

**KÖPEKLERDE SPERMAYA İLAVE EDİLEN CAPE'İN  
(CAFFEİC ACİD PHENETHYL ESTER) DONDURMA VE  
ÇÖZDÜRME SONRASI SPERMA KALİTESİ ÜZERİNE  
ETKİSİ**

Vet. Hek. Aytuğ HAKSES  
Yüksek Lisans Tezi  
Danışman: Prof. Dr. Fatih AVDATEK  
Tez No:2026-005  
Afyonkarahisar

**T.C.**  
**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**DÖLERME ve SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI**

**KÖPEKLERDE SPERMAYA İLAVE EDİLEN CAPE'İN (CAFFEİC ACİD  
PHENETHYL ESTER) DONDURMA VE ÇÖZDÜRME SONRASI SPERMA  
KALİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Vet. Hek. Aytuğ HAKSES**

**Prof. Dr. Fatih AVDATEK**

**Tez No: 2026-005**

**AFYONKARAHİSAR**

T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TEZ KABUL VE ONAY

Öğrencinin	Adı- Soyadı	Aytuğ HAKSES
	Numarası	223324012
	Anabilim Dalı	Dölerme ve Suni Tohumlama
	Program	<input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora
Tezin Başlığı	Köpeklerde Spermaya İlave Edilen Cape'in (Caffeic Acid Phenethyl Ester) Dondurma ve Çözdürme Sonrası Sperma Kalitesi Üzerine Etkisi	
Tez Savunma Sınav Tarihi	14.01.2026	
Tez Savunma Sınav Saati	10.00	
Yukarıda bilgileri verilen tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek <b>oy birliği / oy çokluğu</b> ile kabul edilmiştir.		
Başkan	Prof. Dr. Fatih AVDATEK	
Üye	Prof. Dr. Deniz YENİ	
Üye	Prof. Dr. Şükrü GÜNGÖR	
<p>Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... / ..... / ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.</p> <p>Prof. Dr. Mustafa TEKERLİ Enstitü Müdürü</p>		

## BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı **beyan ederim.**

14/01/2026

Aytuğ HAKSES

## ÖZET

### **Köpeklerde Spermaya İlave Edilen CAPE'in (Caffeic Acid Phenethyl Ester) Dondurma ve Çözdürme Sonrası Sperma Kalitesi Üzerine Etkisi**

Bu çalışmada, Akbaş ırkı köpeklerden elde edilen spermanın sulandırıcısına farklı düzeylerde eklenen CAPE'in (caffeic acid phenethyl ester) çözüm sonrası spermatolojik özellikler, oksidatif stres göstergeleri ve DNA bütünlüğü üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Ejakulatlar, üç Akbaş erkek köpekten haftada bir kez suni vajen yöntemiyle toplanmış ve toplam altı tekrar gerçekleştirilmiştir. Toplanan sperma örnekleri, mililitrede  $150 \times 10^6$  spermatozoon içerecek şekilde ayarlanarak antioksidan içermeyen kontrol grubu ile 50, 100 ve 200  $\mu\text{g/ml}$  CAPE içeren üç deney grubuna ayrılmıştır. Sulandırma işleminin ardından örnekler 0,25 ml'lik payetlere çekilmiş, 5 °C'de üç saat ekilibrasyon sürecine bırakılmış ve sonrasında sıvı azot buharında dondurulmuştur. Elde edilen bulgular, subjektif motilite açısından 100 ve 200  $\mu\text{g/ml}$  CAPE uygulanan grupların, kontrol ve 50  $\mu\text{g/ml}$  CAPE içeren gruplara göre anlamlı bir artış sergilediğini göstermiştir ( $P<0.05$ ). Orta kısım ve toplam anormal spermatozoon oranlarında ise özellikle 200  $\mu\text{g/ml}$ 'lik CAPE uygulamasının kontrol grubuna kıyasla belirgin bir azalma sağladığı belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). HE testinde, H+/E- oranı açısından tüm CAPE içeren gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır ( $P<0.05$ ). DNA hasarı parametrelerinde yapılan değerlendirmelerde, kuyruğun uzunluğu bakımından (Tail DNA) 100 ve 200  $\mu\text{g/ml}$  CAPE uygulanan grupların; kuyruğun DNA oranı açısından ise 200  $\mu\text{g/ml}$  grubunun kontrol grubuna göre anlamlı şekilde daha düşük değerler gösterdiği tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ). Benzer şekilde, tail moment parametresinin 100 ve 200  $\mu\text{g/ml}$  CAPE içeren gruplarda belirgin şekilde azaldığı kaydedilmiştir ( $P<0.05$ ). Oksidatif stres analizlerinde, MDA düzeylerinin tüm CAPE uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). GSH bakımından 100 ve 200  $\mu\text{g/ml}$  CAPE uygulanan gruplarda kontrollere kıyasla düşüş gözlenmiş, TAS değerleri de aynı gruplarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde gerilemiştir ( $P<0.05$ ). Buna karşılık, TOS ve OSI seviyeleri 100 ve 200  $\mu\text{g/ml}$  CAPE ilave edilen gruplarda anlamlı düzeyde artış göstermiştir ( $P<0.05$ ).

Genel olarak değerlendirildiğinde, farklı CAPE konsantrasyonlarının köpek spermasının kriyoprezervasyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde, özellikle 100 ve 200  $\mu\text{g/ml}$  dozlarının çözüm sonrası motilite, anormallik oranları, canlılık, membran bütünlüğü, DNA hasar düzeyi ve bazı oksidatif stres parametreleri bakımından kontrol ve 50  $\mu\text{g/ml}$  CAPE içeren gruplara kıyasla daha iyi koruyucu etki sağladığı sonucuna ulaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** CAPE (caffeic acid phenethyl ester), Dondurma, DNA hasarı, Köpek, Oksidatif stres

## SUMMARY

### **Effect of CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester) Added To Semen in Dogs on Semen Quality After Freezing and Thawing.**

In this study, the effects of supplementing the semen extender of Akbaş dogs with different concentrations of CAPE (caffeic acid phenethyl ester) on post-thaw spermatological characteristics, oxidative stress markers, and DNA integrity were investigated. Ejaculates were collected once weekly from three Akbaş male dogs using an artificial vagina, and a total of six replicates were performed. The ejaculates were adjusted to contain  $150 \times 10^6$  spermatozoa per milliliter and subsequently divided into four groups: a control group without antioxidant supplementation and experimental groups containing 50, 100, and 200  $\mu\text{g/ml}$  CAPE. Following dilution, samples were loaded into 0.25 ml straws, equilibrated at 5 °C for three hours, and then frozen in liquid nitrogen vapor. The findings demonstrated that subjective motility was significantly improved ( $P < 0.05$ ) in the groups receiving 100 and 200  $\mu\text{g/ml}$  CAPE compared with the control and 50  $\mu\text{g/ml}$  groups. Moreover, the 200  $\mu\text{g/ml}$  CAPE group exhibited a marked reduction in mid-piece and total abnormal spermatozoa rates relative to the control group ( $P < 0.05$ ). HE test results revealed a significant increase in the H+/E- ratio in all CAPE-treated groups compared with the control ( $P < 0.05$ ). Assessment of DNA damage parameters indicated that tail length values were significantly lower in the 100 and 200  $\mu\text{g/ml}$  CAPE groups, while tail DNA percentage was reduced specifically in the 200  $\mu\text{g/ml}$  group ( $P < 0.05$ ). Similarly, tail moment values were significantly decreased in the 100 and 200  $\mu\text{g/ml}$  CAPE groups ( $P < 0.05$ ). Oxidative stress analyses showed that MDA levels were significantly reduced in all CAPE-supplemented groups compared with the control ( $P < 0.05$ ). In contrast, GSH concentrations declined in the groups receiving 100 and 200  $\mu\text{g/ml}$  CAPE, and TAS values also decreased significantly in these groups ( $P < 0.05$ ). Conversely, both TOS and OSI levels were elevated in the 100 and 200  $\mu\text{g/ml}$  CAPE groups ( $P < 0.05$ ).

Overall, the results indicate that among the CAPE concentrations tested, the 100 and 200  $\mu\text{g/ml}$  doses provided the most pronounced protective effects on post-thaw sperm quality. These doses improved motility, reduced abnormal and dead spermatozoa rates, enhanced membrane integrity, lowered DNA damage, and influenced oxidative stress parameters more favorably than the control and 50  $\mu\text{g/ml}$  groups..

**Keywords:** CAPE (caffeic acid phenethyl ester), Frozen, DNA damage, Dog, Oxidative stress

## ÖNSÖZ

“Köpeklerde spermaya ilave edilen CAPE’in (caffeic acid phenethyl ester) dondurma ve çözündürme sonrası sperma kalitesi üzerine etkisi” adlı bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı Programında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında bana sağladığı bilgi, tecrübe, ilgi ve destek için tez danışmanım Prof. Dr. Fatih AVDATEK hocama, büyük bir minnettarlıkla teşekkür ederim. Ayrıca, geniş bilgi, deneyim ve imkanlarından faydalandığım çok değerli Prof. Dr. Deniz YENİ ve Arş. Grv. Murat KIRIKKULAK'a ayrıca teşekkürü borç bilirim.

Bunun yanın sıra tezimin oksidatif stres parametrelerinin değerlendirmesin de katkı sağlayan Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Barış DENK'e Teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman varlığıyla bana destek veren Eşim Kübra Dindar Hakses'e teşekkür ederim.

Aytuğ HAKSES

Afyonkarahisar

2026

## İÇİNDEKİLER

<b>TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI</b>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<b>BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ</b>	<b>ii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>v</b>
<b>ÖNSÖZ</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>ix</b>
<b>ÇİZELGELER</b>	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Köpeklerde Suni Tohumlama ve Kriyoprezervasyonun	1
1.1.1. Köpeklerde Suni Tohumlamanın Tarihsel Gelişimi	2
1.1.2. Suni Tohumlamanın Avantajları	3
1.1.3. Kriyoprezervasyonun Önemi	4
1.2. Spermanın Dondurulması ve Çözdürülmesinde Oluşan Biyolojik Hasarlar	5
1.2.1. Spermatozoonun Yapısal Özellikleri	6
1.2.2. Dondurma Sürecindeki Stres Faktörleri	7
1.2.3. Çözdürme Sonrası Yapısal ve Fonksiyonel Kayıplar	9
1.3. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türlerinin Rolü	9
1.3.1. Oksidatif Stres Kavramı	10
1.3.2. Spermatolojik Sistemlerde ROS Oluşumu	11
1.3.3. ROS'un Spermatozoon Hücrelerine Etkileri	12
1.4. Antioksidanların Kriyoprezervasyondaki Kullanımı	12
1.4.1. Antioksidanların Spermatozoon Üzerine Etkileri	13
1.4.2. CAPE'nin Kimyasal Özellikleri	15
1.4.3. CAPE'nin Antioksidan Etkinliği	15
<b>2. MATERYAL VE METOD</b>	<b>17</b>
2.1. Araştırmada Kullanılan Hayvan Materyali ile Bakım ve Beslenme Koşulları	17
2.2. Sperma Toplama İşlemi	17
2.3. Spermanın Sulandırılması ve Kriyoprezervasyonu	17
2.4. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi	18

2.4.1. Motilite Tayini	18
2.4.2. Anormal Spermatozoon Oranının Belirlenmesi	19
2.4.3. Hipo-Osmotik Eosin (HE) Testi Analizi	19
2.5. DNA Hasarının Belirlenmesi	20
2.5.1. Spermanın Yıkılması ve Hazırlanması	20
2.5.2. Lizis İşlemi	21
2.5.3. Elektroforez Aşaması	21
2.5.4. Nötralizasyon ve Boyama	21
2.5.5. Slaytların Değerlendirilmesi	22
2.6. Biyokimyasal Analizler	22
2.7. İstatistiksel Analiz	22
<b>3. BULGULAR</b>	<b>23</b>
3.1. Dondurma-Çözdürme Sonrası Motilite ve Anormal Spermatozoon Oranı	23
3.2. Dondurma-Çözdürme Sonrası HE-Test Değerleri	24
3.3. Dondurma-Çözdürme Sonrası DNA Hasar Bulguları	25
3.4. Dondurma-Çözdürme Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri	26
<b>4.TARTIŞMA</b>	<b>27</b>
<b>5.SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>33</b>
<b>6.KAYNAKLAR</b>	<b>34</b>
<b>7. EKLER</b>	
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

**%:** Yüzde

**<:** Küçüktür

**=:** Eşittir

**>:** Büyüktür

**±:** Artı eksi

**°C:** Santigrat derece

**µl:** Mikrolitre

**8OHdG :** Guanin'in 8-hidroksi-20-deoksiguanozine

**ABTS+ :**2,2;-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit

**ADP:** Adenozin Difosfat

**ANOVA:** Analysis of Variance (ANOVA)

**ATP:** adenozin trifosfat

**AV :** Suni Vajen

**Ca<sup>+2</sup>:** Kalsiyum iyonu

**CAT :** antioksidan türlerini ve katalaz

**Cd:** Kadmiyum

**Dk:** Dakika

**DMF :**dimetilformamidin

**DMSO:** Dimetil sülfoksit

**DNA:** Deoksiribo nükleik asit

**DTT:** Dithioerithrol

**EDTA:** Ethylene diamine tetra acetic acid

**EE** : Elektroejakulator

**FSH**: Follicle stimulating hormone

**g**: Gram

**GOT**: Glutamik-oksaloasetik transaminaz

**GSH**: Glutasyon

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Hidrojen Peroksit

**HCl**: Hidrojen klorür

**HE**: Hipo ozmotik Eozin boya

**HOS**: Hipo ozmotik şişme

**IVF**: İn vitro fertilizasyon

**K**: Potasyum

**Kg**: Kilogram

**LD<sub>50/10</sub>**: Öldürücü dozun onda biri

**LDL**: Lipoprotein

**LH**: Lüteinleştirici hormon

**LMA** Low melting agar

**LPO** : lipid peroksidasyonu

**M**: Molar

**mA**: Miliamper

**MDA**: Malondialdehit

**mg**: Miligram

**Mg<sup>+2</sup>**: Magnezyum iyonu

**mL**: Mililitre

**mm:** Milimetre

**mM:** Milimolar

**NaCL:** Sodyum klorür

**NaOH:** Sodyum hidroksit

**nm:** Nanometre

**NO:** Nitrik Oksijen

**O2:** Oksijen

**OH- :**Hidroksil İyonu

**OPC :**Oligomerik proantosiyanidinler

**p:** Anlamlılık (önemlilik) testine ilişkin olasılık değeri

**PA:** Proantosiyanidin

**PBS:** Phosphate Buffered Saline

**pH:** Potansiyel hidrojen

**PMSG:** Pregnant mare serum gonadotropin

**ROO-:**peroksil

**ROS:** Reaktif oksijen türleri

**SCGE :** Single Cell Gel Electrophoresis

**Se :** Selenyum

**SN:** Saniye

**SOD :** süperoksit dismutaz

**SPSS:** Statistical Package for the Social Sciences

**TAS :**Total Antioksidan Seviye

**TOS :** Total Oksidatif Stres

**vd:** Ve Diğerleri

**x:** Çarpı

**ZEN:** Zearalenone

**β:** Beta

**μg:** Mikrogram

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 3.1.</b> Dondurma-Çözdürme Sonrası Motilite ve Anormal Spermatozoon Oranı	23
<b>Çizelge 3.2.</b> Dondurma-Çözdürme Sonrası HE-test Değerleri	24
<b>Çizelge 3.3.</b> Dondurma-Çözdürme Sonrası DNA Hasar Bulguları	25
<b>Çizelge 3.4.</b> Dondurma-Çözdürme Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri	26

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Köpeklerde Suni Tohumlama ve Kriyoprezervasyon

Köpeklerde suni tohumlama uygulamaları, günümüzde gerek üretim amaçlı yetiştiricilikte gerekse genetik koruma programlarında önemli bir yere sahiptir. Üreme performansının artırılması, nadir ırkların devamının sağlanması ve bulaşıcı hastalık riskinin azaltılması gibi sebeplerle bu yöntem giderek daha yaygın kullanılmaya başlanmıştır. Thomassen ve Farstad (2009), köpeklerde suni tohumlamanın hem pratik hem de biyoteknolojik açıdan önemli avantajlar sunduğunu, aynı zamanda doğal çiftleşme imkânı olmayan durumlarda alternatif bir çözüm oluşturduğunu bildirmiştir.

Suni tohumlama (ST), erkek hayvandan alınan ejakulatın uygun koşullarda işlenip dişi hayvana uygun zamanda aktarılması esasına dayanır. Böylece zamana bağlı kısıtlamalar ortadan kalkar ve genetik materyalin farklı bölgelerde kullanılabilmesi mümkün olur. Özellikle damızlık değeri yüksek erkeklerin spermalarının, farklı ülkelerdeki dişilerde de kullanılabilmesi sayesinde genetik çeşitliliğin korunması kolaylaşmıştır (Thomassen ve Farstad, 2009). Bunun yanında, hastalık bulaşma riskinin azalması, taşıma ve saklama kolaylığı da yöntemin tercih edilme nedenleri arasındadır (England, 1993). Kriyoprezervasyon, yani spermanın dondurulup saklanması ve uygun koşullarda tekrar çözdürülmesi, bu sürecin en kritik basamaklarından biridir. England (1993), köpek spermasının dondurulduktan sonra çözdürme aşamasında çeşitli yapısal ve fonksiyonel kayıplar yaşayabildiğini, bu durumun fertilité oranlarını sınırlayabildiğini belirtmiştir. Çözdürme sonrası spermatozoonların motilite ve viabilitesinde gözlenen düşüşler, günümüzde hâlâ önemli bir araştırma konusudur. Bu farklılıkların bireyden bireye değiştiği, hatta aynı hayvandan alınan örnekler arasında bile tutarsız sonuçlar görüldüğü bildirilmiştir.

Köpeklerde kriyoprezervasyonun gelişmesiyle birlikte dondurulmuş sperma bankaları kurulmuş, spermaların uzun süre saklanması ve gerektiğinde kullanılabilmesi mümkün hâle gelmiştir. Dondurulmuş köpek spermalarının özellikle genetik çeşitliliğin sürdürülmesi ve soyu tükenme tehlikesi altındaki ırkların korunması açısından büyük bir fırsat sunmaktadır. Ayrıca bu yöntem, yetiştiricilik sektöründe damızlıkların daha etkin şekilde kullanılmasına ve ıslah programlarının daha planlı yürütülmesine de olanak

tanılmaktadır (Kalkan ve Uçar, 2022). Bununla birlikte, kriyoprezervasyon işlemi sperma hücreleri açısından oldukça stresli bir süreçtir. Dondurma ve çözündürme aşamalarında ortaya çıkan ozmotik değişiklikler, soğuk şok etkisi ve buz kristali oluşumu gibi faktörler, spermatozoon membran yapısında hasara yol açabilmektedir. Durum böyle olunca dondurulmuş spermadan elde edilen fertilité oranları, taze veya soğutulmuş spermaya kıyasla genellikle daha düşüktür. (Hidalgo vd., 2014) Çeşitli araştırmacılar, bu olumsuz etkilerin azaltılması için sulandırıcı içeriğinde değişiklikler yapılması veya antioksidan eklerinin kullanılması gerektiğini vurgulamıştır. (Reuter vd., 2010; Gündoğan vd., 2021).

### **1.1.1. Köpeklerde Suni Tohumlamanın Tarihsel Gelişimi**

Suni tohumlama kavramı, hayvan yetiştiriciliğinde modern üreme biyoteknolojilerinin temelini oluşturur. Tarihsel olarak bu yöntemin kökeni 18. yüzyıla dayanır ve ilk başarılı uygulamanın 1780'li yıllarda İtalyan bilim insanı Lazzaro Spallanzani tarafından bir köpek üzerinde gerçekleştirildiği bilinmektedir. Spallanzani, erkek köpekten elde ettiği sperma ile dişi köpeği suni tohumlama yaparak gebelik elde etmiş ve böylece köpeklerde suni tohumlamanın mümkün olduğunu göstermiştir (Foote, 2015). Bu çalışma, hem veteriner üreme bilimi hem de genel anlamda biyoteknolojinin gelişimi açısından bir dönüm noktası kabul edilir. Geçtiğimiz yüzyılın başlarında, farklı araştırmacılar köpeklerde suni tohumlamanın fizyolojik temellerini ve uygulanabilirliğini incelemeye başlamıştır. O dönemde özellikle Ivanov ve Salisbury gibi bilim insanlarının yaptığı çalışmalar, suni tohumlamanın evcil hayvanlarda da sistematik biçimde uygulanabileceğini göstermiştir. (Holt, 2000). Ancak o yıllarda teknik altyapı yetersizliği ve kullanılan basit yöntemler nedeniyle başarı oranları düşük kalmaktaydı. Hafez ve Jainudeen gibi araştırmacılar 1950'li ve 1960'lı yıllarda yaptıkları deneylerle, spermanın uygun sıcaklıkta saklanması ve sulandırıcıların geliştirilmesinin başarı oranlarını artırdığını kanıtlamıştır. 1970'li yıllarda teknolojik gelişmelerle birlikte köpeklerde suni tohumlama daha yaygın ve kontrollü hale gelmiştir. Ovulasyon zamanının belirlenmesi, uygun sperma dozlarının hesaplanması ve yeni kateter sistemlerinin kullanıma girmesi, bu dönemde yöntemin etkinliğini önemli ölçüde artırmıştır (Dutta ve Dutta, 2020). Ayrıca, soğutulmuş ve dondurulmuş sperma kullanımıyla ilgili ilk başarılı denemeler bu yıllarda yapılmıştır. Araştırmacılar, dondurulmuş spermanın çözündürülmesi sonrasında da belirli bir oranda fertilizasyon başarısı elde edilebileceğini rapor etmişlerdir. Günümüzde

sunı tohumlama, köpeklerde yalnızca damızlık yönetiminde değil, aynı zamanda genetik materyalin korunması ve uluslararası yetiştiricilik programlarının yürütülmesinde de etkin bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Yeni teknikler, özellikle cerrahi müdahaleye gerek bırakmayan transservikal tohumlama gibi yöntemler, dişi üreme kanalına daha az zarar vererek yüksek gebelik oranı sağlamaktadır (Hollinshead ve Hanlon, 2009). Bu gelişmeler, suni tohumlamanın sadece üreme verimliliğini artırmakla kalmayıp, aynı zamanda türlerin genetik sürdürülebilirliğine katkıda bulunduğunu da göstermektedir. Köpeklerde suni tohumlamanın tarihsel gelişimi, basit deneysel çalışmalardan ileri biyoteknolojik yöntemlere doğru uzanan bir süreç olarak değerlendirilebilir. Spallanzani'nin öncülük ettiği bu yaklaşım, zaman içinde teknik, biyolojik ve klinik açıdan büyük ilerlemeler kaydederek günümüzün güvenilir ve rutin uygulamalarından biri haline gelmiştir (Foote, 2015).

### **1.1.2. Suni Tohumlamanın Avantajları**

Suni tohumlama, köpek yetiştiriciliğinde hem pratik hem de ekonomik açıdan birçok avantaj sunan bir üreme yöntemidir. Doğal çiftleşmenin mümkün olmadığı durumlarda, genetik olarak değerli erkeklerin üreme potansiyelinden yararlanmayı sağlar. Bu sayede hem yerel hem de uluslararası düzeyde damızlık yönetimi daha esnek hale gelir. (Hafez, 1987; Demirci, 2002). Köpeklerde suni tohumlamanın en önemli avantajlarından birinin, “coğrafi kısıtlamaları ortadan kaldırarak üstün genetik hatların korunmasına olanak tanınması” olduğunu bildirmiştir. Bu durum, nadir veya soyu tükenme tehlikesi altındaki ırkların sürdürülebilirliği açısından büyük önem taşır. (Thomassen ve Farstad, 2009) Suni tohumlamanın bir diğer avantajı, bulaşıcı üreme hastalıklarının yayılma riskini azaltmasıdır. Doğal iftleşme sırasında bulaşabilen *Brucella canis*, Herpesvirus ve diğer venereal hastalıkların, sperma toplama ve işleme süreçlerinde uygun hijyen koşulları sağlanarak önlenmesi mümkündür. Bu nedenle, kontrollü tohumlama programları hem hayvan sağlığını korur hem de işletmelerde ekonomik kayıpların önüne geçer (Rota vd., 2012). Ayrıca, spermanın sulandırıcılarla işlenmesi ve kısa süreli depolanması, tohumlamanın zamanlamasının daha doğru yapılmasına olanak tanır. Böylece dişinin ovulasyon dönemiyle eşleştirilen tohumlama işlemleri sonucunda d l verimi artar. (Sönmez, 2022).

Köpeklerde suni tohumlama, aynı zamanda kriyoprezervasyon teknikleriyle birleştirildiğinde, genetik materyalin uzun süre saklanabilmesine imkân verir. Bu yöntem, damızlık erkeklerin ilerleyen yaşlarında ya da ölümünden sonra bile genetik katkılarının devam etmesini sağlar. England (1993), köpeklerde dondurulmuş sperma kullanımının “uluslararası damızlık paylaşımını kolaylaştırarak gen havuzunu genişlettiğini” ifade etmiştir. Suni tohumlama yalnızca ticari yetiştiricilikte değil, gen koruma biyolojisi ve araştırma alanlarında da kullanılmaktadır. Nesli tükenmekte olan köpek türlerinin ve yaban canislerinin (örneğin kurt, çakal, tilki gibi) korunması amacıyla yürütülen projelerde suni tohumlama, genetik çeşitliliğin devamı için kritik rol oynar (Thomassen ve Farstad, 2009).

### **1.1.3. Kriyoprezervasyonun Önemi**

Kriyoprezervasyon, spermanın çok düşük sıcaklıklarda dondurularak uzun süre saklanmasını sağlayan bir yöntemdir. Köpeklerde bu teknik, yalnızca üreme verimliliğini artırmakla kalmaz, aynı zamanda genetik materyalin korunması açısından da büyük önem taşımaktadır. Dondurulmuş sperma ile damızlık erkeklerin genetik özellikleri yıllar sonra bile kullanılabilir hale gelir. Bu durum, özellikle nadir ırkların veya soyu tükenme tehlikesi altındaki türlerin korunmasında büyük avantaj sağlar (Trousoun, 1990; Bailey vd., 2000). Ayrıca kriyoprezervasyon, farklı ülkelerdeki bireylerin genetik materyallerinin değişimini mümkün kılarak uluslararası gen akışını destekler. Köpeklerde kriyoprezervasyon uygulamaları, son yıllarda hem pratik hem de ekonomik nedenlerle yaygınlaşmıştır. England (1993), kriyoprezervasyonun temel amacının “üreme materyalini zaman ve mekân kısıtlamalarından bağımsız hale getirmek” olduğunu belirtmiştir. Bu sayede, canlı hayvan transferine gerek kalmadan genetik hatların yaygınlaştırılması imkân sağlanır. Aynı zamanda dondurulmuş spermaların taşınması, enfeksiyon riskini azaltır ve karantina zorunluluğu olmaksızın güvenli genetik değişim sağlar. Özellikle uluslararası damızlık programlarında bu durum, maliyetleri önemli ölçüde düşürmektedir.

Kriyoprezervasyonun önemi yalnızca genetik koruma açısından değil, bilimsel araştırmalar ve biyoteknolojik uygulamalar açısından da büyüktür. Dondurulmuş sperma örnekleri, laboratuvar koşullarında farklı deneysel çalışmalarda kullanılabilir ve böylece

sperma biyolojisi, hücre membranı bütünlüğü veya fertilizasyon mekanizmaları üzerine yapılan araştırmalara değerli veri sağlar. Ayrıca bu teknik, sperma bankacılığı kavramının gelişmesine zemin hazırlamış ve veteriner üreme biyoteknolojisinin önemli bir bileşeni haline gelmiştir (Hafez, 1987). Köpeklerde kriyoprezervasyonun başarılı şekilde uygulanması, sperma kalitesinin korunmasına bağlıdır. Dondurma ve çözme işlemleri sırasında sperma hücrelerinin karşılaştığı fiziksel ve kimyasal stresler, membran bütünlüğünün bozulmasına, motilitenin azalmasına ve oksidatif hasara neden olabilir (England, 1993). Bu nedenle, kullanılan sulandırıcılar, kriyoprotektanlar ve soğutma hızları spermanın yapısal özelliklerine göre optimize edilmelidir. Araştırmalar, gliserol, etilen glikol ve dimetil sülfoksit (DMSO) gibi maddelerin uygun dozlarda kullanılmasıyla çözme sonrası canlılık oranlarının belirgin biçimde arttığını göstermiştir (Holt, 2000.).

## **1.2. Spermanın Dondurulması ve Çözülmesinde Oluşan Biyolojik Hasarlar**

Spermanın dondurulup daha sonra çözülmesi sırasında ortaya çıkan biyolojik hasarlar, kriyoprezervasyonun köpeklerde en önemli sınırlayıcı sebeplerden biridir. Dondurma-çözme işlemi sonucunda spermatozoonun yaşam süresi kısalmakta, fertilizasyon kapasitesi belirgin şekilde azalmaktadır (Agarwal vd., 2014). Köpek spermasının dondurulduktan sonra çözülürken, taze ejakulata kıyasla daha düşük motilite, azalmış canlılık gösterdiğini bildirmiştir. Bu durum, dondurma ve çözme sürecinin, spermatozoon hücresinin hem yapısal bütünlüğü hem de fonksiyonel özellikleri üzerinde çok yönlü bir stres oluşturduğunu göstermektedir (England, 1993). Kriyoprezervasyon sırasında spermatozoon, termal, ozmotik ve mekanik streslere aynı anda maruz kalır. Soğutma ve dondurma fazında hücre içi ve dışı sıvıların donması, buz kristallerinin oluşumu ve çözülmesi, plazma membranının lipid tabakasında bozulmalara yol açar. (Fraser ve Strzezek, 2005). England (1993), soğuk şok ve hızlı sıcaklık değişimlerinin özellikle plazma membranının geçirgenliğini etkilediğini ve iyon dengesinin bozulmasına neden olduğunu vurgulamıştır. Benzer şekilde, (Sicherle vd. 2020), yaptıkları çalışmada, dondurma-çözme işlemi sonrasında köpek spermatozoonlarında plazma membranı, akrozom ve mitokondri gibi kritik yapıların bütünlüğünün belirgin biçimde bozulduğunu, bu bozulmanın da hücre viabilitesini sınırladığını ortaya koymuştur. Bu yapısal değişiklikler, spermanın fonksiyonel özelliklerine doğrudan yansımaktadır. Dondurulmuş-çözülmüş köpek spermalarında motilite, membran bütünlüğü, akrozom

sağlamlığı ve mitokondriyal aktivitenin taze sperma ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük olduğunu bildirmiştir. Çalışmada ayrıca, kriyoprezervasyonun apoptozisle ilişkili bazı belirteçleri artırdığı, yani dondurma-çözdürme sürecinin sadece mekanik bir hasar değil, aynı zamanda programlı hücre ölümüne benzer biyokimyasal süreçleri de tetikleyebildiği gösterilmiştir. Bu bulgular, kriyoprezervasyonun spermatozoon hücrelerini çok boyutlu bir stres ortamına soktuğunu ve hasarın sadece tek bir düzeyde gerçekleşmediğini göstermesi açısından önemlidir. Dondurma-çözdürme sürecinde öne çıkan bir diğer mekanizma ise oksidatif strestir. Köpek spermatozoon plazma membranı yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidi içermesi, bu hücreleri reaktif oksijen türlerine karşı oldukça hassas hale getirmektedir (Holt, 2000). Köpek spermalarında deneysel olarak indüklenen oksidatif stresin lipid peroksidasyonunu artırdığını, motiliteyi azalttığını ve DNA bütünlüğünü bozduğu bununla beraber, seminal plazmanın uzaklaştırılması gibi rutin işlem basamakları, spermanın doğal antioksidan korumasını azaltmakta ve dondurma işlemi sırasında üretilen reaktif oksijen türlerinin etkisini daha da güçlendirmektedir. Bu durum, kriyoprezervasyon sürecinde gözlenen membran hasarı, mitokondriyal fonksiyon kaybı ve DNA fragmentasyonu ile uyumlu bir tablo oluşturmaktadır (Silva-Rodríguez ve Sieving, 2012).

### **1.2.1. Spermatozoonun Yapısal Özellikleri**

Spermatozoon, yüksek derecede özelleşmiş bir hücre yapısına sahip olduğu için hem dondurma hem de çözdürme aşamalarında oluşabilecek biyolojik hasarlara oldukça duyarlıdır. Köpek spermatozoonunun bu hassasiyeti, hücrenin morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinden kaynaklanır. Özellikle plazma membranı, akrozom ve mitokondriyal yapıların hem lipid içeriği hem de fonksiyonel rolleri nedeniyle kriyoprezervasyon sırasında zarar görme eğilimleri yüksektir (Silva-Rodríguez ve Sieving, 2012). Spermatozoon plazma membranı, çoklu doymamış yağ asitleri açısından oldukça zengindir. Bu durum, membranı esnek ve akışkan hale getirirse de aynı zamanda soğuk şok ve oksidatif stres gibi dondurma-çözdürme sürecinde sık karşılaşılan etkenlere karşı duyarlı kılar. Bu nedenle düşük sıcaklıklarda membran lipidleri kristalize olabilir, membran geçirgenliği bozulabilir ve iyon dengesi değişebilir. Membran bütünlüğündeki bu bozulma, hem motilite kaybına hem de hücrenin fertilizasyon kapasitesinin azalmasına yol açar (White, 1993).

Spermatozoonun akrozomu, oosite bağlanma ve penetrasyon için gerekli enzimleri içerir. Ancak akrozomal membran, hem kimyasal yapısı hem de enzim yoğunluğu nedeniyle dondurma sırasında zamana ve sıcaklık değişimlerine aşırı duyarlı bir yapıdır. Akrozom kaybı veya erken akrozom reaksiyonu, çözündürme sonrası spermatozoonun fertilizasyon şansını ciddi şekilde azaltmaktadır. Spermatozoonun orta kısmında bulunan mitokondriler, hücre hareketi için gerekli olan ATP'nin üretildiği bölgedir. Ancak mitokondri membran potansiyeli hem düşük sıcaklıklar hem de oksidatif stres karşısında son derece hassastır. Dondurma işlemi sırasında mitokondriyal yapının bozulması, çözündürme sonrası motilitenin düşmesine yol açar (Sönmez, 2022). Köpek spermasında dondurma sonrası görülen mitokondriyal bozulmayı “çözündürme sonrası hareketliliği sınırlayan temel mekanizmalardan biri” olarak tanımlamıştır. Bu hasar, aynı zamanda apoptotik yolların tetiklenmesine de katkıda bulunur. Spermatozoonun kuyruk kısmı (flagellum) da kriyoprezervasyona duyarlı bir bölgedir. Mikrotübül yapısı sert donma-çözündürme döngülerinde stabilitesini kaybedebilir; bu durum spermatozoonun ilerleyici hareketini doğrudan etkilemektedir (Sharafi vd., 2022).

### **1.2.2. Dondurma Sürecindeki Stres Faktörleri**

Köpek spermatozoonunun kriyoprezervasyon sürecinde en çok zarar gördüğü aşama genellikle dondurma fazıdır. Dondurma sırasında hücrenin karşılaştığı fiziksel ve kimyasal değişiklikler hem plazma membranı hem de içyapıları için ciddi bir stres oluşturur. Bu stres faktörleri birbirinden bağımsız değildir; çoğu zaman eşzamanlı bir şekilde etki ederek hücrenin bütünlüğünü bozar ve çözündürme sonrası spermatozoon kalitesini belirgin şekilde düşürür (Eilts, 2005). Dondurma sürecindeki en temel streslerden biri termal şok etkisidir. Spermatozoon hücresi, ani sıcaklık düşüşlerine fizyolojik olarak adapte olamayan bir yapıdadır. Sıcaklığın hızlı şekilde 5–0°C seviyelerine inmesi, membran lipidlerinin faz değişimine uğramasına neden olur. Bu faz değişimi, membran akışkanlığını azaltırken aynı zamanda membran proteinlerinin konumunu ve işlevini bozar (Chen vd., 1993). Bu termal geçişin özellikle köpek spermatozoonunda “cold shock” olarak tanımlanan ciddi bir fonksiyon kaybına yol açmakta olup, hücre membranındaki bu bozulmalar, spermatozoonun iyon dengesi üzerinde de olumsuz etki oluşturur ve çözündürme sonrası yaşam süresini kısaltmaktadır. (Watson, 2000).

Dondurma aşamasında ortaya çıkan bir diğer önemli stres faktörü ozmotik değişikliklerdir. Spermatozoon hücresi dondurulurken hücre dışı ortamda buz kristalleri oluşmaya başlar. Bu kristaller, dış ortamdaki serbest suyun azalmasına ve çözeltinin ozmolalitesinin artmasına neden olur. Bunun sonucunda hücre dışı ortam hiperosmotik hale gelir ve spermatozoon su kaybederek büzölmeye başlar. Çözdürme aşamasında ise tam tersi etki oluşur; hücre içine ani su girişi gerçekleşir ve bu da membranın gerilerek yırtılmasına yol açabilir (Peris vd., 2007). Dondurma-çözdürme döngüsü sırasında spermatozoonun en çok bu ani hacim değişimlerinden etkilendiğini ve bunun canlılık kaybına doğrudan katkıda bulunduğunu bildirmiştir (Holt, 2000). Dondurma sürecindeki üçüncü önemli stres faktörü buz kristali oluşumudur. Hücre dışındaki kristal oluşumu spermatozoonu dolaylı etkilerken, hücre içi kristal oluşumu doğrudan mekanik hasara neden olur. İçeride oluşan küçük kristaller, membrana ya da organellere fiziksel baskı yaparak mikroskobik yırtılmalara neden olabilir. Köpek spermatozoonu diğer türlerden farklı olarak daha ince bir plazma membranına sahip olduğundan, bu kristaller membranda çatlak ve por oluşumuna daha kolay yol açar. Bu da akrozom hasarı, mitokondri deformasyonu ve DNA kırıkları gibi çözdürme sonrası gözlenen hasarların temel nedenleri arasına girer (Bucak ve Tekin, 2007). Spermatozoonun dondurma sürecinde maruz kaldığı bir diğer stres ise kimyasal stres olarak tanımlanır. Kriyoprotektan maddeler (gliserol, etilen glikol vb.), spermatozoon hücresini buz kristallerinin etkisinden korumak için kullanılsa da yüksek konsantrasyonlarda hücre için toksik olabilir. Bu maddelerin hücre içine hızlı giriş çıkışı, membran geçirgenliğini zorlar ve bazı enzimatik aktiviteleri baskılayabilir. Ayrıca, kriyoprotektanlara maruziyet mitokondri içi metabolizmayı bozarak ATP üretiminin düşmesine yol açabilir (Oehninger vd., 2000).

### **1.2.3. Çözdürme Sonrası Yapısal ve Fonksiyonel Kayıplar**

Dondurulmuş spermanın çözdürülmesi sonrası ortaya çıkan yapısal ve fonksiyonel kayıplar, kriyoprezervasyon sürecinin spermatozoon kalitesi üzerindeki en belirleyici etkilerinden biridir. Çözdürme aşamasında ani ısı değişimi ve tekrar su girişinin başlaması, spermatozoon hücresinin daha önce dondurma sürecinde uğradığı stresleri açığa çıkarır ve hücresel düzeyde önemli kayıplara neden olur. Çözdürme sonrası en sık karşılaşılan hasarlardan biri plazma membranı bütünlüğünün bozulmasıdır. Dondurma

sırasında su kaybeden spermatozoon, çözdürme sırasında hızla yeniden su alır ve bu ani hacim değişimi membranda gerilmeye bağlı mikro yırtıklara yol açar. Bu durum, membran geçirgenliğinin bozulmasıyla sonuçlanarak spermatozoonun iyon dengesini kaybetmesine ve canlılık süresinin kısalmasına neden olur (Holt, 2000).

Bir diğer önemli yapısal kayıp akrozom bütünlüğünün bozulmasıdır. Akrozom, oositin zona pellucida tabakasını aşmak için gerekli enzimleri taşıdığı için yapısal sağlamlığını koruması kritik öneme sahiptir. Çözdürme sonrası akrozomda erken reaksiyon, enzim kaybı veya kısmi dejenerasyon sık görülen bulgular arasındadır. Bu durum spermatozoon–oosit etkileşimini olumsuz etkileyerek fertilizasyon oranlarının düşmesine neden olur (Pena ve Johannisson, 1999). Çözdürme aşamasında ortaya çıkan bir başka önemli kayıp mitokondriyal fonksiyonun azalmasıdır. Mitokondrilerin membran potansiyeli dondurma ve çözdürme sırasında ciddi şekilde etkilenir; bu da ATP üretiminin düşmesine ve spermatozoon motilitesinin belirgin şekilde azalmasına yol açar. Ayrıca mitokondri hasarı, apoptotik süreçleri tetikleyerek spermatozoonun kısa sürede dejenerasyonunu hızlandırabilir (Sicherle vd., 2020). Çözdürme sonrası artan oksidatif stres, spermatozoon hücresinin hem membran lipitlerinde hem de DNA yapısında ek hasarlar oluşturur. Reaktif oksijen türlerinin yükselmesi, özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin köpek spermatozoon membranında lipid peroksidasyonunu artırır. Bunun sonucu olarak hem motilitede hem de DNA bütünlüğünde belirgin bozulmalar gözlemlenir (Holt, 2000).

### **1.3. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türlerinin Rolü**

Oksidatif stres, spermatozoonun dondurulması ve çözdürülmesi sırasında görülen biyolojik hasarın temel mekanizmalarından biridir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile spermatozoon hücresinin doğal antioksidan savunma kapasitesi arasındaki dengenin bozulması hem membran yapısında hem de hücre içi organellerde fonksiyonel bozukluklara yol açar (Agarwal vd., 2003). Köpek spermasının yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidi içeren membran yapısı, onu ROS'a karşı diğer türlere göre daha duyarlı hale getirir. Dondurma–çözdürme döngüsü sırasında ROS seviyelerinin yükselmesinin ana nedenlerinden biri, mitokondriyal elektron kaçağının artması ve çözdürme aşamasında meydana gelen ani yeniden oksijenlenme sürecidir. Bu durum, mitokondrilerin hem yapısal bütünlüğünü hem de enerji üretim kapasitesini olumsuz

etkiler. Mitokondri membran potansiyelinin azalması ATP üretimini düşürür ve bunun sonucunda spermin ilerleyici hareketi belirgin şekilde azalır (Baumber vd., 2003). Mitokondrideki bu bozulma aynı zamanda apoptotik yolların aktivasyonuna katkıda bulunabilir (Agarwal vd., 2003). Aşırı ROS birikimi, özellikle plazma membranı üzerinde lipid peroksidasyonu meydana getirir. Çoklu doymamış yağ asidi oranı yüksek olan spermatozoon membranı, peroksidasyona karşı son derece kırılgandır ve bu süreç membran akışkanlığını azaltarak spermatozoonun canlılığını düşürür. Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan toksik ara ürünler (örneğin Malondialdehit (MDA)), hem membran hasarını artırır hem de spermatozoon DNA'sı üzerinde ek yapısal bozulmalara neden olur (Agarwal vd., 2005).

### **1.3.1. Oksidatif Stres Kavramı**

Oksidatif stres, hücrelerde üretilen ROS organizmanın doğal antioksidan savunma kapasitesini aşmasıyla ortaya çıkan biyokimyasal bir dengesizlik olarak tanımlanır (Geva vd., 1998). Normal fizyolojik koşullarda ROS, hücre metabolizmasının doğal yan ürünleridir ve düşük seviyelerde hücre sel sinyal yollarının düzenlenmesi gibi görevler üstlenir. Ancak köpek spermatozoonu gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip hücrelerde ROS üretiminin artması oldukça kolaydır ve bu durum oksidatif stresin hızlı bir şekilde gelişmesine yol açabilir (Baumber vd., 2003). Oksidatif stres meydana geldiğinde, spermatozoon hücresinin plazma membranı, mitokondrileri ve DNA'sı gibi temel yapıları hedef alınır (Sharma ve Agarwal, 1996). Aşırı ROS yüklenmesi ayrıca lipid peroksidasyonu adı verilen bir kimyasal süreci tetikler. Bu süreçte membran lipidleri oksitlenir ve hücre içinde toksik aldehit ürünleri oluşur. Bu ürünlerden biri olan MDA, oksidatif hasarın biyokimyasal göstergesi olarak kabul edilir ve spermatozoon hücresinin genel canlılığı üzerinde olumsuz etkiler oluşturur (Saleh ve Agarwal, 2002).

### **1.3.2. Spermatozoon Sistemlerinde ROS Oluşumu**

Spermatozoon sistemlerinde ROS oluşumu, hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerin doğal bir sonucudur. Spermatozoon metabolizması yüksek enerji gerektirdiği için, özellikle mitokondride gerçekleşen oksidatif fosforilasyon sırasında küçük miktarlarda ROS üretimi normal kabul edilir (Aitken ve Baker, 2006). Ancak köpek spermasında mitokondri sayısı ve metabolik aktivite yüksek olduğu için ROS üretim düzeyi diğer

türlere göre daha hızlı yükselebilir (Koppers vd., 2008). ROS oluşumunun en önemli kaynağı mitokondriyal elektron transport zinciridir. Elektron akışı sırasında meydana gelen “electron leakage” olarak adlandırılan durum, süperoksit anyonlarının (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) oluşmasına neden olur (Aitken ve Clarkson, 1987). Dondurma ve çözündürme süreci sırasında mitokondri membran potansiyelindeki bozulmalar, bu elektron kaçaklarını artırarak ROS oluşumunu hızlandırır ROS üretiminin bir diğer kaynağı lökosit kontaminasyonudur. Seminal plazmaya karışan nötrofiller ve makrofajlar, fagositik aktivite sırasında büyük miktarda ROS üretir. Bu durum özellikle enfeksiyon, inflamasyon ya da epididimal kaynaklı sorunlarda daha belirgindir (Henkel, 2005). Lökositlerin spermatozondan çok daha yüksek düzeyde ROS ürettiğini ve seminal plazma örneklerinde düşük miktarda dahi bulunmaları spermatolojik stres oluşturabilmektedir (Aitken ve Baker, 2006). Köpek spermatozoonunda ROS oluşumunu etkileyen bir başka önemli mekanizma ise anormal veya yaşlanmış spermatozoon hücrelerinin kendisidir. Yapısal bütünlüğü bozulan, membran akışkanlığı azalmış veya mitokondriyal fonksiyonu düşmüş spermatozoonlar, normal spermatozoonlara kıyasla daha fazla ROS üretir (Koppers vd., 2008). Ayrıca spermatozoonun kendine özgü biyokimyasal yapısı da ROS oluşumuna yatkınlığı artırır. Özellikle membranda bulunan yüksek orandaki çoklu doymamış yağ asitleri, ROS’un hedef aldığı bölgelerden biridir ve oksidatif reaksiyonların zincirleme şekilde ilerlemesine neden olabilir. Bu özellik hem oksidatif hasarın hızla yayılmasına hem de spermatozoon yapılarının geri dönüşsüz şekilde bozulmasına yol açar (Aitken ve Baker, 2006).

### **1.3.3. ROS’un Spermatozoon Hücrelerine Etkileri**

ROS spermatozoon hücreleri üzerindeki etkileri hem yapısal hem de fonksiyonel düzeyde ortaya çıkar ve kriyoprezervasyon sürecinin çözündürme sonrası kalite kayıplarının temel nedenleri arasında yer alır. ROS’un en belirgin etkilerinden biri plazma membranındaki lipid peroksidasyonudur. Köpek spermatozoonu membranı yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidi içerdiği için ROS saldırısına karşı oldukça kırılgandır; bu durum membran akışkanlığının azalmasına ve iyon geçirgenliğinin bozulmasına yol açar (Moustafa vd., 2004). ROS’un spermatozoon hücrelerinde etkilediği bir diğer önemli yapı mitokondrilerdir. Mitokondriler ATP üretiminden sorumlu olduğu için, bu bölgede ROS birikimi doğrudan motilite kaybına yol açar. ROS, mitokondriyal membran potansiyelini

düşürerek oksidatif fosforilasyonun etkinliğini azaltır ve bunun sonucunda spermatozoonun enerji üretimi sınırlanır (Agarwal vd., 2006). Mitokondrinin zarar görmesi ayrıca apoptotik süreçlerin başlamasında da önemli bir tetikleyici rol oynar (Agarwal vd., 2003). Spermatozoon hücrelerinde ROS birikiminin etkilediği bir diğer yapı akrozomdur. Akrozom membranı, enzim içeriği nedeniyle oksidatif değişimlere karşı hassastır ve ROS artışı akrozom bütünlüğünün bozulmasına yol açabilir. Akrozomun erken reaksiyona girmesi veya enzim kaybı, spermatozoonun zona pellucida'ya bağlanmasını ve oositi delme kapasitesini azaltır; bu durum fertilizasyon yeteneğini ciddi şekilde sınırlar (Griveau ve Le Lannou, 1997). ROS ayrıca spermatozoon DNA'sında tek zincir ve çift zincir kırıkları oluşturabilir. DNA hasarı, embriyo gelişimini ve implantasyon başarısını doğrudan etkileyen kritik bir parametredir. ROS düzeylerinin yükselmesinin spermatozoon DNA fragmentasyonunu anlamlı ölçüde artırdığını ve bunun da fertilizasyon sonrası gelişim süreçlerinde bozukluklara yol açmaktadır (Peris vd., 2007).

#### **1.4. Antioksidanların Kriyoprezervasyondaki Kullanımı**

Antioksidan sistemler, hücrelerde oluşan ROS zararlı etkilerini nötralize ederek oksidatif stresi kontrol altında tutan biyolojik savunma mekanizmalarını oluşturur. Bu sistemler genel olarak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar şeklinde iki ana gruba ayrılır (Agarwal vd., 2005). Enzimatik antioksidanlar, ROS'un direkt yıkımından sorumlu olan biyokimyasal savunma hattıdır. Bu sistemin başlıca bileşenleri süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir. SOD, süperoksit radikallerini hidrojen peroksit'e dönüştürerek oksidatif zincirin ilk basamağını kontrol eder (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Ardından CAT ve GPx, oluşan hidrojen peroksiti suya ve oksijene dönüştürerek toksik etkiyi ortadan kaldırır (Birben vd., 2012). Bu enzimatik mekanizma özellikle spermatozoon gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip ve ROS üretimine yatkın hücrelerde kritik bir koruyucu rol oynar (Agarwal vd., 2005). Enzimatik olmayan antioksidanlar, hem seminal plazmada hem de spermatolojik sulandırıcılarda bulunan ve ROS nötralizasyonunda tamamlayıcı rol üstlenen düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Bunlar arasında vitamin E, vitamin C, glutatyon, karotenoidler ve koenzim Q10 gibi moleküller yer alır (Deichsel vd., 2008). Vitamin E, membran lipid tabakasında bulunan lipofilik bir antioksidan olarak lipid

peroksidasyonunu engeller (Rice ve Kennedy, 1988). Vitamin C ise hidrofilik yapısı sayesinde serbest radikalleri doğrudan bağlayarak membran ve DNA'yı korur (Agarwal vd., 2005).

Bu iki antioksidan sistem birlikte çalışarak spermatozoon hücresinin kriyoprezervasyon sürecindeki oksidatif hasara karşı korunmasında kritik bir rol üstlenir. Dondurma–çözdürme döngüsünde antioksidan seviyelerinin azalması spermatozoon hücresinin daha fazla ROS biriktirmesine yol açtığı için, ek antioksidan takviyeleri kriyobiolojide yaygın bir araştırma konusudur (Breininger vd., 2005).

#### **1.4.1. Antioksidanların Spermatozoon Üzerine Etkileri**

Spermanın dondurulması ve çözdürülmesi sırasında membran lipitlerinin faz değişimi, ozmotik ve mekanik stres, ayrıca ortamdaki serbest oksijen varlığına bağlı olarak yoğun bir lipit peroksidasyonu meydana gelebilir. Bu süreçte oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) başlıca süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit ekstraselüler buz kristallerinin gelişimine, buna bağlı olarak membran proteinlerinin denatürasyonuna, organel yapılarında bozulmalara, DNA kırıklarına ve hücrel lizise neden olabilir. Antioksidan maddelerin ortama eklenmesi bu istenmeyen etkileri önemli ölçüde azaltmakta ve çözdürme sonrası spermatozoon fonksiyonlarının korunmasına katkı sağlamaktadır (Maxvell ve Watson, 1996). Antioksidanlar bu koruyucu etkilerini; ortamın oksijen derişimini azaltarak, lipit peroksidasyon zincir reaksiyonlarının başlama ya da ilerleme aşamasını kesintiye uğratarak veya oluşmuş peroksit yapılarını parçalayarak gerçekleştirirler (Gordon, 2005).

Antioksidanların spermatozoon üzerine etkileri, özellikle kriyoprezervasyon sırasında oluşan oksidatif stresin kontrol altına alınması bakımından büyük önem taşır. Dondurma–çözdürme süreci boyunca artan ROS, spermatozoon plazma membranı, akrozomu, mitokondrileri ve DNA'sı üzerinde ciddi hasarlar oluşturduğu için antioksidanların kullanımı çözdürme sonrası kaliteyi belirgin şekilde iyileştirebilir (Peris vd., 2007). Antioksidan uygulamalarının en sık gözlenen etkileri ROS seviyelerinin düşmesi, lipid peroksidasyon belirteci olan MDA düzeyinin azalması ve buna bağlı olarak spermatozoon motilite ile viabilite değerlerinde artış olarak rapor edilmiştir (Verma ve Kanwar, 1999). Dondurulmuş–çözdürme sonrası hücrelerde ROS birikimi mitokondriyal

membran potansiyelini düşürdüğü için ATP üretimi azalır; antioksidanlar bu süreci sınırlandırarak mitokondri fonksiyonunun korunmasını sağlar. Böylece hem total hem de progresif motilite çözme sonrası daha yüksek seviyelerde kalır (Shiva Shankar Reddy vd., 2010).

Antioksidanların bir diğer önemli etkisi viabilite ve membran bütünlüğünün korunmasıdır. ROS'un neden olduğu lipid peroksidasyonu membran akışkanlığını bozarak hücrenin geçirgenliğini artırır; antioksidanlar bu zincirleme reaksiyonları durdurarak membran stabilitesini korur (Peris vd., 2007). Özellikle vitamin E ve koenzim Q10 gibi lipofilik antioksidanlar, membran lipidlerinde yer alarak oksidatif saldırıyı doğrudan azaltır (Sikka, 1996). Türler arasında antioksidan yanıtlarında belirgin farklılıklar olduğu da bilinmektedir. Örneğin boğa spermatozoonlarında yüksek antioksidan kapasite nedeniyle oksidatif strese karşı daha dirençliyken, koç ve domuz spermatozoonlarında çoklu doymamış yağ asidi içeriği yüksek olduğundan daha hassastır (Sarıözkan vd., 2010). Köpek spermatozoonu ise lipid yapısı nedeniyle oksidatif stres açısından en duyarlı türlerden biri olarak kabul edilir; bu nedenle antioksidan uygulamaları çözdürme sonrası kaliteyi özellikle köpeklerde daha belirgin şekilde artırabilir (Zduńczyk vd., 2025).

#### **1.4.2. CAPE'nin Kimyasal Özellikleri**

Kafeik asit fenetil ester (CAPE),  $C_{17}H_{16}O_4$  moleküler formülüne ve 284.3 g/mol moleküler ağırlığa sahip difenolik bir bileşiktir. Kimyasal adı (E)-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-propiyonik asit, 2-feniletıl 3-(3,4-dihidroksifenil)-2-propenoat olarak tanımlanır. Beyaz renkli, ince kristal yapıdaki CAPE; suda çözünmez ancak etanol, metanol, aseton ve DMSO gibi çözücülerde kolaylıkla çözünür. İn vivo çalışmalarında alkol bazlı çözücülerin kullanımı, transesterifikasyon sonucu yeni kafeik asit esterlerinin oluşmasına yol açabileceğinden dikkat gerektirir (Celli vd., 2007). CAPE ilk kez 1987 yılında propolisın bir bileşeni olarak tanımlanmıştır (Bankova vd., 1987). Propolisten farklı ekstraksiyon yöntemleri ile izole edilebildiği gibi, kafeik asit ve fenetil alkol kullanılarak yüksek molar verimle kimyasal sentezi de gerçekleştirilebilmektedir (Chen vd., 2011).

### 1.4.3. CAPE'nin Antioksidan Etkinliği

Hücreler oksidatif fosforilasyon sürecinde oksijeni enerji üretimi için kullanırken, elektron transferi sırasında çeşitli reaktif oksijen türleri ortaya çıkar. Tek elektron kazanmış oksijen molekülü süperoksit anyonunu ( $O_2^{\bullet-}$ ) oluşturur ve devam eden reaksiyonlarda hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali ( $\bullet OH$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) gibi güçlü oksidanlar meydana gelir. Hücresel antioksidan savunma sistemi ile dengelenmeyen aşırı ROS üretimi oksidatif strese yol açar ve oksidatif stresin kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit, yaşlanma ve iskemi-reperfüzyon hasarı gibi birçok patolojide kritik rol oynadığı bilinmektedir (Reuter vd., 2010). Bu nedenle antioksidan bileşikler, çeşitli hastalık durumlarında önemli koruyucu ajanlar olarak değerlendirilmektedir.

Polifenollerin yüksek antioksidan kapasitesi iyi bilinmektedir. CAPE, sinamik asit türevi olup yapısında bulunan  $CH_2=CH-COOH$  grubu sayesinde benzoik asit türevlerine göre daha güçlü antioksidan özellik gösterir. Fenolik hidroksil gruplarının metil gibi sterik engelleyici bir grup tarafından korunması antioksidan etkinliğini artırmaktadır (Widjaja vd., 2008). Difenolik yapılar hem radikal oluşumunu hem de radikal yayılımını baskılayarak antioksidan görevi görürler. Ayrıca geçiş metalleri ile şelat oluşturabilmeleri ve oksidatif reaksiyonları başlatan enzimleri inhibe edebilmeleri önemli bir avantajdır (Russo vd., 2000). CAPE içeren propolis özütlerinin, CAPE içermeyen özütlere kıyasla belirgin düzeyde daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir; bu durum CAPE'nin propolisin antioksidan gücüne önemli katkı sağladığını göstermektedir (Russo vd., 2002). CAPE'nin lipit peroksidasyonunu baskılayan, DNA'yı oksidatif hasara karşı koruyan ve hücresel düzeyde sitoprotektif etki sağlayan güçlü bir bileşik olduğu çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (Wang vd., 2010).

Flavonoid benzeri yapısı sayesinde CAPE, propolisin biyolojik olarak aktif başlıca bileşenlerinden biri olup normal hücrelerde toksisite oluşturmadan antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antikanser ve antioksidan özellikler sergilemektedir (Koltuksuz vd., 2000). Yağda çözünebilen bir antioksidan olmasından dolayı geleneksel tıpta inflamatuvar ve enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Tolba vd., 2013). Ayrıca oksidatif stresin azaltılmasında CAPE'nin iyileştirici etkilerini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Song vd., 2012). Antiproliferatif, antibakteriyel, antiparazitik ve antioksidan aktiviteleri nedeniyle farmakolojik açıdan ilgi çekici bir bileşik olarak

değerlendirilmektedir (Alday-Provencio vd., 2015). CAPE'nin serbest radikalleri azaltarak antioksidan enzimlerle sinerjik şekilde çalışması ve bu enzimlerin tüketimini önlemesi de önemli bir biyolojik avantajdır (Ogeturk vd., 2005). Literatürde CAPE'nin sperm fonksiyonları, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerindeki etkilerine yönelik çalışmaların sınırlı olması, bu konuda yapılacak araştırmalara önemli bir yenilik ve özgünlük kazandıracaktır.

Tez çalışmamızın amacı ülkemizin önemli köpek ırklarından olan Akbaş Çoban Köpeği spermasının kriyopreservasyonunda sulandırıcıya ilave edilen farklı dozdaki Kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in motilite, anormal ve ölü-canlı spermatozoon oranı, membran bütünlüğü, oksidatifstres parametreler ile DNA hasarı üzerine ne derecede etki edebileceğinin ortaya konması amaçlanmaktadır.

## **2. MATERYAL ve METOT**

### **2.1. Araştırmada Kullanılan Hayvan Materyali ile Bakım ve Beslenme Koşulları**

Bu alışmada, Eskişehir y6resinde bulunan, 1.5–3 yaş arasında, sağlıklı, fertilitesi normal ve androlojik muayenelerinde herhangi bir patoloji belirlenmeyen 6 adet Akbaş ırkı erkek k6pek kullanılmıştır. Çalışmada yer alan hayvanlar 6zel bir çiftliğe ait olup aynı çevresel koşullarda barındırılmış ve aynı standart bakım-beslenme programı uygulanmıştır. Hayvanların g6nl6k bakımı ve beslenmeleri çiftlik personeli tarafından y6r6t6lm6řt6r.

### **2.2. Sperma Toplama İşlemi**

Sperma 6rneklerinin alınması sırasında, k6peklerin libidosunu uyarmak amacıyla kızgın bir dişinin varlığı sağlanmıştır. 6rnekler Eyl6l ayı boyunca toplanmıştır. Toplanan ejak6latlar; hacim (ml), yoğunluk ( $10^9$ /ml), motilite (%), anormal spermatozoon oranı (%), 6l6 spermatozoa oranı (%) ve pH parametreleri y6n6nden değerlendirilmif ve yalnızca normospermik 6zellik g6steren ejak6latlar çalışmaya dahil edilmiştir. Sperma, elle masaj tekniği kullanılarak toplanmıştır. Bu amaçla erkek k6peğe sağ tarafından yaklaşılmış, prepusyum 6zerinden penis ve bulbus glandis b6lgesine masaj uygulanmıştır. Bulbus glandis belirgin Şekilde Őiřtięinde prepusyum geri ekilmif ve masaja devam edilmiştir. Ardından penis arka bacakların arasına doğru y6nlendirilerek ejak6lat elde edilmiştir Her hayvandan haftada bir kez olmak 6zere toplam altı tekrar yapılmış, yoğunluğu  $\geq 400 \times 10^6$  spermatozoa/ml ve motilitesi  $\geq 80$  olan ejak6latlar birleştirilerek (pooling) sulandırma ve dondurma aşamalarında kullanılmıştır (S6nmez, 2022).

### **2.3. Spermının Sulandırılması ve Kriyoprezervasyonu**

Toplama kaplarından deney t6plerine aktarılan ve birleştirilen spermalarda yoğunluk tayini yapıldıktan sonra 6rnekler d6rt eşit hacme ayrılmıştır. Her grup için 6nceden hazırlanmış Tris bazlı sulandırıcı kullanılmış ve antioksidan olarak farklı konsantrasyonlarda CAPE ilave edilmiştir. Kriyoprotektan olarak % 6 gliserol içeren sulandırıcı ile nihai sulandırma gerekleştirilmifdir.

Tris stok solüsyonunun hazırlanmasında aşağıdaki bileşenler kullanılmıştır:

\* Trisma base: 3.63 g

\* Sitrik asit: 1.82 g

\* Glikoz: 0.5 g

\* Penisilin: 100.000 IU/ml

\* Streptomisin: 100 mg/ml

Tüm bileşenler bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanarak Tris–sitrik asit–glikoz solüsyonu elde edilmiştir (Evans ve Maxwell, 1987). Temel sulandırıcının osmolaritesi 310 mOsm olarak ölçülmüştür.

Çalışma grupları aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur:

Grup I (Kontrol): Tris–sitrik asit–glukoz– %16 yumurta sarısı–penisilin–streptomisin– %6 gliserol

Grup II (CAPE 50): Kontrol sulandırıcısı + 50 µg/ml CAPE

Grup III (CAPE 100): Kontrol sulandırıcısı + 100 µg/ml CAPE

Grup IV (CAPE 200): Kontrol sulandırıcısı + 200 µg/ml CAPE

Sulandırma sonrasında örnekler hızla laboratuvara ulaştırılmış, gliserolizasyonun ardından 5°C'de 1.5 saat dengelemeye bırakılmıştır. Daha sonra 5°C'deki örnekler 0.25 ml'lik payetlere çekilmiş ve –110°C'de sıvı azot buharında 12 dakika süreyle dondurulmuştur. Farklı renklerdeki payetler grupların tanımlanması için kullanılmış ve örnekler analiz gününe kadar –196°C'de sıvı azotu içinde saklanmıştır. Çözdürme işlemi 37°C su banyosunda 30 saniyede gerçekleştirilmiştir.

## **2.4. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi**

Her bir grup için altı payet olmak üzere toplam 24 dondurulmuş sperma örneği analiz edilmiştir. Çözdürülen spermalarda motilite, morfolojik bütünlük, oksidatif stres göstergeleri ve DNA hasarı parametreleri incelenmiştir.

### **2.4.1. Motilite Tayini**

Motilite değerlendirmesi için faz-kontrast mikroskopun 37°C'ye ayarlanmış ısıtmalı tablasına bir lam yerleştirilmiştir. Lam üzerine izotonik solüsyonla hafifçe seyreltilmiş

sperma, toplu iğne başı büyüklüğünde bir damla halinde konmuş ve lamel ile kapatılmıştır. Mikroskopta önce 100x ile görüntüleme sağlanmış, ardından 200x ve 400x büyütmelerde inceleme yapılmıştır. Her örnek için en az üç ayrı mikroskop alanında değerlendirme yapılarak doğrusal ve düzenli ilerleyen spermatozoonların toplam spermatozoon sayısına oranı yüzde (%) olarak kaydedilmiştir (Hafez, 1987).

#### **2.4.2. Anormal Spermatozoon Oranının Belirlenmesi**

Spermatozoon morfolojisi Giemsa boyama yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Lam üzerine 10 µL sperma damlatılarak froti hazırlanmış ve yatay konumda kurutulmuştur. Kuruyan preparatlar alkol ile fikse edilmiş, ardından tekrar kurutulmuştur. Boyama aşamasında, Giemsa solüsyonu tüm yüzeyi kaplayacak şekilde uygulanmış ve lamlar 45 dakika süreyle bu boyada bekletilmiştir. Daha sonra lamlar yıkanarak temizlenmiş ve kurutma kabında tamamen kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan preparatlar 400x büyütmede incelenmiş ve her lamda 400 spermatozoon sayılarak anormal spermatozoon oranı yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Baş, orta kısım ve kuyruk bölgesine ait anomaliler ile toplam anomali oranları ayrı ayrı değerlendirilmiş ve kaydedilmiştir (Watson, 1975).

#### **2.4.3. Hipo-Osmotik Eosin (HE) Testi Analizi**

Sperma örneklerinde canlı-ölü spermatozoon oranının ve membran bütünlüğünün eş zamanlı olarak değerlendirilmesi amacıyla HE testi uygulanmıştır. Test için 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletilen 100 mOsm'luk HOST çözeltisinden 1 mL, Eppendorf tüplere alınmış ve üzerine 10 µL sperma numunesi eklenmiştir. Daha sonra eosin boyası ilave edilerek karışım örnekler 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra karışımdan bir damla lam üzerine aktarılmış, frotiler hazırlanarak hızlı bir şekilde kurutulmuştur. Hazırlanan preparatlar mikroskopta 400x büyütmede değerlendirilmiş ve her bir spermatozoon, baş kısmının boyanma durumu ile kuyruk bölgesinde şişme veya kıvrılma bulunup bulunmadığına göre dört kategoriye ayrılmıştır:

Tip I: Kuyruk şişmiş, baş bölgesi boyanmamış (H<sup>+</sup>/E<sup>-</sup>)

Tip II: Kuyruk şişmemiş, baş bölgesi boyanmamış (H-/E-)

Tip III: Kuyruk şişmiş, baş kısmı boyanmış (H+/E+)

Tip IV: Kuyruk şişmemiş, baş kısmı boyanmış (H-/E+) (Gündoğan vd., 2010).

#### *Eosin Boyasının Hazırlanışı*

Eosin-Y: 1.67 g

Sodyum sitrat: 2.9 g

Distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak çözelti hazırlanmıştır.

#### *HOS Test Çözeltisinin Hazırlanışı*

Fruktoz: 0.9 g

Sodyum sitrat: 0.49 g Distile su ile toplam hacim 100 mL olacak şekilde tamamlanmış ve 100 mOsm/kg osmolaritede HOST solüsyonu elde edilmiştir.

## **2.5. DNA Hasarının Belirlenmesi**

Bu çalışmada spermatozoon DNA bütünlüğünün değerlendirilmesinde Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE), diğer adıyla Comet Assay yöntemi uygulanmıştır. Bu teknik, farklı moleküler yapıya ve elektrik yüküne sahip DNA parçalarının alkali ortamda elektrik alanı boyunca göç etmesi prensibine dayanır. Elektroforez sonunda oluşan “kuyruklu yıldız” benzeri DNA görüntüleri, hücrelerdeki hasar düzeyini yansıtır ve bu görüntülerin analizi yöntemin temel değerlendirme aşamasını oluşturur. Prosedür, birbirini izleyen birden fazla deneysel basamaktan oluşan sistematik bir yaklaşımdır (Singh vd., 2003).

### **2.5.1. Spermanın Yıkama ve Hazırlanması**

Çözdürme işlemi için dondurulmuş payetler 37°C'de 30 saniye bekletildikten sonra Eppendorf tüplerine alınmıştır. Örnekler, kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS ile 1:1 oranında karıştırılarak 10 dakika santrifüj edilerek ilk yıkama yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra aynı işlem tekrarlanmış ve ikinci yıkama sonunda elde edilen pellete PBS eklenerek spermatozoalar  $20 \times 10^6$  hücre/mL yoğunlukta süspanse edilmiştir (Nandre, 2007). Comet Assay slayt hazırlığı için öncelikle %0.75 düşük erime noktalı agar (LMA) kullanılarak lam üzerinde temel agar tabakası oluşturulmuş ve oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır. Hazırlanan sperma süspansiyonundan 5 µL

alınmış, 37°C’de eritilmiş %1’lik LMA jelinin 85 µL’siyle karıştırılarak ilk agar tabakasının üzerine yayılmış ve lamel ile kapatılmıştır. +4°C’de bekletilerek jel tamamen katılaştırılmış, ardından lameller dikkatlice kaldırılarak slaytlar lizis aşamasına hazır hale getirilmiştir (Hughes vd., 1997; Singh vd., 2003).

### **2.5.2. Lizis İşlemi**

Hazırlanan slaytlar, agar jel içerisine gömülü hücrelerin membranlarının parçalanması ve nükleer yapıların açığa çıkarılması amacıyla lizis solüsyonuna (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 10 mM Tris, %1 Triton X-100; pH 10) dik konumda yerleştirilmiş ve +4°C’de yaklaşık 1 saat bekletilmiştir. Ardından lizis ortamına 40 mM dithioeritritol (DTT) eklenmiş ve aynı sıcaklıkta 1 saat daha inkübasyon yapılmıştır. Son aşamada, DNA-protein bağlarının tamamen ayrılması için 100 µg/mL proteinaz K eklenmiş ve slaytlar 37°C’de bir gece inkübe edilmiştir (Hughes vd., 1997; Singh vd., 2003).

### **2.5.3. Elektroforez Aşaması**

Lizis sonrası slaytlar, DNA zincirlerinin ayrılması için taze hazırlanmış soğuk elektroforez tamponunda 20 dakika alkali denatürasyona bırakılmıştır. Bu tampon 300 mM NaOH ve 1 mM EDTA içerecek şekilde hazırlanmış ve pH 12.5’e ayarlanmıştır. Denatürasyonu takiben slaytlar aynı tamponda elektroforez tankına yerleştirilmiş ve 300 mA akım ile 20 V gerilim altında 20 dakika elektroforeze tabi tutulmuştur. Böylece hasarlı DNA parçalarının elektrik alanında kuyruk formu oluşturacak şekilde göç etmesi sağlanmıştır (Hughes vd.,1997; Singh vd.,2003).

### **2.5.4. Nötralizasyon ve Boyama**

Elektroforez sonrasında alkali ortamın uzaklaştırılması amacıyla slaytlar 40 mM Tris-HCl (pH 7.4) içeren tamponla yıkanarak nötralize edilmiştir. Nötralizasyonu takiben DNA’nın floresan olarak görüntülenebilmesi için slaytlar 5 µg/mL ethidium bromide ile boyanmıştır (Hu vd.,2008).

### **2.5.5. Slaytların Değerlendirilmesi**

Boyanan preparatlar lamel ile kapatılarak floresan ataçmanlı mikroskop (Olympus CX-31) altında 400× büyütmede incelenmiştir. Her slaytta beş farklı alan taranmış ve toplam 100 hücrenin görüntüsü kaydedilerek değerlendirilmiştir. Dijital görüntü analizleri TriTek CometScore 1.5 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm işlemler, DNA'nın ışığa duyarlılığı nedeniyle karanlık oda koşullarında yürütülmüştür (Avdatek vd.,2018).

### **2.6. Biyokimyasal Analizler**

Spermatozoon örneklerinde oksidatif stres ve antioksidan kapasiteyi değerlendirmek amacıyla çeşitli biyokimyasal parametreler analiz edilmiştir. Lipid peroksidasyonunun belirteci olan malondialdehit (MDA) düzeyi, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonuna dayanan klasik kolorimetrik yöntemle belirlenmiş ve absorban 532 nm'de ölçülmüştür (Draper and Hadley, 1990). Glutasyon (GSH) konsantrasyonu ise Ellman yöntemine göre ölçülmüş; DTNB ile reaksiyona giren sülfidril gruplarının oluşturduğu renk değişimi spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir (Sedlak ve Lindsay, 1968).

Toplam antioksidan kapasite (TAS), toplam oksidan seviye (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) ticari kitler (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak belirlenmiştir. TAS analizleri 660 nm, TOS analizleri ise 560 nm dalga boyunda ölçülmüştür. OSI değeri TOS/TAS oranı üzerinden hesaplanmıştır (Erel, 2004; 2005). Tüm ölçümler, üretici protokollerine uygun şekilde ve her parametre için üç tekrar yapılarak gerçekleştirilmiş; sonuçlar ortalama ± standart hata (SE) olarak sunulmuştur.

### **2.7. İstatistiksel Analiz**

Elde edilen veriler SPSS yazılımı (IBM SPSS Statistics 13, IBM Corp., Armonk, NY, USA) ile analiz edilmiştir. Verilerin dağılım özellikleri Shapiro–Wilk ve Kolmogorov–Smirnov testleriyle değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren veriler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmış, varyans homojenliği Levene testi ile kontrol edilmiştir. Homojen varyanslı gruplarda Duncan çoklu karşılaştırma testi, homojen olmayanlarda ise Tamhane's T2 testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Dondurma-Çözdürme Sonrası Motilite ve Anormal Spermatozoon Oranı

Çalışmamızda elde edilen sübjektif motilite değerleri ile anormal spermatozoon oranlarına ilişkin bulgular Çizelge 3.1’de sunulmuştur. Sübjektif motilite açısından değerlendirildiğinde, kontrol grubuna kıyasla 100 ve 200 µg/ml CAPE ilavesi yapılan gruplarda gözlenen artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (P<0.05). Orta kısım anomalileri ve toplam anormal spermatozoon oranları bakımından ise, kontrol grubuna göre 200 µg/ml CAPE içeren grupta tespit edilen azalmanın istatistiksel açıdan önemli olduğu saptanmıştır (P<0.05).

Çizelge 3.1. Dondurma-Çözdürme Sonrası Motilite ve Anormal Spermatozoon Oranı (± SEM, n:24).

Gruplar	Motilite (%)	Baş (%)	Orta Kısım (%)	Kuyruk (%)	Toplam (%)
Kontrol	40,00±4,47 <sup>c</sup>	3,25±1,40	2,67±1,32 <sup>ab</sup>	5,83±1,40	11,75±1,86 <sup>ab</sup>
50 µg/ml	35,00±3,16 <sup>d</sup>	3,33±1,25	3,41±0,49 <sup>a</sup>	5,91±1,71	12,66±2,40 <sup>a</sup>
100 µg/ml	47,50±5,24 <sup>b</sup>	2,83±0,68	2,08±0,49 <sup>b</sup>	4,91±1,15	9,83±1,40 <sup>bc</sup>
200 µg/ml	52,50±2,73 <sup>a</sup>	2,41±0,73	1,66±0,60 <sup>b</sup>	4,25±1,44	8,33±2,04 <sup>c</sup>
<b>p</b>	<b>0,000</b>		<b>0,008</b>		<b>0,005</b>

a-d: Her bir sütündeki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir p<0,05

### 3.2. Dondurma-Çözdürme Sonrası HE-Test Değerleri

Araştırmamıza ait HE-test bulguları Çizelge 3.2’de verilmiştir. H+/E– oranı değerlendirildiğinde, kontrol grubuna kıyasla CAPE içeren tüm gruplarda anlamlı düzeyde bir artış saptanmıştır (P<0.05). H–/E– kategorisinde ise kontrol grubuna göre 200 µg/ml CAPE uygulanan grupta belirgin bir artış görülmüştür (P<0.05). H+/E+ sonuçları incelendiğinde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 100 µg/ml CAPE ilavesi yapılan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir yükseliş olduğu belirlenmiştir (P<0.05). Bununla birlikte, H–/E+ değerleri açısından tüm antioksidan içeren gruplarda kontrol grubuna göre kaydedilen düşüşün de istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (P<0.05).

**Çizelge 3.2.** Dondurma-Çözdürme Sonrası HE-test Değerleri ( $\bar{X} \pm \text{SEM}$ , n:24)

Gruplar	H+/E- (%)	H-/E- (%)	H+/E+ (%)	H-/E+ (%)
<b>Kontrol</b>	21,66±1,96 <sup>d</sup>	20,83±1,16 <sup>b</sup>	29,66±2,16 <sup>bc</sup>	27,83±2,99 <sup>a</sup>
<b>50 µg/ml</b>	26,33±2,80 <sup>c</sup>	21,83±1,16 <sup>ab</sup>	31,83±1,47 <sup>ab</sup>	20,00±4,47 <sup>b</sup>
<b>100 µg/ml</b>	32,33±1,63 <sup>b</sup>	20,83±2,04 <sup>b</sup>	33,83±2,48 <sup>a</sup>	13,00±3,57 <sup>c</sup>
<b>200 µg/ml</b>	35,83±2,13 <sup>a</sup>	23,83±2,48 <sup>a</sup>	28,33±2,80 <sup>c</sup>	12,00±2,19 <sup>c</sup>
<b>p</b>	<b>0,000</b>	<b>0,029</b>	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>

a-d: Her bir sütundaki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir p<0,05 \* H+/E-: Kuyruk şişmiş, baş boya almamış, H-/E-: Kuyruk şişmemiş, baş boya almamış, H+/E+: Kuyruk şişmiş, baş boya almış, H-/E+: Kuyruk şişmemiş, baş boya almış

### 3.3. Dondurma-Çözdürme Sonrası DNA Hasar Bulguları

Çözüm sonrası değerlendirilen DNA hasarına ilişkin sonuçlar Çizelge 3.3'te sunulmuştur. Tail length parametresi incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla 100 ve 200 µg/ml CAPE uygulanan gruplarda gözlenen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (P<0.05). Tail DNA oranı açısından değerlendirildiğinde, 200 µg/ml CAPE içeren grupta tespit edilen düşüşün anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür (P<0.05). Benzer şekilde, Tail moment değerlerinde de kontrol grubuna göre 100 ve 200 µg/ml CAPE ilavesi yapılan gruplarda meydana gelen azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır (P<0.05).

Çizelge 3.3. Dondurma-Çözdürme Sonrası DNA Hasar Bulguları ( $\bar{X} \pm \text{SEM}$ , n:24)

Gruplar	Tail Length (µm/s)	Tail DNA (%)	Tail Moment (µm/s)
<b>Kontrol</b>	19,04±0,62 <sup>a</sup>	43,92±1,40 <sup>a</sup>	13,49±0,72 <sup>a</sup>
<b>50 µg/ml</b>	18,82±0,50 <sup>a</sup>	43,61±3,67 <sup>a</sup>	13,33±1,02 <sup>a</sup>
<b>100 µg/ml</b>	16,10±1,16 <sup>b</sup>	42,13±2,17 <sup>a</sup>	11,42±1,28 <sup>b</sup>
<b>200 µg/ml</b>	15,04±0,60 <sup>c</sup>	36,83±3,61 <sup>b</sup>	10,64±0,40 <sup>b</sup>
<b>p</b>	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>

a-c: Her bir sütündeki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir p<0,001 \*\*

### 3.4. Dondurma-Çözdürme Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri

Dondurma-çözdürme işlemi sonrasında elde edilen oksidatif stres parametrelerine ilişkin bulgular Çizelge 3.4'te sunulmuştur. MDA düzeyleri incelendiğinde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında antioksidan (CAPE) içeren tüm gruplarda gözlenen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). GSH konsantrasyonları değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre 100 ve 200  $\mu\text{g/ml}$  CAPE uygulanan gruplarda kaydedilen düşüşün de istatistiksel açıdan önemli olduğu saptanmıştır ( $P<0.05$ ). Toplam antioksidan kapasitesini yansıtan TAS değerleri bakımından, kontrol grubuna kıyasla 100 ve 200  $\mu\text{g/ml}$  CAPE ilave edilen gruplarda görülen azalma anlamlı bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Buna karşılık, toplam oksidan yükü gösteren TOS seviyeleri ile oksidatif dengeyi ifade eden OSI değerleri açısından aynı CAPE konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda kontrol grubuna oranla belirgin artışların meydana geldiği ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ).

**Çizelge 3.4.** Dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametreleri ( $\bar{X} \pm \text{SEM}$ , n:24).

a-c: Her bir sütundaki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir  $p<0,05$

Gruplar	MDA nmol/ml	GSH mg/ml	TAS (mmolTrolox Equiv./L)	TOS ( $\mu\text{mol}$ hidrojenperok sit-Equiv./L)	OSI
<b>Kontrol</b>	60.53 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>	64.90 $\pm$ 1.82 <sup>c</sup>	7.165 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	12.62 $\pm$ 0.009 <sup>a</sup>	1,761 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>
<b>50 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	55.27 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	62.12 $\pm$ 1.20 <sup>b,c</sup>	7.160 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	12.58 $\pm$ 0.023 <sup>a</sup>	1.757 $\pm$ 3.40 <sup>a</sup>
<b>100 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	55.87 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	58.74 $\pm$ 1.23 <sup>a,b</sup>	7.145 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	12.85 $\pm$ 0.010 <sup>b</sup>	1.798 $\pm$ 1.90 <sup>b</sup>
<b>200 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	55.62 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>	57.48 $\pm$ 1.64 <sup>a</sup>	7.139 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	12.88 $\pm$ 0.029 <sup>b</sup>	1.804 $\pm$ 4.10 <sup>b</sup>
<b>p</b>	<0,001	0,009	<0,001	<0,001	<0,001

#### 4.TARTIŞMA

Dondurma-çözdürme işleminin sonrasında spermada antioksidan savunmanın zayıflaması ve reaktif oksijen türlerinin artması, spermatolojik özellikler ile fertilité üzerinde olumsuz etkilere yol açmaktadır. Bu süreçten geçen spermatozoonlar, taze örneklerle kıyasla lipid peroksidasyonuna daha açık hale gelmektedir. Güncel çalışmalar, spermın depolanması sırasında karşılaşılan infertilitenin başlıca nedenlerinden birinin, plazma membranındaki lipidlerin peroksidasyonuna bağlı hasar olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle, köpek spermasının kriyoprezervasyonunda çözdürme sonrası kaliteyi iyileştirme potansiyeli göz önünde bulundurularak sulandırıcılara çeşitli antioksidan bileşiklerin ilavesi önerilmektedir (Chen vd.,1993; Sinha vd.,1996).

Çözüm sonrası çalışmamızda elde edilen bulgulara bakıldığında uygulanan farklı konsantrasyonların hem spermatozoon motilitesi hem de morfolojik bütünlük üzerinde belirgin ve doz bağımlı etkiler oluşturduğunu göstermektedir. Çalışmada en yüksek motilite değerinin 200 µg/ml grubunda tespit edilmesi, bu dozun spermatozoanın hareket yeteneğini destekleyici bir etki oluşturduğuna işaret etmektedir. Benzer şekilde 100 µg/ml grubunda da motilitenin kontrol ve düşük doz grubuna kıyasla anlamlı biçimde artmış olması, uygulamanın belirli bir konsantrasyon aralığında motiliteyi olumlu yönde bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Motilitedeki bu iyileşme, muhtemelen hücre membran bütünlüğünün korunması veya oksidatif strese karşı savunmanın güçlenmesiyle ilişkilendirilebilir. Morfolojik değerlendirmeler de motilite bulgularını destekler niteliktedir. Özellikle baş anomalilerinin 200 µg/ml ve 100 µg/ml gruplarında anlamlı düzeyde azalması, bu konsantrasyonların spermatozoon morfolojisi üzerinde koruyucu bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Artan dozla birlikte orta kısım ve kuyruk anomalilerinde gözlenen azalma eğilimi, spermının yapısal stabilitesinin iyileştiğini düşündürmektedir. Morfolojik bozuklukların toplam oranının en düşük 200 µg/ml grubunda olması, yüksek dozun hücresel bütünlük açısından en etkili düzey olduğunu desteklemektedir. Gündoğan vd. (2021), Merinos koçlarına ait sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonlarda CAPE ilave ettikleri çalışmalarında, 100 µg/ml CAPE grubunun kontrol ve diğer uygulama gruplarına kıyasla spermatozoon motilitesi ile anormal spermatozoon oranı açısından daha üstün bir koruyucu etki sağladığını

bildirmişlerdir. Bu çalışmada da bizim çalışmamızda olduğu gibi doz bağımlı olarak en yüksek dozda en iyi koruma sağlanması açısından benzerlik olduğu görülmektedir.

Uygulanan farklı konsantrasyonların spermatozoonların membran bütünlüğü ve canlılığı üzerinde belirgin etkiler oluşturmaktadır. En kritik parametre olan H+/E- (membranı sağlam-canlı spermatozoon) oranı, doz artışına bağlı olarak düzenli bir yükseliş göstermiş ve en yüksek değer 200 µg/ml grubunda elde edilmiştir. Bu sonuç, özellikle yüksek dozun canlı spermatozoonlarda membran bütünlüğünün korunmasına en güçlü katkıyı sağladığını göstermekte olup, hücrel viabilite açısından olumlu bir etkidir. Buna karşın H-/E-, yani canlı ancak membranı hasarlı spermatozoon oranı gruplar arasında daha sınırlı düzeyde değişmekle birlikte 200 µg/ml grubunda en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Bu bulgu, yüksek dozun bir kısmı canlı kalmaya devam eden spermatozoonlarda membran bütünlüğünü koruma açısından tam olarak yeterli olmayabileceğini düşündürmektedir. Ölü spermatozoonların değerlendirildiği kategoriler incelendiğinde, H+/E+ oranı (ölü ancak membranı sağlam spermatozoonlar) 100 µg/ml grubunda en yüksek düzeye ulaşmıştır. Bu durum, orta konsantrasyonun bazı spermatozoonlarda membranı korusa da hücrel ölümün tamamen engellenemediğine işaret edebilir. Buna karşılık H-/E+, yani ölü ve membranı hasarlı spermatozoon oranı, doz arttıkça belirgin biçimde azalmış ve en düşük seviyeler 100 ve 200 µg/ml gruplarında görülmüştür. Bu durum, özellikle yüksek dozun ölü hücrelerdeki yapısal bozulmayı sınırlayarak hücrel dejenerasyonu azalttığını düşündürmektedir. Bu iyileşme, spermanın dondurulma aşamasında gerçekleşen fosfolipid faz değişimleri ve ROS kaynaklı oksidatif yükün azaltılmasının bir sonucu olarak yorumlanabilir. Bulgularımız, Namula vd. (2018), tarafından domuz spermasının kriyoprezervasyonunda 100 µM kafeik asit eklenmesinin motilite, canlılık ve membran bütünlüğünü anlamlı düzeyde iyileştirdiğini bildiren çalışma ile yüksek düzeyde örtüşmektedir. Benzer şekilde Soleimanzadeh vd. (2020), mandalarda kafeik asit ilavesinin çözüm sonu motiliteyi ve oksidatif stres parametrelerini olumlu yönde etkilediğini rapor etmiş; bu durum çalışmamızda gözlenen membran ve canlılık parametrelerinin iyileşmesiyle paralellik sergilemektedir.

DNA hasarına baktığımızda uygulanan farklı dozların spermatozoonlarda DNA bütünlüğü üzerinde önemli etkiler oluşturduğu görülmektedir. Tail Length, Tail DNA (%)

ve Tail Moment gibi comet assay parametreleri DNA hasarının düzeyini yansıtan temel göstergelerdir. Genel eğilim, artan konsantrasyonun DNA hasarını azaltıcı bir etki oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Öncelikle Tail Length değerleri değerlendirildiğinde, kontrol grubunda 19,04  $\mu\text{m/s}$  olarak ölçülen kuyruğun uzama uzunluğunun, doz artışıyla birlikte anlamlı şekilde azaldığı ve en düşük düzeye 200  $\mu\text{g/ml}$  grubunda ulaştığı görülmektedir (15,04  $\mu\text{m/s}$ ;  $p=0,000$ ). Kuyruk uzunluğundaki bu azalma, DNA zincir kırıklarının ve elektroforez sırasında DNA göçünün azaldığını gösterdiğinden, yüksek doz uygulamasının DNA bütünlüğünü daha iyi koruduğuna işaret etmektedir. Benzer şekilde Tail DNA (%) değerleri de 200  $\mu\text{g/ml}$  grubunda belirgin şekilde düşerek (36,83%) en düşük seviyeye ulaşmıştır ( $p=0,001$ ). Kuyruk bölgesine geçen DNA yüzdesinin azalması, daha az parçalanmış DNA anlamına geldiğinden bu bulgu yüksek dozun DNA hasarını azaltmada belirgin bir koruyucu etki sağladığını desteklemektedir. DNA hasarını bütüncül olarak değerlendiren önemli bir parametre olan Tail Moment, hem DNA kırıklarının miktarını hem de göç uzaklığını birlikte yansıtmaktadır. Bu parametre açısından da 200  $\mu\text{g/ml}$  ve 100  $\mu\text{g/ml}$  gruplarında anlamlı düşüşler gözlenmiş olup en düşük değer 200  $\mu\text{g/ml}$  grubunda kaydedilmiştir (10,64  $\mu\text{m/s}$ ;  $p=0,000$ ). Bu sonuç, yüksek konsantrasyonun DNA stabilitesini en iyi şekilde koruduğunu ve hasarı minimize ettiğini göstermektedir. Bu bulgular, uygulanan maddenin belirli dozlarda antioksidan veya DNA koruyucu etkiler gösterebileceğini desteklemekte; özellikle 200  $\mu\text{g/ml}$  dozunun DNA bütünlüğünün korunmasında en etkili konsantrasyon olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle yüksek dozun, dondurma-çözdürme veya diğer stres koşullarının oluşturduğu oksidatif yük altında spermatozoon DNA'sını daha etkin şekilde stabilize ettiği sonucuna varılabilir. DNA hasarının azalması, hem membran bütünlüğünün korunmasından hem de antioksidan kapasitenin artmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayla vd. (2018)'nin insan spermatozoonları üzerinde CAPE ile gerçekleştirdikleri inkübasyon çalışmasında, CAPE'nin hem MDA seviyelerini düşürdüğü hem de DNA bütünlüğünü koruduğu bildirilmiştir. Gündoğan vd. (2021)'nin koçlarda sulandırıcıya CAPE ilave ettikleri çalışmalarında doza bağımlı olarak en yüksek doz olan 100  $\mu\text{g/ml}$  grubun DNA hasarını önemli dercede azalttığı bildirilmektedir. Bu bulgu, çalışmamızda yüksek konsantrasyonlarda gözlenen DNA hasarı azalması ile doğrudan uyumludur. Son olarak Ceylan vd. (2020), ratlarda sisplatin'e bağlı DNA hasarının CAPE tarafından anlamlı düzeyde azaltıldığını ortaya koymuş, bu bulgu

çalışmamızdaki DNA bütünlüğü parametreleriyle doğrudan ilişkilendirilebilir. Antioksidan bileşiklerin spermatozoon DNA'sını ROS aracılı zincir reaksiyonlarına karşı koruduğu bilinmekte olup, bu etkinin özellikle kriyojenik stres altında daha belirgin hale geldiği düşünülmektedir.

Oksidatif stres parametreleri yönünden çalışmamızı değerlendirdiğimizde ise farklı dozlarda sulandırıcıya ilave edilen CAPE'in spermatozoonlarda oksidatif dengeyi anlamlı biçimde etkilediği görülmektedir. MDA düzeyleri, lipid peroksidasyonunun başlıca göstergesi olarak hücrel membran hasarını yansıtır. Kontrol grubunda en yüksek düzeyde olan MDA'nın, tüm uygulama gruplarında anlamlı biçimde düştüğü ve özellikle 50, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında birbirine yakın düşük değerler sergilediği görülmektedir ( $p<0,001$ ). Bu durum, uygulanan maddenin lipid peroksidasyonunu baskılayarak membran bütünlüğünü koruduğunu ve oksidatif hasarı azalttığını göstermektedir. Oksidatif stres parametrelerinin değerlendirilmesi, uygulanan bileşiğin biyokimyasal etkilerini anlamak açısından önemli bir veri sağlamıştır. Çalışmamızda kontrol grubunda yüksek saptanan MDA düzeylerinin tüm uygulama gruplarında anlamlı bir şekilde düşmesi, lipid peroksidasyonunun baskılandığını göstermektedir. Bu durum, CAPE ve türevlerinin testis dokusu ve spermatozoon hücrelerinde oksidatif hasarı azaltıcı etkilerinin gösterildiği birçok çalışma ile uyumludur. Örneğin Okutan vd. (2005), diyabetik ratların kalp dokusunda artan oksidatif stresin CAPE uygulamasıyla gerilediğini bildirmiştir. Benzer şekilde Mercantepe vd. (2018), sisplatin toksisitesine maruz bırakılan ratlarda CAPE tedavisinin testisteki histopatolojik hasarı belirgin şekilde azalttığını ortaya koymuştur. Bu çalışmalar, çalışmamızda MDA seviyelerindeki düşüş ile güçlü bir paralellik sergilemektedir. Antioksidan savunmanın önemli bir bileşeni olan GSH düzeyleri ise doza bağlı bir azalma eğilimi göstermiş ve en düşük düzeye 200 µg/ml grubunda ulaşmıştır ( $p=0,009$ ). GSH'daki bu düşüş, yüksek dozlarda artan reaktif oksijen türlerinin nötralize edilmesi için GSH tüketiminin arttığını düşündürmektedir. Bir diğer ifadeyle, uygulanan maddenin oksidatif yükü azaltıcı etkisine rağmen hücrel savunmanın aktif kullanımda olduğu anlaşılmaktadır. Diğer yandan GSH düzeylerinin yüksek dozlarda düşüş göstermesi, antioksidan glutatyonun ROS nötralizasyonu sırasında tüketilmesiyle açıklanabilir. Erboğa vd. (2016), kadmiyum toksisitesi oluşturulan ratlarda CAPE'nin oksidatif stres belirteçlerini baskılayarak testis dokusunu koruduğunu bildirmiştir; benzer şekilde Özyurt vd. (2006), sigara dumanına maruz kalan ratlarda

CAPE uygulamasının GSH-Px ve diğer antioksidan enzimlerin aktivitesini normalize ettiğini göstermiştir. Abdallah vd. (2012), ratlarda bir pestisit olan cyhalothrin maruziyetinin üreme sistemi ve fertilité üzerindeki olumsuz etkilerini inceledikleri araştırmalarında, CAPE uygulamasının cyhalothrin kaynaklı oksidatif stres artışı ve testiküler toksisiteyi önemli ölçüde hafiflettiğini göstermiştir. Çalışmamızdaki GSH tüketimindeki artış, bu çalışmaların antioksidan sistemin dinamik kullanımına ilişkin sonuçlarıyla uyumludur. Toplam antioksidan kapasiteyi yansıtan TAS değerleri özellikle 100 ve 200 µg/ml gruplarında anlamlı biçimde düşük bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Bu sonuç, yüksek dozlarda antioksidan kapasitenin tüketildiği veya antioksidan rezervlerin daha fazla kullanıldığı şeklinde yorumlanabilir. Benzer şekilde, toplam oksidan düzeylerini gösteren TOS değerleri 100 ve 200 µg/ml gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artış göstermiştir ( $p<0,001$ ). TOS'taki bu artış, yüksek dozun oksidan yükünü artırdığını ve oksidatif dengeyi olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Bu iki parametrenin birleşik hali olan OSI (Oksidatif Stres İndeksi), oksidatif dengeyi bütüncül şekilde değerlendiren en kritik göstergelerden biridir. OSI değerleri 100 ve 200 µg/ml gruplarında anlamlı şekilde yükselmiş ve en yüksek değer 200 µg/ml'de saptanmıştır ( $p<0,001$ ). Bu bulgu, yüksek doz uygulamalarının genel oksidatif stresi artırdığını ve hücresele ortamda pro-oksidan baskının arttığını göstermektedir. Ayrıca TAS değerlerindeki artış ve TOS ile OSI'de yüksek dozlarda saptanan artış, antioksidan ve oksidan sistemler arasındaki hassas dengenin uygulanan dozlara göre değiştiğini göstermektedir. Bu durum, antioksidan bileşiklerin yüksek dozlarında pro-oksidan bir etki gösterebileceğini öne süren literatürle uyumludur. Benzer şekilde Armağan vd. (2008), metotreksat ile oluşturulan testis hasarında CAPE'nin lipid peroksidasyonunu azalttığını, SOD aktivitesini düşürdüğünü ve oksidatif dengeyi düzenlediğini bildirmiştir. Yılmaz vd. (2008), radyografik kontrast madde uygulanan ratlarda CAPE'nin erdostine kıyasla daha güçlü antioksidan koruma sağladığını belirtmiş, bu da çalışmamızda yüksek dozlarda bile oksidatif stres belirteçlerinde gözlenen iyileştirici yönelimle tutarlılık göstermektedir. Huyut vd. (2020), ise doxorubicin ile oluşturulan testis hasarında CAPE ve curcuminin oksidatif stresi belirgin şekilde azalttığını ifade etmiş; bu durum antioksidan etkinin toksisite modellerinde dahi sürdüğünü göstermiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde, çalışmadan elde edilen sonuçlar, antioksidan bileşiğin sperma fonksiyonelliğini hem hücresele hem moleküler düzeyde koruyucu bir etki yarattığını

güçlü biçimde desteklemektedir. Özellikle 50–100 µg/ml konsantrasyonları, spermatozoon membran bütünlüğü, DNA stabilitesi ve oksidatif denge açısından en optimal sonuçları üretmiştir. Buna karşın 200 µg/ml grubunda bazı parametrelerde iyileşme devam ederken oksidatif yükte hafif bir artış eğilimi gözlenmiştir. Bu durum antioksidanların düşük ve orta dozlarda antioksidan, yüksek dozlarda ise pro-oksidan etki gösterebilme olasılığı mevcuttur.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada köpek spermanın dondurularak saklanması spermaya katılan farklı dozlardaki CAPE'in 100 ve 200 µg/ml grubunun spermatozoon motilite, anormal spermatozoon oranı, HOST-Eozin test oranı, oksidatif stres ve DNA hasarı yönünden kontrol ve 50 µg/ml gruba göre en iyi korumayı sağladığı görüldü. Literatür taramalarında bal arısı propolis ekstraktının biyolojik olarak aktif bileşeni olan CAPE köpek sperma sulandırıcısına ilavesi sonucunda spermatolojik parametrelere dair verilere rastlanmadığından konuyla ilgili daha geniş hayvan materyalleri ile başka çalışmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca yapılacak araştırmalarda in-vitro muayene parametrelerinin in-vitro/vivo fertilité parametreleri ile de desteklenmesinin uygun olacağı kanaatine varıldı.

## 6. KAYNAKLAR

- Abdallah, F.B., Fetoui, H, Zribi, N., Fakhfakh, F, Keskes, L. (2012). Protective role of caffeic acid on lambda cyhalothrin-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Toxicol Ind Health*, 28: 639-47.
- Agarwal A., Durairajanayagam, D., Halabi, J., Peng, J., Vazquez-Levin, M. (2014). Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 29: 32– 58.
- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R.K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology*, 3(1): 28.
- Agarwal, A., Prabakaran, S., Allamaneni, S. (2006). What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology*, (67): 2–8.
- Agarwal, A., Saleh, R.A., Bedaiwy, M.A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*, 79(4): 829-843.
- Aitken, R.J., Baker, M.A. (2004). Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(5): 581-588.
- Aitken, R.J., Baker, M.A. (2006). Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250(1-2): 66-69.
- Aitken, R. J., Clarkson, J. S. (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Reproduction*, 81(2): 459-469.
- Alday-Provencio, S., Diaz, G., Rascon, L., Quintero, J., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Astiazaran, H., Hernandez, J., Velazquez, C. (2015). Sonoran propolis and some of its chemical constituents inhibit in vitro growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *Planta Med*, 81(9): 742–747.
- Armagan, A., Uzar, E., Uz, E., Yilmaz, H.R., Kutluhan, S., Koyuncuoglu, H.R., Soyupek, S., Cam, H., Serel, T.A. (2008). Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Hum Exp Toxicol*, 27: 547-52.
- Avdatek, F., Gündoğan, M. (2018). Effects of some antioxidant additives on spermatological parameters, oxidative stress and DNA damage after freezing-thawing process in ram semen. *Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, Fırat Üniversitesi*, 32(2): 135-142.
- Ayla, Ş., Tunalı, G., Bilgiç, B.E., Sofuoğlu, K., Özdemir, A.A., Tanrıverdi, G, Özdemir, S., Soner, B.C., Öztürk, B, Karahüseyinoğlu, S, Aslan, E.G., Seçkin I. (2018). Antioxidant activity of CAPE (caffeic acid phenethyl ester) in vitro can protect human sperm deoxyribonucleic acid from oxidative damage. *Acta Histochemica*, 120(2): 117-121.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S., Marekov, N. (1987). A GC/MS study of the propolis phenolic constituents. *Z Naturforsch*, 42: 147-151.
- Baumber, J., Sabour, K., Vo, A., Ball, B. A. (2003). Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 60(7): 1239-1247.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O.( 2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy organization journal*, 5(1): 9-19.
- Breining, E., Beorlegui, N.B., O’Flaherty, C.M., Beconi, M.T. (2005). Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 63(8): 2126-2135.

- Bucak M.N, Tekin N. (2007). Kriyoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kriyoprotektif etki. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54: 67-72.
- Celli, N., Dragani, L.K., Murzilli, S., Pagliani, T., Poggi, A, (2007). In vitro and in vivo stability of caffeic acid phenethyl ester, a bioactive compound of propolis. *J Agric Food Chem*, 55: 3398– 3407.
- Ceylan, T., Kaymak, E., Cantürk, F., Yakan, B. (2020). Research on the protective effect of caffeic acid phenethyl ester on testicular damage caused by cisplatin. *Turk J Med Sci*, 50: 2032-2039.
- Chen, Y., Foote, R.H., Brockett, C.C. (1993). Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 30(4): 423-431.
- Chen, H.C., Chen, J.H., Chang, C., Shieh, C.J. (2011). Optimization of ultrasoundaccelerated synthesis of enzymatic caffeic acid phenethyl ester by response surface methodology. *Ultrason Sonochem*, 18: 455–459.
- Deichsel K., Palm F., Koblichke P., Budik S., Aurich C. (2008) Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. *Theriogenology*, 69: 940–945.
- Demirci E.(2002). Evcil hayvanlarda reproduksiyon, sun'i tohumlama ve androloji ders notları (1nd ed). *F.Ü.Vet. Fak. Ders Teksiri* No:53 Elazığ
- Draper, H.H., Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 186: 421-430.
- Dutta, J., Dutta, J. (2020). Artificial Insemination in Canines: A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 9(8): 2417–2421.
- Eilts B.E. (2005). Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*, 65: 685-91.
- England, G.C.W. (1993). Cryopreservation of dog semen: A review. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47: 243–255.
- Erboga, M., Kanter, M., Aktas, C., Donmez, Y.B., Erboga, Z.F., Aktas, E., Gurel A. (2016). Anti-Apoptotic and Anti-Oxidant Effects of Caffeic AcidPhenethyl Ester on Cadmium-Induced Testicular Toxicity in Rats. *Biol Trace Elem Res*, 171: 176–184.
- Erel, Ö. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions, *Clin Biochem*, 37(2): 112-119.
- Erel, Ö. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clin Biochem*, 38(12): 1103-1111.
- Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1987). Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Sydney, 194 pp.
- Foote, R.H. (2015). Artificial insemination: History, hurdles, and milestones. 11–22.
- Fraser, L, Strzezek, J. (2005). Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reproduction in Domestic Animals*, 40: 530-36.
- Geva, E., Lessing, J.B., Lerner-Geva, L., Amit, A. (1998). Free radicals, antioxidants and human spermatozoa. *Clinical Implications*. 13(6): 1422-1424.
- Gordon I.R. (2005). Artificial Insemination (Ed) In: Gordon I.R. Reproductive Technologies in Farm Animals. Cambridge. MA, USA.
- Griveau, J.F., Le Lannou, D. (1997). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int. J. Androl*, 20: 61–69.

- Gündoğan, M., Yeni, D., Avdatek, F., Hazman, Ö. (2021). Koçlarda spermaya katılan CAPE'in (caffeic acid phenethyl ester) dondurma ve çözündürme sonrası spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkileri. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3): 270-277.
- Gündoğan, M., Yeni, D., Avdatek, F., Fidan, A.F. (2010). Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Anim. Reprod, Sci*, 122: 200-207.
- Hafez, E.S.E. (1987). Semen Evaluation (5 Ed) In: Hafez, E. S. E. (Ed) *Reproduction in farm animals*. Philadelphia. Lea and Fabiger.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press.
- Henkel, R. (2005). The impact of oxidants on sperm function. *Andrologia*, 37: 205–206.
- Hidalgo, M., Portero, J.M., Demyda-Peyras, S., Ortiz, I., Dorado, J. (2014). Cryopreservation of canine semen after cold storage in a neopor box: Effect of Extender, Centrifugation and Storage Time. *Veterinary Record*, 175: 20.
- Hollinshead, F.K., Hanlon, D.W. (2009). Transcervical insemination in the dog. *Theriogenology*, 72(5): 715–721.
- Holt, W.T. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53: 47-58.
- Holt, W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 62: 3-22.
- Hu, J.H., Li, Q.W., Jiang, Z.L., Li, W.Y. (2008). Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. *Cryobiology*, 57(3): 257-262.
- Hughes, C.M., Lewis, S.E., McKelvey-Martin, V.J., Thompson, W. (1997). Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 374(2): 261-268.
- Huyut, Z., Alp, H.H., Yaman, T., Keleş, Ö.F., Yener, Z., Türkan, F., Ayengin, K. (2020). Comparison of the protective effects of curcumin and caffeic acid phenethyl ester against doxorubicin-induced testicular toxicity. *Andrologia*, 00:e13919.
- Kalkan, O., Uçar, Ö. (2022). Semen Collection, Cryopreservation and Artificial Insemination in Dogs. *Institute of Health Sciences Journal*, 7(1): 61-69.
- Koltuksuz, U., Irmak, M.K., Karaman, A., Uz, E., Var, A., Ozyurt, H., Akyol, O. (2000). Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. *Urol. Res*, 28(6): 360–363.
- Koppers, A.J., De Iuliis, G.N., Finnie, J.M., McLaughlin, E.A., Aitken, R.J. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(8): 3199-3207.
- Maxvell W.M.C., Watson, P.F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci*, 42: 55-65.
- Mercantepe, T., Unal, D., Tümkaya, L., Yazıcı, Z.A. (2018). Protective effects of amifostine, curcumin and caffeic acid phenethyl ester against cisplatin-induced testis tissue damage in rats. *Exp Ther Med*, 15(4): 3404-3412.
- Moustafa, M.H., Sharma, R.K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M.A., Thomas, A.J., Agarwal, A. (2004). Relationship between ROS production, apoptosis and DNA

- denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum. Reprod*, 19 (1): 129–138.
- Namula, M., Hirata, M., Wittayarat, F., Tanihara, N., Thi Nguyen, T., Hirano, M., Nii, T. (2018). Effects of chlorogenic acid and caffeic acid on the quality of frozen-thawed boar sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 53: 1600–1604.
- Nandre, R.M. (2007). Effect of preservation of spermatozoa at sub-zero temperature on DNA integrity by Comet Assay. Master of Veterinary Science, Department Of Animal Biotechnology College Of Veterinary Science And Animal Husbandry Anand Agricultural University, Anand, Gujarat.
- Oehninger, S., Duru, N.K., Srisombut, C., Morshedi, M. (2000). Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 169(1-2): 3-10.
- Ogeturk, M., Kus, I., Colakoglu, N., Zararsiz, I., Ilhan, N., Sarsilmaz, M. (2005). Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 97(2): 273–280.
- Okutan, H., Ozcelik, N., Yilmaz, H.R., Uz, E. (2005). Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clinical Biochemistry*, 38: 191–196.
- Ozyurt, H., Pekmez, H., Parlaktas, B.S., Kus, I., Ozyurt, B., Sarsilmaz, M. (2006). Oxidative stress in testicular tissues of rats exposed to cigarette smoke and protective effects of caffeic acid phenethyl ester. *Asian J Androl*, 8: 189-93.
- Peña, A., Johannisson, A. (1999). Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, 52(6): 965-980.
- Peris, S.I., Bilodeau, J.F., Dufour, M., Bailey, J.L. (2007). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol. Reprod. Dev*, 74: 878–892.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal. B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*, 49: 1603-1616.
- Rice, D., Kennedy, S. (1988). Vitamin E: function and effects of deficiency. *Br. Vet. J.* 144: 482-492.
- Rota, A., Peña, A. I., Linde-Forsberg, C. (2012). Infectious causes of reproductive failure in dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(Suppl 6): 194–202.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M.L., Vanella, A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol*, 16: 91-98.
- Russo, A., Longo, R., Vanella, A. (2002). Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 73(1): S21-29.
- Saleh, R.A., Agarwal, A. (2002). Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practise. *J. Androl.* 23(6): 737–752.
- Sarıözkan, S., Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Taşdemir, U., Kinet, H., Ulutaş, P.A. (2010). Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. *Theriogenology*, 73(3): 316-323.

- Sedlak, J., Lindsay, R.H.C. (1968). Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Anal Biochem*, 25: 192-205.
- Sharafi, M., Borghei-Rad, S.M., Hezavehei, M., Shahverdi, A., Benson, J.D. (2022). Cryopreservation of semen in domestic animals: A review of current challenges, applications, and prospective strategies. *Animals*, 12(23): 3271.
- Sharma, R.K., Agarwal, A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. Clinical review. *Urology*, 48(6): 835-850.
- Shiva Shankar Reddy, N., Jagan Mohanarao, G., Atreja, S.K. (2010). Effect of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm following cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 119: 183-190.
- Sicherle, C.C., de Souza, F.F., Freitas-Dell'Aqua, C.P., Mothé, G.B., Padovani, C.R., Papa, F.O., Lopes, M.D. (2020). Effects of the cryopreservation process on dog sperm integrity. *Animal Reproduction*, 17(1): e20190081.
- Sikka, S.C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Bioscience*, 1: 78-86.
- Silva-Rodríguez, E.A., Sieving, K.E. (2012). Domestic dogs shape the landscape-scale distribution of a threatened forest ungulate. *Biological Conservation*, 150(1): 103-110.
- Singh, N.P., Muller, C.H., Berger, R.E. (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*, 80(6): 1420-1430.
- Sinha, M.P., Sinha, A.K., Singh, B.K., Prasad, R.L. (1996). The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Animal reproduction science*, 41(3-4): 237-243.
- Soleimanzadeh, A., Talavi, N., Yourdshahi, V.S., Bucak, M.N. (2020). Caffeic acid improves microscopic sperm parameters and antioxidant status of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen following freeze-thawing process, *Cryobiology*. 95: 29-35.
- Song, J.J., Lim, H.W., Kim, K., Kim, K.M., Cho, S., Chae, S.W. (2012). Effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative and inflammatory responses in human middle ear epithelial cells. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*, 76(5): 675-679.
- Sönmez, M. (2022). Veteriner Hekimlikte Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları (2 nd ed). F.Ü.Vet. Fak. Ders Teksiri No:53 Elazığ
- Thomassen, R., Farstad, W. (2009). Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding dogs. *Theriogenology*, 71(1): 190-199.
- Tolba, M.F., Azab, S.S., Khalifa, A.E., Abdel-Rahman, S.Z., Abdel-Naim, A.B. (2013). Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: a review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life*, 65(8): 699-709.
- Trounson, A.O. (1990). Cryopreservation. *Brit. Med. Bull.* 147. 427-433 / Bailey J.L, Bilodeau J-F and N. 2000. Corneir Semen Cryopreservation in domestic animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon *J. of And*, 21(1): 1-7.
- Verma, A., Kanwar K.C. (1999). Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro *Asian J Androl*, 1: 151-154.
- Wang, X., Stavchansky, S., Kerwin, S.M., Bowman, P.D. (2010). Structure-activity relationships in the cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and fluorinated derivatives: effects on heme oxygenase-1 induction and antioxidant activities. *Eur J Pharmacol*, 635: 16-22.

- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60: 481-492.
- Watson, P.F. (1975). Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Veterinary Record*, 97: 12-15.
- White, I.G. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation. *Reprod. Fertil. and Dev.* 5(6): 639–658.
- Widjaja, A., Yeh, T.H., Ju, Y.H. (2008). Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester. *J Chin Inst Chem Eng*, 39: 413-418.
- Yılmaz, H.R, Uz, E., Yeşildağ, A., Özden, A., Sırmalı, R., Ağackiran, Y., Vural, H. (2008). Effects of caffeic acid phenethyl ester and erdosteine on radiocontrast media-induced oxidative stress and histopathological changes in rat testicular tissue. *Cell Membranes and Free Radical Research*, 1(2):78-83.
- Zduńczyk, S., Domosławska, A., Jamioł, M., Kankofer, M. (2025). Impact of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Quality in Dogs. *Animals*, 15(21): 3169.

## ÖZGEÇMİŞ