KOÇ SPERMASININ DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE PROANTOSİYANİDİNİN ETKİLERİ

Vet. Hek. Saltuk Buğra BERK
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Doç. Dr. Fatih AVDATEK
Tez No:2023-011
Afyonkarahisar

T.C.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DÖLERME ve SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

KOÇ SPERMASININ DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE PROANTOSİYANİDİNİN ETKİLERİ

Vet. Hek. Saltuk Buğra BERK

Doç. Dr. Fatih AVDATEK

Tez No: 2023-011

AFYONKARAHİSAR

Bu Tez Çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: "21.SAĞ.BİL.21

T.C.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

ENSTİTÜ ONAYI

Öğrencinin	**Adı- Soyadı**	Saltuk Buğra BERK
	Numarası	203324003
	Anabilim Dalı	Dölerme ve Suni Tohumlama
	Programı	Veteriner-Dölerme ve Suni Tohumlama
	Program Düzeyi	☒Yüksek Lisans ☐Doktora
Tezin Başlığı		Koç Spermasının Dondurulabilirliği Üzerine Proantosiyanidinin Etkileri
Tez Savunma Sınav Tarihi		09.06.2023
Tez Savunma Sınav Saati		10.00

Yukarıda bilgileri verilen öğrenciye ait tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
…… / …… / …… tarih ve
…… sayılı kararıyla onaylanmıştır.

e-imzalıdır

Prof. Dr. Esma KOZAN

Enstitü Müdürü

Bu tez, Enstitü Müdürlüğünce kontrol edilerek, elektronik imza kullanılarak onaylanmıştır.

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

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

- 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.**

../../…..

Saltuk Buğra BERK

ÖZET

KOÇ SPERMASININ DONDURULABİLİRLİĞİ ÜZERİNE PROANTOSİYANİDİNİN ETKİLERİ

Bu çalışmanın amacı Sönmez ırkı koçların sperma sulandırıcısına katılan farklı konsantrasyondaki proantosiyanidinin çözüm sonu spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkileri araştırıldı. Ejakulatlar üç baş Sönmez koçtan haftada bir kez suni vajen yardımıyla toplandı ve bu işlem altı tekrar şeklinde uygulandı. Ejakulatlar ml'de 150x106 spermatozoon olacak şekilde antioksidan içermeyen (kontrol) ve antioksidan içeren (10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml) sulandırıcılar ile beş bölüme ayrıldı. Sulandırılan örnekler 0,25 ml'lik payetlerde 5 ^{0}C'de 3 saat ekilibrasyona tabi tutulduktan sonra sıvı azot buharında dondurulduu. Subjektif motilite yönünden 10 µg/ml içeren grup, kontrol ve diğer gruplara göre belirgin bir üstünlük sağladığı ($P<0,05$) gözlendi. Baş, kuyruk ve toplama anormal spermatozoa oranları açısından kontrol grubuna göre 10 µg/ml proantosiyanidin içeren gruptaki düşüş ile orta kısım bakımından 10 ve 25 µg/ml proantosiyanidin içeren gruplardaki azalma istatistiki olarak önemli ($P<0,05$) bulundu. H+/E- bakımından kontrol grubuna göre 10 µg/ml proantosiyanidin içeren gruptaki artışın istatistiki olarak önemli ($P<0,05$) olduğu belirlendi. Kontrol grubuna kıyasla Tail lenght açısından 10 ve 25 µg/ml proantosiyanidin ilave edilen gruplardaki düşüşün, Tail DNA bakımından 10, 25 ve 50 µg/ml proantosiyanidin ilave gruplardaki azalmanın, Tail moment açısından da tüm antioksidan ilave edilen gruplardaki düşüşün istatistiki olarak anlamlı ($P<0,001$) olduğu belirlendi. TOS açısından kontrol grubuna göre 10, 25 ve 100 µg/ml proantosiyanidin ilave edilen gruplardaki artış istatistiki olarak önemli ($P<0,05$) bulundu.

Sonuç olarak yapılan çalışmada koç spermasının saklanmasında spermaya katılan farklı dozlardaki proantosiyanidinin 10 µg/ml dozu spermatozoon motilite, anormal ve ölü-canlı spermatozoon oranı, membran bütünlüğü ve DNA hasarı yönünden kontrol grubu ve diğer gruplara göre en iyi korumayı sağladığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Koç, Sperma, Proantosiyanidin, Antioksidan, Kryopreservasyon

SUMMARY

EFFECTS OF PROANTHOCYANİDİN ON FREEZABİLİTY OF RAM SPERM

The aim of this study was to investigate the effects of proanthocyanidin at different concentrations on post-thaw spermatozoal parameters, oxidative stress, and DNA damage in the semen diluent of Sönmez breed rams. Ejaculates were collected once a week from three mature rams using artificial vagina and repeated six times. The ejaculates were divided into five groups, including a control group with no antioxidant and four groups with different concentrations of proanthocyanidin (10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, and 100 µg/ml) in the semen diluent to obtain 150 x 10^6 spermatozoa per ml. After equilibration for 3 hours at 5°C, the diluted samples were frozen in 0.25 ml straws and stored in liquid nitrogen vapor. The subjective motility of the group with 10 µg/ml proanthocyanidin was significantly higher (P<0,05) than that of the control and other groups. A decrease in abnormal spermatozoa rates was found to be statistically significant (P<0,05) in the group containing 10 µg/ml proanthocyanidin compared to the control group, in terms of both head and tail abnormalities. There was also a significant decrease in the mid-piece of spermatozoa in the groups containing 10 and 25 µg/ml proanthocyanidin. The H+/E- ratio significantly increased (P<0,05) in the group with 10 µg/ml proanthocyanidin compared to the control group. The tail length significantly decreased (P<0,001) in the groups with 10 µg/ml and 25 µg/ml proanthocyanidin, the tail DNA significantly decreased (P<0,001) in the groups with 10 µg/ml, 25 µg/ml, and 50 µg/ml proanthocyanidin, and the tail moment significantly decreased (P<0,001) in all antioxidant-treated groups compared to the control group. The total oxidant status significantly increased (P<0,05) in the groups with 10 µg/ml, 25 µg/ml, and 100 µg/ml proanthocyanidin compared to the control group.

In conclusion, the results of this study indicated that 10 µg/ml proanthocyanidin provides the best protection for ram semen during storage in terms of sperm motility, abnormal and dead/live spermatozoa ratios, membrane integrity, and DNA damage.

Keywords: Ram, Sperm, Proanthocyanidin, Antioxidant, Cryopreservation

ÖNSÖZ

“Koç Spermasının Dondurulabilirliği Üzerine Proantosiyanidinin Etkileri” adlı bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı Programı’nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında bana sağladığı bilgi, tecrübe, ilgi ve destek için tez danışmanım Doç. Dr. Fatih AVDATEK hocama, büyük bir minnettarlıkla teşekkür ederim. Ayrıca, geniş bilgi, deneyim ve imkanlarından faydalandığım çok değerli Prof .Dr. Mustafa GÜNDOĞAN, Doç. 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 Dalından Dr. Öğr. Üyesi Barış DENK‘e ve Tez çalışmamın istatistiki analizin de desteklerini esirgemeyen Mehmet Akif Ersoy Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Öğr. Üyesi Doç. Dr. Şükrü GÜNGÖR’e teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman varlığıyla bana destek veren sevgili annem ve babama ayrıca sevgili eşim Özge Melike BERK’e ve varlıklarıyla moral bulduğum oğlum Atahan BERK ve Yavuz Kaan BERK‘e teşekkür ederim.

Saltuk Buğra BERK

Afyonkarahisar

2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET I

SUMMARY II

ÖNSÖZ III

İÇİNDEKİLER IV

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ VI

ÇİZELGELER X

1. GİRİŞ 1

1.1.Koçlarda Spermanın Alınması 2

1.2.Koçlarda Spermanın Sulandırılması ve Yoğunluğu 3

1.3.Koçlarda Spermanın Kriyopreservasyonu 4

1.4.Koçlarda Kriyopreservasyon Sulandırıcıları 5

1.5.Koç Spermasının Kriyopreservasyonunda Kullanılan Kriyoprotektanlar 6

1.6.Koçlarda Spermanın Sulandırılması ve Soğutulması 8

1.7.Koç Spermasında Ekilibrasyon Süresi 9

1.8.Koçlarda Spermanın Dondurulması 10

1.9.Koçlarda Spermanın Çözdürülmesi 11

1.10.Spermatozoondaki Reaktif Oksijen Türlerinin Biyolojisi 12

1.11.Antioksidanlar 14

1.11.1.Non-Enzimatik Antioksidanlar 15

1.11.2.Enzimatik Antioksidanlar 15

1.11.2.Proantosiyanidin 16

2.1. Hayvan Materyali Bakım ve Besleme 17

2.2. Suni Vajenin Hazırlanması ve Sperma Alımı 17

2.3. Koç Spermasının Sulandırılması, Gruplandırılması ve Kriyopreservasyonu 18

2.4. Sperma Parametrelerinin Değerlendirilmesi 18

2.4.1. Spermatozoonların Motilitesi 18

2.4.2. Anormal Spermatozoonların Oranı 19

2.4.3. Hipo-ozmotik Eosin Boyama Testi (HE testi) 19

2.4.4. Dna Hasarı Bulgusu 20

2.4.4.1. Spermanın Yıkanması, Lamların Hazırlanması ve Hücre Lizisi 20

2.4.4.2. Slaytların Elektroforezi 21
2.4.4.3. Slaytların Nötralizasyonu ve Boyanması 21
2.4.4.4. Slaytların Değerlendirilmesi 21
2.5 Oksidatif Stres Paramatrelerinin Değerlendirilmesi 21
2.5.1. Glutatyon (GSH) 21
2.5.2. Malondialdehit (MDA) 22
2.5.3. Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü 22
2.5.4. Total Oksidatif Stres (TOS) Ölçümü 22
2.6. İstatistiksel Analiz 23
3. BULGULAR 24
3.1. Dondurma-Çözdürme Sonrası Motilite ve Anormal Spermatozoon Oranı 24
3.2. Dondurma-Çözdürme Sonrası HE-Test Değerleri 25
3.3. Dondurma-Çözdürme Sonrası DNA Hasar Bulguları 26
3.4. Dondurma-Çözdürme Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri 27
4.TARTIŞMA 28
5.SONUÇ 32
6.KAYNAKLAR 33

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

AU: Arbitrary Unit

Ca^{+2}: 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 : Elektroejakülatör

FSH*:* Follicle stimulating hormone

g: Gram

GOT: Glutamik-oksaloasetik transaminaz

GSH: Glutatyon

H2O2:Hidrojen Peroksit

HCl: Hidrojen klorür

HE: Hipo ozmotik Eozin boya

HOS: Hipo ozmotik şişme

IVF: İn vitro fertilizasyon

K: Potasyum

Kg: Kilogram

$LD_{50/10}$: 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^{+2}: 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

SV : Suni Vajen

TAS : Total Antioksidan Seviye

TOS : Total Oksidatif Stres

vd: Ve Diğerleri

x: Çarpı

ZEN: Zearalenone

β: Beta

µg: Mikrogram

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Dondurma-Çözdürme Sonrası Motilite ve Anormal Spermatozoon Oranı **24**

Çizelge 3.2. Dondurma-Çözdürme Sonrası HE-test Değerleri **25**

Çizelge 3.3. Dondurma-Çözdürme Sonrası DNA Hasar Bulguları **26**

Çizelge 3.4. Dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametreleri **27**

1. GİRİŞ

Suni tohumlama, çiftlik hayvanlarının genetiğini iyileştirmek için uygulanan önemli bir biyoteknolojidir. Yüksek üretkenlik potansiyeline sahip erkeklerin arzu edilen özelliklerinin hızlı ve yaygın olarak yayılmasını teşvik eder. Spermatozoon dondurulması, üreme teknolojisini geliştirmek için hayvan araştırmalarında kullanılan en önemli araçlardan biridir (Benson vd., 2012). Memeli spermatozoasının doldurulması, optimal sonuçlara ulaşmak için birçok faktörün uygun şekilde dengelenmesini gerektiren karmaşık bir tekniktir. Koç sperması, diğer türlere kıyasla hücre membranı düşük bir kolesterol-fosfolipid oranı içerir. Bundan dolayı, koç spermatozoasının soğuk şok duyarlılığı diğer türlere göre daha yüksektir (Salamon ve Maxwell, 1995). Sulandırıcılar, sulandırma-soğutma-dondurma ve çözme tekniklerinin tümü, koç spermasının dondurularak saklanmasının başarısında rol oynar (Tekin vd., 2006). Spermatozoon hücreleri, dondurularak uzun süreli saklanmaları nedeniyle biyokimyasal ve fonksiyonel değişikliklere uğrayarak fertilizasyon yetenekleri sınırlanabilmektedir (Chelucci vd., 2015)

Akrozom, çekirdek, mitokondri, aksonem ve plazma zarı da soğuk şoku gibi hızlı sıcaklık değişimlerinden ve donma-çözülme işlemi sırasında meydana gelen buz kristallerinin oluşması ve bunların çözünmesinden etkilenmektedir.(Nur vd., 2010). Hücre içi kristallenmeyi önlemek için, sperma sulandırıcısına rutin olarak belirli oranlarda kriyoprotektan maddeler ilave edilmektedir. Yumurta sarısı, çözüm sonrası spermatozoon fonksiyonlarını (motilite, canlılık ve akrozom bütünlüğü) başarıyla koruyan permabl olmayan bir kriyoprotektan olarak kullanılırken, gliserol ise en yaygın kullanılan permabl kriyoprotektandır (Rekha vd., 2018; Zohara vd., 2014). Çözünme sonrası en iyi canlılık oranını sağlayan gliserol konsantrasyonu %3 ile %7 arasında iken yumurta sarısında %5 ile 20 arasındadır (Gil vd., 2003). Dondurma ve çözünme hızları spermatozoonların çözüm sonrası canlı kalma oranını etkilemektedir (Peña ve C. Linde-Forsberg, 2000). Hücre içi pH ve iyonik bileşimdeki değişikliklerin yanı sıra, önemli hücre içi buz oluşumunun neden olduğu spermatozoon plazma zarının ve Deoksiribo nükleik asit (DNA) yapısının bozulması gibi dondurma hasarlarını en aza indirmek için yeterli bir soğutma hızı uygulanmalıdır (Hammadeh vd., 1999). Spermatozoonları çözdürme sıcaklığı olan 37 ^{o}C'den hızla soğutulması "soğuk şoku" hasarına neden olur

(Watson, 2000). Soğuma sırasındaki sıcaklık değişimleri, spermatozoon hücre zarlarında stres oluşturarak lipidlerde faz kaymalarına ve spermatozoon zarlarının işlevsel durumlarında değişikliğe neden olur. 5° ile -15°C arasındaki sıcaklıkların önemli bir faz değişikliğine neden olduğu bilinmektedir. Sıcaklığa bağlı hasar için mükemmel sıcaklık aralığı olabilir. Hücre içi buz kristali oluşumunu en aza indirmek için uygun donma hızı, suyun hücrelerden ayrılmasına izin verecek kadar yavaş, ciddi hücre dehidrasyonunu ve çözünme etkisini önleyecek kadar da hızlıdır (Drobnis vd., 1993). İlk kez Polge (1957), spermatozona yıkımının çoğunun -15 ve -30°C arasındaki kritik bir sıcaklık bölgesinde meydana geldiğini ve soğutma hızları yeterli değilse, tüm hücrelerin -80°C'de ölebileceğini iddia etti. Aşırı soğutma fazı (0°C ila -5°C) ve buz kristallerinin gelişimi (-6°C ila -15°C), dondurma sırasında spermatozoonun zarar gördüğü iki ana sıcaklık aralığıdır (Woelders vd., 1997).

Mazur (1965), dondurma ve çözme sırasında, kritik sıcaklık aralığı olarak bilinen -15°C ila -60°C sıcaklık aralığında spermatozoon hücre zarlarında hasar meydana geldiğini bildirmektedir. Standart dondurma teknikleri, sıvı nitrojen üzerinde buhar fazında plastik payet içinde sulandırıcı ve kriyoprotektif madde içeren ortamda bulunan spermatozoayı soğutmayı içermektedir. Programlanabilir biyo-dondurucular, sıvı nitrojen buharı ve kuru buz gibi yöntemler kullanarak koç spermasının dondurulmasına ilişkin doğru veriler elde edilmektedir. Sperma alma teknikleri, sperma sulandırıcı bileşenleri, seminal plazmanın dondurulmadan önce ayrılıp ayrılmaması gerektiği, spermanın dondurulmadan önce ne kadar süreyle ekilibrasyona tabii tutulması (2 saat veya 4 saat), nihai spermatozoon konsantrasyonu 50 x 10^6/mL ile 1000 ×10^6/mL), payet boyutu (0,25 mL, 0,5 mL) ve dondurma yöntemleri (peletler için kuru buz, semen payetleri için buharla dondurma veya kontrollü dondurma).gibi etkenler de çözüm sonrası canlı spermatozoon oranını etkilemektedir.

1.1.Koçlarda Spermanın Alınması

Sperma toplama, her ejakülasyondan mümkün olan en iyi kalitede maksimum spermatozoon hücresi elde etmeyi amaçlar. Sperma, küçükbaş hayvanlarda esas olarak suni vajen (SV) veya elektroejakülatör (EE) yoluyla toplanır. SV ile sperma alma koçlar için tercih edilen yöntemdir (Leboeuf vd., 2000). SV ile sperma alma yöntemi daha uygun ve kullanımı basittir ve doğal ejakülatla karşılaştırılabilir sperma kalitesinde

ejakülat elde edilmektedir (Wulster-Radcliffe ve Lewis, 2002). Suni vajendeki sıcak su termal stimülasyon sağlarken, yine suni vajendeki basınç mekanik olarak glans penisi uyarır (Donovan vd., 2001). Bu yöntemin dezavantajı ise libidosu yüksek koçlara ve bunun yanı sırada östrusta erkek hayvanın atlamasına izin verecek bir dişinin ortamda bulunmasıdır. Suni vajene alternatif olarak EE yöntemi kullanılabilir (Giuliano vd., 2008). EE yönteminde üreme organı olan erkek eklenti bezlerinin sinirine 15–20 sn aralıklarla 3–5 kısa stimülasyon (3–8 sn) uygulamak için bir elektrot probu (6–12 V) kullanılır (Evans ve Maxwell, 1987). EE yöntemi, koçları suni vajene alıştırma eğitimi ortadan kaldırır, ejakülasyonu hızlı bir şekilde artırır ve en önemlisi, yaralanma veya yaşlılık nedeniyle atlama eğilimi göstermeyen üstün verimli erkeklerden sperma alınabilmektedir (Ortiz-de-Montellano vd., 2007). Bu prosedürün en önemli dezavantajı, hayvan refahında büyük bir sorun olan hayvan için stres oluşturmasıdır (Marco-Jim´enez vd., 2005). Sperma alma yöntemine göre sperma kalitesi de değişmekle beraber SV ile alınan spermanın kalitesi diğer yönteme göre çok daha iyidir (Malejane vd., 2014). Sperma kalitesinden kast edilende elde edilen sperma içerisindeki spermatozoon yoğunluğunun fazla olması, canlı ve motil spermatozoon oranın ile mass aktivitesi yüksek spermatozoon hücreleri elde edilmektedir. Sperma alma yönteminin spermatozoon özellikleri ve hacmi ile seminal plazma bileşenleri üzerine önemli etkisi vardır. Koçlarda suni vajen ile elde edilen spermalar elektroejakülatör ile elde edilenlere göre soğuk şokuna daha dirençlidir (Marco-Jim´enez vd., 2005). Ayrıca seminal plazma proteinlerinin, spermatozoon hücre zarına zarar vermeden soğuk şoklarını önlemede önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Barrios vd., 2005). Bununla birlikte, EE prosedürü sırasında sperma bileşimi değişerek spermatozoonun kriyo direncini etkileyebilmektedir.

1.2.Koçlarda Spermanın Sulandırılması ve Yoğunluğu

En az sayıda tohumlama ve tohumlama başına kullanılan sperma ile yüksek fertilite oranı elde etmek için, bir tohumlama payetinde yeterli miktarda spermatozoon ve sulandırıcı bulunacak şekilde sperma örnekleri uygun şekilde sulandırılması gerekir. Çiftlik hayvanlarında sperm numunelerini sulandırıcılarla seyreltmek veya bunları belirli bir spermatozoa yoğunluğunda dozajlama yaygın bir uygulamadır. 1:1–1:3 sulandırma oranlarını küçük ruminantların spermasında etkili bir şekilde

kullanmaktadır. 80 ile 500 × 10^6 hücre/ml arasında değişen yoğunluklarda uygun şekilde dondurulmuş ve yeterli feriliteye sahip spermatozoon örnekleri vardır (Ritar vd. 1990).

1.3.Koçlarda Spermanın Kriyopreservasyonu

Spermanın kriyoprezervasyonu, genetik materyalin korunmasına ve suni tohumlama kullanılarak spermatozoonların en verimli şekilde kullanılmasına izin vererek, spermanın en iyi donörden elde etmeyi sağlayan isteğe bağlı bir yaklaşımdır. Spermatozoa kriyoprezervasyonunun prensibi, sıvı azotta donmuş spermatozoon hücrelerinin hücresel metabolik hızını durdurmak ve çözüm sonrası fonksiyonel olarak canlı kalmalarını sağlamaktır (Ruane, 2000). Prosedürün boyunca spermatozoon hücresi sulandırma, inkübasyon, soğutma, dondurma ve çözünme gibi durumlara yüksek düzeyde adaptasyon gerektirmektedir (Medeiros vd., 2002). Spermatozoa değişen derecelerde ultrastrüktürel, biyokimyasal ve fonksiyonel hasara uğrayarak motilitede, membran bütünlüğünde ve fertilizasyon yeteneğinde azalmalar şekillenmektedir (Bearden, 2004). Spermatozoon hücresinde oluşan hücre dışı ve hücre içi buz kristallerinin bu hasarlara neden olduğu düşünülmektedir. Spermatozoon hücresinin plazma membranı, akrozom zarları, mitokondriyal kılıfı ve aksonemi dondurulmuş-çözdürülmüş spermada daha fazla zarar görmektedir (Watson, 2000). Spermatozoonun biyokimyasal özellikleri de kriyoprezervasyon tekniğinden etkilenir. Glutamik-oksaloasetik transaminaz (GOT) salınımı, hiyalüronidaz, akrosin enziminin inaktivasyonu ve sodyumda (Na) artış görülmektedir. Fosfataz aktivitesinde, akrozomal proteolitik aktivitede, kolesterol proteininde, potasyum içeriğinde, adenozin trifosfat (ATP) ve adenozin difosfat (ADP) sentezinde, ayrıca amino asit ve prostaglandinlerde kayıplar oluşmaktadır (Salamon ve Maxwell, 1995). Kriyoprezervasyonun spermatozoa hücreleri üzerindeki toplam etkisi, hem içsel hem de dışsal değişkenlerden etkilenir. Hücre geometrik şekli (çap, hacim, ilgili yüzey hacmi), spermatozoon hidrasyon durumu, su ve kriyoprotektanlara karşı plazma zarı geçirgenliği ve spermatozoa yaşı veya olgunlaşma durumu gibi özelliklerinin tümü içsel değişkenlerdir (Curry vd., 1996). Kolesterol/fosfolipid oranı, çift tabakadaki lipitlerin sayısı, hidrokarbon zinciri doyma derecesi ve protein/fosfolipid oranı önemli hususlardır (Medeiros vd., 2002). Bu bağlamda, boğa, koç ve yaban domuzlarının permatozoonlarında doymamış yağ asidi doymuş yağ asidine oranla daha yüksektir ve kriyopreservasyona daha duyarlıdır. Buna

karşılık tavşan, köpek ve insan spermatozoonlarında doymamış yağ asidi doymuş yağ asidine oranla daha düşük orana sahiptir ve kriyopreservasyona daha dirençlidir. Soğutma ve dondurma hızları, kriyoprotektif madde tipi ve konsantrasyonu, sulandırıcı bileşimi, sulandırma oranı, sulandırıcıya ilave edilen gliserolün oranı ve sıcaklığı, ekilibrasyon süresi ve çözünme hızının tümü dışsal faktörlerdir (Anel vd., 2005). Koç spermatozoonları, dondurma işlemi sırasında aşırı sıcaklık değişikliklerine karşı boğa spermatozoonlarına kıyasla daha hassastır ve daha fazla hasar görür (Gillan vd., 2004). Koç spermasının dondurulması basit bir işlem değildir. Kriyopreservasyon olayında koç spermasının motilitesi, morfolojik bütünlüğüne kıyasla daha iyi korunur. Spermatozoonun mitkondrial yapısı donma ve çözünme olaylarından etkilenmektedir. Ancak kuyruk filamenti ve fibrilleri herhangi bir değişiklik göstermezler (Salamon ve Maxwell, 2000).

1.4.Koçlarda Kriyopreservasyon Sulandırıcıları

Sulandırıcılar, ejakülat hacmini artırmak ve spermatozoon fertilitesini mümkün olan en uzun süre muhafaza etmek için kullanılan ve çok sayıda dişi hayvanın uzun bir süre boyunca döllenmesine izin veren ortamlardır (Hafez ve Hafez, 2000). Sperma sulandırıcıları, besinleri bir enerji kaynağı olarak sunabilmeli, hücreleri sıcaklık değişimlerine bağlı hasardan koruyabilmeli, zararlı pH değişimlerini önlemek için bir tampon sağlayabilmelidir. Pesch ve Hoffmann (2007), na göre iyi bir sulandırıcı bakteri gelişimini baskılayabilmeli ve sp sırasında sperermanın saklanması sırasında spermatazoon hücrelerinin koruyabililidir. (Forouzanfar vd., 2010). Sulandırıcılar, suda maksimum çözünürlüğe ve diğer tüm çözücülerde minimum çözünürlüğe, düşük tuz etkilerine, düşük tampon konsantrasyonlarına, düşük sıcaklık etkilerine, iyi huylu katyon etkileşimlerine, daha yüksek iyonik kuvvetlere ve kimyasal kararlılığa sahip olmalıdır (Ellis ve Morrison, 1982). Sulandırıcı kompozisyonu, spermatozoa kalitesini etkileyen ve spermatozoa fertilitesini en uzun süre koruyan temel unsurlardan biridir. Geçmişte koç spermasının sulandırılmasında sitratlar, yumurta sarısı ve glikoz ile fruktoz gibi monosakkaritler ve süt kullanılmaktaydı (Valente vd., 2010). Koç spermasının sulandırılması ve dondurulması için disakkaritler (laktoz, trehaloz), trisakkaritler (rafinoz) kompleks polisakkaritler (Arap sakızı) veya diğer kompleks bileşikler (polivinilpirolidon) ve ayrıca yumurta sarısı ve gliserol bazlı çeşitli dondurma

sulandırıcıları kullanılmıştır (Paulenz vd., 2002). Sulandırıcı kombinasyonları arasında, koç spermasında rutin kullanım için tris bazlı veya süt bazlı sulandırıcılar önerilmektedir (Shipley vd., 2007). Mikrobiyolojik kontaminasyon riskinden kaçınmak için birçok araştırmacı, sulandırıcılarda yumurta sarısı yerine soya fasulyesi lesitini kullanmaktadır (Fukui vd., 2008). Aboagla ve Terada (2004), 'ya göre, sperma sulandırıcılara trehaloz veya rafinoz ilavesi, koç spermasının dondurularak muhafaza edilmesinin donma aşamasında önemli bir rol oynar. Trehaloz veya rafinoz ilavesi, kriyoprotektif aktivitesini arttırır. Bioxcell® (soya fasulyesi lesitini bazlı) ve AndroMed® (Tris bazlı), koç spermasının dondurulmasında kullanılan ticari sulandırıcılardandır.

1.5.Koç Spermasının Kriyopreservasyonunda Kullanılan Kriyoprotektanlar

Kriyoprezervasyon için kullanılan sulandırıcı, soğutma ve dondurma sırasında spermatozoayı kriyojenik yaralanmalardan korumak için bir kriyoprotektan madde içermelidir (Salamon ve Maxwell, 2000). Kriyoprotektanlar, aşırı tuz konsantrasyonlarını baskılayarak, belirli bir sıcaklıkta hücre büzülmesini sınırlayarak, hücre içi buz oluşumunu en aza indirerek ve belirli bir sıcaklıkta donmuş çözelti fraksiyonunu azaltarak donmuş spermatozoonları korur (Bucak ve Tekin 2007). Penetre olabilen (hücre içi kriyoprotektanlar) ve penetre olamayan (hücre dışı kriyoprotektanlar) olmak üzere iki tip kriyoprotektan madde vardır. Bu ayrım, hücrelere girme kapasitelerinden kaynaklanmaktadır (Tonieto vd., 2010). Düşük molekül ağırlığına sahip penetre olabilen kriyoprotektanlar (gliserol, dimetil sülfoksit, etilen glikol ve propilen glikol) artan membran akıcılığı, daha düşük sıcaklıklarda artan dehidrasyon ve düşük hücre içi buz oluşumu nedeniyle hücre membranında lipid ve proteinlerin yeniden yapılandırılmasına neden olur bu da spermatozoonlarda daha yüksek bir canlı kalma oranına yol açmaktadır (Holt, 2000).Penetre olmayan kriyoprotektanlar (yumurta sarısı, yağsız yağsız süt, trehaloz, aminoasitler, dekstranlar, laktoz, soya fasulyesi ve sükroz) yüksek bir moleküler ağırlığa sahiptir, plazma zarından geçmemektedirler ve yalnızca hücre dışı işlev görür; dolayısıyla hücre dehidrasyonunu etkileyebilirler. Koç sperması dondurulmasında, gliserol genellikle bir kriyoprotektan olarak kullanılır (Medeiros vd., 2002). Gliserol suyu bağlar ve çözeltinin donma noktasını düşürerek her sıcaklıkta buz oluşumunu azaltır. Ozmotik stimülasyon ve hücre dehidrasyon mekanizması nedeniyle, gliserol hücre dışı bir etkiye sahiptir, dondurma için mevcut

hücre içi su hacmini azaltır ve kriyoprezervasyona tabi tutulan hücrelerin hayatta kalma oranını arttırır (Holt, 2000). Sulandırıcı içerisindeki oranı ve kullanıldığı sıcaklığa bağlı olarak gliserol, spermatozoa için biyolojik olarak zararlı ve membran bütünlüğü için toksik olabilmektedir. Gliserolün toksisitesi sulandırıcılarda kullanımını sınırlar (Gil vd., 2003). Yüksek yoğunlukta gliserol, ozmotik hasara neden olabileceğinden spermatozoonlar için tehlikelidir. Çözüm sonrası canlı kalma oranını en iyi sağlayan yoğunluk sulandırıcıya %4 ile %7 arasında ilave edilmesidir. Gliserol koç spermatozoonuna daha kolay girdiğinden, % 6'dan daha yüksek konsantrasyonlar spermatozoon canlılığı için zararlıdır (Salamon ve Maxwell, 2000). Sulandırıcılara eklenen gliserol miktarı, sulandırıcı bileşimi, gliserol ilave yöntemi ve soğutma ve donma hızı ile belirlenir (Holt, 2000). Çeşitli araştırmalara göre, %5 ile %20 yumurta sarısı içeren sulandırıcılara %3 ila %7 gliserol eklenmesi, koç spermatozoonunda dikkate değer bir çözüm sonu motilite oranı (%44 ile %85) elde edilmesini sağlamaktadır (Gil vd., 2000). Sperma sulandırıcısına yüksek oranda yumurta sarısı ilavesi ile gliserol seviyelerini düşürebilir. Nur vd. (2010), koç spermasının dondurma-çözdürme sonrası kalitesi üzerinde gliserol (6%), propanediol (6%), sukroz (62.5 mM) ve trehaloz (62.5 mM) etkisini inceledikleri çalışmalarında tüm kriyoprotektanların spermatozoon motilitesi, morfoloji ve DNA bütünlüğü üzerinde olumsuz etkileri olduğunu bildirmektedirler. Silva vd. (2012), Tris-yumurta sarısı bazlı koç sperma sulandırıcısına gliserol (5%), etilen glikol (3%) ve asetamid (3%) ilave edip bunları karşılaştırdıkları çalışmalarında etilen glikolün, gliserol gibi, dondurma işlemi sırasında ilerleyici spermatozoon motilitesi, akrozom bütünlüğü ve oksidatif stresi koruyabilen bir madde olduğunu ve %5 gliserol kullanımının ise plazma membran bütünlüğü için en iyi korumayı sağladığını belirlediler. Moustacas vd. (2011), gliserol ile birlikte kriyoprotektan olarak dimetilformamidin (DMF) etkinliğini değerlendirirken, 5% gliserol içeren sulandırıcının plazma ve akrozomal membran bütünlüğünü daha iyi koruduğunu belirtti. Saf DMF veya gliserol ile kombinasyon halinde %2'den fazlasını içeren sulandırıcıların ise spermatozoon motilitesini neredeyse sıfıra kadar indirgendiğini bildirmektedirler. Yumurta sarısı spermatozoonu soğuk şokundan korur, hareketli tutar, akrozomal enzim kaybını önler ve mitokondriyal zarlarını sağlam tutar (Salamon ve Maxwell, 2000). Fosfolipid konsantrasyonu, yüksek molekül ağırlığı ve düşük yoğunluklu lipoprotein fraksiyonu gibi özellikleri nedeniyle, kriyoprezervasyon

sırasında yumurta sarısının lipid bileşeni, spermatozoon plazma membranını ve akrozomu termal hasardan korur. Bir spermatozoa-lipoprotein kompleksi oluşturarak, yumurta sarısının fosfolipitleri ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), spermatozoonu soğuk şokunu ve dolayısıyla soğutmanın zararlı etkilerini azaltır (Medeiros vd., 2002). Sulandırıcıda yumurta sarısı gliserol ile kullanıldığında soğuk şokuna karşı koruma arttırılabilir (Forouzanfar vd., 2010). Aslında sulandırıcıda yüksek yumurta sarısı oranı kullanmak, her zaman spermatozoon motilitesini iyi bir şekilde koruduğu anlamına gelmez. Gil vd. (2003), süt bazlı bir sulandırıcıya ilave ettikleri yüksek yumurta sarısı konsantrasyonun (%5'in üzerinde) çözüm sonrası motiliteye olumlu katkı sağlamadığını bildirmişlerdir. Etki, sulandırıcı bileşimine bağlı olsa da koç spermasını dondurmak için %3-6 (en düşük) ile %15-20 (en yüksek) arasında değişen yumurta sarısı konsantrasyonları kullanılmaktadır (Aboagla ve Terada, 2004).

1.6.Koçlarda Spermanın Sulandırılması ve Soğutulması

Sperma dondurma işleminden önce uygun sulandırıcılar ile sulandırılarak metabolik aktiviteyi yavaşlatılarak spermatozoonların ömrünü uzatmak için kademeli olarak 5°C'ye kadar soğutulur. Sulandırma ve soğutma, yeterli sayıda spermatozoonun doz başına eklenmesini ve yüksek verimlilik sağlamak için hücre kaybı yaşanmadan yeterli sayıda spermatozoonun kullanılmasını sağlamak için belirli oranlarda yapılır (Rasul vd., 2000). Spermatozoon hücrelerinin potasyum içeriğindeki artış nedeniyle, çok yoğun spermatozoon konsantrasyonu spermatozoonların metabolik aktivitesini azaltır. Spermalar suni tohumlama için hazırlarken, suni tohumlama dozu başına spermatozoon sayısı standardize edilmeli ve bir sulandırıcı kullanılarak sulandırılması gerekmektedir. Soğutma işlemi dozajlama için yeterli sayıda motil spermatozoon elde etmek amacıyla kademeli ve yavaş yapılmalıdır. 30 ila 0°C arasındaki hızlı soğutma, "soğuk şok" olarak adlandırılan spermatozoon hasarına neden olur (Watson, 2000). Spermatozoon hücrelerinin soğuk şokundan korunması için, spermanın ilk sulandırılması, karıştırılması ve karışımın vücut sıcaklığına yakın tutulması yoluyla 1.5-2.0 saat içinde yavaşça 5°C'ye kadar yapılır (Chaveiro vd., 2006). Hücreleri dehidrasyonun neden olduğu hiperozmotik koşullara maruz bırakmadan önce, soğutma hızı, yeterli hücresel dehidrasyona izin verecek kadar yavaş ve kalan hücre içi sıvıyı dondurmaya yetecek kadar hızlı olmalıdır (Watson, 2000). Öte yandan, yavaş soğutma, suyun ozmoz yoluyla hücrelerden çıkmasına izin vererek ölümcül hücre içi buz oluşumunu önler

(Mazur, 1984). Optimal soğutma hızı (vücut sıcaklığından 5°C'ye) -10°C/saat olup, koruyucu madde olarak yumurta sarısı veya süt kullanımı en az soğuk şok neden olmaktadır (Medeiros vd., 2002). Sperma sulandırıcılarına gliserol ilavesi, sulandırma ve soğutma işlemi sırasında başlangıçta veya sonradan ayrı bir fraksiyon halinde eklenebilir. Tek adımlı sulandırma yönteminde, sulandırıcının tamamı sperma alındıktan sonra ilk durumda eklenir. İki adımlı sulandırma yönteminde ise, sulandırıcının bir kısmı (gliserolsüz) sperma alındıktan sonra uygulanır ve kalanı (gliserollü) soğuduktan sonra sperma dondurulmadan önce eklenir (iki aşamalı prosedür) (Gil, 1999). Bazı araştırmacılar, 4°C'de gliserol fraksiyonu eklendiğinde iyi sonuçlar elde ettiğini, ancak diğer araştırmacılar ise, 30–37°C'de gliserol eklendikten sonra daha iyi sonuçlar elde ettiklerini bildirmektedir (Colas, 1983). Aradaki fark küçük olsa da, 5°C'de gliserol eklemek, 30°C'de eklemekten daha iyi spermatozoon canlılığı sağlamaktadır. Aşamalı sulandırma prosedüründe spermatozoon stresi tolere edilebilir seviyelere düşürülür . Bunun sebebi ise gliserolün 30 ºC'de hücre membranına nüfuz edebilmesidir. Gliserol, 4°C'de hücre zarlarına karşı daha az geçirgendir, bu da onu daha az tehlikeli hale getirir. Gliserol'ün kullanımı toksisitesi nedeniyle kısıtlanmıştır. Gliserolün kriyoprotektif özelliklerinden yararlanmak ve kriyoprezervasyondan önce gereksiz spermatozoon kaybını önlemek için gliserol ile ekilibrasyon süreleri dengelenmelidir (Leite vd., 2010).

1.7.Koç Spermasında Ekilibrasyon Süresi

Spermatozoaların dondurulmadan önce gliserol ile temas halinde kaldıkları toplam süre ekilibrasyon süresidir. Ancak, ekilibrasyon işlemi yalnızca gliserol ile sınırlı değildir; diğer osmotik aktif sulandırıcı bileşenleri de içerir. Sonuç olarak, ekilibrasyon süresine yaklaşımda, kullanılan sulandırıcı türü (tampon ve kriyoprotektan) ve diğer kriyojenik maddeler bu süreçte göz önünde tutulmalıdır (Muiño vd., 2007). Koçlarda 1 ile 5 saat arasında değişen ekilibrasyon süreleri kullanılarak çözüm sonrası farklı sperma kaliteleri elde edilmektedir (Jha vd., 2019). Sharma ve Sood (2020), 4 saatlik bir ekilibrasyon süresinin çözüm sonrası sperm kalitesini iyileştirdiğini bildirmektedirler. Öte yandan, Baruah vd. (2003), 0.5, 1 ve 1.5 saat boyunca ekilibrasyona tabii tutulan sperma örneklerinde spermatozoon motilitesinde ve akrozomal bütünlükte önemli bir değişiklik olmadığını belirlemişlerdir.

1.8.Koçlarda Spermanın Dondurulması

Spermanın dondurulmasındaki amaç, spermatozoon hücrelerine zarar vermemek için yavaşça sıcaklığı 5 ile −196°C arasında düşürmektir. Sıcaklık 5°C'nin altına ve −10°C'ye yaklaştığında, hücre içi su donar ve spermatozoon hücreleri buz kristalleri oluşma riskiyle karşı karşıya kalır. Donma hızı, hücre dehidrasyonunun kapsamını ve hızını düzenlediğinden, mümkün olduğu kadar hızlı olmalıdır. Spermatozoon hızla soğutulduğunda, dengeyi korumak için su yeterince hızlı kaybolmaz ve kriyoprezervasyon sırasında oluşan hücre içi buz spermatozoonların ölümüne neden olur (Muldrew ve McGann, 1994). Soğutma hızının yeterince yavaş olduğunu varsayalım. Bu durumda, spermatozoonların uzun bir süre yüksek çözünen konsantrasyonlara maruz kalacak, bu da hücre dehidrasyonuna, hacim daralmasına ve hücre içi donmaya neden olmayacaktır. Tüm bu değişkenlerin spermatozoonların dondurma başarısı üzerinde etkisi vardır. Sperma sulandırıcısı, en iyi soğutma hızını ve kullanılan paketleme yöntemini belirleyecektir. Spermatozoonlar ve onları çevreleyen ortam, yaklaşık -5°C'ye soğutulduğunda donmamış ve aşırı soğutulmuş halde kalır. Dış ortam -5 ile -10°C arasında donar, ancak spermatozoon içeriği donmamış ve aşırı soğutulmuş olarak kalır. Hücrelerin içindeki aşırı soğutulmuş su, kısmen donmuş hücre dışı çözeltideki sudan daha güçlü bir kimyasal potansiyele sahip olduğu için, su ozmotik olarak hücrelerden dışarı akar ve dışarıda donar (Mazur, 1990). Koç sperması için etkili soğutma hızının yaklaşık 20°C/dk veya daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. Sperma daha hızlı veya daha yavaş dondurulabilir. Sperma, soğutma hasarını önleyecek kadar hızlı, ancak hücre içi buz üretimi olmadan hücre kurumasına izin verecek kadar yavaş soğutulur. Bu yavaş dondurma teknikleriyle ilişkili hücre kuruluğu, spermatozoonların hayatta kalmasına yardımcı olabilir, oysa hızlı dondurma hızları hücre ölümüne daha çok neden olabilir. Daha kararlı bir termodinamik denge, yavaş dondurmayı karakterize eder. Genellikle kimyasal toksisite ve ozmotik basınçla bağlantılı olan düşük kriyoprotektanlar kullanır (Arav vd., 2002). Spermatozoonları dondurmak için manuel dondurma veya otomatik olarak programlanmış bir biyo-dondurucu seçenekleri vardır. Sperma payetleri yatay olarak soğutulmuş bir rafa yerleştirilir ve manuel bir dondurucuda buhar fazında (-75°C ile -125°C arasında) sıvı azot seviyesinin 4-6 cm üzerinde 8-10 dakika süreyle dondurulur. Çözüm sonrası, spermanın canlılığı ve hızı üzerinde başlangıç donma sıcaklığının önemli bir etkisi vardır (Bag vd., 2002). Bununla

birlikte, küçük çaplı payetlerin dondurulması, sıcaklıkta hızlı bir düşüşe neden olarak, hücre içi su kristalleşmesine yol açarak, sıcaklıktaki düşüş sırasında ciddi dehidrasyona neden olan gecikmeli dondurmaya göre daha az hücre hasarına neden olabilir (Berg, 1999). Payetlerin boyutu, Chemineau ve arkadaşlarının belirttiği gibi sıvı nitrojen üzerinde dondurulacak seviyeyi belirlemek için kullanılmalıdır (Chemineau, 1992). 0,25 ml pipetler, sıvı nitrojenin 16 cm üzerinde 2 dakika dondurulduktan sonra 4 cm'ye kadar indirilerek 3 dakika daha dondurulduktan sonra sıvı nitrojende saklanmalıdır. 0,5 ml payetler, sıvı nitrojenin 16 cm üzerinde 2 dakika dondurulduktan sonra sıvı nitrojende saklanmalıdır. Sıvı nitrojenin 4-5 cm yukarısında 4-5 dakika gibi alternatif donma konumları ve sürelerinden bahsedilmiş ve tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir (Leboeuf vd., 2000). Pontbriand vd. (1989), 6 ile 24°C/dakika ve 10 ila 100°C/dakika arasındaki sıcaklık değişimlerinin dayanılabilir olduğunu bulmuştur, bu da koç spermatozoa'nın geniş bir soğutma hızı aralığına dayanabileceği anlamına gelmektedir. Otomatik bir dondurma makinesi kullanılarak kontrol edilmiş ve programlanmış bir hızda sıcaklık 4 ile -5°C arasında 20°C/dakika, -5 ile -110°C arasında 55°C/dakika ve -110 ile -140°C arasında 35°C/dakika düşürülmüştür. Spermatozoonlar genellikle yüksek bir hızda (15-60°C/dakika) dondurulduğunda en iyi çözüm sonuçları elde edilir (Byrne vd., 2000). Genellikle donma sulandırıcısı ile mix edilen sperma yaklaşık 0.1°C/dakika hızla oda sıcaklığından 5°C'ye kadar yavaşça soğutulur ve daha sonra -80°C'ye kadar 10-60°C/dakika hızla dondurularak sıvı nitrojende saklanır (Sieme ve Oldenhof, 2015).

1.9.Koçlarda Spermanın Çözdürülmesi

Çözdürme işlemi, katı fazın normal bir sıvı faza dönüştüğü donmanın tersine çevrilmesidir (Medeiros vd., 2002). Kriyoprezervasyon yöntemleri ve sonrasında da çözünme, spermatozoonların hayatta kalması üzerinde bir etkiye sahiptir. Sperma kalitesi dondurma ve çözdürme işlemi sırasında zarar görebilir; çünkü sperma hücrelerin (−15 ile −60°C) olan iki önemli sıcaklık bölgesine maruz kalarak -196°C'ye soğutulmaktadır. Genel olarak, spermatozoonların kabaca yüzde 40-50'si dondurulup çözüm sonrası ölür (Watson, 2000). Spermanın çözdürülmesi, dondurulmuş spermanın hayatta kalması için en az dondurma aşamaları kadar önemlidir (Salamon ve Maxwell, 2000). Gliserol içeriği, dondurma hızı ve paketleme yöntemi gibi işleme elemanlarının kombinasyonu çoğu durumda ideal çözme hızını belirler. Dikkat edilmesi gereken bir nokta, spermanın dondurulmasında kullanılan soğutma hızının hücre içi donmayı

indüklemek için yeterince yüksek veya hücre dehidrasyonuna neden olacak kadar düşük olup olmadığıdır (DeJarnette vd., 2004). Soğutma hızı yüksekse, spermatozoondaki herhangi bir hücre içi buzun yeniden kristalleşmesini önlemek için hızlı çözülme gereklidir. Spermatozoonlar hızlıca çözüldüğünde, konsantre bir çözeltiye ve kriyoprotektana kısa bir süre maruz kalırlar ve hücre içi ve hücre dışı denge yenilenmesi yavaş çözülmeye kıyasla daha hızlı olur. Yavaş çözünme (35°C, 12 saniye) sırasında çözüm sonrası spermatozoon motilitesi ve membran bütünlüğü sırasıyla %63 ve %50'ye elde edilmektedir (Soderquist vd., 1997). Hızlı çözünme (70°C, 5 saniye) daha yüksek çözüm sonrası spermatozoon motilitesi ve membran bütünlüğüne (sırasıyla %67 ve %50) neden olur. Evans ve Maxwell (1987), koç spermasının 38-42°C'de 15-30 saniye çözündürülmesinin, çözüm sonrası spermatozoon motilitesi, akrozom bütünlüğü ve spermatozoon fertilite kapasitesi gibi özelliklerde benzer sonuçlar verdiğini bildirmektedirler (Pontbriand vd., 1989) payetleri su banyosunda daha yüksek bir hızla (60°C'de 8 saniye) çözdürmeye kıyasla, daha yavaş bir hızla (20 saniye için 37°C) çözdürmenin spermatozoon motilitesi ve akrozomal bütünlük açısından bir fark olmadığı belirlemişlerdir. Spermalar 70°C'de 5 saniye yerine 50°C'de 9 saniye çözündürüldüğünde, motilite veya membran bütünlüğü açısından fark görülmedi, bu da 70°C'de 5 saniye çözündürmenin 37°C'de 20 saniye çözündürmeden üstün olduğunu gösterdi. Çiftlik koşullarında, daha düşük bir sıcaklıkta çözündürmek, dondurulmuş-çözülmüş koç spermatozoonlarının kullanımını kolaylaştırabilir.

1.10.Spermatozoondaki Reaktif Oksijen Türlerinin Biyolojisi

Reaktif oksijen türleri(ROS), serbest elektrona veya kararsız bağa sahip oksijen içeren moleküllerdir ve molekülün hücrelerdeki nükleik asitler, lipidler, proteinler ve karbonhidratlarla reaksiyona girmesine izin veren bu özelliklerdir. ROS'un aşırı üretimi yaşlanmanın ve kanser, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, kardiyovasküler hastalık, nörodejeneratif bozukluklar (Alzheimer, Huntington, Parkinson, amiyotrofik lateral skleroz, spinoserebellar ataksi, iskemik inme) ve inflamatuar bağırsak hastalığı gibi birçok kronik ve dejeneratif hastalığın gelişiminde rol oynamaktadır (Shekhar vd., 2021). ROS'un birçok türü spermatozoonda bulunur bunlar arasında süperoksit (O2-), hidrojen peroksit (H2O2), hidroksil radikal (OH), peroksil (ROO-), singlet oksijen (O2), nitrik oksijen (NO), peroksit iyonu (O22-) ve hidroksil iyonu (OH-) yer almaktadır ve

hepsi kendi reaktivite spektrumları ile farklı biyolojik hedeflere sahiptir (Aitken, 2017). ROS oluşumu spermatozoonlarda ve seminal plazmada endojen olarak (i) spermatozoon mitokondrilerinde aerobik metabolizma ve ATP üretiminin bir yan ürünü olarak veya (ii) genital yolla enfeksiyon veya inflamasyona yanıt olarak ayrıca eksojen olarakta seminal plazmadaki yüksek lökositler, sigara içme, aşırı alkol tüketimi, radyasyona maruz kalma, genital ısı stresi ve obezite gibi kaynaklardan olabilir (Barazani vd., 2014). Normal fizyolojik süreçlerin, yani kapasitasyonun, hiperaktivasyonun ve akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesi için spermatozoonlarda biyolojik bir ROS konsantrasyonu bulunması fertiliazsyon başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için gereklidir. ROS, adenilil siklazın aktivasyonu aracılığıyla kapasitasyonu kolaylaştırır, böylece ATP'yi siklik AMP'ye (cAMP) dönüştürür. cAMP'nin downstream etkileri, hiperaktivasyon için gereken proteinlerin fosforile edilmesine neden olur ve ROS, tirozin fosfatazların inhibisyonuyla desteklenen hiperaktivasyonu kolaylaştırır (Boerke vd., 2013). ROS ayrıca akrozom reaksiyonu ve gametlerin füzyonu için gereklidir, çünkü membran içindeki kolesterolü oksitleyip çıkartarak membran akışkanlığını arttırır. Ancak, spearmdeki ROS konsantrasyonu spektrumun her iki ucunda (çok düşük veya çok yüksek) zararlı olabilir. Düşük seviyelerde ROS, adenilat siklazın azaltılmış aktivasyonu yoluyla spermatozoon kapasitasyonunu inhibe ederken, yüksek seviyelerde ROS, spermatozoon lipid peroksidasyonunu ve DNA hasarını indükler (Aitken ve Drevet, 2020). Spermatozoonlar, sitoplazmik süpürücü enzimlerin eksikliği ve plazma membranlarında bulunan yüksek seviyelerde çoklu doymamış yağ asitleri nedeniyle ROS hasarına karşı oldukça hassastır, bu da ROS ile ilişkili hasarı onarma kapasitelerini azaltır (Aitken ve Fisher, 1994). Spermatozoonun yağ asitli membranları nispeten kararsız bağlar içerir ve ROS tarafından kolayca oksitlenerek kendini sürdüren bir döngüde yakındaki yağ asitleriyle reaksiyona girerek lipit peroksidasyonu oluşturur. Spermatozoonların özellikle orta kısımda membranlarının bozulması, erkek infertilitesinin bir işaretidir ve spermatozoon motilitesinde azalmaya neden olur (Khosrowbeygi ve Zarghami, 2007). ROS ile ilişkili sperm DNA hasarı, guanin'in 8-hidroksi-20-deoksiguanozine (8OHdG) oksitlenmesi yoluyla oluşur (Su vd., 2019). Sperm, bu bazı baz tamir mekanizmalarını kullanarak çıkarabilir, ancak sadece gerekli mekanizmanın yarısı bulunur ve diğer yarısı oositte bulunur (Barati vd., 2020). Bu nedenle, bu abazik bölge, fertilizasyon sırasına kadar onarılmaz ve zararlı bir şekilde,

DNA molekülünü istikrarsız hale getirebilir, tek sarmal kırıklara, çift sarmal kopmaları ve nihayetinde DNA parçalanmasına neden olabilir (Aitken, 2017). Bu nedenle, spermdeki herhangi bir ROS kaynaklı DNA hasarı, doğumda aktarılabilir ve mutajenezise, çoklu doymamış lipidlerin peroksidasyonuna, mitokondriyal metabolizmanın bozulmasına ve erken embriyoda metilasyon işaretlerinde değişikliklere neden olabilir. Böylece, kalıtsal mutasyonlara ve pediatrik fenotiplere yol açabilir (Weitzman vd., 1994). Spermatozoondaki yüksek ROS konsantrasyonları, obezite, sigara içme, aşırı alkol alımı, yaşlanma, çevresel ve mesleki maruziyet ve kısırlık gibi erkek patolojilerinde gözlenmiştir; bunların tümü kısırlık, yavruların hastalığa karşı artan duyarlılığı ve erkeklerde yaşam süresinin kısalması ile ilişkilendirilmiştir (Sharpe, 2010).

1.11.Antioksidanlar

Antioksidanlar, hücrelere zarar vermeden önce ROS veya serbest radikalleri nötralize veya yok ederek yaşamımızın vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyonları engelleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme becerisine sahip maddeler antioksidan olarak adlandırılır (Ellıot, 1999). ROS tarafından indüklenen oksidasyon, hücre membranı çözünmesi, membran protein hasarı ve DNA mutasyonlarına neden olur, bu da yaşlanmaya ve arterioskleroz, kanser, diyabet mellitus, karaciğer hasarı, iltihaplanma, cilt hasarları, koroner kalp hastalıkları ve artrit gibi birçok hastalığın gelişimini başlatır veya yaygınlaştırır. Sperma sulandırıcısına eklenen antioksidanlar spermanın saklanması işlemi süresince oksidatif stresi azaltıp tesir edebilmekte ve bununla birlikte dondurulan sperma kalitesini artırmaktadır. Antioksidanların sperma kalitesini artırarak, DNA hasarını önleyerek ve lökosit hücreleri tarafından üretilen serbest radikalllerin (ROS) süpürücüsü olarak spermotozoonları himaye etmektedir (Bilodeau vd., 2001). Antioksidanlar, ROS'un saldırısına karşı hücreleri savunmanın doğal yoludur. Oksidatif stres, vücuttaki serbest radikallerin antioksidan savunmalarımızı aştığı durum olarak tanımlanır. Bu durumda, kromozomların telomer uzunluğunu da azaltırlar. Oksidasyon, bir maddenin bir oksitleyici ajanla elektron alışverişi yoluyla reaksiyona girmesi olarak tanımlanır. Bu oksidasyon reaksiyonları tarafından üretilen serbest radikaller, hücrelere zarar veren zincir reaksiyonlarına başlatırlar (Bangalore vd., 2005). Antioksidanlar, serbest radikal

ara ürünlerini kaldırarak ve kendileri oksitlenerek diğer oksidasyon reaksiyonlarını engelleyerek bu zincir reaksiyonlarını sonlandırırlar. Bu nedenle, antioksidanlar genellikle tiyoller veya polifenoller gibi indirgeyici ajanlardır. Oksidasyon reaksiyonları hayat için önemlidir, ancak hücrelere zarar verirler. Bu nedenle, bitkiler ve hayvanlar glutatyon (GSH), C vitamini ve E vitamini gibi çeşitli antioksidan türlerini ve katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve çeşitli peroksidazlar gibi enzimleri içeren karmaşık sistemlerini korurlar. Antioksidan seviyelerinin düşük olması veya antioksidan enzimlerinin inhibisyonu, oksidatif stresi tetikler ve hücrelere zarar verir veya öldürür. Bu oksidanlar, lipid peroksidasyonu (LPO) gibi zincir reaksiyonları veya DNA veya proteinleri oksitleyerek hücrelere zarar verirler (Calliste vd., 2005). DNA hasarı, DNA tamir mekanizmaları tarafından düzeltilmezse mutasyonlara ve muhtemelen kansere neden olabilirken, protein hasarı enzim inhibisyonuna, denatürasyona ve protein yıkımına neden olur. Beyin, yüksek metabolik hızı ve çoklu doymamış yağ asidi seviyeleri nedeniyle LPO tarafından oksidatif hasara karşı savunmasızdır. Antioksidanlar, nöronlarda oksidatif stresi önler ve apoptozu ve nörolojik hasarı önler. Antiyoksidanlar enzimatik antioksidanlar ve non-enzimatik antioksidanlar olmak üzere iki türde sınıflandırılabilir (Cerda ve Espin, 2005).

1.11.1.Non-Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar serbest radikal zincir reaksiyonlarını keserler. Örneğin, E vitamini sadece beş reaksiyondan sonra serbest radikal aktivitesinin zincirleme tepkimelerini keser. Diğer örnekler arasında C vitamini, bitki polifenoller, karotenoidler, Se ve GSH bulunur.

1.11.2.Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar serbest radikalleri parçalayarak ve uzaklaştırarak çalışırlar. Genel olarak, bu antioksidan enzimler, bir dizi iz metal koenzim (bakır, çinko, mangan ve demir) gerektiren çok adımlı bir süreçte bunları hidrojen peroksit haline dönüştürerek ve suya çevirerek tehlikeli oksidatif ürünleri uzaklaştırırlar. Bu enzimatik antioksidanlar eksojen olarak takviye edilemez, ancak vücudumuzda üretilmelidir (Tachakittirungrod vd., 2007).

1.11.2.Proantosiyanidin

Yoğun tanenler olarak da bilinen proantosiyanidinler, meyvelerde, sebzelerde, tohumlarda, kabuklu yemişlerde, çiçeklerde ve kabukta yaygın olarak bulunan, doğal olarak oluşan güçlü polifenolik antioksidanlardır. Proantosiyanidinler, Vitis vinifera'nın tohumlarından elde edilir ve serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif strese karşı koruyucu etkileri olan biyolojik olarak aktif bileşikler içerir (Hala vd., 2010). Son on yılda, bitki ve gıda kaynaklı proantosiyanidinler, kronik hastalıkları önleme yetenekleri nedeniyle yalnızca gıda endüstrisinden değil, aynı zamanda halk sağlığı kuruluşlarından da ilgi görmektedir (Nie vd., 2019). Proantosiyanidinlerin antibakteriyel, antiviral, antiinflamatuar, antialerjik ve damar genişletici etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonunu, trombosit agregasyonunu, kılcal geçirgenliği ve kırılganlığı inhibe ettikleri gösterilmiştir (Avdatek vd., 2020). Yapısal olarak proantosiyanidinler, oksijen radikal süpürücüsü ve lipit peroksidasyon inhibitörü olarak temel oluşturan çift bağlarla konjuge hidroksil grubuna sahiptir. Bu nedenle vücuda saniyeler içinde ve çok hızlı bir şekilde nüfuz ettiği güçlü bir serbest radikal temizleyici olarak etki ettikleri ortya konmuştur (Bagchi vd., 1997). Proantosiyanidinler, farklı miktarlarda kateşinlerin veya epikateşinlerin C4-C6 veya C4-C8 bağları ile yoğunlaştırılmasıyla oluşan geniş bir doğal polifenolik bileşikler sınıfıdır (Brillouet vd., 2017). Oligomerik proantosiyanidinler (OPC) iki ile beş polimere sahiptir ve suda yüksek oranda çözünürler (Plumb vd., 1998). OPC, süperoksit anyon radikallerinin ve hidroksil radikallerinin ortadan kaldırılmasını etkili bir şekilde indükleyebilir (Zhao vd., 2014). Üzüm çekirdeği proantosiyanidinlerinin C, E vitaminleri ve karotenden daha güçlü serbest radikal temizleyiciler olduğu in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir (Bagchi vd., 2014). Proantosiyanidinler, flavan-3-ol birimlerinin oligomerlerini ve polimerlerini içermektedir (He vd., 2008). Proantosiyanidinlerdeki çoklu fenolik hidroksil gruplarının varlığı, vücutta H+ salınmasına neden olarak serbest radikallerle rekabet ederek organizmayı lipid oksidasyonuna karşı korur. Lipit peroksidasyonunu, trombosit agregasyonunu, kapiller geçirgenliği ve kırılganlığı inhibe etme özelliği olduğu ve fosfolipaz A_2, siklooksijenaz ve lipojenaz gibi enzim sistemlerini etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca, proantosiyanidinlerin serbest radikal üreticisi olan ksantin oksidazın aktivitesini inhibe etme yeteneğine sahip olduğu kanıtlanmıştır (Fine, 2000). Bagchi vd., (2000) proantosiyanidinlerin antioksidan

enzimlerin ekspresyonunu arttırarak ve serbest radikallerin rejenerasyonunu azaltarak antioksidan bir rol oynayabileceğini ileri sürmektedir.

Tez çalışmamızda Afyonkarahisar koşullarında yetiştirilen Sönmez ırkı koçların spermalarının dondurulmasında sulandırıcıya katılacak olan farklı dozdaki proantosiyanidinin motilite, anormal ve ölü-canlı spermatzoon oranı, membran bütünlüğü, oksidatif stres parametreleri ile DNA hasarı üzerine etkisinin ortaya konması amaçlanmaktadır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Hayvan Materyali Bakım ve Besleme

Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AKÜHADYEK) tarafından 49533702/120 ve AKÜHADYEK-97-21 refarans numarası ile etik onay alınarak çalışmaya başlandı. Hayvan materyali olarak bu çalışmada Afyonkarahisar ili TR 03856924 işletme nolu Feyzi Şensoy'a ait özel bir çiftlikte bulunan 2-3 yaşlı 3 adet Sönmez ırkı koç kullanılmıştır. Hayvanların bakım ve beslenmesi işletmenin yem proogmanına göre sağlandı. Koçların androlojik muayeneleri kabul görmüş yöntemlerle yapıldı.

2.2. Suni Vajenin Hazırlanması ve Sperma Alımı

Hayvanlardan sperma suni vajen yardımıyla alındı. Spermanın alınamsı için, koçlara özel boyutlarda hazırlanmış silindir şeklinde suni vajenler kullanıldı. Suni vajenler kullanılmadan önce hem dış silindirik yapının hem de iç kısım ile iç laştiği bölümünün dezenfeksiyonu yapılıp kurutmaya bırakıldı. Silindir şeklindeki suni vajenin içinden iç lastik geçirilip her iki ucuda silindirin dış yüzeyine çevrilerek lastik bantlar ile sabitlendi. Daha sonra dereceli sperma toplama kadehi suni vajene uygun bir şekilde yerleştirildi. Bu işlemlerden sonra suni vajenin üst kısmunda bulunan valf bölümünden 45-50 ^{o}C'lik sıcak su ilave edildikten sonra valf bölümünden hava üflenerek gerekli basınç elde edildi. Suni vajenin giriş kısmına bir baget yardmıyla kayganlaştırıcı olarak vazelin uygulandı. Böylelikle suni vajeni sperma alma için gerekli kriterler olan sıcaklık, basınç ve kayganlığı sağlamış oldu (Demirci, 2002).

2.3. Koç Spermasının Sulandırılması, Gruplandırılması ve Kriyopreservasyonu

Ayrı ayrı tüplere alınan sperma örnekleri bir tüpde birleştirilip (pooling) spermatolojik muayeneleri yapıldıktan sonra 5 eşit hacime ayrılarak daha önceden hazırlanmış ve farklı antioksidanlar içeren sulandırıcılarla sulandırıldıktan sonra kryoprotektan olarak % 5 gliserol içeren sulandırıcı ile son sulandırma yapıdı. Spermanın uzun süreli saklanması amacıyla spermanın sulandırılmasında kullanılacak grupların içerikleri;

Kontrol Grubu. Tris- sitrik asit- glukoz-yumurta sarısı- penicillin- streptomycin- gliserol

Grup I. Tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı-penicillin-streptomycin-gliserol + 10 µg/ml proantosiyanidin

Grup II. Tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı-penicillin-streptomycin-gliserol + 25 µg/ml proantosiyanidin

Grup III. Tris-sitrik asit- fruktoz glukoz-yumurta sarısı-penicillin-streptomycin-gliserol + 50 µg/ml proantosiyanidin

Grup IV. Tris-sitrik asit- früktoz-glukoz-yumurta sarısı-penicillin-streptomycin-gliserol + 100 µg/ml proantosiyanidin sulandırıcıları ile deneme grupları oluşturulacaktır.

Gliserolizasyon sonrası spermalar 4ºC'de 3 saat ekilibrasyona bırakıldıktan sonra 4ºC'de bulunan spermalar 0,25 ml'lik payetlere çekilip sıvı azot buharında 12 dakikada dondurulduu. Payetler inceleme gününe kadar sıvı azot içerisinde (-196ºC) depolandı.

2.4. Sperma Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Dondurulmuş payetlerden her bir çalışma grubu için en az 6 adet olmak üzere toplam 30 payet, 37°C'lik su banyosunda 30 saniye boyunca çözdürüldü. Çözüm sonrası spermatolojik parametrelerden motilite, anormal ve ölü-canlı spermatozoa oranı, membran bütünlüğü bunun yanı sıra Comet Assay yöntemiyle DNA hasarı ve oksidatif stres yönünden değerlendirmeleri yapıldı.

2.4.1. Spermatozoonların Motilitesi

Isıtma tablalı (37°C) faz-kontrast mikroskopta analiz geçekleştirildi. Lama bir damla sperma ve bir damlada sulandırıcı (izotonik) damlatılıp karıştırıldıktan sonra karışımın üzeri lamael ile kapatıldı. Daha sonra 100x objektifi ile görüntü sağlanıp, 200x ve 400x

objektifler ile değerlendirme yapıldı. En az üç yada beş saha taranarak değerlendirme yapıldı ve kendi başına güçlü bir yöne düzgün doğrusal hareket eden spermatozoon hücreleri, aynı mikroskop sahasındaki tüm spermatozoonlara oranı yüzde (%) şeklinde belirlenerek kaydedildi (Hafez, 1987).

2.4.2. Anormal Spermatozoonların Oranı

Anormal spermatozoon oranı sperma örneklerinin Giemsa boya ile boyanarak belirlendi. Lam üzerine 10 mikrolitre sperma örneğinden bırakıldı. Daha sonra froti çekilerek yatay bir şekilde kurumaya bırakıldı. Bu işlemi takiben alkolle fikse edilip kuruması için beklenildi. Boyama aşamasına kuruma işleminin ardından geçildi ve hazırlanan Giemsa boyasından pipetle lamın üzerini kapatacak şekilde yayıldı. Kırk beş dakika beklenildi. Bekleme süresinin ardından lamlar yıkandı. Yıkanan lamlar kuruması için getaway saklama kabına sırayla bırakıldı. Kuruma işleminden sonra faz-kontrast mikroskopta 40X ' de 400 spermatozoon sayılarak anormal spermatozoon oranı olarak belirlendi. Normal olmayan spermatozoonlar, anormal olarak kabul edildi ve spermatozoonun baş, orta kısım, kuyruk ve toplam anomalileri ayrı ayrı belirlenerek kayıt altına alındı(Watson, 1975).

2.4.3. Hipo-ozmotik Eosin Boyama Testi (HE testi)

Ölü-canlı spermatozoon oranını ve membran bütünlüğünü kombine olarak HE test boyama yöntemi ile belirlendi. Hazırlanan 100 mOsm'luk solüsyondan 1 ml ependorfa alıp içinede 10 µl sperma numunesinden ve 20 µl eosin boyasından ilave ederek Ependorf tüpler içerisine su banyosunda karışım 37ºC'lik su banyosunda 30 dk. inkübasyona bırakıldı. Daha sonra karışımdan bir damla lam üzerine alınıp frotiler çekildi. Frotilerin hızlıca kurutulması sağlandıktan sonra mikroskopta 400x büyütmede 200 spermatozoon baş kısmının tamamın ya da bir bölümünün boya alıp almayışına ve kuyruktaki kıvrılma veya şişmeye olup olmayışına göre dört sınıfa ayrıldı.

Tip I. Kuyruk şişmiş, baş boya almamış H+/E-

Tip II. Kuyruk şişmemiş, baş boya almamış H-/E-

Tip III. Kuyruk şişmiş, baş boya almış H+/E+

Tip IV. Kuyruk şişmemiş, baş boya almış H-/E+

Çalışmada sadece kuyruk şişmiş, baş boya almış (H+/E-) spermatozoonlar değerlendirildi.

Eosin boyasının hazırlanışı:
Eosin-Y (1,67 gram)
Sodyum Sitrat (2,9 gram), 100 ml distile suya tamamlanarak hazırlandı.
HOS Test Solüsyonunun hazırlanışı:
0,9 g fruktoz
0,49 g sodyum sitrat, 100 ml'ye tamamlanarak (100 mOsm/kg) hazırlanmıştır (Avdatek vd. 2018).

2.4.4. Dna Hasarı Bulgusu

Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) yöntemi kullanılarak spermatozoon DNA hasarı belirlendi. Alkali pH da farklı molekül ağırlıklarına ve elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda göçleri esasına dayanan bu yötemin bir diğer adı da Comet assay yöntemi olarak adlandırılmaktadır (Singh vd. 2003).

2.4.4.1. Spermanın Yıkanması, Lamların Hazırlanması ve Hücre Lizisi

Payetler 37ºC'de 30 sn çözdürdükten sonra örnekler kalsiyum ve magneztum içermeyen PBS ile +4 ºC'de 800x g'de 10 dk santrifüj edilerek yıkandı. Bu işlem süpernatant atılarak en az 2 kere tekrarlanarak nihayetinde ml'de $20x10^6$ hücre olacak şekilde sulandırıldı (Nandre, 2007). Kullanılacak olan tamamı traşlanmış lamların üzerine önce ilk kat olarak % 0.75'lik LMA (low malting agar) düşük kaynama dereceli agardan yayılarak oda ısısında kurutuldu. Daha sonra sulandırılmış spermadan 10 µl ve üzerine 90 µl % 1'lik LMA 37 ºC'de karıştırılıp birinci katın üzerine yaylarak 24x60 mm'lik lamel ile kapatılarak +4 ºC'de sertleşmesi için bekletildikten sonra lameller hassas bir şekilde çekilerek lamlar hazır hale getirilirdi (Hughes vd., 1997). Spermatozoonların DNA iplikçiklerinin agaroz içinde serbest halde hareket etmesi için hücre ve çekirdek zarını lizize eden lizis solüsyonu kullanıldı. Sperma numuneleri lam üzerine agaroz jel gömüldükten sonra, slaytlar yüksek yoğunlukta tuz ve deterjan içeren yeni hazırlanmış soğuk lizis solüsyonunda (2.5 M NaCl, 100 mM Na2-EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, pH 10) yaklaşık olarak 1 saat boyunca +4 ^{0}C'de inkübasyona tabii tutuldu. Daha sonra, slaytlara 40 mM DTT ilave edilerek 1 saat daha +4 ^{0}C'de inkübasyona tabii

tutuldu. Son olarak, slaytlara 100 µg/ml proteinase K ilave edilerek 37ºC'de bir gece boyunca inkübasyona tabii tutuldu (Singh vd., 2003).

2.4.4.2. Slaytların Elektroforezi

DNA iplikçiklerinin ayrışabilmesi için elektroferezde yürütme öncesinde slaytlar taze olarak hazırlanmış ve soğutulmuş elektroforez tamponunda 20 dk. inkübasyona bırakıldı. Agaroza gömülü spermatozoonların elektroforez tamponunda (300 mM NaOH ve 1 mM EDTA, pH 12.5) kuluçkası sona erdikten sonra DNA'lar bu tampon çözelti içerisinde 300 mA ve 20 volt'luk elektriksel alanda 20 dk yürütüldü.

2.4.4.3. Slaytların Nötralizasyonu ve Boyanması

Alkali elektroforez çözeltisini slaytlardan uzaklaştırmak için elektroforezde yürütme işlemi sonrası slaytlar yeni hazırlanmış tris tamponuyla (40 mM Tris HCl, pH 7.4) 3 kez yıkanarak nötralizasyon sağlandı. Nötralizasyon sona erdikten sonra slaytlar floresan etkili boya olan ethidium bromid (5 µg/ml) kullanılarak DNA iplikçikleri boyandı ve 4 saat içinde sonuçlar değerlendirildi (Hu vd. 2008).

2.4.4.4. Slaytların Değerlendirilmesi

Ethidium bromide ile boyanan slaytlar üstüne lamel kapatılarak 400x büyütmeli floresan atamalı mikroskop (Olympus CX-31) ile 100 adet DNA iplikçiğinin görüntüsü değerlendirildi. Florasan mikroskobu altında slaytlar incelendi ve TriTek CometScore yazılım versiyonu 1.5 (TriTek Corp., Sumerduck, VA, ABD) kullanılarak bir kuyruklu yıldız testi ile sonraki analizler / skorlama için dijital görüntüler saptandı. Toplam 100 sperm hücresi için beş parametre her slaytta incelendi. Bütün çalışmalar daha fazla kromatin dejenerasyonuna karşı korunmak için karanlık oda şartlarında yapıldı (Avdatek vd. 2018).

2.5 Oksidatif Stres Paramatrelerinin Değerlendirilmesi

2.5.1. Glutatyon (GSH)

Sedlak ve Lindsay (1968), metodu kullanılarak spermatozoon Glutatyon içeriği ölçüldü. Örnekler % 50 trikolroasetikasit ile çöktürüldükten sonra 5 dk. 1000 g'de santrifüj edildi. Reaksiyon karışımı 0.5 ml supernatant, 2.0 ml Tris-EDTA tamponu (0.2 mol/l; pH 8.9) ve 0.1 ml 0.01 mol/l 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoik asit'den oluşmaktadır. Çözeltinin konsantrasyonu spektrofotometrede 412 nm'de ölçülerek belirlendi. Glutatyon değerleri mg/ml olarak ölçüldü.

2.5.2. Malondialdehit (MDA)

Draper ve Hadleyin (1990), çift kaynatma metodu ile Malondialdehit konsantrasyonu belirlendi. Kısaca metod Malondialdehit ile thiobarbituric asitin (TBA) reaksiyona girip eflatun mor rengin oluşup spektrofotometrede 532 nm'de ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Malondialdehit değerleri nmol ml olarak kayıt altına alındı.

2.5.3. Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü

Ölçüm Erel (2005), geliştirdiği metoda göre, numune ve ayıraçlar karıştırıldıktan 5 dakika sonra spektrofotometrede kinetik okuma yapılarak gerçekleştirildi. Metot, numunede bulunan antioksidanların, kullanılan ayıraçlardaki koyu yeşil renkli ABTS+ (2,2;-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikal katyonunu indirgeyerek ABTS molekülüne dönüştürmesi esasına dayanmaktadır. Numunede bulunan antioksidan miktarına bağlı olarak değişebilen, ABTS+ radikalinin ABTS ye indirgenme oranı attıkça, koyu yeşil olan renk açılmaya, beyazlamaya bağlamakta; spektrofotometrede 660 nm de okunan absorbans değerlerinin değişimi numunede bulunan total antioksidan düzeyleri ile ilişkilendirilmektedir. Ölçüm genelde TAS analizlerinde kullanılan, bir vitamin E analoğu olan ve Trolox Equivalent olarak adlandırılan standart antioksidan solüsyonu kullanılarak kalibre edilmekte, ölçülen TAS düzeyleri mmol Trolox Equivalent/L olarak okunmaktadır.

2.5.4. Total Oksidatif Stres (TOS) Ölçümü

Ölçüm Erel (2005), geliştirdiği metoda göre, numune ve ayıraçlar karıştırıldıktan 3-4 dakika sonra spektrofotometrede end-point okuma yapılarak gerçekleştirildi. Metot, numunede bulunan oksidanların analizde kullanılan ayıraçtaki ferrous (Fe+2) iyon komplekslerini ferrik (Fe+3) forma okside ederek dönüştürme esasına dayanmaktadır. Oksidasyon reaksiyonu sonucu miktarı artan ferrik iyonlar, reaksiyonun asidik ortamında bulunan kromojen ile renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Oluşan rengin yoğunluğu numunede bulunan oksidan maddelerin toplam miktarına bağlı olarak değişmektedir. Bu değiŞimler spektrofotometrede 560 nm de okuma yapılarak belirlenmektedir. TOS analizi hidrojenperoksit (H_2O_2) ile kalibre edilir ve sonuçlar hidrojenperoksit equivalent litre (μmol H_2O_2 Equiv./L) olarak ifade edilmektedir.

2.6. İstatistiksel Analiz

Önemlilik testlerinden önce, tüm değişkenler parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilks test ile varyansların homojenliği yönünden ise Levene's testi ile incelendi. Normal dağılım gösteren değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü tek varyans analizi (One-Way ANOVA) ile. Gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testinden yararlanıldı. SPSS 22.0 paket programından yararlanıldı. $P<0,05$ ve $P<0,001$ düzeyi anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Dondurma-Çözdürme Sonrası Motilite ve Anormal Spermatozoon Oranı

Çalışmamızda sonucunda ortay koyduğumuz sübjektif motilite ve anaormal spermatozoon oranlarına ait değerler Çizelge 3.1.'de verildi. Sübjektif motilite bakımından kontrol grubuna göre 10 µg/ml proantosiyanidin ilave edilen gruptaki artışın istatistiki olarak anlamlı ($P<0,05$) bulundu. Baş, kuyruk ve toplama anormal spermatozoon oranları açısından kontrol grubuna göre 10 µg/ml proantosiyanidin içeren gruptaki düşüş ile orta kısım bakımından 10 ve 25 µg/ml proantosiyanidin içeren gruplardaki azalma istatistiki olarak önemli ($P<0,05$) bulundu.

Çizelge 3.1. Dondurma-Çözdürme Sonrası Motilite ve Anormal Spermatozoon Oranı ($\overline{X} \pm$ SEM, n:18).

Gruplar	Motilite (%)	Baş (%)	Orta Kısım (%)	Kuyruk (%)	Toplam (%)
Kontrol	65,41±1,64^{b}	2,16±0,21^{a}	2,50±0,26^{b}	8,67±0,40^{a}	13,33±0,42^{ab}
10 µg/ml	74,17±1,54^{a}	1,00±0,13^{b}	0,92±0,08^{d}	6,33±0,38^{b}	8,25±0,49^{c}
25 µg/ml	45,42±1,19^{c}	2,00±0,45^{a}	1,92±0,38^{c}	7,75±0,28^{a}	11,66±0,40^{b}
50 µg/ml	40,00±1,71^{d}	2,33±0,26^{a}	2,83±0,10^{ab}	8,50±0,77^{a}	13,66±0,31^{ab}
100 µg/ml	31,66±1,24^{e}	2,08±0,73^{a}	3,08±0,24^{a}	8,75±0,88^{a}	15,50±1,53^{a}
p	*	*	*	*	*

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

3.2. Dondurma-Çözdürme Sonrası HE-Test Değerleri

Araştırmamıza ait olan HE-test sonuçları Çizelge 3.2.'de sunuldu. H+/E- bakımından kontrol grubuna göre 10 µg/ml proantosiyanidin içeren gruptaki artışın ve diğer gruplardaki azalmanın, H-/E- açısından kontrol grubuna göre 25, 50 ve 100 µg/ml proantosiyanidin ilave edilen gruplardaki azalmanın, H+/E+ değerlerine bakıldığında göre kontrol grubuna kıyasla 10 µg/ml proantosiyanidin içeren gruptaki düşüşün ve diğer gruplardaki artışın ve H-/E+ açısından kontrol grubuna göre 25, 50 ve 100 µg/ml proantosiyanidin içeren gruplardaki artışın istatistiki olarak önemli ($P<0,05$) olduğu belirlendi.

Çizelge 3.2. Dondurma-Çözdürme Sonrası HE-test Değerleri ($\overline{X}$ ± SEM, n:18).

Gruplar	H+/E- (%)	H-/E- (%)	H+/E+ (%)	H-/E+ (%)
Kontrol	39,83±2,26^{b}	29,33±2,03^{a}	17,00±1,55^{c}	13,83±1,87^{c}
10 µg/ml	46,00±1,15^{a}	33,17±1,22^{a}	10,17±1,45^{d}	10,67±0,80^{c}
25 µg/ml	26,00±2,17^{c}	21,17±1,83^{b}	28,67±3,42^{b}	24,17±2,07^{b}
50 µg/ml	21,16±060^{d}	16,17±0,31^{c}	36,33±2,17^{a}	26,67±1,72^{b}
100 µg/ml	14,66±2,06^{e}	12,33±0,49^{c}	38,67±0,67^{a}	34,33±2,48^{a}
P	*	*	*	*

a-e: 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 DNA hasarına ait bulgularımız Çizelge 3.3.'de verildi. Kontrol grubuna Tail lenght açısından 10 ve 25 µg/ml proantosiyanidin ilave edilen gruplardaki düşüşün, Tail DNA bakımından 10, 25 ve 50 µg/ml proantosiyanidin ilave gruplardaki azalmanın, Tail moment açısından da tüm antioksidan ilave edilen gruplardaki düşüşün istatistiki olarak anlamlı (P<0,001) olduğu belirlendi.

Çizelge 3.3. Dondurma-Çözdürme Sonrası DNA Hasar Bulguları ($\bar{X}$ ± SEM, n:18)

Gruplar	Tail Lenght (µm/s)	Tail DNA (%)	Tail Moment (µm/s)
Kontrol	38,31±1,06^{a}	40,80±0,67^{a}	28,06±083^{a}
10 µg/ml	31,24±1,28^{c}	35,58±0,60^{b}	22,32±0,78^{b}
25 µg/ml	32,88±1,13^{bc}	36,11±0,63^{b}	23,12±1,14^{b}
50 µg/ml	36,08±0,88^{ab}	36,63±0,75^{b}	23,27±0,87^{b}
100 µg/ml	36,03±1,40^{ab}	39,82±0,58^{a}	23,61±1,08^{b}
P	**	**	**

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

3.4. Dondurma-Çözdürme Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri

Dndurma-çözdürme sonrası elde edttiğimiz oksidatif stres parametrelerine ait veriler Çizelge 3.4.'de sunuldu. MDA, GSH, TAS ve OSI bakımından gruplar arasında istatistiki bir fark belirlenemişken TOS açısından kontrol grubuna göre 10, 25 ve 100 µg/ml proantosiyanidin ilave edilen gruplardaki artış istatistiki olarak önemli (P<0,05) bulundu.

Çizelge 3.4. Dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametreleri ($\bar{X}$ ± SEM, n:18).

Gruplar	MDA nmol/ml	GSH mg/ml	TAS (mmolTrolox Equiv./L)	TOS (µmol hidrojenperoksit-Equiv./L)	OSI
Kontrol	4,10±0,18	0,38±0,002	6,77±1,21	13,19±0,38^{b}	20,11±1,30
10 µg/ml	4,98±0,32	0,38±0,003	7,09±0,78	15,60±1,05^{a}	22,31±2,10
25 µg/ml	4,56±0,53	0,39±0,008	7,04±0,35	17,03±0,29^{a}	24,24±0,87
50 µg/ml	4,29±1,52	0,39±0,001	6,75±0,40	13,47±0,78^{b}	19,92±1,75
100 µg/ml	4,83±0,97	0,39±0,000	7,37±0,12	15,74±0,72^{a}	21,46±0,80
p				*	

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

4.TARTIŞMA

Başka türlere kıyasla koç spermatozoasının membranındaki fosfolid-kolesterol oranının düşük olması spermatozoonları oksidatif hasara karşı hassas hale getirmektedir (Gündoğan vd. 2010). Spermanın kriyopreservasyonunda çözüm sonrası elde edilen motilite en önemli sperma kalite kriterlerindendir. Sperma sulandırıcısına ilave edilen antioksidan bir taraftan spermatozoonların oksidatif hasara maruz kalmasını engellerken bir taraftanda spermatozoon motilitesinin artmasına katkı sağlamaktadır. Spermanın uzun süreli saklanması sırasında serbest radikaller ve ROS'un artması sonucunda da oksidatif stres şekillenmekte, bunun nedenininde palazma zarının yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna olduğu bilinmektedir. Normal spermatozoa fonksiyonu, kapasitasyonla ilişkili sinyal iletim yollarını teşvik etmek için düşük ROS seviyelerine bağlı olsa da, spermatozoa, savunma enzimlerini barındırmak için sınırlı hacim ve sınırlı sitoplazmik alandan kaynaklanan önemli antioksidan koruma eksikliği nedeniyle oksidatif strese karşı oldukça savunmasızdır (Bansal ve Bilaspuri, 2010). Ek olarak, spermatozoon zarındaki yüksek çoklu doymamış yağ asitleri seviyeleri, onu oksidatif strese karşı daha duyarlı hale getirir. Buna göre, spermatozoadaki aşırı ROS organel hasarına neden olur ve kademeli olarak intrinsik apoptotik değişimler başlatır, sonuç olarak spermatozoa hareketliliğini, DNA bütünlüğünü ve canlılığını kaybeder ve epigenetik profillerini değiştirir (Aitken vd., 2012). Lipit peroksidasyonu, spermatozoon motilitesi üzerinde önemli etkisi olan doğal bir olgudur (Alvarez ve Storey, 1982). Çok sayıda çalışma, diyetle ve sperma sulandırıcısına antioksidan takviyesinin lipid peroksidasyonunu azaltabileceğini ve antioksidatif durumu iyileştirebileceğini göstermiştir (Salami vd., 2016). ROS, yalnızca biyofilmlerde PUFA'nın peroksidasyonu yoluyla hücre hasarına neden olmakla kalmaz, aynı zamanda LPO'nun ayrışma ürünleri yoluyla da hücre hasarına neden olur. MDA seviyeleri dolaylı olarak hücrelerin serbest radikaller tarafından ne ölçüde saldırıya uğradığını yansıtır (Fraczek vd., 2001). Spermatozoadaki yüksek ROS seviyeleri ve düşük antioksidan seviyeleri, düşük spermatozooa motilitesi ve konsantrasyonu ile ilişkili olduğundan oksidatif stresi en aza indirmek ve sperma kalitesini iyileştirmek için birçok antioksidan kullanılmıştır. Tris bazlı sperma sulandırıcısına farklı yoğunluklarda katılan proantosiyanidin spermatozoon motilitesinde ve membran bütünlüğündeki artışın en önemli nedeni

proantosiyanidinlerin çok zengin antioksidan içeriğinden kaynaklandığı, üzümden elde edilen proantosiyanidin gibi flavonoidler zararlı serbest radikalleri oldukça etkili bir şekilde temizlediği, bu bileşiklerin hücre zarlarına gömülü olan yağlar ve LDL kaynaklı lipid peroksidasyon hasarının azaltmasında yararlı olduğu vurgulanmaktadır (Evans ve Maxwell, 1987).

Farklı konsantrasyonlarda proantosiyanidin ilave ettiğimiz araştırmamızı çözüm sonu 10 µg/ml içeren grubun, kontrol ve diğer gruplara kıyasla subjektif motilitede önemli bir artış sağladığı ($P<0,05$) gözlemledik. Ayrıca baş, kuyruk ve toplam anormal spermatozoon oranı bakımından kontrol grubuna göre 10 µg/ml proantosiyanidin içeren gruptaki ve orta kısım anomaliler açısından 10 ve 25 µg/ml proantosiyanidin içeren gruplardaki azalma istatistiki bakımdan önemli ($P<0,05$) bulunmuştur. Bu çalışmada, proantosiyanidinin sperma sulandırıcısına ilave edilmesinin, başka antioksidanların uygulandığı önceki çalışmaların verilerine paralel spermatozoon motilitesinde doza bağımlı olarak artışlar meydana getirdi (Bucak ve Tekin 2006; Tuncer vd., 2010; Avdatek ve Gündoğan, 2018; Güngör vd., 2019). Spermatozoon plazma zarının stabil olması spermatozoon metabolizmasının yanında akrozom reaksiyonu ve kapasitasyon içinde gereklidir. H+/E- oranı açısından kontrol grubuna göre 10 µg/ml proantosiyanidin ilave edilen gruptaki artış ve H+/E+ oranı bakımından kontrol grubuna göre 10 µg/ml proantosiyanidin içeren gruptaki azalmanın önemli ($P<0,05$) olduğu belirlendi. Ölü-canlı spermatozoon oranı ve membran bütünlüğünün aynı anda değerlendirildiği H/E test, günümüzde sperma kalitesini ortaya koyan önemli fertilite parametrelerindendir (Avdatek vd., 2018). Araştırmamızda sperma sulandırıcısına proantosiyanidin ilavesinin doza bağımlı olarak membran bütünlüğünü önemli ölçüde koruduğunu belirledik. Çalışmamızı DNA hasarı yönünden değerlendirdiğimizde tail lenght bakımından kontrol grubuna göre 10 ve 25 µg/ml proantosiyanidin içeren gruplardaki düşüş, tail DNA açısından ise kontrol grubuna kıyasla 10, 25 ve 50 µg/ml proantosiyanidin katılan gruplardaki azalmanın ve tail moment yönünden kontrol grubuna göre tüm antioksidan içeren gruplardaki azalmalar istatistikî olarak önemli ($P<0,001$) bulundu. Spermatozoon TOS düzeyleri bakımından kontrol grubuna göre 10, 25 ve 100 µg/ml proantosiyandin içeren gruplardaki artış istatistikî olarak önemli ($P<0,05$) bulundu. Çözüm sonu bulgularına baktığımızda 10 µg/ml proantosiyanidin katılan grubun kontrol ve diğer gruplara kıyasla motilite, anormal ve ölü-canlı

spermatozoon oranı, membran bütünlüğü ve DNA hasarını üzerine daha koruyucu bir etki yaptığını belirledik. Konsantrasyon 10 µg/ml'yi aştığında, spermatozoonun fizyolojik özelliklerinin ve antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığını belirtmekte fayda var. Yüksek proantosiyanidin konsantrasyonlarının spermatozoonların apoptozuna neden olabileceğini düşünüyoruz, ancak spesifik moleküler mekanizmalar daha fazla araştırma gerektiriyor.

Çalışmamızla aynı yönde farklı türlerde yapılan çalışmalarda, Avdatek vd. (2020) Merinos koçların spermalarının kısa süreli saklanması için sulandırıcıya ilave ettikleri farklı konsantrasyonda proantosiyanidin çalışmalarında 10 µg/ml katılan grubun kontrol ve diğer gruplara göre spermatozoon motilitesi ve membran bütünlüğü üzerine iyileştirici etkisi olduğunu bildirmektedirler. Kısa süreli saklanan teke sperması sulandırıcısına çeşitli yoğunluklarda katılan proantosiyanidinin sperma kalitesi üzerine yapılan bir çalışmada 30 mg/l katılan grubun kontrol ve diğer gruplara kıyasla spermatozoon membtan bütünlüğünü ve motiliteyi artırdığı ayrıca akrozom hasarını da azalttığı tespit edilmiştir (Wen vd., 2019). Al-Daraji (2012) horoz spermasının kısa süreli sakladığı çalışmasında sulandırıcıya kattığı proantosiyanidinin spermatozoon motilitesini artırdığını bildirmektedir. Domuz sperma sulandırıcısına farklı yoğunluklarda oligomerik proantosiyanidin katılarak yapılan kısa süreli bir çalışmada 50 µg/mL proantosiyanidin içeren grupta elde edilen spermatozoon motilitesini ve membran bütünlüğünü kontrol ve diğer gruplara göre daha iyi koruduğu Li vd. (2018) tarafından belirlenmiştir. Zhao vd. (2017) ahıllarda oksidatif strese maruz bırakılarak yaşayan koçların yemlerine farklı oranlarda güçlü antioksidanlar olarak hareket edebilen zengin bir polifenol kaynağı içeren şaraplık üzüm posası ilave ettikleri çalışmalarında katkı maddesi olarak verilen bu maddenin oksidatif stresi azalttığı ve sperma kalitesini iyileştirdiğini bildirmektedirler. Long vd. (2017), ratlara Zearalenone (ZEN) uygulamasından önce proantosiyanidin verdikleri çalışmalarında ZEN ‘in neden olduğu artmış anormal spermatozoon oranında azalma ve azalmış motilite oranınında artışa yol açarak koruyucu bir etki yaptığını bildirmektedirler. Ratlarda kadminyum ile indüklenerek oluşturulan bazı toksisite çalışmalarında proantosiyanidin uygulamasının spermatolojik parametrelerden motilite, anormal ve ölü/canlı spermatozoon oranı üzerine koruyucu etkisi olduğu ortaya konmuştur (Sönmez ve Tascioglu, 2016; He, vd., 2018; Bashir vd., 2019). Doksorubisin toksisitesine maruz kalmış ratlarda meydana

gelen spermatogonial kromozomal anormalliklerini ve başa bağlı anormal spermatozoon oranını proantosiyanidin uygulmasının önemli derecede azalttığını bildirilmektedir (Attia vd., 2010). Yapılan bir çalışmada kadmiyuma maruz kalan ratların spermatozoonlarında yüksek DNA hasarının oluştuğu fakat proantosiyanidin uygulamasının DNA hasarını koruyucu etki yaptığını bildirmektedir. Bu etkiyi de proantosiyanidinin antioksidan özelliği nedeniyle olduğu ileri sürülmektedir (Bashir vd., 2019). Sisplatin içeren DDP toksisitesine maruz kalmış ratlarda farklı dozlarda uygulanan proantosiyanidinin spermatolojik ve oksidatif stres parametreleri üzerine koruyucu etkisinin olduğu Zhao ve ark. tarafından belirlenmiştir (Zhao vd., 2014). Bai vd. (2014) radyasyona maruz bırakılmış ratlarda testis hasarını önlemek için proantosiyanidin tedavisi uyguladıkları çalışmalarında prosiyanidinlerinin MDA, H_2O_2 ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimini inhibe ederek ve antioksidan aktivitelerini iyileştirerek koruyucu etki yaptığını belirlemişlerdir. Su vd., (2011), proantosiyanidinin Nikel tarafından indüklenen apoptoz ve oksidatif stresi dengeleyerek ratlarda spermatozoon motilitesini artırdığını ayrıca rat testisindeki oksidatif stresi, H_2O_2'yi temizleyerek MDA ve NO'yu doğrudan azaltarak etkisiz hale getirdiğini bildirmektedirler. Ayrıca proantosiyanidin, ROS ve –OH (Wood vd., 2002). gibi serbest radikalleri ortadan kaldırarak DNA'yı oksidatif hasardan kurtarır. Proantosiyanidin süperoksit anyon radikallerini ve hidroksil radikallerini etkili bir şekilde temizleyebilir, böylece serbest radikal zincir reaksiyonlarını kesintiye uğratabilir (Fracassetti vd., 2013). Farklı türlerde farklı uygulama yöntemlerine göre alınan sonuçların elde edilen bulgularımızla uyumlu olması proantosiyanidinin seçkin antioksidan özelliğini değişik ortamlarda dahi gösterebildiği yönünde değerlendirmekteyiz.

5.SONUÇ

Tüm bu bulgular ışığı altında sunduğumuz tez çalışmamızda Sönmez ırkı koçların spermasının kriyopreservasyonunda sulandırıcıya farklı konsantrasyonda ilave edilen proantosiyanidinin 10 μg/ml grubunun spermatozoon motilite, anormal ve ölü-canlı spermatozoon oranı, membran bütünlüğü ile DNA hasarı yönünden kontrol grubu ve diğer gruplara göre en iyi korumayı sağladığı görüldü. Literatür taramalarında spermanın uzun süre saklanmasında proantosiyanidinin 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 fertilite parametreleri ile de desteklenmesinin uygun olacağı kanaatine varıldı.

6.KAYNAKLAR

Aboagla, E. M. E., Terada, T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, *62*(6): 1160-1172.

Aitken, R. J., Jones, K. T., Robertson, S. A. 2012. Reactive oxygen species and sperm function-in sickness and in health. Journal of andrology, 33(6): 1096-1106.

Aitken, J., Fisher, H. 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. Bioessays, 16(4): 259-267.

Aitken, R. J. 2017. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. Molecular reproduction and development, 84(10): 1039-1052.

Aitken, R. J., Drevet, J. R. 2020. The importance of oxidative stress in determining the functionality of mammalian spermatozoa: a two-edged sword. Antioxidants, 9(2): 111.

Al-Daraji, H. J. 2012. The use of certain grape constituents for improve semen quality and storage ability of diluted Roosters' semen. Am J Pharm Tech Res, 2: 308-322.

Alvarez, J. G., Storey, B. T. 1982. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. Biology of reproduction, 27(5): 1102-1108.

Andersen Berg, K. 1999. Artificial insemination in sheep in Norway. In Proceedings of Centre for Reproductive Biology (CRB): Special symposium" Aspects of Ovine Reproduction 8: 35-44.

Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., De Paz, P. 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. Theriogenology, 63(4): 1235-1247.

Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., Gacitua, H. 2002. New trends in gamete's cryopreservation. Molecular and Cellular Endocrinology, 187(1-2): 77-81.

Attia, S. M., Bakheet, S. A., Al-Rasheed, N. M. 2010. Proanthocyanidins produce significant attenuation of doxorubicin-induced mutagenicity via suppression of oxidative stress. Oxid Med Cell Longev, 3(6): 404-413.

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.

Avdatek F., Yeni D., Taşdemir U. 2020. Influence of proanthocyanidin on motility and osmotic resistance parameters of merino ram sperm during short term storage. Kocatepe Veterinary Journal, 13(4): 362-367.

Avdatek, F., Birdane, Y. O., Türkmen, R., Demirel, H. H. 2018. Ameliorative effect of resveratrol on testicular oxidative stress, spermatological parameters and DNA damage in glyphosate-based herbicide-exposed rats. Andrologia, 50(7): e13036.

Bag, S., Joshi, A., Rawat, P. S., Mittal, J. P. 2002. Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment. Small ruminant research, 43(1): 23-29.

Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D. K., Ray, S. D., Kuszynski, C. A., Pruess, H. G. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. Toxicology, 148(2-3): 187-197.

Bagchi, D., Swaroop, A., Preuss, H. G., Bagchi, M. 2014. Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: an overview. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 768: 69-73.

Bai, H., Wang, Z., Cui, J., Yun, K., Zhang, H., Liu, R. H., Cheng, C. 2014. Synergistic radiation protective effect of purified Auricularia auricular-judae polysaccharide (AAP IV) with grape seed procyanidins. Molecules, 19(12): 20675-20694.

Bangalore, D. V., McGlynn, W., Scott, D. D. 2005. Effect of β-cyclodextrin in improving the correlation between lycopene concentration and ORAC values. Journal of agricultural and food chemistry, 53(6): 1878-1883.

Bansal, A. K., Bilaspuri, G. S. 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Veterinary medicine international, 2011.

Barati, E., Nikzad, H., Karimian, M. 2020. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. Cellular and Molecular Life Sciences, 77: 93-113.

Barazani, Y., Katz, B. F., Nagler, H. M., Stember, D. S. 2014. Lifestyle, environment, and male reproductive health. Urologic Clinics, 41(1): 55-66.

Barrios, B., Fernández-Juan, M., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J. A. 2005. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. Journal of Andrology, 26(4): 539-549.

Baruah, C. K., Biswas, R. K., Deka, B. C., Borgohain, B. N. 2003. Effect of glycerol equilibration periods on quality of frozen semen in Beetal x Assam local crossbred goats. Indian Veterinary Journal (India).

Bashir, N., Shagirtha, K., Manoharan, V., Miltonprabu, S. 2019. The molecular and biochemical insight view of grape seed proanthocyanidins in ameliorating cadmium-induced testes-toxicity in rat model: implication of PI3K/Akt/Nrf-2 signaling. Biosci Rep, 39(1).

Bearden, H. J., Fuquay, J. W. 1984. Applied animal reproduction. Reston Publishing Company, Reston, VA, USA, 6th edition.

Benson, J.D., Woods, E.J., Walters, E.M., Critser, J.K. 2012. The cryobiology of spermatozoa. Theriogenology, 78(8): 1682-1699.

Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Gagnon, C., Sirard, M.A. 2001. Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology, 56 (2): 275–286.

Boerke, A., Brouwers, J. F., Olkkonen, V. M., van de Lest, C. H., Sostaric, E., Schoevers, E. J., Helms, J.B., Gadella, B. M. 2013. Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during in vitro fertilization. Biology of reproduction, 88(1): 21-1.

Brillouet, J. M., Fulcrand, H., Carrillo, S., Roumeas, L., Romieu, C. 2017. Isolation of native proanthocyanidins from grapevine (Vitis vinifera) and other fruits in aqueous buffer. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65(13): 2895-2901.

Bucak M.N., Tekin N. 2006. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. Small Ruminant Res, 73: 103-108.

Bucak, M. N., Tekin, N. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. Small Ruminant Research, 73(1-3): 103-108.

Byrne, G. P., Lonergan, P., Wade, M., Duffy, P., Donovan, A., Hanrahan, J. P., Boland, M. P. 2000. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. Animal reproduction science, 62(4): 265-275.

Calliste, C. A., Trouillas, P., Allais, D. P., Duroux, J. L. 2005. Castanea sativa Mill. leaves as new sources of natural antioxidant: an electronic spin resonance study. Journal of agricultural and food chemistry, 53(2): 282-288.

Cerdá, B., Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C. 2005. Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. Journal of agricultural and food chemistry, 53(2): 227-235.

Chaveiro, A. M. L. F., Machado, L., Frijters, A., Engel, B., Woelders, H. 2006. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. Theriogenology, 65(9): 1875-1890.

Chelucci, S., Pasciu, V., Succu, S., Addis, D., Leoni, G. G., Manca, M. E., Berlinguer, F. 2015. Soybean lecithin–based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. Theriogenology, 83(6): 1064-1074.

Chemineau, P., Daveau, A., Maurice, F., Delgadillo, J. A. 1992. Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. Small Ruminant Research, 8(4): 299-312.

Colas, G. 1983. Factors affecting the quality of ram semen. Proceedings-Easter School in Agricultural Science, University of Nottingham.

Curry, M. R., Millar, J. D., Tamuli, S. M., Watson, P. F. 1996. Surface area and volume measurements for ram and human spermatozoa. Biology of reproduction, 55(6): 1325-1332.

DeJarnette, J. M., Marshall, C. E., Lenz, R. W., Monke, D. R., Ayars, W. H., Sattler, C. G. 2004. Sustaining the fertility of artificially inseminated dairy cattle: the role of the artificial insemination industry. Journal of Dairy Science, 87: 93-104.

Demirci, E. 2002. Evcil hayvanlarda reprodüksiyon, Suni tohumlama ve androloji ders notları (1nd ed). F.Ü.Vet.Fak., Ders Teksiri No:53 Elazığ.

Donovan, A., Hanrahan, J.P., Lally, T., Boland, M., Byrne, G.P., Duffy, P., O'Neill, D.J. 2001. AI For Sheep Using Frozen-thawed Semen. Teagasc, Dublin, Ireland.

Draper, H.H., Hadley, M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol, 186: 421-430.

Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchordoguy, T. J., Overstreet, J. W., Crowe, J. H. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. Journal of experimental zoology, 265(4): 432-437.

Ellıot, J.G. 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. Food Tech., 53 (2): 46-48.

Ellis, K. J., Morrison, J. F. 1982. Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. In Methods in enzymology 87: 405-426. Academic Press.

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. Collection of semen; Handling and examination of semen; Dilution of semen; Frozen storage of semen; Insemination. Salmon's Artificial Insemination of Sheep and Goats, 85-166, Butterworths, Sydney, Australia.

Evans, G., Maxwell, W.M.C. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goat, Ed. G Evans and WMC Maxwell, Butterworths Pty Limited, Australia.

Fine A.M. 2000. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. Alter Med Rev., 5: 144-151.

Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Nasr-Esfahani, M. H. 2010. In vitro comparison of egg yolk–based and soybean lecithin–based extenders for cryopreservation of ram semen. Theriogenology, 73(4): 480-487.

Fracassetti, D., Costa, C., Moulay, L., Tomás-Barberán, F. A. 2013. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (Myrciaria dubia). Food chemistry, 139(1-4): 578-588.

Fraczek, M., Szkutnik, D., Sanocka, D., Kurpisz, M. 2001. Peroxidation components of sperm lipid membranes in male infertility. Ginekologia Polska, 72(2): 73-79.

Fukui, Y., Kohno, H., Togari, T., Hiwasa, M., Okabe, K. 2008. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. Journal of Reproduction and Development, 54(4): 286-289.

Gil, J., Lundeheim, N., Söderquist, L., Rodríguez-Martínez, H. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology, 59(5-6): 1241-1255.

Gil, J., Rodriguez-Irazoqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L., Rodríguez-Martínez, H. 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. Theriogenology, 59(5-6): 1157-1170.

Gil, J., Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H. 2000. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. Theriogenology, 54(1): 93-108.

Gil, L. J. (1999). Evaluation of post-thaw sperm quality in the bull and ram with special emphasis on semen processing. Licenciate thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

Gillan, L., Maxwell, W. C., Evans, G. 2004. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. Reproduction, Fertility and Development, 16(4): 447-454.

Giuliano, S., Director, A., Gambarotta, M., Trasorras, V., Miragaya, M. 2008. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (Lama glama). Animal Reproduction Science, 104(2-4): 359-369.

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.

Güngör, Ş., İnanç, M.E., Ata, A. 2019. Effect of gallic acid on ram semen spermatological parameters at +4 °C storage. Eurasian Journal of Veterinary Sciences, 35 (2): 87-92.

Hafez, E.S.E. 1987. Preservation and cryopreservation of gamates and embryos. Editor: HAFEZ ESE. Reproduction in Farm animals, 5th edition Lea-Febiger, Philadelphia, page 571-600.

Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2000. Reproduction in Farm Animals. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, PA, USA, 7th edition.

Hala, A. H., Khattab, Z. A., Abdallah, G., Kamel, M. 2010. Grape seed extract alleviate reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. J Am Sci, 6(12): 352-361.

Hammadeh, M. E., Askari, A. S., Georg, T., Rosenbaum, P., Schmidt, W. 1999. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. International journal of andrology, 22(3): 155-162.

He, F., Pan, Q. H., Shi, Y., Duan, C. Q. 2008. Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. Molecules, 13(10): 2674-2703.

He, L., Li, P., Yu, L. H., Li, L., Zhang, Y., Guo, Y., Yang, S. H. 2018. Protective effects of proanthocyanidins against cadmium-induced testicular injury through the modification of Nrf2-Keap1 signal path in rats. Environmental toxicology and pharmacology, 57: 1-8.

Holt, W. V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal reproduction science, 62(1-3): 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.

Jha, P. K., Alam, M. G. S., Mansur, A. A., Naher, N., Islam, T., Bhuiyan, M. U., Bari, F. Y. 2019. Cryopreservation of Bangladeshi ram semen using different diluents and manual freezing techniques. Cryobiology, 89: 35-41.

Khosrowbeygi, A., Zarghami, N. 2007. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 77(2): 117-121.

Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Animal reproduction science, 62(1-3): 113-141.

Leite, T. G., do Vale Filho, V. R., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Emerick, L. L., Zaffalon, F. G., de Andrade, V. J. 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. Animal reproduction science, 120(1-4): 31-38.

Li, Q., Shaoyong, W., Li, Y., Chen, M., Hu, Y., Liu, B., Hu, J. 2018. Effects of oligomeric proanthocyanidins on quality of boar semen during liquid preservation at 17 C. Animal reproduction science, 198: 47-56.

Long, M., Yang, S., Zhang, Y., Li, P., Han, J., Dong, S., He, J. 2017. Proanthocyanidin protects against acute zearalenone-induced testicular oxidative damage in male mice. Environmental Science and Pollution Research, 24: 938-946.

Malejane, C. M., Greyling, J. P. C., Raito, M. B. 2014. Seasonal variation in semen quality of Dorper rams using different collection techniques. South African Journal of Animal Science, 44(1): 26-32.

Marco-Jiménez, F., Puchades, S., Gadea, J., Vicente, J. S., Viudes-de-Castro, M. P. 2005. Effect of semen collection method on pre-and post-thaw Guirra ram spermatozoa. Theriogenology, 64(8): 1756-1765.

Mazur, P. 1965. Causes of injury in frozen and thawed cell. Proc. Fedn. Am. Socs. Exp. Biot., 24(15): 175-182.

Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. American journal of physiology-cell physiology, 247(3): 125-142.

Mazur, P. 1990. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. Cell biophysics, 17: 53-92.

Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., Rodrigues, J. L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. Theriogenology, 57(1): 327-344.

Moustacas, V. S., Zaffalon, F. G., Lagares, M. A., Loaiza-Eccheverri, A. M., Varago, F. C., Neves, M. M., Henry, M. 2011. Natural, but not lyophilized, low density lypoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. Theriogenology, 75(2): 300-307.

Muiño, R., Fernandez, M., Peña, A. I. 2007. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. Reproduction in domestic animals, 42(3): 305-311.

Muldrew, K., McGann, L. E. 1994. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. Biophysical journal, 66(2): 532-541.

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.

Nie, Y., Stürzenbaum, S. R. 2019. Proanthocyanidins of natural origin: molecular mechanisms and implications for lipid disorder and aging-associated diseases. Advances in Nutrition, 10(3): 464-478.

Nur, Z., Zik, B., Ustuner, B., Sagirkaya, H., Ozguden, C. G. 2010. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNAintegrity. Theriogenology, 73(9): 1267-1275.

Ortiz-de-Montellano, M., Galindo-Maldonado, F., Cavazos-Arizpe, E. O., Aguayo-Arceo, A. M., Torres-Acosta, J. F. J., Orihuela, A. 2007. Effect of electro-ejaculation on the serum cortisol response of Criollo goats (Capra hircus). Small Ruminant Research, 69(1-3): 228-231.

Paulenz, H., Ådnøy, T., Fossen, O. H., Söderquist, L., Andersen Berg, K. 2002. Effect of deposition site and sperm number on the fertility of sheep inseminated with liquid semen. Veterinary Record, 150(10): 299-302.

Peña, A., Linde-Forsberg, C. 2000. Effects of Equex, one-or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. Theriogenology, 54(6): 859-875.

Pesch, S., Hoffmann, B. 2007. Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie-Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology, 4(2): 101-105.

Plumb, G. W., De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Cheynier, V., Williamson, G. 1998. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. Free radical research, 29(4): 351-358.

Polge, E. J. C. 1957. Low-temperature storage of mammalian spermatozoa. Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences, 147(929): 498-508.

Pontbriand, D., Howard, J. G., Schiewe, M. C., Stuart, L. D., Wildt, D. E. 1989. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. Cryobiology, 26(4): 341-354.

Rasul, Z., Anzar, M., Jalali, S., Ahmad, N. 2000. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. Animal reproduction science, 59(1-2): 31-41.

Rekha, A., Zohara, B. F., Bari, F. Y., Alam, M. G. S. 2018. Comparisons of commercial Triladyl and locally manufactured extenders for the chilling of semen and their effects on pregnancy rates after transcervical AI in Bangladeshi Indigenous (Ovis aries) sheep. Animal Reproduction (AR), 13(4): 735-742.

Ritar, A. J., Ball, P. D., O'may, P. J. 1990. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. Reproduction, Fertility and Development, 2(1): 27-34.

Ruane, J. 2000. A framework for prioritizing domestic animal breeds for conservation purposes at the national level: a Norwegian case study. Conservation Biology, 14(5): 1385-1393.

Salami, S. A., Guinguina, A., Agboola, J. O., Omede, A. A., Agbonlahor, E. M., Tayyab, U. 2016. In vivo and postmortem effects of feed antioxidants in livestock: a review of the implications on authorization of antioxidant feed additives. Animal, 10(8): 1375-1390.

Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Animal Reproduction Science, 37(3-4): 185-249.

Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of ram semen. Animal reproduction science, 62(1-3): 77-111.

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.

Sharma, A., Sood, P. 2020. Caprine semen cryopreservation and the factors affecting it: an overview. Veterinary Sciences: Research and Reviews, 6(1): 46-57.

Sharpe, R. M. 2010. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 365(1546): 1697-1712.

Shekhar, S., Liu, Y., Wang, S., Zhang, H., Fang, X., Zhang, J., Booz, G. W. 2021. Novel mechanistic insights and potential therapeutic impact of trpc6 in neurovascular coupling and ischemic stroke. International Journal of Molecular Sciences, 22(4): 2074.

Shipley, C. F. B., Buckrell, B. C., Mylne, M. J. A., Pollard, J., Hunton, J. R. 2007. Artificial insemination and embryo transfer in sheep. In Current therapy in large animal theriogenology. WB Saunders, Philadelphia, PA, USA, 629-641.

Sieme, H., Oldenhof, H. 2015. Cryopreservation of semen from domestic livestock. Cryopreservation and freeze-drying protocols, 277-287.

Silva, E. C. B., Cajueiro, J. F. P., Silva, S. V., Soares, P. C., Guerra, M. M. P. 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. Theriogenology, 77(8): 1722-1726.

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.

Söderquist, L., Madrid-Bury, N., Rodriguez-Martinez, H. 1997. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. Theriogenology, 48(7): 1115-1125.

Sönmez, M. F., Tascioglu, S. 2016. Protective effects of grape seed extract on cadmium-induced testicular damage, apoptosis, and endothelial nitric oxide synthases expression in rats. Toxicol Ind Health, 32(8): 1486-1494

Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Peng, Z. Y. 2019. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. Oxidative medicine and cellular longevity, 5080843.

Su, L., Deng, Y., Zhang, Y., Li, C., Zhang, R., Sun, Y., Yao, S. 2011. Protective effects of grape seed procyanidin extract against nickel sulfate-induced apoptosis and oxidative stress in rat testes. Toxicology mechanisms and methods, 21(6): 487-494.

Tachakittirungrod, S., Okonogi, S., Chowwanapoonpohn, S. 2007. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. Food chemistry, 103(2): 381-388.

Tekin, N., Uysal, O., Akcay, E., Yavas, I. 2006. Effects of different taurine doses and freezing rate on freezing of row semen. Veterinary Journal of Ankara University 53(3):179-184.

Tonieto, R. A., Goularte, K. L., Gastal, G. D. A., Schiavon, R. S., Deschamps, J. C., Lucia Jr, T. 2010. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. Small Ruminant Research, 93(2-3): 206-209.

Tuncer, P. B., Bucak, M. N., Büyükleblebici, S., Sarıözkan, S., Yeni, D., Eken, A., Gündoğan, M. 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. Cryobiology, 61(3): 303-307.

Valente, S. S., Pereira, R. M., Baptista, M. C., Marques, C. C., Vasques, M. I., Pereira, M. S., Barbas, J. P. 2010. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. Animal Reproduction Science, 117(1-2): 74-77.

Watson, P.F. 1975. Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. Veterinary Record, 97: 12-15.

Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal reproduction science, 60: 481-492.

Weitzman, S. A., Turk, P. W., Milkowski, D. H., Kozlowski, K. 1994. Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(4): 1261-1264.

Wen, F., Li, Y., Feng, T., Du, Y., Ren, F., Zhang, L., Hu, J. 2019. Grape seed procyanidin extract (GSPE) improves goat sperm quality when preserved at 4 C. Animals, 9(10): 810.

Woelders, H., Matthijs, A., Engel, B. 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. Cryobiology, 35(2): 93-105.

Wood, J.E., Senthilmohan, S.T., Peskin, A.V. 2002. Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at di_erent phs. Food Chem, 77: 155–161.

Wulster-Radcliffe, M. C., Lewis, G. S. 2002. Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificial insemination catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility. Theriogenology, 58(7): 1361-1371.

Zhao, Y. M., Gao, L. P., Zhang, H. L., Guo, J. X., & Guo, P. P. 2014. Grape seed proanthocyanidin extract prevents DDP-induced testicular toxicity in rats. Food Function, 5(3): 605-611.

Zhao, J., Jin, Y., Du, M., Liu, W., Ren, Y., Zhang, C., Zhang, J. 2017. The effect of dietary grape pomace supplementation on epididymal sperm quality and testicular antioxidant ability in ram lambs. Theriogenology, 97: 50-56.

Zohara, B. F., Bari, F., Alam, M. G. S. 2014. Effects of proportion of egg yolk and preservation time on chilled semen from indigenous rams. GSTF Journal of Veterinary Science (JVet), 1(1).