +Yumurta sarısı+L-sistein (2mM)	Tris-sitrik asit +Yumurta sarısı +Katalaz (20µg/ml)+ L-sistein (1mM)	Tris-sitrik asit + Yumurta sarısı+ Katalaz (50µg/ml)+ L-sistein (2mM)	Kontrol	
0. Saat	72,03 ^{abc} ±0,59	76,03 ^{cd} ±0,50	78,46 ^d ±0,68	74,13 ^{bc} ±1,81	70,99 ^{ab} ±0,48	73,20 ^{bc} ±0,95	68,64 ^a ±0,39	0,000
24. Saat	68,37 ^b ±0,96	72,64 ^{cd} ±0,46	74,38 ^d ±0,94	69,33 ^{bc} ±0,50	67,82 ^{ab} ±1,05	69,87 ^{bc} ±0,37	64,70 ^a ±1,06	0,000
48. Saat	62,52 ^{ab} ±1,75	63,58 ^{ab} ±1,52	67,27 ^b ±1,30	66,86 ^b ±0,97	61,92 ^{ab} ±0,65	63,75 ^{ab} ±0,33	58,56 ^a ±1,75	0,001
72. Saat	55,56 ^{abc} ±2,81	59,01 ^{bc} ±1,85	63,32 ^c ±2,65	57,97 ^{abc} ±2,12	50,19 ^{ab} ±2,01	55,80 ^{abc} ±1,85	48,68 ^a ±2,56	0,002
96. Saat	30,56 ^{ab} ±1,65	32,34 ^{ab} ±1,22	41,51 ^c ±1,77	36,76 ^{bc} ±1,11	30,70 ^{ab} ±1,38	34,09 ^b ±0,71	26,87 ^a ±2,36	0,000
120. Saat	11,51 ^b ±1,38	13,61 ^b ±1,86	18,33 ^b ±2,32	15,04 ^b ±2,16	12,50 ^b ±1,59	13,45 ^b ±0,89	0,00 ^a ±0,00	0,000

*Tabloda kullanılan değerler eosin boyası ile başı boya almamış canlı spermatozoaya ait değerlerdir.

4.3. Anormal Spermatozoa Oranı

Çalışmada her denemde 3 boğadan alınan epididimal spermalar Hancock solüsyonu içerisine konularak her 24 saatte bir morfolojik yönden incelenip sonuçlar istatistiki yönden değerlendirildi. 24, 96 ve 120. saatlerde elde edilen veriler arasında çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). 0. saat, 48. saat ve 72. saatte gruplarda yüksek değerlerde istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). 0. saatte grup 3 ve grup 4 diğer gruplar arasından taşıdıkları farklı harf ile belirtildiği gibi istatistiki açıdan önemli fark görülmüştür. 24. saatte grup 2, grup 3 ve grup 6 aynı satırda istatistiki açıdan önemli fark belirlenmiştir. 48. saatte grup 3 ve grup 4 istatistiki açıdan önemli fark gösterirken, 72. saatte ise grup 3 bütün gruplara göre istatistiki açıdan önemli fark göstermiştir. 96. saatte grup 3 ve grup 6 aynı satırda istatistiksel olarak önemli farklılık görülmüştür. Canlı sperma oranı gruplar arasında istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. 120. saatte ise grup 1, grup 3 ve grup 5 aynı satırda istatistiksel olarak önemli farklılık belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Çalışmada morfoloji testi ile elde edilen verilerden oluşturulan sütun grafiği

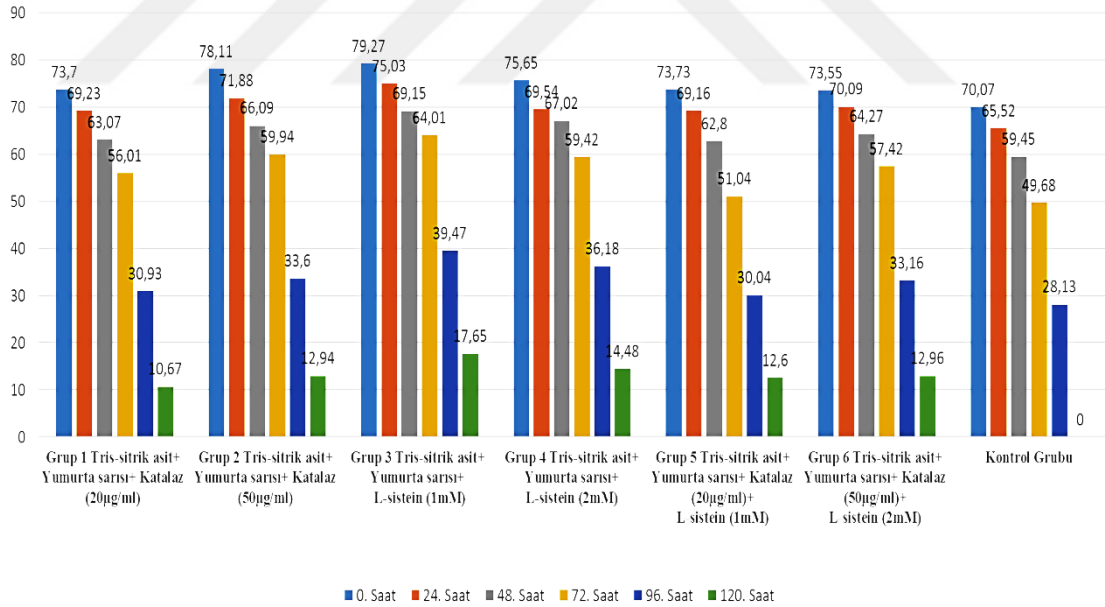
Tablo 4.3. Çalışmada incelenen spermaların morfolojik olarak normal- anormal sperma oranı tablosu

MORFOLOJİ TESTİ								
GRUP ZAMAN	1	2	3	4	5	6	7	P<0,05
	Tris-sitrik asit +Yumurta sarısı+ Katalaz (20µg/ml)	Tris-sitrik asit + Yumurta sarısı+ Katalaz (50µg/ml)	Tris-sitrik asit + Yumurta sarısı+ L-sistein (1mM)	Tris-sitrik asit +Yumurta sarısı+ L-sistein (2mM)	Tris-sitrik asit +Yumurta sarısı+ Katalaz (20µg/ml)+ L-sistein (1mM)	Tris-sitrik asit +Yumurta sarısı+ Katalaz(50µg/ml) + L-sistein (2mM)	Kontrol	
0. Saat	73,15 ^{ab} ±1,32	75,05 ^{ab} ±1,94	77,28 ^b ±0,93	75,70 ^b ±1,52	72,24 ^{ab} ±0,39	72,93 ^{ab} ±1,17	69,98 ^a ±0,59	0,006
24. Saat	68,81 ^{ab} ±0,59	70,88 ^b ±1,14	74,41 ^c ±0,26	71,25 ^{bc} ±0,38	68,20 ^{ab} ±0,53	69,35 ^b ±0,63	65,79 ^a ±1,19	0,000
48. Saat	62,63 ^{ab} ±1,88	65,09 ^{ab} ±1,58	69,10 ^b ±1,51	67,59 ^b ±0,38	63,48 ^{ab} ±0,76	64,54 ^{ab} ±0,42	59,24 ^a ±2,57	0,002
72. Saat	56,79 ^{ab} ±3,22	59,68 ^{ab} ±2,40	63,74 ^b ±2,53	59,60 ^{ab} ±1,60	50,91 ^a ±2,23	55,41 ^{ab} ±1,28	50,58 ^a ±3,25	0,006
96. Saat	30,62 ^{ab} ±1,36	34,30 ^{bc} ±1,40	40,36 ^c ±1,28	33,96 ^{bc} ±2,12	29,69 ^{ab} ±0,79	33,23 ^b ±0,94	25,83 ^a ±1,99	0,000
120. Saat	10,87 ^b ±1,18	11,59 ^{bc} ±1,22	17,03 ^c ±2,02	13,36 ^{bc} ±1,17	11,20 ^b ±1,35	11,58 ^{bc} ±0,90	0,00 ^a ±0,00	0,000

*Tabloda kullanılan değerler morfolojik bozukluk görülmeyen normal spermatozoa değerleridir.

4.4. Spermatozoa Membran Bütünlüğü- HipoOsmotik Swelling Test (HOST)

Çalışmada kullandığımız epididimal spermatozoa küçük Eppendorf tüpleri içerisinde 100 µl sperma, 900 µl 100 mOsmol früktoz solüsyonu ile karıştırdığımızda mikroskop altında Osmotik basınçtan etkilenen spermatozoa membran bütünlüğü açısından incelendi. 0. saat, 24. saat, 96. saat ve 120. saatlerde çok yüksek değerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). 48. saat ve 72. saatte ise gruplar arasında yüksek değerde istatistiksel anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0.05$). 0. saatte grup 3 ile diğer gruplar arasında önemli istatistiki fark görülmüştür. 24. saatte aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasında istatistiki açıdan aralarında önemli farklılık vardır. 48. saatte grup 3 ve grup 4 diğer gruplara istatistiki olarak önemli farklılık göstermektedir. 72. saatte ve 96. saatte istatistiki açıdan gruplar arasında sadece grup 3 önemli farklılık oluşturmuştur. 120. saatte grup 1 ve grup 3 istatistiki olarak diğer gruplarla arasında istatistiki açıdan önemli fark göstermiştir.



Şekil 4.4. Çalışmada elde edilen spermatozoa membran bütünlüğü verileriyle oluşturulan sütun grafiği

Tablo 4.4. Çalışmada sulandırılmış spermaya uygulanan hipo-osmotik swelling istatistiki tablosu

HİPO OSMOTİK TEST TABLOSU								
GRUP ZAMAN	1	2	3	4	5	6	7	P<0,05
	Tris-sitrik asit +Yumurta sarısı+ Katalaz (20µg/ml)	Tris-sitrik asit +Yumurta sarısı+ Katalaz (50µg/ml)	Tris-sitrik asit +Yumurta sarısı+ L-sistein (1mM)	Tris-sitrik asit +Yumurta sarısı+ L-sistein (2mM)	Tris-sitrik asit +Yumurta sarısı+ Katalaz (20µg/ml)+ L-sistein (1mM)	Tris-sitrik asit +Yumurta sarısı +Katalaz (50µg/ml)+ L-sistein (2mM)	Kontrol	
0. Saat	73,70 ^{abc} ±0,95	78,11 ^{cd} ±0,51	79,27 ^d ±0,56	75,65 ^{bcd} ±1,30	73,73 ^{abc} ±0,77	73,55 ^{ab} ±0,78	70,07 ^a ±1,64	0,000
24. Saat	69,23 ^b ±0,90	71,88 ^{bc} ±0,56	75,03 ^c ±0,25	69,54 ^b ±0,51	69,16 ^b ±0,91	70,09 ^b ±0,36	65,52 ^a ±1,38	0,000
48. Saat	63,07 ^{ab} ±2,44	66,09 ^{ab} ±1,41	69,15 ^b ±1,63	67,02 ^b ±0,91	62,80 ^{ab} ±0,78	64,27 ^{ab} ±0,59	59,45 ^a ±1,79	0,002
72. Saat	56,01 ^{ab} ±3,24	59,94 ^{ab} ±2,46	64,01 ^b ±2,92	59,42 ^{ab} ±1,77	51,04 ^a ±2,75	57,42 ^{ab} ±2,13	49,68 ^a ±2,78	0,007
96. Saat	30,93 ^{ab} ±1,74	33,60 ^{abc} ±1,12	39,47 ^c ±0,99	36,18 ^{bc} ±1,26	30,04 ^{ab} ±1,16	33,16 ^{abc} ±0,77	28,13 ^a ±2,58	0,000
120. Saat	10,67 ^b ±1,30	12,94 ^{bc} ±1,69	17,65 ^c ±2,43	14,48 ^{bc} ±1,27	12,60 ^{bc} ±1,81	12,96 ^{bc} ±0,50	0,00 ^a ±0,00	0,000

*Tablo da kullanılan değerler kuyruğu kıvrılan ve şişen spermatozoa değerleri

5.TARTIŞMA

Çalışmada çevresel faktörlerin etkisini en aza indirebilmek amacıyla epididimal sperma kullanılmıştır. Ayrıca epididimal spermalar ejaküle edilmiş spermalardan ihtiva ettiği protein farklılığıyla ve hareket karakterleriyle farklılık göstermektedir. Lee ve arkadaşları (1985) yılında yaptıkları çalışma ile epididimal spermaların ejaküle edilmiş spermalar ile arasındaki protein farklılığını belirlemişlerdir (47). Ayrıca Goovaerts ve arkadaşları (2006) epididimal spermaların ejaküle edilmiş spermalardan hareket karakterleri açısından farklılığını ortaya koymuşlardır (30). Epididimal sperma kullanmasındaki amaç beklenmedik hayvan ölümlerinde nesillerini devam ettirebilmek için kauda epididimisten spermaların kullanılabilmesidir. Bu yöntem ölümden sonra genetik kaynaklardan yararlanabilmenin en iyi yoludur diyen Kaabi ve arkadaşları (2003) yaptıkları çalışma ile bu tezi ispatlamışlardır (42). Bu ve benzer çalışmalar nedeniyle epididimal spermalar çalışmada kullanılmıştır.

Spermatozoaların +4°C'de dondurulmadan uzun bir süre muhafaza edilebilmesi halinde VanDemark ve arkadaşları (1949) yaptıkları çalışmalarında bir ya da iki gün muhafaza edilen spermalarda fazla miktarda H₂O₂ (hidrojen peroksit) meydana geleceğinden sperma sulandırıcısına katalaz ilave edilmesinin muhafaza süresini arttıracak ve daha iyi motilite ve döl verimi sağlayacağını söylemektedirler (76). Ancak Sevinç ve Hafs (1961) yaptıkları çalışmalarında spermaların boğadan aldıktan sonraki 24-36 saatleri içerisinde tohumlamada kullandıklarında katalaz antioksidanı ilavesinin spermatozoa canlılığını korumada gösterdiği etkinin fertilite gücünde gösteremediğini ortaya koymuşlardır. Bu konuda Foote ve arkadaşları (1958)'de ile Lee ve arkadaşları da (2014) +4°C'de spermaları bir hafta süreyle muhafaza edebildiklerine dair olumlu sonuçlar ortaya koymuşlardır (28, 48). Bu durum ile şu mantıki sonuca çıkarılabilmektedir. +4°C'de uzun süre muhafaza edebildiğimiz spermaları donmuş spermanın pahalı olduğu birçok hallerde dondurma tekniği yerine bu tekniğin uygulanmasının daha çok fayda sağlayacağı düşünülmüştür (64).

Çalışmamızda +4°C'de kısa süreli saklama olgusunu bu araştırmacıların elde ettiği sonuçlar baz alınarak sperma sulandırıcılarına eklenen antioksidanlar vasıtasıyla dondurma tekniğiyle uğraşmadan verimli ve sağlıklı spermalara ulaşabilmek amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda yapılan çalışmanın istatistiksel sonuçları da gösteriyorki istatistiksel olarak çok yüksek düzeyde ve yüksek düzeyde antioksidanlar ilave edilen çalışma grupları kontrol grubuna göre anlamlı farklılık elde edilmiştir.

Tris-sitrik asit yumurta sarısı sulandırıcısına eklediğimiz farklı miktarlardaki l-sistein ve katalaz antioksidanlarıyla oluşturduğumuz sperma sulandırıcıları epididimal spermalarda en iyi sonucu 1 mM'lık l-sistein grubunda gösterdi.

Anghel ve arkadaşları (2009)'da +4°C'de koç spermalarını sulandırmada kullandıkları sulandırıcıya sistein ekleyerek koyun keçi yetiştiriciliğinde kullanmışlardır (7). 120 saat boyunca tohumlanmaya uygun biçimde canlılığını koruyan spermalar %60 gibi bir oran verirken dondurmadan da üretim yerlerinde spermaları bu teknikler ile kullanabileceklerini bilim dünyasına göstermişlerdir. Sistein gibi antioksidanlar sperm hücrelerinin membranı geçirgenliğini ve motilitelerine önemli derecede katkı sağlamaktadır. Çalışmada da kullanılan birçok literatür (26, 71, 76) ve bilinen gerçeklere dayanarak spermayı kısa süreli saklamayı hem ucuza mal etmek için hem de genetik materyalleri taşıyan spermatozoonları çok fazla işleme sokmadan bir başka canlıya aktararak neslin devamını sağlayabilmek hedefine ulaşılabilir.

Öğretmen ve arkadaşları (2015) sazan balıklarından aldığı spermaları sulandırırken sulandırıcıya l-sistein ilave etmişlerdir. Dondurup çözdükleri spermaların motilitelerine ve oluşabilecek DNA hasarlarına bakmışlardır (58). Spermatozoonlarda meydana gelebilecek DNA hasarlarının azaldığını ve motilitenin düşmediğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışma ile birçok hayvan spermatozoası üzerinde yapılan çalışmalarda olduğu gibi balık spermatozoonlarında da sistein spermatozoonlar için adeta koruyucu kalkan oluşturabilmektedir. Epididimal spermatozoonlarla gerçekleştirilen çalışmada l-sistein ve katalazın antioksidan olarak spermatozoonların canlılığını ve dayanıklılığını korumada yardımcı olduğu gösterildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada boğalardan alınan epididimal spermalarda +4°C’de kısa süreli saklanmasında sperma sulandırıcısına eklenen l-sistein ve katalaz antioksidanlarının spermatozoa üzerindeki etkisi araştırıldı. Çalışmada Burdur Güç Birliği mezbahasında kesilerek Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Dölerme ve Suni tohumlama Laboratuvarına getirilen testislerden elde edilen epididimal spermalarla 11 kez deneme çalışmaları yapıldı. Tüm denemelerden elde edilen değerlerin ortalaması alındı. Ortalamaya en yakın 5 denemeden elde edilen veriler istatistiki değerlendirmede kullanıldı. Alınan epididimal spermatozoonlara motilite muayenesi, morfolojik muayene, ölü- canlı spermatozoa muayenesi ve hipo osmotik swelling test uygulandı.

Genetik kaynaklarına ihtiyaç duyduğumuz canlıların genetik kaynaklarını taşıyan spermatozoonları dondurmadan kullanarak nesillerin devam ettirebilmesi amacıyla dişilerine transfer edilmesi için arada geçen sürede olabildiğince fazla canlı spermatozoona sahip olabilmek istenilmektedir. Bunu sağlayabilmek adına da sperma sulandırıcılarına l-sistein ve katalaz ekleyerek epididimal spermalar üzerindeki etkilerin araştırması yapılmaktadır. Spermatozoonların in-vitro şartlarda fertilitite kabiliyetlerini kaybetmeden ne kadar süre uzatılabileceğinin araştırmaları yapılmaktadır. Erkek infertilitesinde spermatozoonların canlılığını koruması için katalazın antioksidan olarak önemli etkileri olduğu literatürlerde bildirilmektedir. Bunun yanında l-sisteinin de önemli rol oynayacağı düşünülerek çalışmalara antioksidan olarak ilave edilmektedir.

Çalışmada 20 µg/ml ve 50 µg/ml katalaz ile 1 mM ve 2 mM l-sistein kullanıldı. Her iki antioksidanın beraber ilave edildiği çalışma gruplarıda oluşturuldu. Oluşturulan bu gruplarda yapılan testlere göre farklılıklar bulunsa da katalaz ve l-sisteinin belirli miktarlarında olumlu sonuçlar kaydedilmiştir.

Sonuç olarak, +4°C’de kısa süreli saklamada boğa epididymal spermaları kullanılarak sperma sulandırıcılarına eklediğimiz antioksidanlar arasında tüm parametrelerde istatistiksel olarak çok yüksek düzeyde ve yüksek düzeyde anlamlılık elde edilmiştir. 0. saatten 120. saate kadar sperma sulandırıcısına eklenen 1 mM l-sistein neredeyse bütün parametrelerde istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdi. Ölçülen parametreler arasında 0. saatte motilite testinde grup 6 (katalaz 50 µg/ml + l-sistein 2 mM), morfoloji testinde de grup 4 (l-sistein 2 mM) istatistiksel olarak önemli fark belirlendi. 24. saatte tüm testlerde grup 3 (1 mM l-sistein) istatistiksel olarak anlamlı fark gösterirken, 20 µg/ml katalaz ve 50 µg/ml katalaz ihtiva eden grup 1 ve grup 2 istatistiksel olarak diğer gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü. 48. saatte motilite testi hariç bütün testlerde 1 mM’lık l-sistein ve 2 mM’lık l-sistein bulduran grup 3 ve grup 4 istatistiksel olarak diğer gruplarla arasında anlamlı fark bulunduğunu gösterdi. Motilite testinde ise sadece grup 3 istatistiksel olarak anlamlı fark verdi. 72. saatte her test için grup 3 istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi. Morfoloji ve Host testinde grup 5 (20 µg/ml katalaz + 1 mM l-sistein) istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdi. 96. saatte motilite testinde kontrol grubu ve diğer gruplar arasında grup 2 (50 µg/ml katalaz), grup 3 (1 mM l-sistein) ve grup 6 (50 µg/ml katalaz + 2 mM l-sistein) istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdi. 96. saatte morfoloji ve ölü-canlı testlerinde de grup 3 ve grup 6 istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi. Host testinde ise sadece grup 3 gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık verdi. 120. saatte motilite ve Host testinde grup 1 ve grup 3 istatistiksel olarak aradaki fark anlamlı olarak belirlendi. Morfoloji testinde bu iki gruba ek olarak grup 5 de anlamlı farklılık belirlendi. Ölü-canlı testinde ise 120. saatte kontrol grubuna göre diğer gruplar istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi.

Kısacası; hem katalaz hem de l-sistein kullanılmasının sperma sulandırıcıları için yararlı ve gerekli olduğu gösterildi. Bunun yanı sıra istatistiksel sonuçlara göre en iyi sonuç l-sistein gruplarında elde edildi. Çalışma grupları arasında yapılan değerlendirme sonucunda da en iyi sonucun grup 3 yani 1 mM l-sistein ilave edilen grupta olduğu belirlendi.

7. KAYNAKLAR

1. **Agarwal A, Prabhakaran SA, Sikka SC** (2007): Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: evidence-based analysis. *Am J Reprod Immunol.*, **26**, 1-12.
2. **Alessio HM, Blasi ER** (1997): Physical activity as a natural antioxidant booster and its effect on a health lifestyle. *Res Q Exerc Sport.*, **68**(4), 292-302.
3. **Altan N, Dinçel AS, Koca C** (2006): Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Turk J Biochem.*, **31**(2), 51-56.
4. **Altıntaş A** (2017): Amino asitler ve peptidler. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, <https://acikders.ankara.edu.tr/mod/resource/view.php?id=595>. Erişim tarihi: 14.02.2017.
5. **Amann RP, Almquist JO** (1961): Reproductive capacity of dairy bulls. I. Technique for direct measurement of gonadal and extra-gonadal sperm reserves. *J Dairy Sci.*, **44**, 1537-1543.
6. **Amann RP, Almquist JO** (1962): Reproductive capacity of dairy bulls. VII. Morphology of epididymal sperm. *J Dairy Sci.*, **45**, 1516-1526.
7. **Anghel AH, Zamfirescu S, Coprean D, Nadolu D** (2009): Antioxidant additives effect on cytological parameters of refrigerated ram semen. *Lucrari Ştiinţifice, Seria Zootehnie*, **53**.
8. **Ansari MS, Rakha BA, Akhter S** (2011): Effect of L-cysteine in extender on post-thaw quality of Sahiwal bull semen. *Anim Sci Pap Rep.*, **3**, 197-203.
9. **Arık M** (2008): Eritrositlerde l-sistein ve n-asetil-l-sistein transportunun karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay.
10. **Arslan R** (1999): Homeostatik mekanizmanın korunması ve sağaltımda antioksidanlar. *İlaç ve Tedavi Dergisi*, **12**, 8, 475-480.
11. **Ax RL, Dally MA, Didion BA, Lenz WR, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME** (2000): *Semen evaluation*, Ed(s): Hafez ESE, Hafez B, Reproduction in Farm Animals 7th edition, Lea and Febiger, Philadelphia, pp: 365–375.

12. **Aydın A, Sayal A, Işimer A** (2001): *Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi*. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ayın Kitabı No: 20, GATA Basımevi, Ankara, s: 28-30.
13. **Barker CA** (1954): Low temperature preservation of bovine epididymal spermatozoa. *J Comp Med Vet Sci.*, **18**, 390-393.
14. **Baker MA, Aitken RJ** (2005): Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol.*, **3**(1), 67.
15. **Bender SA, Reichelt W, Norenberg DM** (2000): Characterization of cysteine uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Int.*, **37**, 269- 276.
16. **Bravo J, Fita I, Gouet P, Jouve HM, Melik–Adamyany W, Murshudov GN** (1997): *Structure of catalases*. Ed: Scandalios JG, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, p: 407-445.
17. **Chen LH, Boissonneault GA, Glauert HP** (1988): Vitamin C, Vitamin E and Cancer (Review). *Anticancer Res.*, **8**, 739-748.
18. **Conway M, Chappel S** (2000): *Montgomery-Conway Spector Chapell (Biyokimya–Olgu Sunumlu Yaklaşım)*. Çeviren: Altan N, Palme Yayıncılık, Ankara, s: 249-254.
19. **Çetin K** (2000): Tavuk karaciğerinden katalaz enziminin saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
20. **Çoyan K, Başpınar N, Bucak MN, Akalın PP** (2011): Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. *Cryobiology*, **63**, 1-6.
21. **Davies Morel MCG** (1999): *Production Spermatozoa*. Ed: Davıes Morel MCG, Equine Artificial Insemination, Wallingford, Oxon UK, New York, CAB International, p: 78- 150.
22. **Deutscher GH, Wells ME, Battaglia RA** (1974): Evaluation of epididymal sperm by the cannulation technique and the effects of in vivo storage in Angus bulls. *J Anim Sci.*, **39**, 1136-1143.

23. **Dinçer B** (2005): Bazı termofilik bakterilerdeki katalaz aktivitesinin incelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
24. **Dündar Y, Arslan R** (1999): Oksidan antioksidan denge ve korunmasında vitaminlerin rolü. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, **9**, 1-2, 32-39.
25. **Dündar Y, Aslan R** (2000): *Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar*. I. Basım. Uyum Ajans Ankara, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon, s:32.
26. **Edge R, Mc Gavery DJ, Truscott TG** (1997): The Carotenoids as antioxidants, a review. *J Photochem and photobiol b.*, **41**(3), 189-200.
27. **Ellington JE, Wilker CW, Hillman RB, Ball BA** (1993): Ability of epididymal or ejaculated bull spermatozoa to bind to cow zonae before and after oviduct epithelial cell co-culture. *Theriogenology*, **39**, 213.
28. **Foot RH** (1962): Survival of bull sperm in milk and yolk extenders with added catalase. *J Anim Sci.*, 907-910.
29. **Garcia MA, Graham EF** (1987): Effects of low molecular weight fractions from milk, egg yolk and seminal plasma on freezeability of bovine spermatozoa. *Cryobiology*, **24**, 429-436.
30. **Goovaerts IGF, Hoflack GG, Van Soom A, Dewulf J, Nichi M, De Kruif A, Bols PEJ** (2006): Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton- Throne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. *Theriogenology*, **66**, 323-330.
31. **Gözükara EM** (2001): *Biyokimya*. İnönü Üniversitesi Yayınları, Malatya, s: 28-35.
32. **Graham JK** (1994): Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology*, **41**, 1151-1162.
33. **Griffith OW** (1999): Biological and pharmacological regulation of mammalian glutathione synthesis, *Free Radic Biol Med.*, **27**, 922-935.
34. **Hafez ESE, Hafez B** (2000): *Fertilization and Cleavage*. Ed(s): Hafez ESE, Hafez B, Reproduction in Farm Animals. 7. baskı, WB Saunders Co, Philadelphia, USA, p: 142-150.

35. **Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross EC** (1992): Free radical antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med*, **119** (6), 598-620.
36. **Halliwell B, Gutteridge JMC** (2015): *Free radicals in biology and medicine*. 5. Baskı, Oxford Press, USA, p: 869.
37. **HAMPL R, DRABKOVA P, KANDAR R, STEPAN J** (2012): Impact of oxidative stress on male infertility, Ceska gynekologie/Ceska lekarska spolecnost *J Ev Purkyne.*, **77**(3), 241-245.
38. **Hancock LJ** (1952): The Morphology of bull spermatozoa. *Journal Exp Biol.*, **29**, 445-453
39. **Igboeli G, Foote RH** (1968): Maturation changes in bull epididymal spermatozoa. *J Dairy Sci.*, **51**, 1703-1705.
40. **İleri İK, Ak K, Pabuccuoğlu S, Birlir S** (1996): *Evcil hayvanlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama*. 133. Baskı İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, p: 66-67.
41. **Jones PD, Mody CV, Carlson LJ, Lynn JM, Stenberg P** (2002): Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses, *Free Radic Biol Med.*, **33**, 1290-1300.
42. **Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Herraes P, Anel L** (2003): Effect of epididymis handling conditions on the Quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*, **60**, 1249- 1259.
43. **Kaeoket K, Chanapiwat P, Tummaruk P, Techakumphu M** (2010): Supplemental effect of varying l-cysteine concentrations on the quality of cryopreserved boar semen. *Asian J Androl.*, **12**, 760-765.
44. **Karabulut AB** (2001): Hepatit B' li hastalarda eritrosit ve lenfosit antioksidan enzimler, nitrik oksit aktiviteleri ile plazma sitokinleri. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Malatya.
45. **Kershaw-Young CM, Maxwell WMC** (2011): The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Theriogenology*, **76**, 1197-1206.
46. **Kulaksız R, Çebi Ç, Akçay E** (2012): The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4°C. *Turk J Vet Anim Sci.*, **36** (2), 177-182.

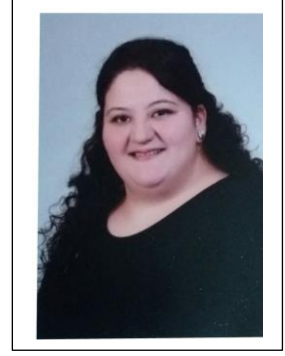
47. **Lee CN, Handrow RR, Lenz RW, Ax RL** (1985): Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. *Gamete Res.*, **12**, 345-355.
48. **Lee S, Lee K, Woo J, Lee SH, Cheong H, Yang B, Park C** (2014): Characteristic changes in Korean native cattle spermatozoa frozen- thawed with L-cysteine and/or Catalase. *J Embryo Transf.*, **2**, 163-169.
49. **Lopes G, Soares L, Ferreira P, Rocha A** (2015): Tris–Egg Yolk–Glycerol (TEY) extender developed for freezing dog semen is a good option to cryopreserve bovine epididymal sperm cells. *Reprod Dom Animal.*, **50**, 97-103.
50. **Lu C, Sun MW, Yi J, Ookhtens M, Sze G, Kaplwitz N** (1996): Role of two recently cloned rat liver gsh transporters in the ubiquitous transport of gsh in mammalian cells. *J Clin Invest.*, **97**, 1488-1496.
51. **Luun G, Dale GL, Beutler E** (1979): Transport accounts for glutathione turnover in human erthhrocytes. *Blood.*, **54**, 238-244.
52. **MacLeod J** (1943): The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol.*, **138**(3), 512-518.
53. **Maldjian A, De Vriese SR, Christophe AB** (2003): *Male fertility and lipid metabolism*. 4. Baskı, CRC Press, New York, p: 277.
54. **Mates JM, Peres-Gomez C, De- Castro IN** (1999): Antioxidant enzymes and human disease. *Clin Biochem.*, **32**(8), 595-603.
55. **Mccord JM** (1993): Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem.*, **26**(5), 351-357.
56. **Meister A, Anderson ME** (1983): Glutation. *A Rev Biochem.*, **52**(1),711-760.
57. **Onat T, Emerk K, Sözmen EY** (2002): *İnsan Biyokimyası*. Palme Yayıncılık, Bölüm 1-4: Hücre, Aminoasitlerin Metabolizması, Ankara, 1-18, s: 80-104.
58. **Öğretmen F, İnanan BE, Kutluyer F, Kayim M** (2015): Effect of semen extender Supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus caprio*). *Theriogenology*, **83**, 1548-1552.

59. **Pabuccuoğlu S** (2013): Sperma sulandırıcıları ve spermanın sulandırılması spermanın kısa ve uzun süreli saklanması ve kryobioloji. <http://cdn.istanbul.edu.tr/FileHandler2.ashx?f=sperma-sulandiricilari-ve-sperma-sulandirilmesi.pdf>. Erişim. 22.10.2017.
60. **Palacin M, Estevez R, Bertran J, Zorzano A** (1998): Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev.*, **78**(4), 969-1054.
61. **Papa PM, Papa FO, Oliveira LA, Guasti PN, Castilho C, Giometti IC** (2015): Different extenders in the cryopreservation of bovine epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci.*, **161**,58-63.
62. **Robert SJ** (1986): *Veterinary obstetrics and genital diseases*. 3. Baskı, Theriogenology, Edwards Brothers inc, p: 872–893.
63. **Rota A, Linde Forsberg C, Vannozzi J, Romagnoli S, Rodriguez-Martinez H** (1998). Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. *Reprod Domest Anim.*, **33**: 355-361.
64. **Sevinç MA, Hafs HD** (1961): Boğa spermasının katalaz fermenti ihtiva eden ve etmeyen süt, CUE ve 1:1 oranında süt+CUE sulandırıcılarında muhafazası. *AÜ Vet Derg.*, cilt 7.
65. **Sharma RK, Agarwal A** (1996): Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, **48**(6), 835-850.
66. **Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJG** (1995): Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl.*, **16**, 464-468.
67. **Silva PFN** (2006): Physiology of peroxidation process in mammalian sperm. PhD Thesis, Utrech University, Ridderprint, Ridderkerk, p:4-45
68. **Soderquist L, Bury-Madrid N, Rodriguez-Martinez H** (1997): Assesment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology*, **48**, 1115-1125.
69. **Stout M, Alapati R, Saenez J, Gentry GT, Godke RA, Devireddy RV** (2009): Comparasion of the permeability properties and post-thaw motility of ejaculated and epididymal bovine spermatozoa. *Cryobiology*. **59**(2): 164–70.

70. **Şener G ve Yeğen BÇ** (2009): İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi*, **22**(3), 5-13.
71. **Turri F, Madeddu M, Gliozzi T, Gandini G, Pizzi F** (2012): Influence of recovery methods and extenders on bull epididymal spermatozoa quality. *Reprod Domest Anim.*, **47**: 712–717.
72. **Ulakoğlu EZ, Gümüştaş MK, Belce A, Altuğ T, Kökoğlu E** (1998): Strese bağlı mide mukozası hasarında endojen glutatyon tükenişinin enerji metabolizması ile ilişkisi. *Cerrahpaşa J Med.*, **29**(3), 127-131.
73. **Unwin PNT** (1975): Beef liver catalase structure: interpretation of electron micrographs. *J Mol Biol*, **98**, 235-242.
74. **Usta B** (2016): Sağlıklı ve diabetik ratlarda melatonin uygulamasının testis dokusuna GDF-9 ve katalazın immunohistokimyasal lokalizasyonu üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kafkas Üniversitesi, Kars.
75. **Uysal O, Korkmaz T, Bucak MN, Yavaş İ** (2006): Evaluation by hypoosmotic swelling-eosine test of cryopreserved bovine spermatozoa. *Indian Vet J.*, **83**, 557-559.
76. **VanDemark NL, Salisbury GW, Bratton RW**(1949): Oxygen damage to bull spermatozoa and its prevention by catalase. *J Dairy Sci.*, **32**, 353-360.
77. **Vasquez JH, Nunez VH, Florentini EA, Gonzalez JM, Camargo LA, Vadivia ME** (2013): Effects of five cryoprotective agents on quality of sheep epididymal spermatozoa during pre-freezing. *Livest Sci.*, **152**, 94-99.
78. **Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR ve Turner ND** (2004): Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J Nutr.*, **134**, 489-492.
79. **Yurdakul Z** (2005): Oksijen ve Canlılar <http://www.klinikbiyokimya.com/seminer/oksijen.htm>. Erişim. 22.10.2017.
80. **Zhang SM, Willett CW, Sehub J, Manson JE, Colditz GA, Hankinson SE** (2003): A Prospective study of plasmtotal cysteine and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prev.*, **12**, 1188-1193.

8. ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı soyadı:** Alime MERDAN
2. **Doğum Tarihi:** 24.01.1991
3. **Ünvanı:** Biyolog
4. **Öğrenim Durumu:** Yüksek Lisans
5. **Medeni Hali:** Bekar
6. **Email:** alimemerdan@gmail.com
7. **Telefon:**05466401194
8. **Okuduğu Okullar**



Derece	Alan	Okul	Yıl
Lise	Sayısal	A.Fevzi Alaattinoğlu Süper Lisesi	2004-2008
Lisans	Biyoloji	Kütahya Dumlupınar Üniversitesi/ Fen Fakültesi	2008-2012
Y.Lisans	Sağlık Bilimleri	Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi /Burdur	2015-2017

9. Yaptığı seminer ve tezler

Lisans tezi

Çilek Bitkisinin Meme Kanseri Hücre Kültürü Üzerindeki Etkileri

Yüksek Lisans Semineri

Epididymal Boğa Spermatoozonlarının Düşük Isılarda Saklanması

10. Eğitim ve Çalıştay

‘Sucul Ekosistem Çalıştayı’: Dr. Beth Middleton (U.S. Geological Survey), Dr. Keith Edwards (South Bohemia University), Doç.Dr. Nüket Akanıl Bingöl (Dumlupınar Üniversitesi) ve Yar. Doç. Dr. Cüneyt Nadir Solak (Dumlupınar Üniversitesi) 2-6 Mayıs 2011.

‘Dumlupınar Üniversitesi TÜBİTAK destekli Meme Kanseri Hücre Kültürü Laboratuvarı Çalışmaları’ Doç.Dr. Azmi Yerlikaya, Eylül, 2011- Mayıs, 2012.

11. Aldığım Sertifikalar

‘Sucul Ekosistem Çalıştayı Sertifikası’ 2-6 Mayıs 2011

‘Etkili İletişim Stratejileri ve Beden Dili’ 15.06.2015

‘Motivasyon ve Verimli Çalışma Yöntemleri’ 15.06.2015

‘İnsanları Etkileme ve İkna Etme Sanatı’ 15.06.2015

12. İlgi alanları

Sağlık Bilimleri, Tıp Alanı, Biyokimya, Moleküler Biyoloji, Genetik, Onkoloji, Suni Tohumlama, Farmakoloji, İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi, Kişisel Gelişim (NLP), Bilim ve Teknoloji

13. Hedeflerim

Lisans ve lisans üstü eğitimim boyunca edindiğim bilgileri, tecrübeleri ve becerileri ilgi alanlarım doğrultusundaki literatür taramalarımla harmanlayarak akademik kariyer basamaklarını kendimden emin, teknolojiye ayak uydurarak tırmanırken, vatanıma ve milletime faydalı bir kişi olmak için çabalamaktayım. Bunlar doğrultusunda Sağlık Bilimleri ya da Tıp alanında doktora programımı tamamlamak ilk hedeflerimdir. Bununla birlikte Öğretim Görevlisi olmak akademik hayatın birebir içinde olup öğrendiklerimi ve değerli birçok hocamdan tecrübe ederek öğreneceklerimi insanlarla paylaşmak paylaştıkça çoğaltmak hedeflerim arasındadır. Gelecekteki en büyük hedefim de insan sağlığı için büyük buluşlara imza atan yeniliklere doymayan bir bilim insanı olmayı yeğlemektedirim.

