

T.C

FIRAT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI



KOÇ SPERMASININ KISA VE UZUN SÜRELİ
SAKLANMASINDA L-KARNOSİN KULLANIMININ
SPERMATOLOJİK VE
FLOW-SİTOMETRİK ANALİZLERLE
DEĞERLENDİRİLMESİ
İbrahim Halil GÜNGÖR
DOKTORA TEZİ
2023

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa İSSİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Seyfettin GÜR

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Seyfettin GÜR _____

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____



ETİK BEYAN

Bu tezi kendime ait çalışmalar ile gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulguların elde edilmesi ve yazım aşamasına kadar olan tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışlarımın olmadığını, tüm bilgi ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

İbrahim Halil GÜNGÖR

Danışman

Prof. Dr. Seyfettin GÜR

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

ELA ZİĞ

İTHAF

Bu eseri hayatımın her aşamasında desteklerini bir an olsun esirgemeyen canım annem ve babama, iki cihan yoldaşım değerli eşime ve hayatımın neşesi kardeşlerime ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Akademik kariyerimin başlangıcından bugüne kadar her sıkıntıyla ilgilenen ve mesleki gelişimimde büyük katkısı olan danışman hocam Prof. Dr. Seyfettin GÜR'e, fikirleriyle ve yaklaşımlarıyla bilimsel düşüncelerimi aydınlatıp her zaman yol gösterici olan değerli hocam Prof. Dr. Mustafa SÖNMEZ'e, bugünlere gelene kadar her sıkıntıda yanımda olan, derdimle dertlenip sevincimle mutlu olan ve mesleki tecrübelerini her daim benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Gaffari TÜRK'e, hem hocam hem ablam olup her zaman yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. Şeyma ÖZER KAYA'ya, çalışmamda oksidatif stres analizlerini yapan ve her zaman desteğini hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Abdurrauf YÜCE'ye ve analizlerin yapılmasında büyük emeği olan değerli arkadaşım Arş. Gör. Edanur GÜLER EKMEN'e, doktora öğrenimim boyunca her zaman birer abi olarak desteklerini hissettiğim Dr. Öğr. Üyesi Serkan Ali AKARSU ve Dr. Öğr. Üyesi Recep Hakkı KOCA'ya, doktora tez çalışmam sırasında yardımlarından dolayı çalışma ve mesai arkadaşlarım Dr. Arş. Gör. Tutku Can ACISU'ya ve Arş. Gör. Aslıhan ÇAKIR CİHANGİROĞLU'na çok teşekkür ederim.

Ayrıca manevi desteğini her zaman hissettiğim ve bir an olsun arkamda durmaktan vazgeçmeyeceğini bildiğim, sevgili eşim Veteriner Hekim Büşra GÜNGÖR'e de teşekkür ederim.

Son olarak bu tezin yapılması için 121O134 numaralı proje ile finansal destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI.....	ii
ETİK BEYAN.....	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
TABLO LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiv
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	1
3.1. Koçlarda Spermatolojik Özellikler.....	2
3.2. Koç Spermasının Dondurulması	3
3.3. Antioksidanlar ve Temel Özellikleri	6
3.4. Antioksidanların Sperma Sulandırıcılarına Katılması.....	7
3.5. L – Karnosin Nedir?	8
3.6. L – Karnosinin Fizyolojik Fonksiyonları	10
3.7. L-karnosinin Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkisi	13
4. GEREÇ VE YÖNTEM	19
4.1. Hayvan Materyali	19
4.2. Koçların Suni Vajen ile Sperma Vermeye Ağıştırılması	21
4.3. Deneysel Aşama	21
4.3.1. Birinci Aşama (Kısa Süreli Saklama).....	21
4.3.1.1. Sulandırma Solüsyonlarının Hazırlanması.....	21
4.3.1.1.1. Sperma Sulandırıcısı.....	21
4.3.1.1.2. Stok ve Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması	22
4.3.1.2. Spermanın Alınması.....	23
4.3.1.3. Sperma ile Çalışma Solüsyonlarının Birleştirilmesi	23
4.3.2. İkinci Aşama (Uzun Süreli Saklama)	27
4.3.2.1 Sulandırma Solüsyonlarının Hazırlanması ve Spermanın Sulandırılması	27

4.4. Spermatolojik Analizler	30
4.4.1. CASA ile Motilite ve Kinematik Parametrelerin Ölçümü.....	30
4.4.2. Anormal Spermatozoon Oranının Belirlenmesi	31
4.4.3. Membran Bütünlüğünün Belirlenmesi – Hipoosmotik Şişme Testi (HOST)	31
4.4.4. pH'nın Belirlenmesi.....	32
4.5. Flow-Sitometrik Analizler.....	32
4.5.1. Canlılık Oranının Belirlenmesi.....	32
4.5.2. Akrozomal Hasarın Tespiti.....	34
4.5.3. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Tayini	36
4.5.4. Apoptoz Tayini	37
4.6. Oksidatif Stres Analizleri	39
4.6.1. Lipid Peroksidasyon (LPO)	39
4.6.2. Glutasyon (GSH).....	39
4.6.3. Glutasyon-Peroksidaz (GSH-Px)	39
4.6.4. Katalaz (CAT).....	40
4.7. İstatiksel Analizler.....	40
5. BULGULAR.....	41
5.1. Birinci Aşama (Kısa Süreli Saklama) Sonucu Elde Edilen Bulgular.....	41
5.1.1. Motilite ve Kinematik Değerler	41
5.1.2. Membran Bütünlüğü (HOST) Değerleri	61
5.1.3. pH Değerleri.....	61
5.1.4. Anormal Spermatozoon Oranları	61
5.1.5. Flow-Sitometrik Değerler	65
5.1.5.1. Ölü/Canlı Spermatozoon Oranları	65
5.1.5.2. Akrozomal Hasar Oranları.....	65
5.1.5.3. Yüksek/Düşük Mitokondriyal Membran Potansiyeli Oranları	66
5.1.6. Oksidatif Stres Düzeyleri	72
5.2. İkinci Aşama (Uzun Süreli Saklama) Sonucu Elde Edilen Bulgular	74
5.2.1. Motilite ve Kinematik Değerler	74
5.2.2. Membran Bütünlüğü (HOST) Değerleri	83
5.2.3. pH Değerleri.....	84

5.2.4.	Anormal Spermatozoon Oranları	85
5.2.5.	Flow-Sitometrik Değerler	86
5.2.5.1.	Ölü ve Canlı Spermatozoon Oranları.....	86
5.2.5.2.	Akrozomal Hasar Oranları.....	89
5.2.5.3.	Yüksek/Düşük Mitokondriyal Membran Potansiyeli Oranları	91
5.2.5.4.	Apoptoz Oranları	93
5.2.6.	Oksidatif Stres Düzeyleri	95
6.	TARTIŞMA.....	98
6.1.	Birinci Aşama (Kısa Süreli Saklama)	98
6.2.	İkinci Aşama (Uzun Süreli Saklama).....	105
7.	SONUÇ ve ÖNERİLER	113
8.	KAYNAKLAR	114
9.	ÖZGEÇMİŞ	121

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Koçların beslenmesinde kullanılan rasyonun içeriği ve besin madde bileşimi	20
Tablo 2.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Total Motilite (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri	42
Tablo 3.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Progresif Motilite (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri	44
Tablo 4.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Hızlı Motilite (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri	46
Tablo 5.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Orta Motilite (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri	47
Tablo 6.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Yavaş Motilite (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri	48
Tablo 7.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki VCL (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri	51
Tablo 8.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki VSL (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri	52
Tablo 9.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki VAP (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri	53
Tablo 10.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki STR (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri	55
Tablo 11.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki WOB (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri	56
Tablo 12.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki LIN (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri	57
Tablo 13.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki ALH (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri	59
Tablo 14.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki BCF (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri	60
Tablo 15.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki HOST (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri	62

Tablo 16.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki pH (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri.....	63
Tablo 17.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Anormal Spermatozoon (Ortalama $\pm$ SEM) Oranları	64
Tablo 18.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Ölü Spermatozoon (Ortalama $\pm$ SEM) Oranları	67
Tablo 19.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Canlı Spermatozoon (Ortalama $\pm$ SEM) Oranları	68
Tablo 20.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Akrozomal Hasar (Ortalama $\pm$ SEM) Oranları	69
Tablo 21.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Yüksek Mitokondriyal Membran Potansiyeli (Ortalama $\pm$ SEM) Oranları	70
Tablo 22.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Düşük Mitokondriyal Membran Potansiyeli (Ortalama $\pm$ SEM) Oranları	71
Tablo 23.	Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Oksidatif Stres (Ortalama $\pm$ SEM) Düzeyleri	73

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	L – karnosinin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.	Hayvan materyali olarak kullanılan Akkaraman ırkı koçlar.	19
Şekil 3.	Suni Vajen Yardımıyla Spermanın Alınması.....	25
Şekil 4.	Birinci Aşamanın (Kısa Süreli Saklama) Deneysel Planı.	26
Şekil 5.	A. Spermanın payetlere çekilmesi, B. Dondurulması C. Çözdürme sonrası CASA ve D. Flow-sitometrik analizlerin yapılması.	28
Şekil 6.	İkinci Aşamanın (Uzun Süreli Saklama) Deneysel Planı.....	29
Şekil 7.	Canlılık oranının belirlenmesinde; (A) Akış kanalı boyunca görüntülenen spermatozoonları büyüklük ve granülaritesine göre elimine etmek için ileri (FSC) ve yana (SSC) saçılımların karşılaştırmalı sitogramı.	34
Şekil 8.	Akrozomal hasarın tespitinde; (A) Akış kanalı boyunca görüntülenen spermatozoonları büyüklük ve granülaritesine göre elimine etmek için ileri (FSC) ve yana (SSC) saçılımların karşılaştırmalı sitogramı.....	35
Şekil 9.	Mitokondriyel membran potansiyelinin tayininde; (A) Akış kanalı boyunca görüntülenen spermatozoonları büyüklük ve granülaritesine göre elimine etmek için ileri (FSC) ve yana (SSC) saçılımların karşılaştırmalı sitogramı.....	37
Şekil 10.	Apoptoz tayininde; (A) Akış kanalı boyunca görüntülenen spermatozoonları büyüklük ve granülaritesine göre elimine etmek için ileri (FSC) ve yana (SSC) saçılımların karşılaştırmalı sitogramı.....	38
Şekil 11.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların total motilite değerleri(%).	75
Şekil 12.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların progresif motilite değerleri(%).	75
Şekil 13.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların hızlı motilite değerleri(%).	77
Şekil 14.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların orta motilite değerleri(%).	77
Şekil 15.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların yavaş motilite değerleri(%).	78

Şekil 16.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların VCL değerleri (%).	79
Şekil 17.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların VSL değerleri (%).	80
Şekil 18.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların VAP değerleri (%).	80
Şekil 19.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların STR değerleri.	81
Şekil 20.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların WOB değerleri.	81
Şekil 21.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların LIN değerleri.	82
Şekil 22.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların ALH değerleri.	82
Şekil 23.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların BCF değerleri.	83
Şekil 24.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların HOST değerleri (%).	84
Şekil 25.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların pH değerleri.	85
Şekil 26.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların anormal spermatozoon oranları.	86
Şekil 27.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermalardaki ölü spermatozoon oranları (%).	87
Şekil 28.	Kontrol ve L-karnosin içeren spermalardaki ölü/canlı spermatozoon oranlarına ait dot plot görüntüleri.	88
Şekil 29.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermalardaki akrozomal hasar oranları (%).	89
Şekil 30.	Kontrol ve L-karnosin içeren spermalardaki akrozomal hasar oranlarına ait dot plot görüntüleri.	90
Şekil 31.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermalardaki yüksek mitokondriyal membran potansiyeli oranları (%).	91

Şekil 32.	Kontrol ve L-karnosin içeren spermallerdeki yüksek/düşük mitokondriyal membran potansiyeli oranlarına ait dot plot görüntüleri.	92
Şekil 33.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermallerdeki apoptotik hücre oranları (%).	93
Şekil 34.	Kontrol ve L-karnosin içeren spermallerdeki apoptoz oranlarına ait dot plot görüntüleri.	94
Şekil 35.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermallerdeki MDA düzeyleri.	95
Şekil 36.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermallerdeki GSH düzeyleri.	96
Şekil 37.	Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermallerdeki GSH-Px düzeyleri.	96

KISALTMALAR LİSTESİ

°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre
ALH	: Spermatozoonların Baş Kısımının Yol Üzerinde İlerlerken Laterale Doğru Sapma Uzaklığı
ATP	: Adenozin Trifosfat
BCF	: Çapraz Geçiş Frekansı
CASA	: Computer-Assisted Sperm Analysis / Bilgisayar Destekli Sperm Analiz Cihazı
CAT	: Katalaz
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DTNB	: 5,5'-ditiyo-bis
FITCH	: Fluorescein Isothiocyanate
FSC	: Forward Scatter / İleri Saçılım
FSC-Area	: Forward Scatter-Area / İleri Saçılım-Alan
FSC-Height	: Forward Scatter- Height / İleri Saçılım- Yükseklik
FÜHADYEK	: Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Gr	: Gram
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
HNE	: 4-hydroxy-nonenal
HOST	: Hipo-osmotik Şişme Testi
IU	: İnternasyonal Ünite
JC-1	: 1,1',3,3'-Tetraethyl-5,5',6,6'-tetrachloroimidacarbocyanine iodide
Ku	: Katal Unit
LIN	: Linearity / Doğrusallık
LPO	: Lipid Peroksidasyon
MDA	: Malondialdehit

Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
Mmol	: Milimol
mM	: Milimolar
N	: Sodyum
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaN₃	: Sodyum azid
PBS	: Fosfat Buffer Saline
PE	: Phycoerythrin
PI	: Propidium Iodide
PNA	: Peanut Agglutinin
PUFA	: Polyunsaturated Fatty Acid / Çoklu Doymamış Yağ Asidi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
SSC	: Side Scatter / Yana Saçılım
STR	: Straightness / Doğrusallık
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBARs	: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Substans
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
VCL	: Velocity of Curvilinear / Eğrisel Hız
VSL	: Velocity of Straight Line / Doğrusal Hız
VAP	: Velocity of Average Path / Ortalama Yol Hızı
WOB	: Wobbel / Kararsızlık

1. ÖZET

Bu çalışma L-karnosin'in farklı dozlarda in vitro olarak spermaya katılmasının spermanın kısa ve uzun süreli saklanabilirliği üzerine olan etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Araştırmada 6 adet akkaraman koçtan alınan spermalar kullanıldı. Çalışmanın birinci aşamasında her bir hayvandan alınan spermalar karıştırıldı ve 1, 5, 10, 20, 50, 100 ve 200 mM L-karnosin içeren tris+yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırılarak +4°C'de 96 saat boyunca saklandı.

Kısa süreli saklama esnasında 1, 5, 10, 20 mM L-karnosin dozlarının total, progresif ve hızlı motilite, kinematik parametrelerden VCL, VSL, VAP değerlerini ve yüksek mitokondriyal membran potansiyeli seviyesini artırdığı, membran bütünlüğünü koruduğu, anormal spermatozoon oranını, akrozomal hasarı ve düşük mitokondriyal membran potansiyeli seviyesini azalttığı belirlendi. 200 mM L-karnosin dozunun toksik etki göstererek parametreleri olumsuz yönde etkilediği tespit edildi.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise birinci aşamadaki en iyi dozlar (1, 5, 10 ve 20 mM) kullanıldı ve 6 kez alınan spermalar dondurma işlemine maruz bırakıldı. Spermanın uzun süreli saklanması 5 mM L-karnosin dozunun tüm analizlerde öne çıktığı ve bu dozun total, progresif ve hızlı motilite, canlı spermatozoon oranı ve yüksek mitokondriyal membran potansiyeli oranını önemli ölçüde artırdığı belirlendi. Bunun yanında spermatozoonun membran bütünlüğünü koruduğu, anormal spermatozoon oranını, ölü spermatozoon oranını, akrozomal hasar oranını,

düşük mitokondriyel membran potansiyelini ve apoptotik hücre oranını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak koç spermasının dondurulması esnasında sperma sulandırıcısına 5 mM L-karnosin katılmasının faydalı olacağı ve spermanın başarılı şekilde dondurulmasına katkı sağlayacağı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: L-karnosin, Sperma, Saklanabilirlik, Flow-sitometrik analizler, Koç



2. ABSTRACT

SHORT AND LONG TERM PROTECTION OF ARIES SPERM THE USE OF L-CARNOSINE IN STORAGE SPERMATOLOGICAL AND WITH FLOW-CYTOMETRIC ANALYSIS EVALUATION

This study was carried out to investigate the effect of in vitro addition of L-carnosine to semen at different doses on short and long term storability of semen.

In the study, semen taken from 6 Akkaraman rams were used. In the first stage of the study, semen from each animal were mixed and diluted with tris+egg yolk extender containing 1, 5, 10, 20, 50, 100 and 200 mM L-carnosine and stored at +4°C for 96 hours.

During short-term storage, doses of 1, 5, 10, 20 mM L-carnosine increased total, progressive and rapid motility, VCL, VSL, VAP values from kinematic parameters, and high mitochondrial membrane potential level. It was determined that these doses preserved membrane integrity, decreased abnormal spermatozoon rate, acrosomal damage and low mitochondrial membrane potential level. It was determined that 200 mM L-carnosine dose had a toxic effect and affected the parameters negatively.

In the second stage of the study, the best doses (1, 5, 10 and 20 mM) in the first stage were used and semen collected 6 times were subjected to freezing. It was determined that 5 mM L-carnosine dose stood out in all analyzes in long-term storage of semen, and this dose significantly increased the rate of total, progressive and rapid motility, viable spermatozoa rate and high mitochondrial membrane potential. In addition, it has been determined that the spermatozoon maintains the integrity of the membrane, significantly reduces the abnormal spermatozoon rate,

the rate of dead sperm, the rate of acrosomal damage, the low mitochondrial membrane potential and the apoptotic cell rate.

As a result, it was determined that adding 5 mM L-carnosine to the semen extender during the freezing of ram semen would be beneficial and contribute to the successful freezing of the semen.

Keywords: L-carnosine, Semen, Storability, Flow-cytometric analysis, Ram,



3. GİRİŞ

Ülkemizde her zaman boyunca küçükbaş hayvan yetiştiriciliği büyük öneme sahip olmuştur. Küçükbaş hayvanların et, süt, deri ve yünleri toplum ihtiyaçlarını karşılama konusunda küçükbaş hayvan üretimini oldukça önemli kılmaktadır (1). Fakat döl verimi düşüklüğü ve ıslah çalışmalarındaki yetersizlikler sebebiyle küçükbaş hayvan üretimi istenilen seviyesini kaybetmektedir. Halkın kırmızı et talebi ve hayvansal proteinlerin önemi bilinmekte, fakat karşılanmakta güçlük çekilmektedir. Sosyo-ekonomik sebeplerin düzeltilmesi, bakım, beslenme ve mera şartlarının iyileştirilmesi ve genotipik yapının ıslah edilmesi ile birlikte dünya standartlarının üzerinde bir koyun yetiştiriciliğinin yapılması mümkün görülmektedir (2). Koyunlarda genotipik yapının iyileştirilmesi için yerli koyun ırklarının kültür ırklara dönüştürülmesini hedefleyen melezleme çalışmaları yapılmaktadır. Melezleme çalışmalarında suni tohumlama yöntemi doğal aşım nispetle daha yaygın kullanılmaktadır. Suni tohumlama yöntemi sayesinde üstün genotipik özelliklere sahip koç spermalarıyla kısa sürede daha fazla sayıda koyun tohumlanması mümkündür (3). Koyunlarda saha şartlarında suni tohumlama yapılırken genellikle sulandırılmış taze sperma tercih edilmektedir. Bir koçun spermasının alınıp uygun sulandırıcılarla sulandırılarak birden fazla koyunun tohumlanması, hem çok sayıda damızlık koç besleme külfetinden hayvan sahiplerini kurtarmakta, hem de genetik ıslah için bir fırsat oluşturmaktadır. Fakat taze spermanın muhafaza ömrünün kısa olması ve taşınmasının zor olması sebebiyle spermanın dondurularak saklanma gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Spermanın dondurulmasının, yüksek verimli damızlık erkek koçların spermasının

ülkenin her bir yanına rahatça taşınmasını sağlayacak olması açısından önemlidir. Sığırlarda aktif olarak yapılan suni tohumlama uygulamalarının, koyunlarda da yapılması ülke ekonomisi ve hayvancılığına büyük katkı sağlayacaktır (4).

Ülkemizin Doğu, Güney ve Orta Anadolu bölgelerinde hem ekonomik hem de coğrafi şartlar sebebiyle küçükbaş hayvan üretimi daha fazla yapılmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK) en son yayımladığı verilere göre Türkiye'de 45 milyondan fazla koyun mevcuttur (5). Bu sayının 3-4 milyonunu Merinos koyun ırkı oluştururken, 42-43 milyonunu ise diğer koyun ırkları (Akkaraman, Morkaraman, Kıvırcık, Dağlıç, Tuj, İvesi, Karayaka, Sakız) oluşturmaktadır. Ülkemizdeki Akkaraman koyun ırkı farklı soylara sahiptir. Bunlar sırasıyla Malatya ve Sivas bölgesinde "Kangal Akkaraman", Diyarbakır bölgesinde "Karakaş" ve Toroslarda ise "Güney Karaman" soylarıdır. Akkaraman ırkının ülkemizde en yaygın olarak bulunduğu bölgeler, özellikle Orta Anadolu'nun yanı sıra Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgeleridir. Akkaraman koyunu ülkemizin koyun popülasyonunun %40'ını temsil ederek koyunlar içerisinde en büyük grubu oluşturmaktadır. Bu ırk koyunlar, ülkemizin iklimsel ve coğrafi sert koşullarına uyum sağlayarak, yetiştiricisine her durumda gelir sağlamaktadır (6).

3.1. Koçlarda Spermatolojik Özellikler

Koç spermatozoonun yapısına temel manada bakıldığında baş ve kuyruk olmak üzere 2 ana yapıdan oluştuğu görülmektedir. Baş kısmı oval ve basık bir yapıda olup, genetik materyali barındırarak, fertilizasyon için gerekli enzimleri ihtiva etmektedir. Spermatozoonun baş kısmının yapısına hücresel boyutta baktığımızda hücre membranı, dış akrozomal membran, nükleus, perforatoryum, iç

akrozomal membran, post-nükleer kap ve implantasyon çukurcuğu gibi bölümleri barındırmaktadır (7). Koç spermasının baş kısmı 8,2 µm, orta kısmı 14 µm, kuyruk kısmı ise 65 µm, genişliği 4 µm, kalınlığı 1 µm, hacmi 31 µm³, yüz ölçümü 142 µm² olarak bilinmektedir (8). Sperma miktarı 0,7 – 3 ml, spermatozoon yoğunluğu 1,5-5,0 x 10⁹ /ml ve motiliteninde %60 – 90 arasında değerlere sahip olduğu bildirilmektedir (9).

3.2. Koç Spermasının Dondurulması

Spermanın dondurularak uzun süreli saklanması, spermaların taşınmasını ve kontrol altına alınmasını sağlamaktadır. Ayrıca bu işlem değerli bir damızlık hayvanın yaşamını yitirmesinden sonraki zamanlarda bile üstün nitelikli genetik materyalinin uzun süreli kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Dünya genelinde, özellikle boğalarda sperma dondurma işlemi önemli bir endüstri dalı haline gelmiştir. Ancak koyunlarda dondurulmuş spermalarla yapılan tohumlamalardan özellikle de sahada kullanımı kolay olan intraservikal tohumlamalardan elde edilen gebelik oranları natif veya sulandırılmış-soğutulmuş spermalarla elde edilen gebelik oranlarına göre çok düşük kalmakta (10, 11), bu sorunun temel nedenini ise, koç spermatozoonlarının membran yapısının diğer türlere göre farklı lipidik kompozisyonda olmasına istinaden dondurma işleminin spermatozoonların membran yapısında meydana getirdiği çeşitli fiziksel ve kimyasal stresler oluşturmaktadır (12). Koç spermatozoonlarının bu özelliğinden dolayı dondurulmuş-çözdürülmüş spermalarla yapılan tohumlamalar sonrasında belirlenen gebelik oranları oldukça düşük seyretmektedir. Öte yandan damızlık bulundurma ve yetiştirme masraflarının yüksek olması ve elde bulunan erkek

damızlıklardan daha fazla oranda yararlanılamaması büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Koç spermasının dondurulmasında sağlanacak başarı, damızlık değeri yüksek koçlardan sadece üreme mevsimi içerisinde sınırlı sayıda koyunun tohumlanması ile heba edilmeyerek, üreme mevsiminde ve dışında bu koçlardan alınan ejekülatların dondurulması ile binlerce koyunun tohumlanmasına olanak sağlayacak ve bunun sonucunda koyun yetiştiricileri için büyük ekonomik kazanımlar olacaktır. Koç spermasının dondurulması esnasında ortaya çıkan hasarların, buz kristal oluşumundan dolayı oksidatif stres düzeyindeki artışın etkisiyle membran lipidlerinin peroksidasyonuna bağlı olduğu öne sürülmektedir. Ancak iyi bilinen bir gerçek olarak, artan oksidatif stresin sadece lipidleri değil, aynı zamanda hücre içindeki proteinleri de peroksidasyona uğrattığı bilinmektedir (13). Koç spermatozoonları boğa, tavşan ve hatta insan spermatozoonlarına göre soğuk şok hasarlarına karşı daha hassastır (14). Bu hassasiyet için, epididimal olgunlaşma esnasında koç spermatozoonlarının kolesterol:fosfolipid oranı, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin, kardiyolipin ve etanolamin plazmalojen konsantrasyonlarında şekillenen azalmalar (15, 16) ile PUFA miktarlarında meydana gelen artışlar (16) muhtemel neden olarak gösterilmektedir. Dolayısıyla ejaküle edilmiş olgun koç spermatozoonlarındaki kolesterol ve total fosfolipid miktarı düşük düzeyde kalırken PUFA miktarı yüksek düzeyde kalmaktadır. Spermatozoon plazma membranının yüksek düzeyde PUFA içermesi ve termodinamik özelliğinden dolayı spermanın soğutulması, dondurulması ve çözündürülmesi esnasında spermatozoon membranlarında geriye dönüşümsüz termotropik lipid faz geçişleri (sıvı fazdan jel fazına geçmesi) meydana gelmektedir.

Koç spermasını dondurma amacıyla, sitrat-şeker tabanlı, süt, laktoz-tabanlı, sakkaroz-tabanlı, rafinoz-tabanlı ve tris-tabanlı sulandırıcılar kullanılmaktadır. Bunlar içerisinde tris [tris (hydroxymethyl) aminomethane]-tabanlı sulandırıcılar iyi tamponlayıcı ve ozmotik aktivite ile yüksek konsantrasyonlarda bile düşük toksisite özellikleri sayesinde daha fazla tercih edilmektedir (17). 250-400 mM tris, glukoz/fruktoz, sitrik asit, yumurta sarısı (%15), gliserol (%5) ve antibiyotik ihtiva eden tris-tabanlı sulandırıcılar koç spermalarının sulandırılması ve akabinde dondurulması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Dondurma işleminin de 5°C'den -20°C'ye düşürülürken düşük hızda (5°C/dakika), -20°C'den -130°C'ye düşürülürken de yüksek hızda (60°C/dakika) programlı dondurma cihazlarında yapılması önerilmektedir (18). Öte yandan düşük dondurma hızının [5°C'den -20°C'ye düşürürken (0,5°C/dakika), -20°C'den -130°C'ye düşürürken (25°C/dakika)] çözündürme sonrası koç spermatozoonlarındaki motiliteyi arttırdığı, akrozom ve kromatin bütünlüğü ile apoptotik indeksi etkilemediği de rapor edilmektedir (19). Ancak ideal sulandırma ve dondurma işlemleri uygulansa da koç spermatozoon membranının yüksek düzeyde PUFA ve düşük düzeyde kolesterol:fosfolipid oranına sahip olması dondurma-çözündürme sonrası spermatozoonlarda geriye-dönüşümsüz pek çok hasara neden olmaktadır. Bu hasarları minimize etmek amacıyla koç spermasını gerek 5°C'de kısa süreli gerekse -196°C'de uzun süreli saklama işlemleri esnasında sulandırıcılara ilave olarak çeşitli katkı maddeleri de katılmaktadır. Bunların içerisinde membran koruyucu özellikleri bulunan vitamin C, vitamin E, kurkumin, ellajik asit, trehaloz, rafinoz, taurin, hipotaurin, sisteamin, hyaluronan, sistein, ergotiyonin, glutamin, metyonin, ditiyoeritritol, L-arjinin, v.b. çeşitli antioksidan, şeker ve aminoasit ilavelerinin

kriyoprezervasyon işlemleri esnasındaki soğuk şok hasarlarını azalttığı literatürde bildirilmektedir (20, 21).

3.3. Antioksidanlar ve Temel Özellikleri

Antioksidanlar, hücresel düzeyde lipit peroksidasyonunu (LPO) engelleyen bileşikler olarak kabul edilmiştir. Son yıllarda ise antioksidanların tanımı lipidlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruma yeteneklerini de içerecek şekilde genişletilmiştir. Böylece antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidatif hasarı önleyen veya bu hasarın oluşmasını erteleyen moleküller olarak tanımlanmakta ve bu tanıma bağlı olarak antioksidanların etkileri çeşitli şekillerde yorumlanabilmektedir (22). Antioksidanlar serbest radikalleri süpürebilen ve hücre hasarını engelleyebilen maddelerdir (23). Serbest radikaller, biyomoleküllerde bulunan eşleşmemiş elektronları hedef alarak, oksidatif yollarla moleküler yapılarda değişiklik yapma yeteneğine sahip olan kimyasal bileşiklerdir (13).

Başlıca antioksidan etki çeşitleri:

- Reaktif oksijen türlerinin (ROS), enzimatik reaksiyonlar veya doğrudan temizlenmesi yoluyla etkisiz hale getirilmesi (*Temizleme Etkisi - Scavenging*); Bu etkileşim, zincir kırıcı antioksidatif etkinlik ile hücre zarındaki doymamış fosfolipit yağ asitlerini serbest radikal zararından koruyan ilk savunma mekanizmasını oluşturarak işlev göstermektedir. E vitamini, yapısında fenolik hidroksil grubu bulunduran ve zincir kırıcı antioksidatif etkinlik sergileyen bir bileşiktir (24).

- ROS'un oluşumunun baskılanma yoluyla engellenmesi (*Söndürme Etkisi – Quenching*); Glutasyon gibi antioksidan moleküller ise doğrudan ROS

konsantrasyonunu azaltmaktadırlar. Süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimler ise serbest radikal üretimini durdururlar (13).

- Metal iyonlarını bağlayarak radikal oluşum reaksiyonlarının durdurulması (*Zincir Kesme Etkisi - Chain Breaking*); Sitrik asit, amino asit ve etilendiamin tetraasetik asit, metal iyonlarını bağlayarak radikal oluşum reaksiyonlarını engelleyici bir etki sağlamaktadır. Metal iyonları, örneğin bakır ve demir gibi, katalitik olaylarda lipid oksidasyonunu hızlandırma eğilimindedirler (25).

- Hedef moleküllerin hasardan sonra onarımı veya temizlenmesi (Tamir Etkisi - Repair); Bu kategoride yer alan örnekler arasında askorbik asit, askorbil palmitat, izoaskorbik asit ve sodyum tuzları, yağ içeren gıdalarda stabiliteyi artırmak için kullanılırlar (26).

Genel olarak bakıldığında, antioksidan maddeler serbest radikallerin hidrojen atomlarını alarak onları etkisiz hale getirme mekanizmasıyla serbest radikallere karşı koruyucu etki sağlarlar (27).

3.4. Antioksidanların Sperma Sulandırıcılarına Katılması

Spermatozoonlar, seminal plazmadaki antioksidanlar sayesinde, serbest radikallerin yol açtığı oksidatif stres karşısında kendilerini korumaya çaba göstermektedirler (28). Hücre membranı yapısında bulunan lipidlerin LPO'ya karşı korunması antioksidanların ilk belirlenen etkisi olmuştur. ROS spermatozoonlarda lipid ve protein peroksidasyonuna sebep olmaktadır. Artan ROS saldırıları kompakt bir yapıya sahip olmasına rağmen spermatozoon DNA'sında (Deoksiribo nükleik asit) kırılmalara sebep olmaktadır (29). Serbest radikallerin yol açtığı oksidatif stresi engellemek için en kritik savunma mekanizması antioksidanlar tarafından

sağlanmaktadır. Bu nedenle koç sperma sulandırıcılarına birçok antioksidan madde katılarak araştırmalar yapılmış ve bu araştırmalar sonucunda koç spermasının dondurulma kalitesine katkı sağlamaya çalışılmıştır (30-32).

3.5. L – Karnosin Nedir?

19. yy sonlarına doğru Almanya’da kimya alanında çok iyi bir seviyede olan Justus Liebig okulunda kantitatif metotlar kullanarak biyokimyasal analizler yapan Vladimir Gulevitch, “Liebig et ekstresi” adında bir substrat geliştirmiş ve iskelet kasından elde edilen bu ekstraktın farklı bileşenleri ihtiva ettiğini ileri sürmüştür. Daha sonra Rusya’ya dönen Gulevitch burada bulunan Kharkov Üniversitesi’nde bu iskelet kasından elde edilen et ekstresi üzerine derin araştırmalarını sürdürmüştür. Gulevitch’in bulduğu ilk sonuçlar etteki organik nitrojen içeriğinin, protein nitrojen içeriğine oranla önemli düzeyde fazlalık göstermesi olmuştur. Bu ilgi çekici sonuçlar Gulevitch’i daha fazla çalışmaya yöneltmiş ve devam eden çalışmalar 1900 yılında sığırların iskelet kasında iki tane bilinen ve iki tane bilinmeyen madde olduğunu ortaya çıkarmasını sağlamıştır. Bu bilinen maddeler kolin ve metilguanidin olarak belirlenirken, bilinmeyen maddelere ise karnitin ve Latince’de et manasına gelen “caro” veya “carnis” diye söylenen karnosin adı Gulevitch tarafından verilmiştir.

Karnitin, 3-hidroksi-4-N-trimetilaminobütirik asitin moleküler yapısını yansıtan bir kimyasal bileşiktir (33-35). Karnitinin, yağ yakımını artırma ve spermatozoon motilitesini artırma gibi özellikleri vardır (36). Karnitin, mitokondrinin iç zarından geçerek uzun zincirli yağ asitlerinin hücre içindeki enerji üretim süreci olan beta-oksidasyon yoluna katılmasını sağlamaktadır

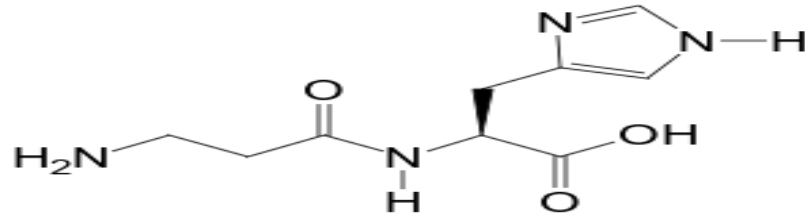
(34). Karnitin, yağların mitokondri içine taşınmasını ve kullanımını düzenleyerek, oksidatif stres nedeniyle peroksidasyona uğramış yağ miktarını azaltarak antioksidatif etki gösterir (33). Antioksidatif özelliği sayesinde, karnitin spermatozoonların mitokondriyal membranlarını ve DNA yapısını reaktif oksijen türlerine karşı koruyarak stabilize eder. Ayrıca, epididimisten geçerken, karnitin spermatozoonların olgunlaşmasını ve motilite yeteneklerini kazanmalarını desteklemektedir (33, 37).

Karnosin miktar olarak karnitinden daha fazla olduğu için Gulevitch çalışmalarını daha çok karnosin üzerine yoğunlaştırmış ve 1911 yılında karnosinin β -alanyl – L-histidine aminoasitlerinin kompleksinden oluşan bir dipeptit olduğunu ileri sürmüştür (38, 39). Karnosin, ATP'ye bağlı karnosin sentaz tarafından histidin ve β -alanyl aminoasitlerinden sentezlenmekte (40) ve metal iyonla bağımlı homodimerik peptidaz (carnosinase) tarafından bileşen aminoasitlerine yıkılmaktadır (41). Karnosinaz CN1 ve CN2 olmak üzere iki izoformda bulunmaktadır. CN1 karaciğer, böbrek ve plazmaya salınırken, CN2 daha yaygın olarak eksprese edilir ve sitozolde kalır (41, 42). L ve D izomerleri olan karnosin, karaciğer, böbrek ve kan serumunda karnosinaz tarafından hidrolize edilebilen bir maddedir (43).

En yaygın analoglar, anserin, ofidin (balenin), homokarnosin, asetilkarnosin ve karsinin gibi karnosin varyantlarıdır. Memelilerde karnosinin sadece iki dokuda (iskelet kası ve beyindeki koku alma merkezi) milimolar düzeyde olduğu bilinmektedir (44). Ayrıca karnosinin seminal plazmada da var olduğu bildirilmektedir (45-47).

Karnosin suda iyi çözünebilen bir bileşik olup (25°C’de 3.1 ml suda 1 g karnosin) üç iyonize edilebilir grupla karakterizedir. Bunlar; karboksilik grup (pKa 2.76), β-alanyl kalıntısının amino grubu (pKa 9.32), ve histidindeki imidazol halkasıdır (pKa 6.72) (48). Bu maddenin aminoasit dizilimi Lysine-Histidine aminoasit dizilimine benzer ve bu dizilim sayesinde şekerlerle reaksiyona girme özelliğine sahiptir (49).

Karnosin radikal olmayan maddelere dönüştürülmeleri için serbest radikallere kolayca hidrojen verebilen fonksiyonel bir imidazol halkasına sahiptir (50). İmidazol halkasının bu tür bir yeteneği, karnosin içerisindeki β-alanyl kısmı tarafından artırılır (51).



Şekil 1. L – karnosinin kimyasal yapısı

3.6. L – Karnosinin Fizyolojik Fonksiyonları

L-karnosinin fizyolojik fonksiyonları başlıca; pH tamponlama, enerjinin korunması için kas ATP aktivasyonu, metal iyonu (bakır, çinko ve demir) şelasyonu ve homeostaz olarak bilinmektedir. Ayrıca L-karnosin, LPO’yu, protein oksidasyonunu, gelişmiş protein glikasyonunu, protein karbonilasyonunu ve

glidiksidasyonunu inhibe ederek, doğrudan reaktif oksijen türleri ile peroksil radikallerini temizleyerek ve dolaylı olarak metalleri şelatlayarak antioksidan etkisini göstermektedir (51).

L-karnosin çok güçlü bir hücre içi tamponlayıcı, immun modülatör, nörotransmitter maddedir (52, 53). Şekerler, doymamış yağ asitleri ve protein oksidasyonundan doğan zararlı reaktif aldehyitleri süpürmektedir (54, 55). α - β doymamış aldehyitler için endojen bir süpürücü, aldehyit kaynaklı sitotoksisiteyi ve protein-protein ya da DNA-protein çapraz bağlanmasını engellediğini gösteren kanıtlar olduğu ispatlanmıştır (54, 56, 57). Membran stabilize edici etkisi (58), hidroksil, peroksil, süperoksit radikali ve singlet oksijen üzerine süpürücü etkisinin olduğu bilinmektedir (59). L-karnosinin sırasıyla süperoksit ve peroksil radikallerini üreten demir askorbat ve linoleik asitin oksidasyonunu engellediği ve deoksiribozun demire bağlı hidroksilasyonunu da inhibe ederek etkili bir hidroksil radikal temizleyici olabileceği düşünülmektedir (60).

L-karnosin histidin ve alaninden çok daha yüksek bir düzeyde DNA'yı ferrik ve bakır askorbat sistemleri tarafından indüklenen hasardan korumaktadır (61). L-karnosinin gama radyasyonlarının sebep olduğu DNA hasarlarına karşı koruma sağladığı (62, 63) ve insan lenfosit hücrelerinde oksidatif hasara karşı DNA'yı koruduğu bildirilmektedir (64). Ayrıca L-karnosinin telomerleri hasardan koruyarak telomer kısalma oranını azaltabildiği ve böylece DNA'yı hasardan koruyabildiğide düşünülmektedir (65). Fizyolojik konsantrasyonlarda L-karnosinin, SOD gibi süperoksit anyon ile doğrudan reaksiyona girdiği bilinmektedir (66). Singlet oksijen ile reaksiyona girme hızı serbest L-histidinden 2-4 kat daha hızlıdır (63).

L-karnosinin alanin kısmının barındırdığı imidazol halkası sayesinde peroksinitritin neden olduğu tirozin nitrasyonunu inhibe ettiği, peroksinitrite bağlı reaksiyonlara karşı koruyucu bir ajan olduğu (67) ve hipoklorit tarafından indüklenen protein çapraz bağlanmasını inhibe ederek koruyucu bir özellik gösterdiği bildirilmiştir (68). Antioksidan özellikleri arasında nonenal ve HNE (4-hydroxy-nonenal) gibi gelişmiş lipid oksidasyon son ürünlerini süpürmesi oldukça önemlidir (69). Karnosinin in vitro ortamda lipoksidasyon ve glikosidasyon son ürünlerini yani şekerler (glukoz, fruktoz, riboz, deoksiriboz) ve reaktif karbonilleri (malondialdehit, glioksal, metilglioksal, asetaldehit ve formaldehit) inhibe ettiği (54, 68, 70) ve doza bağlı olarak hücresel glutatyon tüketimini azalttığı belirtilmiştir (59). Karnosinin antioksidan özelliğinin tespiti amacıyla yapılan bir çalışmada, endojen reaktif bir dikarbonil aldehit olan metilglioksalın artan dozlarda ve karnosin ile birlikte ratların içme sularına katılması sonucunda karnosinin hepatik ve plazma oksidatif stresi baskılayan güçlü bir antioksidan olduğu kanısına varılmıştır (71). Birçok antioksidan maddenin sahip olduğu özellikleri barındıran L-karnosinin, sahip olduğu yaşlanma geciktirici etkisi pek çok antioksidanda bulunmayan bir özelliktir (72). L-karnosin yaşlanma karşıtı bir moleküldür. Bu etkisi bazı araştırmacılar tarafından incelenmiş ve kültürlenmiş insan fibroblast hücrelerinde 20-50 mM karnosinin bu hücrelerin ömrünü uzattığı, yaşlanma fenotipini tersine çevirdiği ve bu hücrelerin büyümesini sağladığı gözlenmiştir (73). Hipkiss, bu yaşlanma karşıtı etkinin, karnosinin elektrofilik aldehitler ve ketonlarla reaksiyona girerek protein-peptit karbonilasyonunu önleme kabiliyetine bağlı olabileceğini öne sürmektedir (74). Bu molekülün doğrudan etkili hidrofilik bir antioksidan olması birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir (75, 76).

L-karnosinin diğer özellikleri arasında mitokondrideki oksidatif fosforilasyon eşleşme düzeyini artırması (38) interleukin 8 üretimini düzenlemesi (77) peptidazlara dirençli olduğundan ötürü hücre içine girmesi, birikmesi ve kolayca çıkmaması (39) yer almaktadır. Ayrıca anaerobik glikoliz sonucu ortaya çıkan laktik asidi nötralize etme yeteneği bilinmektedir (78). Kas içerisinde meydana gelen glikoliz sebebiyle oluşan laktik asit birikimini, sitozolik tampon görevi yaparak azalttığı bildirilmiştir (79).

Aygır seminal plazmasında bol miktarda bulunan karnosin, MDA birikimini gösteren LPO'nun karşısında koruyucu bir etken olarak düşünülmektedir (80). Benzer şekilde Japon bildircinlerinde testis sıvısı ve seminal plazmada karnosin varlığı tespit edilmiş, özellikle seminal plazmada karnosin seviyesinin çok yüksek düzeylerde olduğu belirlenmiştir (47).

3.7. L-karnosinin Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkisi

Tüm hayvanlarda spermanın saklanması sırasında birçok olumsuzluklar meydana gelmektedir. Koç spermatozoonlarının membran yapısının diğer türlere göre farklı lipidik kompozisyonda olmasından dolayı bu türün spermasının saklanabilmesi oldukça zordur. Ayrıca spermanın kısa ve uzun süreli saklanması esnasında serbest radikallerin ortaya çıkmasından dolayı artan oksidatif stres spermatozoonların saklanabilme kapasitesini düşürmektedir.

Adami ve ark., (81) insan spermasında farklı L-karnosin konsantrasyonlarının sperma üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, rutin değerlendirme için 34 kişiden aldıkları sperma örneklerini kontrol (L-karnosin içermeyen), 20 mM ve 50 mM L-karnosin içeren 3 gruba ayırmışlar,

motilite ve kinematik parametreleri, mitokondriyal aktiviteyi, DNA fragmentasyon düzeyini, akrozom bütünlüğünü ve plazma membran bütünlüğünü analiz etmişlerdir. Kontrol grubuna göre 50 mM L-karnosin ilavesinin BCF (Çapraz geçiş frekans ritmi) düzeyini ve mitokondriyal aktiviteyi, 20 mM L-karnosin ilavesinin ise VCL, VSL, VAP, LIN, BCF ve progresif motiliteyi artırdığını tespit etmişlerdir.

Haeri ve ark., (82) farelerde gama radyasyonlarının sebep olduğu testis hasarına karşı karnosinin etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, gama radyasyon ışın uygulamasından 4 gün önce intraperitoneal yolla 10, 50 ve 100 mg/kg dozda karnosin uyguladıklarını, karnosin uygulama grubunun kontrol grubuna oranla spermatogenezis sırasında üretilen germ hücre sayısını artırdığını ve tubül başına düşen apoptotik hücre sayısını azalttığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca gama radyasyonla birlikte kombine edilen karnosin gruplarında gama radyasyon grubuna oranla spermatogonia sayısı, seminifer tubüllerin epitel yüksekliği ve seminifer tubüllerin çapları gibi parametrelerde artış sağladığını belirtmişlerdir.

Kawai ve ark., (80) aygır seminal plazması içerisinde doğal olarak bulunan karnosin maddesinin dondurulmaya faydalı olabileceğini düşünerek 1, 50 ve 100 mM dozlarında karnosini spermaya ilave etmişlerdir. 50 mM karnosin ilavesinin kontrol grubuna oranla spermatozoon plazma membran hasarını azaltırken, mitokondriyal membran potansiyelini artırdığını bildirmişlerdir. Diğer bir doz olan 100 mM karnosin ilavesinin ise kontrol grubuna oranla DNA hasarını azaltırken, ALH düzeyini artırdığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca karnosin ilavesinin düşük donma kabiliyetine sahip numunelerde spermanın dondurulması sırasında oluşan hasarların önlenmesinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Rocha ve ark., (46) aygırların seminal plazmasındaki karnosin düzeyini belirleyerek spermaların motilite düzeylerine göre soğutma ve dondurma işlemine yüksek ve düşük toleranslı farklı gruplar oluşturup seminal plazma düzeyini karşılaştırma amacıyla yaptıkları çalışmada, 4-16 yaş arası 40 aygırdan 2 ejakülat sperma almışlardır. Yapılan çalışmada, toplanan spermaların LPO seviyelerini, plazma ve akrozomal membran bütünlüğünü, mitokondriyal membran potansiyelini ve CASA ile spermatolojik özelliklerini değerlendirmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda düşük motiliteye sahip spermalarda yüksek karnosin konsantrasyonunu tespit etmişlerdir. Soğutma işlemine yüksek toleranslı gruplarda daha yüksek mitokondriyal aktivite, sağlam akrozom ve membran bütünlüğünü belirlemişlerdir. Bu durumun karnosinin yararlı etkisinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca 24 saat buzdolabında saklama sonrasında karnosinin spermatozoon kalitesini geliştirdiğini ve hasarlara karşı koruma sağladığını ortaya koymuşlardır.

Sanchez-Partida ve ark., (83) koçlarda spermanın dondurulabilirliği üzerine yaptıkları çalışmada epididimal bileşiklerden antioksidan özellikli karnosinin tris bazlı sperma sulandırıcılarına 50 mM ve üzerindeki ilavesinin motilite parametrelerinde düşüşe neden olduğunu bildirmişlerdir.

Zhang ve ark., (84) asthenozoospermik ve normozoospermik insan spermasında L-karnitinin spermanın dondurulma-çözdürülme işlemi sırasında oluşacak spermatozoon hasarını önlemedeki başarısını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, L-karnitin ilavesinin hem asthenozoospermik hem de normozoospermik sperma örneklerinde dondurma hasarlarını azalttığı, 1 g/l L-karnitin eklenmesinin kontrol grubuna kıyasla dondurma-çözdürme sonrası total, progresif motilite ve canlılık düzeylerinde artış sağladığını belirlemişlerdir. Ayrıca

spermaya L-karnitin ilavesi normozoospermik spermalara oranla asthenozoospermik spermalarda mitokondriyal membran potansiyelini artırdığını ve DNA hasarını önlediğini ileri sürmüşlerdir.

Jacyno ve ark., (85) domuzlarda L-karnitinin spermatozoon kalitesi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirdikleri bir çalışmada, günlük diyetle 500 mg L-karnitin takviyesinin 5 hafta boyunca toplanan spermalarda kontrol grubuna oranla daha yüksek sperma hacmi, total motilite ve spermatozoon yoğunluğu sağladığını ($p<0.05$), anormal spermatozoon ve akrozomal hasar oranında ise azalmanın ($p<0.01$) olduğunu bildirmişlerdir.

Partyka ve ark., (86) horoz spermasının dondurulması amacıyla sperma sulandırıcısına 1 ve 5 mM dozlarında L-karnitin takviyesi yapıp motilite, kinematik analizler, plazma membran bütünlüğü, akrozom bütünlüğü, mitokondriyal aktivite, LPO düzeyi, apoptoz oranı ve DNA hasar oranı gibi parametreleri incelediklerini belirtmişlerdir. İncelenen bu parametrelerde 1 mM L-karnitin içeren grubun, kontrol grubuna oranla dondurma-çözdürme sonrası spermatozoonlarda apoptoz ve DNA hasarı oranını azalttığı, mitokondriyal aktivite oranını artırdığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca deney gruplarının kontrol grubuna oranla LPO'ya uğramamış canlı spermatozoon oranını artırdığını ileri sürmüşlerdir.

Al-Daraji ve ark., (87) ördeklerde spermatozoon kalitesi üzerine farklı miktarlarda L-karnitin ilavesinin etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada 30 haftalık 1.75-2 kg canlı ağırlığındaki ördeklerin diyetlerine 0, 50, 100 ve 150 mg/kg L-karnitin ilave etmişlerdir. Kontrol grubuna kıyasla 50-150 mg/kg L-karnitin ilavesinin sperma hacmi, kitle hareketi, spermatozoon motilitesi ve yoğunluğunu arttırdığı, ölü, anormal ve akrozomal anomaliye sahip spermatozoon

oranını azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca 150 mg/kg L-karnitin takviyesinin en iyi sonuçları vererek, ördeklerde reproduktif performansı geliştirdiğini ileri sürmüşlerdir.

Fattah ve ark., (33) horoz spermasının fertilite potansiyeli, sperma kalitesi ve spermanın kısa süreli saklanabilirliği üzerine L-karnitin ilavesinin etkilerini belirlemek amacıyla sperma sulandırıcılarına 0, 0.5, 1, 2, 4 ve 8 mM dozlarında L-karnitin ilavesi yapmışlardır. 48 saat süreyle 5°C’de sakladıkları spermalarda, 24 ve 48. saatlerde 1 ve 2 mM L-karnitin içeren grupların kontrol grubuna oranla spermatozoon motilitesi, canlılığı, membran bütünlüğü ve mitokondriyal aktivite parametrelerini yükselttiği ve LPO oranını da düşürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar bir başka çalışmalarında L-karnitin 1 ve 2 mM dozlarını kullanarak spermanın dondurulması üzerine etkisini incelediklerini belirtmişlerdir. Bu değerlendirmeler sonucunda kontrol grubuna kıyasla 1-2 mM L-karnitin içeren grupların dondurma-çözdürme sonrası spermatozoon motilitesi, canlılığı, membran bütünlüğü ve mitokondriyal aktivitede yükselme, LPO düzeyinde ise düşüş olduğunu belirlemişlerdir (88).

De Souza ve ark., (89) koçlarda spermanın dondurulmasında L-karnitin etkinliğini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, L-karnitin içeren (0, 5 ve 10 mM) tris+yumurta sarısı sulandırıcısı ve hazır sperma sulandırıcısı (optiXcell™ - IMV Technologies, L'Aigle, Fransa) olmak üzere iki farklı sulandırıcı çeşidi ile sperma dondurma işlemini gerçekleştirdiklerini belirtmişlerdir. Dondurma-çözdürme sonrası tris+yumurta sarısı+5-10 mM L-karnitin içeren grubun, kontrol grubuna oranla daha yüksek düzeyde total, progresif motilite ve plazma membran bütünlüğü ile daha düşük düzeyde LPO’ya sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

Losano ve ark., (90) köpeklerde farklı karnosin dozlarının spermaya eklenmesinin dondurma-çözdürme sürecine olan etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirdikleri bir çalışmada, üreme çağındaki 6 köpekten alınan spermalara 0, 1, 50 ve 100 mM dozlarında karnosin ilavesi yapmışlardır. Dondurma-çözdürme sonrası spermada plazma membran bütünlüğü, akrozom bütünlüğü, mitokondriyal aktivite, DNA bütünlüğü, oksidatif stres analizi ve CASA ile spermatozoon motilite analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları analizler sonucunda kontrol grubuna göre 50 ve 100 mM karnosin ilavesinin total, progresif motilite ve LPO düzeyini azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca kontrol grubuna göre 50 mM karnosin ilavesinin VAP, VSL ve VCL düzeylerinde azalma sağladığını ileri sürmüşlerdir. Diğer analizlerde ise, kontrol grubu ile karnosin dozları arasında herhangi bir farklılık saptanmadığını gözlemlemişlerdir.

Mutlu (91), erişkin sıçanlarda doksorubisin kullanarak oluşturduğu testis hasarı sonucu testis ağırlıklarının azaldığını, seminifer tubüllerde hasar oluştuğunu ve spermatogoniumlarda dejenerasyonların oluştuğunu bildirmiştir. 200 mg/kg L-karnitin kullanılması sonucunda seminifer tubüllerde hasarın azaldığını ve spermatogenezisin devam ettiğini bildirmiştir.

Verilen tüm bilgiler ışığında; koç spermasının dondurulmasındaki başarısızlıklar ve spermanın dondurulup uzun yıllar saklanabilirliğinin faydaları düşünüldüğünde sulandırıcılara farklı katkı maddeleri ilave edilerek yapılacak çalışmaların gerekliliği açık bir şekilde görülmektedir. Bu çalışma ile antioksidan özelliği bilinen, çok güçlü bir hücre içi tamponlayıcı olan, hücreleri DNA hasarına karşı koruyan, yaşlanma karşıtı bir molekül olan ve laktik asidi nötralize etme yeteneğine sahip L-karnosin amino asidinin sperma sulandırıcılarına ilave edilerek koçlarda spermanın kısa ve uzun süreli saklanabilirliği üzerine etkilerini belirlemek amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Hayvan Materyali

Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (FÜHADYЕК) 06.01.2021 tarihli ve 2021/01 oturum sayılı onayı alındı. Bu çalışmada, klinik olarak sağlıklı olan, genital organ muayenesi sırasında herhangi bir patolojik bulguya rastlanmayan, ortalama 60-65 kg canlı ağırlığında 2 yaşlarında 6 adet Akkaraman ırkı koç ve 1 adet Akkaraman ırkı koyun kullanıldı.



Şekil 2. Hayvan materyali olarak kullanılan Akkaraman ırkı koçlar.

Koçlar Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi Hospitalizasyon Ünitesinde barındırıldı. Deneysel çalışmalar başlamadan önce ve tüm çalışma boyunca koçlar kaliteli kaba yem ve konsantre yemlerle beslendi. İçme suyu ad libitum olarak sağlandı.

Tablo 1. Koçların beslenmesinde kullanılan rasyonun içeriği ve besin madde bileşimi

Yem Maddeleri (%)	
Buğday Samanı	62.18
Yonca Kuru Otu, Çiçek Başı	3.66
Arpa, Tane	25.60
Buğday Kepeği	6.60
Ayçiçeği Küspesi, Kabuklu, %28	1.46
Tuz	0.25
Vitamin-Mineral Karışımı *	0.25
Besin Maddeleri (%)	
Kuru Madde	90.71
Ham Protein	8.80
ME, Mcal/kg**	2.43

*: Her kg'ında; 1.200.000 IU vit A, 200.000 IU vit D3, 5.000 mg vit E, 100 mg vit K3, 100 mg vit B1, 50 mg vit B2, 10 mg vit B6, 500 mg Niasin, 300 mg Cal-D-Pentotenat ve 100 mg vit C, 5.000 mg Fe, 5.000 mg Zn, 1.000 mg Cu, 200 mg I, 50 mg Co, 30 mg Se, 54.000 mg P, 319.000 mg Ca, 100.000 mg NaCl ve 15.000 mg antioksidan vardır.

** : Hesaplama yolu ile elde edilmiştir.

4.2. Koçların Suni Vajen ile Sperma Vermeye Ağıştırılması

Araştırma boyunca koçlar ve koyun ayrı padoklar içerisinde tutuldu. Çalışma üreme mevsimi dışında gerçekleştirildi. Koyuna 5 mg/2mL/koyun dozunda 17-β-östradiol susam yağı içerisinde özdürölerek uygulanarak kızgınlığa getirildi. Bu sayede koçların libidosu uyarılarak suni vajene sperma vermeleri sağlandı. Koçların hepsi 6 hafta süren deneme sürecinin sonunda suni vajene sperma vermeye ağıştırıldı.

4.3. Deneysel Aşama

Tüm analizler Fırat Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Hayvan Hastanesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Androloji Laboratuvarı ve Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışma iki aşamalı olarak gerçekleştirildi.

4.3.1. Birinci Aşama (Kısa Süreli Saklama)

Bu aşamada sperma sulandırıcılarına L-karnosin (%99, Crystalline, C9525-5G, C₉H₁₄N₄O₃, Sigma-Aldrich®) ilavesinin spermanın kısa süreli saklanabilirliği üzerine etkisi CASA ve flow-sitometri yardımıyla yapılan spermatolojik incelemelerle araştırıldı.

4.3.1.1. Sulandırma Solüsyonlarının Hazırlanması

4.3.1.1.1. Sperma Sulandırıcısı

1- Tris(hydroxymetyl aminomethane)

(Sigma, CAS No:77-86-1)

297,58 mM

2- Sitrik asit

(Merck, CAS No:77-92-9)

96,32 mM

3- Fruktöz

(Merck, CAS No: 57-48-7)

82,66 mM

4- Penisilin (Penicillin G Potasyum 1.000.000 IU, İ.E. ULAGAY) 100.000 IU

5- Streptomisin (Kristalize Streptomisin Sülfat 1 g, İ.E. ULAGAY) 100 mg

6- Yumurta sarısı

15 mL

7- Distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

4.3.1.1.2. Stok ve Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

Molekül ağırlığı 226.23 g/mol olan L-karnosinden 399.52 mg alınarak 2.2 ml distile su içerisinde çözündürüldü ve 800 mM'lık stok solüsyon elde edildi. Hazırlanmış olan tris+yumurta sarısı sulandırıcısından 8 farklı falkon tüplere 1'er ml koyuldu. Hazırlanan çalışma solüsyonları dozlara göre;

Çalışma Solüsyonu 1: 2 mM (0.995 ml distile su + 0.005 ml 800 mM'lık stok solüsyon + 1 ml tris+yumurta sarısı sulandırıcısı),

Çalışma Solüsyonu 2: 10 mM (0.975 ml distile su + 0.025 ml 800 mM'lık stok solüsyon + 1 ml tris+yumurta sarısı sulandırıcısı),

Çalışma Solüsyonu 3: 20 mM (0,950 ml distile su + 0,050 ml 800 mM'lık stok solüsyon + 1 ml tris+yumurta sarısı sulandırıcısı),

Çalışma Solüsyonu 4: 40 mM (0.900 ml distile su + 0.100 ml 800 mM'lık stok solüsyon + 1 ml tris+yumurta sarısı sulandırıcısı),

Çalışma Solüsyonu 5: 100 mM (0.750 ml distile su + 0.250 ml 800 mM’lık stok solüsyon + 1 ml tris+yumurta sarısı sulandırıcısı),

Çalışma Solüsyonu 6: 200 mM (0.500 ml distile su + 0.500 ml 800 mM’lık stok solüsyon + 1 ml tris+yumurta sarısı sulandırıcısı),

Çalışma Solüsyonu 7: 400 mM (0.000 ml distile su + 1.000 ml 800 mM’lık stok solüsyon + 1 ml tris+yumurta sarısı sulandırıcısı),

Çalışma Solüsyonu 8: Kontrol (1.000 ml distile su + 0.000 ml 800 mM’lık stok solüsyon + 1 ml tris+yumurta sarısı sulandırıcısı) olacak şekilde ayarlandı.

Sonuç olarak totalde 2 ml tris+yumurta sarısı ve farklı dozlarda L-karnosin ihtiva eden 8 tüp çalışma solüsyonu hazırlanmış oldu.

4.3.1.2. Spermanın Alınması

Hayvanlardan sperma çalışma boyunca haftada iki kez 8.30-11.00 saatleri arasında alındı. Suni vajen kullanılarak 6 koçtan toplanan her bir sperma 38°C su ile dolu beher içerisinde laboratuvara getirildi. Laboratuvara getirilen spermaların motilite ve yoğunluk tayinleri CASA cihazı kullanılarak yapıldı. Alınan spermaların araştırmada kullanılabilmesi için total motilitesi %70’in ve yoğunluğu 2 milyarın üzerinde olma şartı arandı.

4.3.1.3. Sperma ile Çalışma Solüsyonlarının Birleştirilmesi

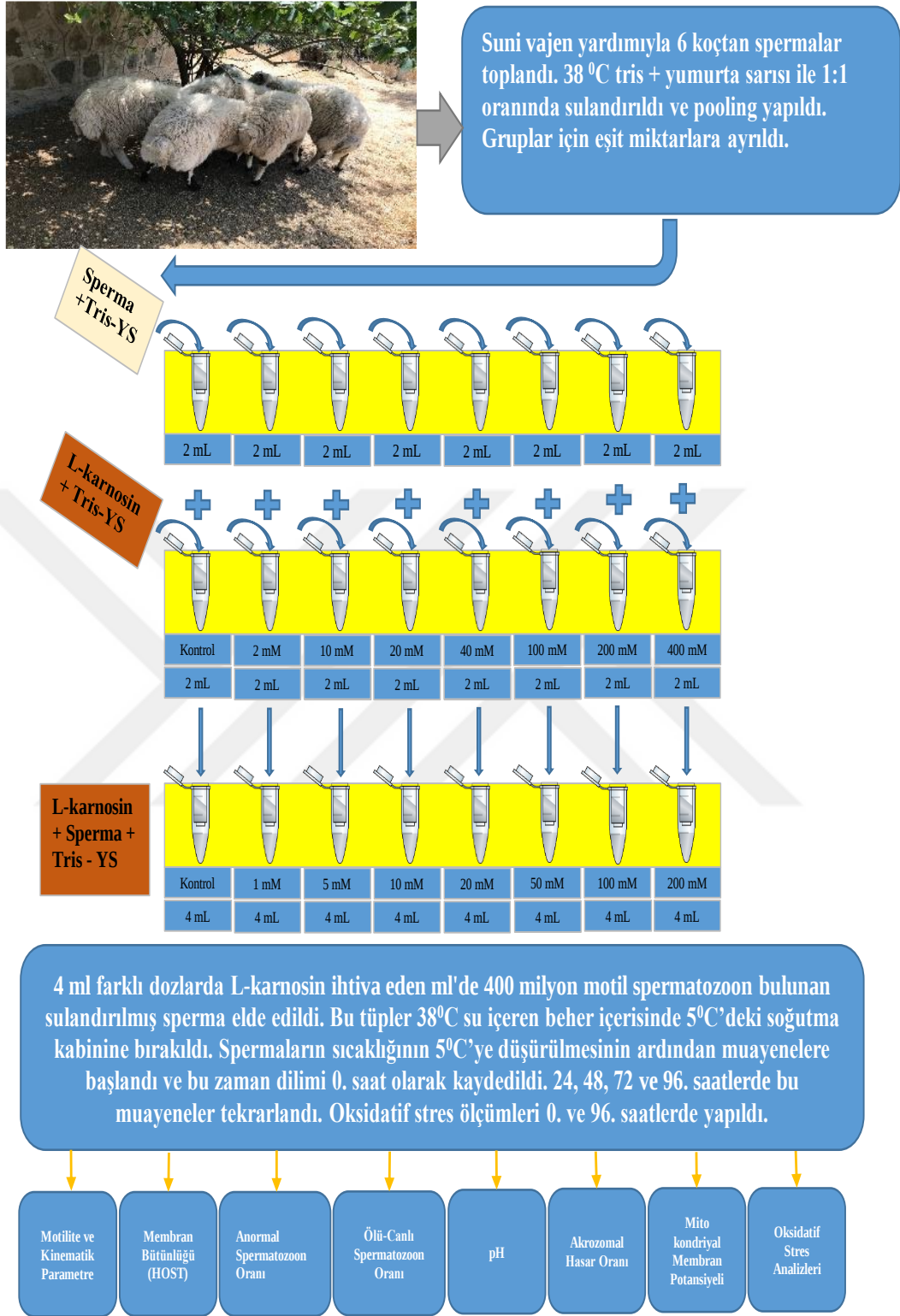
Toplanan spermalar laboratuvara getirildikten sonra 38°C’deki etüv içerisinde 1:1 oranında Tris+yumurta sarısı sulandırıcısıyla sulandırıldı. Gerekli bireysel muayenelerin ardından tüm spermalar pooling (miks) yapıldı. Elde edilen poolingın motilitesi ve yoğunluğu CASA sisteminde tayin edildikten sonra ml’de

800 milyon motil spermatozoon olacak şekilde tekrardan sulandırıldı. Son hacmi oluşturulan pooling 8 farklı tüpe 2'şer ml olacak şekilde bölündü. Daha önceden hazırlanmış 2 ml tris+yumurta sarısı ve farklı dozlarda L-karnosin ihtiva eden çalışma solüsyonları spermaların üzerine ilave edilerek çalışma grupları (**Grup 1:** Kontrol, **Grup 2:** 1 mM, **Grup 3:** 5 mM, **Grup 4:** 10 mM, **Grup 5:** 20 mM, **Grup 6:** 50 mM, **Grup 7:** 100 mM, **Grup 8:** 200 mM) oluşturuldu. Finalde 4 ml farklı dozlarda L-karnosin ihtiva eden ve ml'de 400 milyon motil spermatozoon bulunan sulandırılmış sperma elde edildi. Tüm gruptaki sulandırılmış sperma örnekleri 5°C'deki sıcaklık düşüşü ayarlanabilir soğutma kabinine yerleştirildi. Spermaların sıcaklığının 2 saat içerisinde kademeli bir şekilde 5°C'ye düşürülmesinin ardından muayenelere başlandı. Bu zaman dilimi 0. saat olarak kaydedilerek 0. saat ve sırasıyla her 24 saatte bir (24, 48, 72, 96. saatlerde) motilite ve kinematik parametreler, anormal spermatozoon oranı, membran bütünlüğü, pH, ölü-canlı spermatozoon oranı, akrozom bütünlüğü ve mitokondriyal membran potansiyeli belirlendi. Ek olarak 0. ve 96. saatlerde biyokimyasal yöntemlerle spermadaki oksidatif stres analizleride yapıldı.



Şekil 3. Suni Vajen Yardımıyla Spermanın Alınması.

Kısa süreli saklama boyunca etkin L-karnosin dozlarının belirlenmesinde kullanılan başlıca kriter; CASA ve flow-sitometri ile yapılan analizler neticesinde, deney grupları içerisinde kontrol grubuna kıyasla sayısal veya istatistiksel anlamda en iyi sonuçları gösteren dozların belirlenmesi oldu. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda belirlenen en iyi dört L-karnosin dozu ikinci aşamada kullanıldı.



Şekil 4. Birinci Aşamanın (Kısa Süreli Saklama) Deneyisel Planı.

4.3.2. İkinci Aşama (Uzun Süreli Saklama)

Bu aşamada, çalışmanın birinci aşamasında belirlenen L-karnosin dozlarının sperma sulandırıcılarına ilavesinin spermanın uzun süreli saklanabilirliği (dondurulabilirliği) üzerine etkisi CASA ve flow-sitometri kullanılarak araştırıldı.

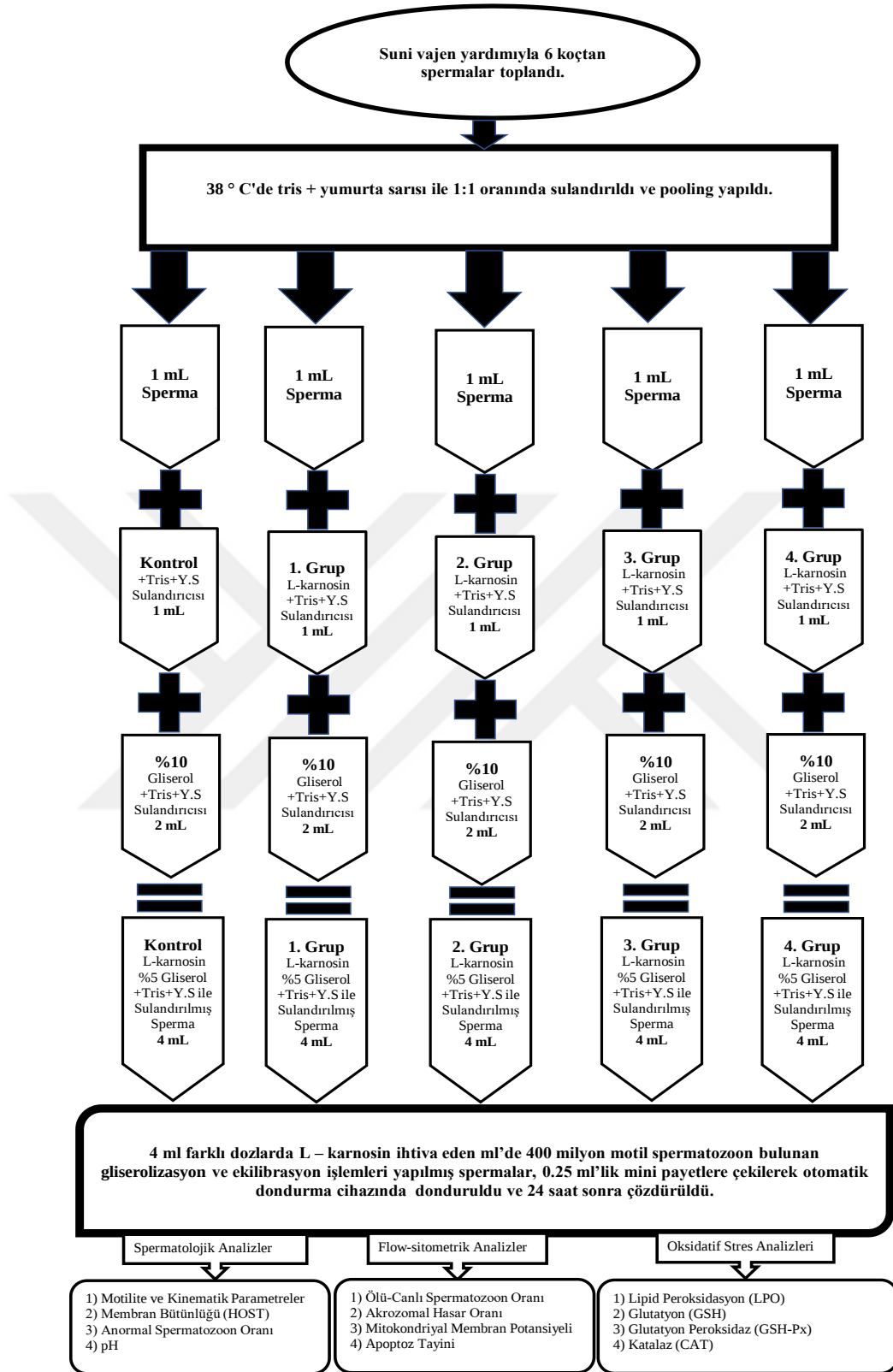
4.3.2.1 Sulandırma Solüsyonlarının Hazırlanması ve Spermanın Sulandırılması

Çalışmanın ikinci aşamasında birinci aşamada öne çıkan en iyi dört grup kullanıldı. Son hacimde istenen dozlarda L-karnosin olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlandı. 1 ml tris+yumurta sarısı ve farklı dozlarda L-karnosin ihtiva eden 1 ml stok solüsyonlar ayrı ayrı tüpler içerisinde birleştirildi. Daha sonra ayrı tüplere yoğunluğu 1 milyar 600 milyon olacak şekilde ayarlanan spermalar konuldu. L-karnosin ihtiva eden çalışma solüsyonları ile tüplerdeki spermalar birleştirildi. L-karnosin ihtiva eden sulandırılmış spermalar 38°C su ile dolu beher içerisinde soğutma kabinine bırakılıp sıcaklığı 5°C'ye düşürüldükten sonra final hacimde % 5 olacak şekilde gliserolizasyon işlemine tâbi tutuldu. Bu amaçla tüplere 2'şer mL L-karnosin içeren sulandırılmış sperma ve bu spermaların üzerine 2'şer mL % 10 gliserol ihtiva eden tris+yumurta sarısı sulandırıcısı 4 eşit parçaya bölünerek 15 dakika aralıklarla eklendi. Gliserolizasyon işleminin ardından spermalar 5°C sıcaklıkta 4 saat süreyle ekilibrasyona tâbi tutuldu. Daha sonra tüplerde bulunan spermalar 0.25 ml'lik mini payetlere çekildi. Özel raflara dizilen payetler otomatik dondurma cihazında (Microdigitcool, IMV, Fransa) sıvı azot buharı yardımıyla donduruldu. Dondurulmuş spermalar -196°C'deki sıvı azot içeren konteynerlerde analiz edilinceye kadar saklandı. Dondurma işleminden 24 saat

sonra sıvı azot tankından alınan payetler 25 saniye boyunca 38°C sıcaklıktaki su içerisinde bekletilerek çözündürüldü. Bir ependorf tüpe aktarılan spermalar özel ısıtılmalı ependorf sporlarına yerleştirildi. Ardından motilite ve kinematik parametreler, anormal spermatozoon oranı, membran bütünlüğü, pH, oksidatif stres, ölü-canlı spermatozoon oranı, akrozom bütünlüğü, mitokondriyal aktivite ve apoptoz muayeneleri yapıldı.



Şekil 5. A. Spermanın payetlere çekilmesi, **B.** Dondurulması **C.** Çözdürme sonrası CASA ve **D.** Flow-sitometrik analizlerin yapılması.



Şekil 6. İkinci Aşamanın (Uzun Süreli Saklama) Deneyisel Planı.

4.4. Spermatolojik Analizler

4.4.1. CASA ile Motilite ve Kinematik Parametrelerin Ölçümü

Bu aşamada CASA (ISASv1, Proiser, Spain) sistemi kullanılarak spermalarda motilite ve kinematik parametre tayinleri yapıldı. Öncelikle CASA'nın bir görüntü alanına düşen spermatozoon sayısının 80-150 adet olması için spermadan 15 µL alınıp üzerine 485 µL tris buffer solüsyonu (Tris (hydroxymethyl) aminomethane 3.63 g, glukoz 0.50 g, sitrik asit 1.99 g ve distile su 100 mL) ilave edilerek sperma sulandırıldı. Sulandırılmış sperma örneklerinden analiz için cihaza uyumlu olarak tasarlanmış özel lam (Spermtrack 20 µm) üzerine 3 µL koyuldu. Daha sonra CASA sistemine entegre olan faz-kontrast mikroskobun ısıtma tablalı sehpasının üzerine hazırlanan bu lam yerleştirildi. Bu işlemi takiben CASA sistemine bağlı motilite modülü kullanıldı. Bu modül üzerinden total, progresif motilite (hızlı, orta ve yavaş hızda hareket eden spermatozoon oranları ile birlikte) oranları (%), hareketsiz spermatozoon oranı (%) ve kinematik parametre değerleri (VCL- Eğrisel hız (µm/s); VSL- Doğrusal hız (µm/s); VAP- Ortalama yol hızı (µm/s); LIN- Doğrusallık (Eğrisel yolakların doğrusallığı, %); STR- Doğrusallık (Ortalama yolun doğrusallığı, %), WOB: Kararsızlık (Gerçek yolakta ilerlerken izlenen dalgalanmanın ölçüsü, %), ALH- Spermatozoon başının ortalama yolda ilerlerken laterale doğru saptığı uzaklık (µm); BCF- Çapraz geçiş frekans ritmi (Eğrisel yolağın ortalama yolaktan geçme frekansı, Hertz) kaydedildi. Spermatozoon hızı için üretici firma tarafından koçlar için ayarlanmış hız aralığı (hareketsiz < 10 µm/s < yavaş < 45 µm/s < orta < 75 µm/s < hızlı) kullanıldı. Cihazın partikül büyüklüğü ise 15-70 µm olarak ayarlandı.

4.4.2. Anormal Spermatozoon Oranının Belirlenmesi

Anormal spermatozoon oranını belirlemek için Diff-Quick Boyama testinin A, B ve C solüsyonları sırasıyla kullanıldı. Öncelikle sperma örneklerinden 100 µL alınıp üzerine 400 µL tris buffer solüsyonu ilave edilerek sulandırma işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra bu karışımdan 75 µL alınıp lam üzerine damlatılarak sürme froti hazırlandı. Frotiler havada kurutulduktan sonra, sırasıyla A, B ve C solüsyonlarına daldırılarak 30 saniye, 20 saniye ve 30 saniye boyunca bekletildi. Sonrasında frotiler distile su ile yıkandı ve ardından 38°C'lik bir etüv içinde kurumaya bırakıldı. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra, faz-kontrast mikroskopunun 400x büyütme ayarıyla 200 adet spermatozoon sayıldı. Anormal morfolojiye sahip spermatozoonların oranı % olarak belirtildi.

4.4.3. Membran Bütünlüğünün Belirlenmesi – Hipoosmotik Şişme Testi (HOST)

Membran bütünlüğünü tespit etmek için hipotonik bir solüsyon (0,49 g sitrik asit, 0,9 g fruktoz, 100 mL distile su) hazırlandı. Sperma örnekleri 1:5 oranında tris buffer ile sulandırıldıktan sonra 50 µL alınıp üzerine 500 µL hipotonik solüsyon ilave edildi. Bu karışım 38°C etüv içerisinde 60 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında karışımdan 15 µL alınarak lam üzerine damlatılıp lamelle kapatıldı. Faz-kontrast mikroskopun 400x büyütmesi kullanılarak 200 adet spermatozoon sayıldı. Şişmiş baş ve kıvrılmış kuyruklu sağlam spermatozoonların oranı % olarak ifade edildi (32).

4.4.4. pH'nın Belirlenmesi

Sperma örneklerinin pH değerleri, dijital pH metre cihazı (Hanna Instrument, Bucharest, Romania) kullanılarak ölçüldü. Bu işlem için sperma örnekleri pH metrenin elektrodu ile temas ettirildi. Sonuç ekranda sabitlenene kadar beklenildi. Bu süreç sonunda pH metrenin dijital ekranında çıkan değer sonuç olarak kaydedildi.

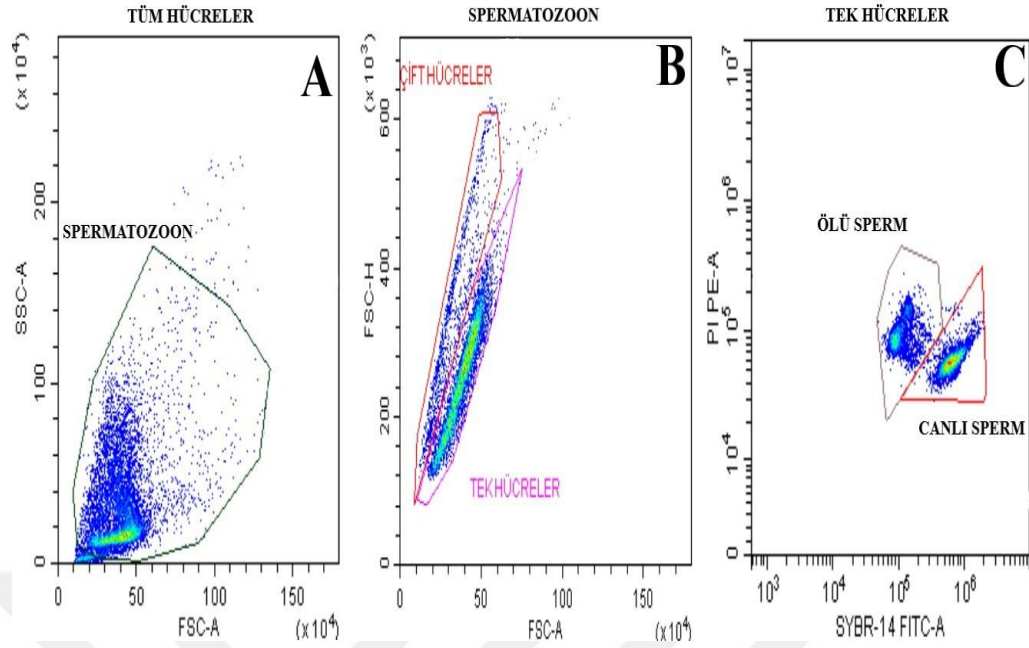
4.5. Flow-Sitometrik Analizler

Flow-sitometri ile sperma örneklerinde 4 farklı analiz gerçekleştirildi. Bu analizlerden canlılık oranının belirlenmesi, akrozomal hasarın tespiti ve mitokondriyel membran potansiyelinin tayini çalışmanın her iki aşamasında da yapıldı. Ancak 2. aşamada bu analizlere ek olarak sperma örneklerinde apoptoz tayini de yapıldı. Sperma örneklerinin değerlendirmeleri 488 nm'de lazer ışını (50 mW lazer çıkışı) ile yapıldı. Bu amaçla 525 ± 40 , 585 ± 42 ve 610 ± 20 nm emisyon filtreleri kullanıldı.

4.5.1. Canlılık Oranının Belirlenmesi

Canlılık oranının tespiti Garner ve ark.,'larının (92) dizayn ettikleri metodun modifiye edilmesi ile gerçekleştirildi. Sperma örneklerinde canlılık muayenesi yapmak için LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (L7011, ThermoFisher Scientific, USA) kullanıldı. SYBR-14 ve PI boyalarının firmanın önerisi doğrultusunda sulandırılmaları yapıldıktan sonra bir ependorf tüp içerisine 980 µL PBS konuldu. Bu solüsyonun üzerine 10 µL sperma, 5 µL SYBR-14, 5 µL PI eklendi ve bir

karışım elde edildi. Böylece elde edilen karışım içerisindeki spermatozoon yoğunluğu 1 milyon oldu. Bu karışım bir dakika süre boyunca vortekslenerek 38°C etüv içerisinde karanlık ortamda 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bu tüpler flow-sitometri cihazının (Cytotflex, Beckman-Coulter, USA) tüp okutma bölümüne yerleştirildi. Cihazın saydığı spermatozoon sayısı 10.000 olarak ayarlandı. İlk grafikte total spermatozoon yoğunluğu FSC (Forward Scatter/İleri saçılım) ve SSC (Side Scatter/Yana saçılım) karşılaştırılması kullanılarak saptandı. Daha sonra bu karşılaştırma içerisinde süzülen hücreler FSC-Area (Forward Scatter-Area/İleri saçılım alan) ve FSC-Height (Forward Scatter-Height/İleri saçılım yükseklik) karşılaştırılmasına tabi tutularak çift olan hücrelerin tek hücrelerden ayrılması sağlandı. Bu aşama da tamamlandıktan sonra ayrılan tek hücreler PE (Phycoerythrin) ve FITCH (Fluorescein Isothiocyanate) karşılaştırılmasına tabi tutularak PI (Propidium Iodide) floresan boyasının boyadığı hücreler ölü sayıldı ve PE kanalına yakın olacak şekilde toplandı. SYBR -14 floresan boyasının boyadığı hücreler canlı kabul edildi ve FITCH kanalına yakın toplandı. Böylece ölü ve canlı hücre grupları grafik üzerinde iki ayrı bölme olarak görüntülendi ve % olarak ifade edildi.

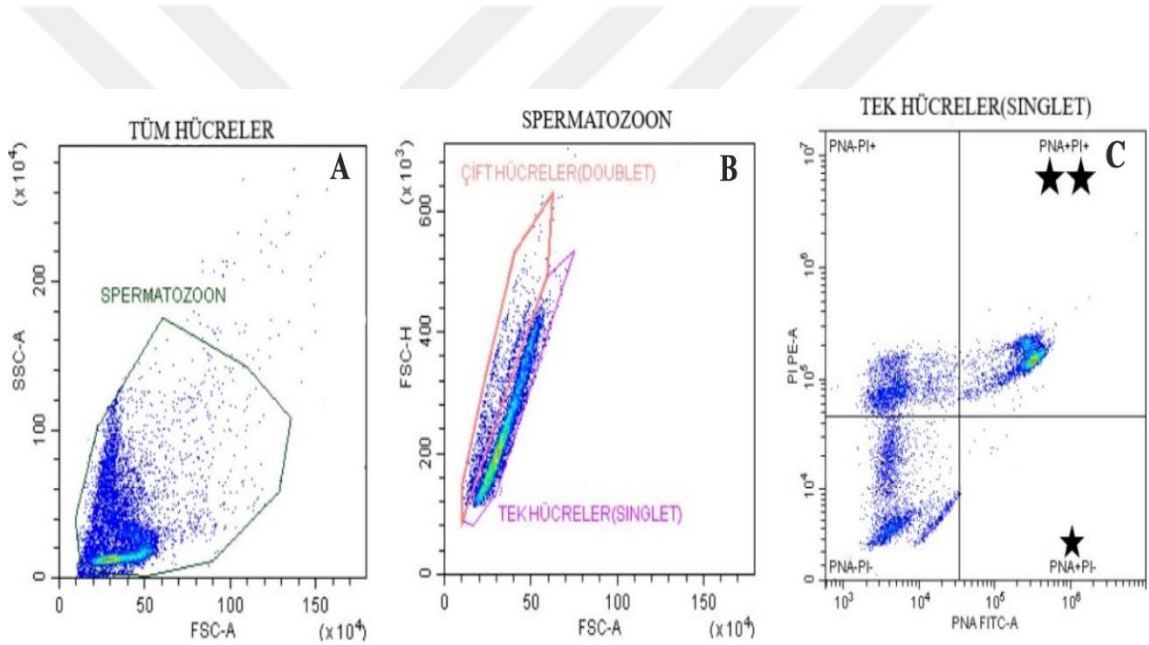


Şekil 7 . Canlılık oranının belirlenmesinde; (A) Akış kanalı boyunca görüntülenen spermatozoonları büyüklük ve granülaritesine göre elimine etmek için ileri (FSC) ve yana (SSC) saçılımların karşılaştırmalı sitogramı. (B) Tek (singlet) ve çift (doublet) hücrelerin birbirinden ayrılması amacıyla kullanılan ileri saçılım yüksekliği (FSC-H) ve ileri saçılım alan (FSC-A) karşılaştırma sitogramı. (C) Ölü ve canlı spermatozoonların ayrıştırılması amacıyla tek (singlet) hücrelerin PE-A ile FITC-A karşılaştırma sitogramı.

4.5.2. Akrozomal Hasarın Tespiti

Akrozomal hasarın tespiti İnanç ve ark.,'larının (93) kullandıkları metodun modifiye edilmesi ile gerçekleştirildi. Sperma örneklerinin akrozomal hasar derecelerinin ölçümü için Lectin PNA from *Arachis hypogaea* (peanut agglutinin), Alexa Fluor™ 488 Conjugate (L21409, ThermoFisher Scientific, USA) kullanıldı. Ependorf tüp içerisine 982 μ L PBS konuldu. Bu solüsyonun üzerine 10 μ L sperma, 5 μ L Lectin PNA ve 3 μ L PI boyası eklendi. Böylece elde edilen karışım içerisindeki spermatozoon yoğunluğu 1 milyon oldu. Elde edilen karışım bir dakika boyunca vortekslenerek 38°C etüv içerisinde karanlık ortamda 30 dakika boyunca

inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bu tüpler flow-sitometri cihazı kullanılarak okutuldu. İlk grafikte total spermatozoon yoğunluğu FSC ve SSC karşılaştırılması kullanılarak saptandı. Daha sonra bu karşılaştırma içerisinde süzülen tek hücreler FSC-Area ve FSC-Height karşılaştırılmasına tabi tutularak çift olan hücrelerin tek hücrelerden ayrılması sağlandı. Daha sonra ayrılan hücreler PE ve FITCH karşılaştırılmasına tabi tutularak akrozomal hasara uğramış ölü ve canlı hücreler grafik ekranında iki ayrı bölmede görüntülendi. İki hücre grubu toplanarak total akrozomal hasar oranı % olarak ifade edildi.



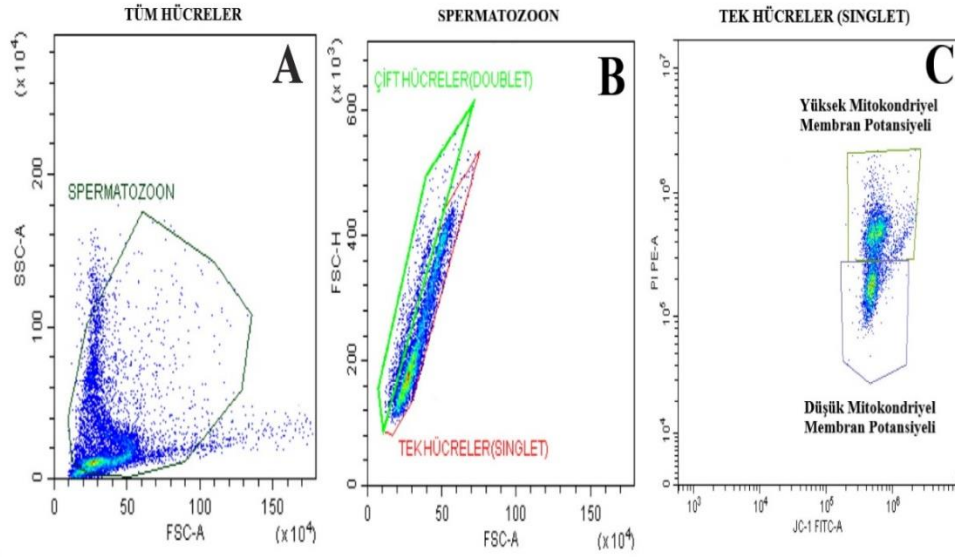
Şekil 8. Akrozomal hasarın tespitinde; (A) Akış kanalı boyunca görüntülenen spermatozoonları büyüklük ve granülaritesine göre elimine etmek için ileri (FSC) ve yana (SSC) saçılımların karşılaştırmalı sitogramı. (B) Tek (singlet) ve çift (doublet) hücrelerin birbirinden ayrılması amacıyla kullanılan ileri saçılım yüksekliği (FSC-H) ve ileri saçılım alan (FSC-A) karşılaştırma sitogramı. (C) Akrozomal hasarın tespiti amacıyla tek (singlet) hücrelerin PE-A ile FITC-A karşılaştırma sitogramı.

☆☆Ölü ve akrozomu hasarlı hücrelerin flow-sitometri grafiğinde görüntülediği alan

☆Canlı ve akrozomu hasarlı hücrelerin flow-sitometri grafiğinde görüntülediği alan

4.5.3. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Tayini

İnanç ve ark.,'larının (93) mitokondriyal membran potansiyelinin tayini için kullandıkları metodun modifiye edilmesi sonucu analiz gerçekleştirildi. Sperma örneklerinde mitokondriyal membran potansiyelinin tespiti için 1,1',3,3'-Tetraethyl-5,5',6,6'-tetrachloroimidacarbocyanine iodide (JC-1 Dye, Mitochondrial Membrane Potential Probe, (T3168, ThermoFisher Scientific, USA) kullanıldı. Ependorf tüp içerisine 987.5 µL PBS konuldu. Bu solüsyonun üzerine 10 µL sperma, 2.5 µL JC-1 boyası eklendi. Elde edilen karışım bir dakika boyunca vortekslenerek 38°C etüv içerisinde karanlık ortamda 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bu tüpler flow-sitometri cihazı kullanılarak okutuldu. İlk grafikte total spermatozoon yoğunluğu FSC ve SSC karşılaştırılması kullanılarak saptandı. Daha sonra bu karşılaştırma içerisinde süzülen hücreler FSC-Area ve FSC-Height karşılaştırılmasına tabi tutularak çift olan hücrelerin tek hücrelerden ayrılması sağlandı. Bu aşama da tamamlandıktan sonra ayrılan tek hücreler PE ve FITCH karşılaştırılmasına tabi tutularak yüksek ve düşük mitokondriyal membran potansiyeline sahip olan spermatozoonlar flow-sitometri cihazında ayrı bölmeler halinde görüntülenerek % olarak ifade edildi.



Şekil 9. Mitokondriyel membran potansiyelinin tayininde; (A) Akış kanalı boyunca görüntülenen spermatozoonları büyüklük ve granülaritesine göre elimine etmek için ileri (FSC) ve yana (SSC) saçılımların karşılaştırmalı sitogramı. (B) Tek (singlet) ve çift (doublet) hücrelerin birbirinden ayrılması amacıyla kullanılan ileri saçılım yüksekliği (FSC-H) ve ileri saçılım alan (FSC-A) karşılaştırma sitogramı. (C) Yüksek ve düşük mitokondriyel membran potansiyeline sahip spermatozoonlarının ayrıştırılıp tespiti amacıyla tek (singlet) hücrelerin PE-A ile FITC-A karşılaştırma sitogramı.

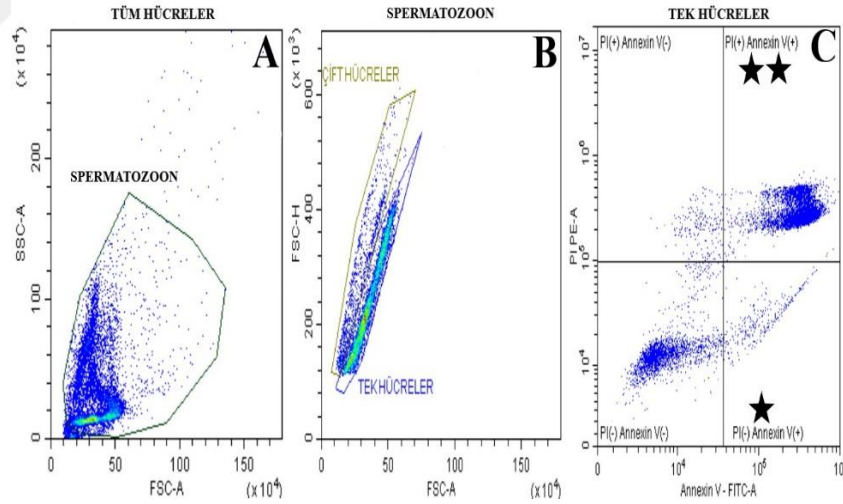
4.5.4. Apoptoz Tayini

Bu analiz için Emamverdi ve ark.,'larının (94) kullandıkları metodun modifiye edilmesi sonucunda dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde gerçekleştirildi. Bu analiz yapılırken Annexin V apoptoz tespit kiti (88-8005-72, ThermoFisher Scientific, USA) kullanıldı ve sırasıyla şu basamaklar takip edildi.

- Bir endorf tüp içerisine 950 μ L PBS + 50 μ L sperma örneği ilave edilerek karıştırıldı.
- Elde edilen bu karışımdan 250 μ L alındı ve ayrı bir endorf tüpe aktarıldı. Ardından, 400 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi ve üstteki sıvı tabaka dikkatlice uzaklaştırıldı.

- 1 mL 10X binding buffer 9 mL distile su ile sulandırılarak 1X binding buffer elde edildi.
- Ependorf tüpünde kalan pellet üzerine 500 μ L 1X binding buffer eklenerek işlem sürdürüldü.
- Bu karışımın üzerine 5'er μ L Annexin V ve PI boya ları eklendi.
- 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından flow-sitometri cihazı kullanılarak okutuldu.

Flow-sitometri okuması esnasında total spermatozoon yoğunluğu FSC ve SSC karşılaştırılması kullanılarak saptandı. Daha sonra bu karşılaştırma içerisinde süzülen hücreler FSC-Area ve FSC-Height karşılaştırılmasına tabi tutularak çift olan hücrelerin tek hücrelerden ayrılması sağlandı. Ayrılan tek hücreler PE ve FITCH karşılaştırılmasına tabi tutularak apoptotik hücre oranı % olarak ifade edildi.



Şekil 10. Apoptoz tayininde; (A) Akış kanalı boyunca görüntülenen spermatozoonları büyüklük ve granülaritesine göre elimine etmek için ileri (FSC) ve yana (SSC) saçılımların karşılaştırmalı sitogramı. (B) Tek (singlet) ve çift (doublet) hücrelerin birbirinden ayrılması amacıyla kullanılan ileri saçılım yüksekliği (FSC-H) ve ileri saçılım alan (FSC-A) karşılaştırma sitogramı. (C) Apoptotik hücre tespiti amacıyla tek (singlet) hücrelerin PE-A ile FITC-A karşılaştırma sitogramı.

☆☆Ölü ve apoptotik hücrelerin flow-sitometri grafiğinde görüntülediği alan

☆Canlı ve apoptotik hücrelerin flow-sitometri grafiğinde görüntülediği alan

4.6. Oksidatif Stres Analizleri

Laboratuvara getirilen sperma örnekleri 4 kat distile su ile sulandırılarak işleme başlandı.

4.6.1. Lipid Peroksidasyon (LPO)

Sperma örneklerinin LPO düzeyi Placer ve ark.,'larının (95) tanımladığı spektrofotometrik yöntemle göre belirlendi. Aerobik şartlarda ve pH 3.5'te spermanın 100°C'de 1 saat inkübasyonu sonucu LPO'nun sekonder ürünü olan malondialdehitin (MDA) tiyobarbitürik asit (TBA) ile meydana getirdiği pembe renkli kompleks spektrofotometre (UV-Vis Spectrophotometer UV-1700, Kyoto, Japan) cihazı ile 532 nm'de ölçüldü. MDA seviyesi nmol/ml olarak belirlendi.

4.6.2. Glutasyon (GSH)

Sperma örneklerinin GSH düzeyi Sedlak ve Lindsay'ın (96) belirttiği metoda göre tayin edildi. Örneklerle birlikte, 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit: DTNB) ile oluşturulan sarı renkli kompleksin renk şiddeti, ortamdaki GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bu nedenle, örnekler 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü ve GSH seviyesi nmol/ml cinsinden belirlendi.

4.6.3. Glutasyon-Peroksidaz (GSH-Px)

Sperma örneklerinin GSH-Px aktivitesi Lawrence ve ark.,'larının (97) tanımladığı şekilde belirlendi. Örnekler, renk ajanı olarak 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit: DTNB) solüsyonuyla karıştırıldıktan sonra oluşan sarı renkli kompleks, spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda ölçüldü. GSH-Px enzim aktivitesi IU/g protein olarak belirlendi.

4.6.4. Katalaz (CAT)

Sperma örneklerinin CAT aktivitesi Goth'un (98) tanımladığı yöntemle göre belirlendi. Sperma, bir hidrojen peroksit (H_2O_2) içeren substrat ile inkübe edildi ve ardından H_2O_2 , katalaz (CAT) aktivitesi sayesinde H_2O ve O_2 'ye parçalandı. Ortam, eklenen amonyum molibdat ile H_2O_2 ile birleşerek reaksiyonu sonlandırıldı. Oluşan renk değişimi, 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülerek katalaz (CAT) enzim aktivitesi kU/g protein olarak belirlendi.

4.7. İstatiksel Analizler

Bütün istatistiksel analizler için SPSS (versiyon 22) istatistik programı kullanıldı. p değeri 0,05'ten küçük olduğu durumlarda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Birinci aşamada aynı grup içerisinde zaman dilimleri arasındaki farklılıklar non-parametrik Friedman testi ile tespit edildi. İkili karşılaştırmalar için ise Wilcoxon testi kullanıldı. Aynı zaman dilimindeki grupların karşılaştırılması için non-parametrik Kruskal-Wallis testi kullanıldı ve ikili karşılaştırmalar için ise non-parametrik Mann-Whitney-U testi tercih edildi.

İkinci aşamada, kontrol ve L-karnosin eklenmiş deney grupları arasındaki farklılıkları belirlemek için non-parametrik Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı ve ikili karşılaştırmalar için de non-parametrik Mann-Whitney-U testi tercih edildi.

5. BULGULAR

5.1. Birinci Aşama (Kısa Süreli Saklama) Sonucu Elde Edilen Bulgular

5.1.1. Motilite ve Kinematik Değerler

Zaman dilimlerine göre farklı L-karnosin dozlarının ve kontrol grubunun total motilite değerleri Tablo 2’de sunulmuştur. Kısa süreli saklamada 5 mM L-karnosin dozunun total motilite değerlerini 72. saatte kontrol grubuna göre arttırdığı, bu artışın istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) olduğu belirlenmiştir. 100 mM L-karnosin dozunun kontrol grubuna göre total motilite değerlerini 96. saatte, 200 mM L-karnosin dozunun ise tüm zaman dilimlerinde kontrol grubuna göre total motilite değerlerini azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca istatistiki olarak bu azalmaların önemli ($p<0.001$) olduğu hesaplanmıştır.

Tüm gruplarda başlangıç değerlerine göre 24. Saatte istatistiksel anlamda önemli ($p<0.001$) bir azalma belirlenmiştir. 5, 10, 20, 50 ve 100 mM L-karnosin dozlarında ise 48. saatin sonunda 24. saate göre önemli ($p<0.001$) bir azalma görülmüştür. 20, 50, 100 ve 200 mM L-karnosin dozlarında ise 72. saatin sonunda 48. saate göre önemli ($p<0.001$) bir azalma meydana gelmiştir. 5, 100 ve 200 mM L-karnosin dozlarında ise 96. saatin sonunda 72. saate göre önemli ($p<0.001$) bir azalma belirlenmiştir.

Tablo 2. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Total Motilite (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	76.56 $\pm$ 2.51 ^{bcA}	57.53 $\pm$ 3.85 ^{bB}	50.41 $\pm$ 2.41 ^{bBC}	38.33 $\pm$ 2.99 ^{bcCD}	34.30 $\pm$ 2.24 ^{cD}
1 mM	79.70 $\pm$ 2.62 ^{bcA}	57.53 $\pm$ 4.54 ^{bB}	55.80 $\pm$ 3.45 ^{bBC}	46.70 $\pm$ 3.80 ^{cdCD}	42.80 $\pm$ 3.03 ^{cD}
5 mM	81.01 $\pm$ 2.49 ^{caA}	63.95 $\pm$ 3.85 ^{bB}	55.53 $\pm$ 2.11 ^{bCD}	54.23 $\pm$ 3.37 ^{dD}	47.30 $\pm$ 2.33 ^{cE}
10 mM	76.88 $\pm$ 1.82 ^{bcA}	66.01 $\pm$ 2.91 ^{bB}	56.35 $\pm$ 2.23 ^{bC}	48.03 $\pm$ 3.39 ^{cdC}	45.70 $\pm$ 2.86 ^{cC}
20 mM	80.38 $\pm$ 1.20 ^{bcA}	68.10 $\pm$ 3.14 ^{bB}	50.20 $\pm$ 3.91 ^{bC}	42.75 $\pm$ 3.60 ^{cdD}	42.33 $\pm$ 3.15 ^{cD}
50 mM	79.05 $\pm$ 1.63 ^{bcA}	65.98 $\pm$ 3.75 ^{bB}	50.35 $\pm$ 2.51 ^{bC}	38.88 $\pm$ 2.56 ^{cD}	32.56 $\pm$ 2.96 ^{bcD}
100 mM	67.50 $\pm$ 2.23 ^{bA}	65.25 $\pm$ 3.42 ^{bB}	39.43 $\pm$ 2.10 ^{bC}	24.41 $\pm$ 3.13 ^{bD}	18.60 $\pm$ 2.60 ^{abE}
200 mM	31.23 $\pm$ 2.10 ^{aA}	18.50 $\pm$ 3.62 ^{aB}	12.40 $\pm$ 2.71 ^{aB}	5.71 $\pm$ 1.13 ^{aC}	3.56 $\pm$ 0.55 ^{aD}

a,b,c,d: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

A,B,C,D,E: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

Zaman dilimlerine göre farklı L-karnosin dozlarının ve kontrol grubunun progresif motilite değerleri Tablo 3’de sunulmuştur. Tabloda görüldüğü gibi 10 mM L-karnosinin 24. saatte kontrol grubuna göre progresif motiliteyi istatistiki olarak önemli (**p<0.001**) ölçüde artırdığı, diğer zaman dilimlerinde istatistiki olarak bir farkın olmadığı belirlendi. Kontrol grubuna göre 100 mM L-karnosin dozunun 72. saatte, 200 mM L-karnosin dozunun da tüm zaman dilimlerinde progresif motiliteyi istatistiki olarak önemli (**p<0.001**) derecede azalttığını tespit edildi.

Progresif motilite değerlerinde 10 mM’lık grup hariç diğer tüm gruplarda 24. saatte istatikselsel anlamda önemli (**p<0.001**) bir azalma belirlenmiştir. Kontrol, 1 ve 200 mM’lık gruplar hariç diğer tüm gruplarda 48. saatte 24. saate göre istatikselsel olarak önemli (**p<0.001**) bir azalma belirlenmiştir. Sadece 100 mM’lık grupta 72. saatte 48. saate göre istatikselsel olarak önemli (**p<0.001**) bir azalma gözlenmiştir. 50 ve 100 mM’lık gruplarda 96. saatte 72. saate göre istatikselsel olarak önemli (**p<0.001**) bir azalma tespit edilmiştir.

Tablo 3. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Progresif Motilite (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	37.41 $\pm$ 3.86 ^{bA}	20.46 $\pm$ 2.48 ^{bcB}	18.83 $\pm$ 2.29 ^{bB}	14.96 $\pm$ 1.45 ^{cdB}	14.43 $\pm$ 3.14 ^{bcB}
1 mM	35.10 $\pm$ 2.97 ^{bA}	25.33 $\pm$ 2.11 ^{bcdB}	21.86 $\pm$ 2.70 ^{bBC}	16.75 $\pm$ 0.93 ^{cdBC}	13.43 $\pm$ 2.08 ^{bcC}
5 mM	36.83 $\pm$ 1.88 ^{bA}	27.75 $\pm$ 1.13 ^{cdB}	22.48 $\pm$ 2.75 ^{bBC}	19.80 $\pm$ 1.71 ^{dC}	17.03 $\pm$ 2.96 ^{cC}
10 mM	33.57 $\pm$ 1.84 ^{bA}	30.23 $\pm$ 2.74 ^{dA}	20.31 $\pm$ 2.92 ^{bB}	18.96 $\pm$ 1.77 ^{dB}	18.26 $\pm$ 3.03 ^{cB}
20 mM	36.16 $\pm$ 1.81 ^{bA}	26.98 $\pm$ 1.74 ^{cdB}	19.98 $\pm$ 3.17 ^{bBD}	14.26 $\pm$ 1.79 ^{cdCD}	14.23 $\pm$ 3.21 ^{bcD}
50 mM	31.06 $\pm$ 3.46 ^{bA}	22.40 $\pm$ 2.43 ^{bcdB}	13.25 $\pm$ 1.80 ^{abC}	9.86 $\pm$ 1.02 ^{bcC}	7.41 $\pm$ 1.58 ^{abcD}
100 mM	28.56 $\pm$ 2.48 ^{abA}	17.83 $\pm$ 1.37 ^{bB}	14.90 $\pm$ 1.93 ^{abB}	6.35 $\pm$ 1.18 ^{abC}	4.66 $\pm$ 1.30 ^{abD}
200 mM	10.60 $\pm$ 2.15 ^{aA}	4.80 $\pm$ 1.24 ^{aB}	4.76 $\pm$ 2.53 ^{aB}	1.25 $\pm$ 0.35 ^{aBC}	0.81 $\pm$ 0.17 ^{aC}

a,b,c,d: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

A,B,C,D: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

Grupların zaman dilimlerine göre hızlı hareket eden spermatozoon oranları Tablo 4’de verilmiştir. Tablo 4 incelendiğinde 100 mM L-karnosin dozunun hızlı hareket eden spermatozoon oranını kontrol grubuna göre 24. saat hariç diğer zaman dilimlerinde, 200 mM L-karnosin dozunun ise tüm zaman dilimlerinde kontrol grubuna göre istatistiki olarak önemli (**p<0.001**) oranda azalttığı belirlenmiştir. Ancak 1 mM ve 10 mM L-karnosin dozunun 0. saat hariç diğer zaman dilimlerinde, 5 mM L-karnosin dozunun tüm zaman dilimlerinde, 20 mM L-karnosin dozunun ise 0, 24 ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre hızlı hareket eden spermatozoon oranını sayısal olarak arttırdığı belirlenmiştir. Fakat bu artışların istatistiki olarak önemli olmadığı görülmüştür.

Grupların zaman dilimlerine göre orta hızda hareket eden spermatozoon oranları Tablo 5’de sunulmuştur. Tabloda görüldüğü gibi 0, 24 ve 48. saat diliminde 100 mM L-karnosin dozunun kontrol grubuna göre orta hızda hareket eden spermatozoon oranını değerini istatistiki olarak önemli oranda artırdığı belirlenmiştir. 96. saat hariç diğer tüm zaman dilimlerinde de 50 mM L-karnosin dozunun kontrol grubuna göre orta hızda hareket eden spermatozoon oranını artırdığı görülmüştür. Ancak 96. saat diliminde 200 mM L-karnosin dozunun kontrol grubuna göre orta hızda hareket eden spermatozoon oranını önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir (**p<0.001**).

Grupların zaman dilimlerine göre yavaş hızda hareket eden spermatozoon oranları Tablo 6’da verilmiştir. Bu verilere göre yavaş hızda hareket eden spermatozoon oranları açısından tüm zaman dilimlerinde kontrol ile deney grupları arasında istatistiksel bir farklılık belirlenememiştir.

Tablo 4. Kontrol ve L-karnosin içeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Hızlı Hareket Eden Spermatozoon (Ortalama $\pm$ SEM) Oranları

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	64.81 $\pm$ 3.53 ^{cA}	40.25 $\pm$ 3.65 ^{bcB}	34.43 $\pm$ 4.31 ^{cBC}	25.70 $\pm$ 2.79 ^{bcC}	26.40 $\pm$ 4.64 ^{cC}
1 mM	64.65 $\pm$ 3.71 ^{cA}	46.01 $\pm$ 4.82 ^{bcB}	39.33 $\pm$ 3.43 ^{cB}	31.88 $\pm$ 3.36 ^{bcC}	28.41 $\pm$ 4.19 ^{cBC}
5 mM	68.03 $\pm$ 3.67 ^{cA}	51.10 $\pm$ 3.67 ^{cB}	39.78 $\pm$ 3.94 ^{cC}	36.63 $\pm$ 2.37 ^{cC}	31.76 $\pm$ 4.49 ^{cC}
10 mM	62.53 $\pm$ 1.86 ^{cA}	47.13 $\pm$ 3.13 ^{cB}	38.33 $\pm$ 4.62 ^{cC}	32.88 $\pm$ 2.90 ^{bcC}	30.78 $\pm$ 2.94 ^{cC}
20 mM	65.81 $\pm$ 2.34 ^{cA}	46.43 $\pm$ 2.36 ^{bcB}	33.76 $\pm$ 3.45 ^{cC}	27.36 $\pm$ 2.90 ^{bcD}	26.15 $\pm$ 3.96 ^{cCD}
50 mM	57.96 $\pm$ 4.84 ^{bcA}	44.75 $\pm$ 4.38 ^{bcB}	29.06 $\pm$ 3.75 ^{bcC}	22.15 $\pm$ 1.77 ^{bcC}	17.01 $\pm$ 2.55 ^{bcD}
100 mM	44.08 $\pm$ 3.76 ^{bA}	31.51 $\pm$ 2.39 ^{bB}	16.48 $\pm$ 2.71 ^{abC}	9.96 $\pm$ 1.57 ^{aD}	7.75 $\pm$ 1.72 ^{abD}
200 mM	12.45 $\pm$ 2.26 ^{aA}	4.50 $\pm$ 1.23 ^{aB}	2.70 $\pm$ 0.65 ^{aBD}	0.91 $\pm$ 0.29 ^{aC}	1.13 $\pm$ 0.41 ^{aCD}

a,b,c: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

A,B,C,D: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

Tablo 5. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Orta Hızda Hareket Eden Spermatozoon (Ortalama $\pm$ SEM) Oranları

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	6.83 $\pm$ 0.84 ^{aAB}	7.93 $\pm$ 0.91 ^{aAB}	7.01 $\pm$ 0.63 ^{abAB}	5.46 $\pm$ 1.08 ^{abA}	7.40 $\pm$ 0.56 ^{bB}
1 mM	9.16 $\pm$ 1.03 ^{abAB}	8.61 $\pm$ 0.59 ^{abA}	8.83 $\pm$ 0.67 ^{bcdA}	7.66 $\pm$ 0.82 ^{bcAB}	6.33 $\pm$ 0.78 ^{bB}
5 mM	7.51 $\pm$ 1.60 ^{abA}	6.90 $\pm$ 0.94 ^{aA}	7.56 $\pm$ 0.21 ^{abA}	8.18 $\pm$ 0.52 ^{bcA}	7.93 $\pm$ 0.64 ^{bA}
10 mM	8.01 $\pm$ 1.38 ^{abA}	7.93 $\pm$ 0.58 ^{aA}	8.61 $\pm$ 0.57 ^{bcdA}	7.55 $\pm$ 0.77 ^{bcA}	7.60 $\pm$ 0.73 ^{bA}
20 mM	8.63 $\pm$ 1.33 ^{abA}	9.75 $\pm$ 0.60 ^{abcA}	8.30 $\pm$ 0.34 ^{bcA}	8.08 $\pm$ 0.80 ^{bcA}	8.20 $\pm$ 0.81 ^{bA}
50 mM	14.61 $\pm$ 3.08 ^{bAB}	13.58 $\pm$ 1.56 ^{cA}	11.78 $\pm$ 1.19 ^{dAB}	9.06 $\pm$ 0.56 ^{dB}	7.48 $\pm$ 1.22 ^{bB}
100 mM	14.83 $\pm$ 1.43 ^{bA}	13.01 $\pm$ 1.36 ^{bcAB}	11.16 $\pm$ 0.99 ^{cdB}	6.23 $\pm$ 1.02 ^{bcCD}	4.83 $\pm$ 0.97 ^{bD}
200 mM	11.48 $\pm$ 1.76 ^{abA}	6.35 $\pm$ 1.17 ^{aA}	4.30 $\pm$ 0.85 ^{aB}	2.36 $\pm$ 0.54 ^{aC}	0.80 $\pm$ 0.36 ^{aD}

a,b,c,d: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

A,B,C,D: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

Tablo 6. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Yavaş Hızda Hareket Eden Spermatozoon (Ortalama $\pm$ SEM) Oranları

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	4.85 $\pm$ 0.53 ^A	9.83 $\pm$ 1.57 ^B	8.98 $\pm$ 1.19 ^B	6.78 $\pm$ 0.69 ^{abAB}	7.18 $\pm$ 1.50 ^{AB}
1 mM	5.86 $\pm$ 0.88	9.30 $\pm$ 1.85	7.63 $\pm$ 0.88	7.17 $\pm$ 1.32 ^{ab}	8.05 $\pm$ 2.12
5 mM	5.45 $\pm$ 1.05	8.00 $\pm$ 1.84	8.03 $\pm$ 1.33	9.43 $\pm$ 2.06 ^b	7.58 $\pm$ 0.63
10 mM	6.33 $\pm$ 0.55	9.55 $\pm$ 2.07	9.38 $\pm$ 1.47	7.60 $\pm$ 0.47 ^{ab}	7.33 $\pm$ 0.87
20 mM	5.93 $\pm$ 1.07	9.81 $\pm$ 1.39	8.11 $\pm$ 0.87	7.21 $\pm$ 0.74 ^{ab}	7.96 $\pm$ 1.98
50 mM	6.46 $\pm$ 1.26	7.26 $\pm$ 0.83	9.48 $\pm$ 1.35	7.70 $\pm$ 1.09 ^b	8.05 $\pm$ 2.55
100 mM	8.55 $\pm$ 1.12	7.96 $\pm$ 0.86	11.75 $\pm$ 2.57	7.20 $\pm$ 1.43 ^{ab}	5.86 $\pm$ 1.87
200 mM	7.31 $\pm$ 1.34 ^A	7.66 $\pm$ 1.86 ^A	5.38 $\pm$ 1.57 ^A	2.41 $\pm$ 0.54 ^{ab}	1.61 $\pm$ 0.35 ^B

a,b: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.05**).

A,B: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.05**).

Zaman dilimlerine göre kontrol ve L-karnosin dozlarına ait VCL değerleri Tablo 7’de sunulmuştur. 50 mM L-karnosin grubunun 0 ve 72. saatlerde kontrol grubundan istatistiki ($p<0.001$) olarak önemli derecede düşük VCL düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre 100 ve 200 mM L-karnosin dozunun 96. saat hariç diğer tüm zaman dilimlerinde VCL değerini istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) derecede azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca 200 mM L-karnosin dozunun kontrol grubuna göre tüm zaman dilimlerinde VCL değerini istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) derecede azalttığı tespit edilmiştir.

Zaman dilimlerine göre kontrol ve L-karnosin dozlarının VSL değerleri tablo 8’de verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi 1, 5, 10 ve 20 mM L-karnosin dozlarının VSL değerlerinin kontrol grubuna göre 0. saat hariç diğer tüm zaman dilimlerinde sayısal bir artış sağladığı görülmüş ve bu artışın istatistiki olarak önemli olmadığı belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre 50 mM L-karnosin dozu 0. saatte VSL değerini önemli ($p<0.001$) derece azaltırken, 100 mM karnosin dozunun 24. saat hariç diğer tüm zaman dilimlerinde VSL değerinde önemli ($p<0.001$) derece azalttığı tespit edilmiştir. Öte yandan 200 mM L-karnosin dozunun kontrole göre tüm zaman dilimlerinde VSL değerini önemli ($p<0.001$) düzeyde düşürmüştür.

Zaman dilimlerine göre kontrol ve L-karnosin dozlarının VAP değerleri Tablo 9’da verilmiştir. Tablo incelendiğinde 1, 5, 10 ve 20 mM L-karnosin dozlarının kontrol grubuna göre VAP değerlerini 0. ve 72. saat hariç diğer zaman dilimlerinde sayısal olarak arttırdığı belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre 50 (24. saat hariç) ve 100 mM L-karnosin dozlarının tüm zaman dilimlerinde VAP değerini sayısal olarak azalttığı tespit edilmiştir. Bu artış ve azalışların istatistiki olarak

önemli olmadığı belirlenmiştir. 200 mM L-karnosin dozunun ise tüm zaman dilimlerinde kontrol grubuna göre VAP değerini istatistiki olarak önemli (**p<0.001**) ölçüde azalttığı görülmüştür.



Tablo 7. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki VCL (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	137.36 $\pm$ 4.73 ^{dA}	118.31 $\pm$ 5.37 ^{cdB}	110.88 $\pm$ 6.32 ^{cdB}	109.70 $\pm$ 6.03 ^{dB}	88.11 $\pm$ 16.64 ^{abB}
1 mM	129.33 $\pm$ 6.06 ^{cdA}	121.46 $\pm$ 6.65 ^{cdA}	116.73 $\pm$ 5.16 ^{dA}	115.76 $\pm$ 2.65 ^{dA}	109.33 $\pm$ 8.32 ^{bA}
5 mM	138.01 $\pm$ 6.58 ^{dA}	132.43 $\pm$ 2.64 ^{dA}	117.46 $\pm$ 3.64 ^{dB}	113.66 $\pm$ 1.80 ^{dB}	111.61 $\pm$ 7.12 ^{bB}
10 mM	127.86 $\pm$ 5.97 ^{cdAB}	124.66 $\pm$ 5.69 ^{dA}	110.80 $\pm$ 4.14 ^{cdBC}	114.53 $\pm$ 4.72 ^{dABC}	108.41 $\pm$ 4.44 ^{bC}
20 mM	127.18 $\pm$ 5.56 ^{cdA}	115.68 $\pm$ 3.03 ^{cdB}	108.80 $\pm$ 4.79 ^{cdBC}	100.55 $\pm$ 3.55 ^{cdC}	102.48 $\pm$ 5.12 ^{bC}
50 mM	105.86 $\pm$ 6.61 ^{bcA}	103.76 $\pm$ 5.63 ^{bcAB}	91.81 $\pm$ 4.73 ^{bcABC}	92.13 $\pm$ 3.97 ^{bcB}	86.58 $\pm$ 1.58 ^{abC}
100 mM	94.78 $\pm$ 1.27 ^{bA}	93.51 $\pm$ 2.33 ^{bA}	75.33 $\pm$ 3.00 ^{abB}	76.31 $\pm$ 2.66 ^{bbB}	75.73 $\pm$ 5.97 ^{abB}
200 mM	71.20 $\pm$ 3.65 ^{aA}	60.08 $\pm$ 3.03 ^{aB}	59.05 $\pm$ 3.39 ^{aBC}	52.15 $\pm$ 3.02 ^{aC}	51.56 $\pm$ 7.57 ^{aCD}

a,b,c,d: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

A,B,C,D: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

Tablo 8. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki VSL (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	59.67 $\pm$ 2.28 ^{ca}	39.58 $\pm$ 1.87 ^{bcB}	38.12 $\pm$ 1.75 ^{bcB}	43.72 $\pm$ 1.90 ^{cdC}	34.20 $\pm$ 1.90 ^{bcC}
1 mM	54.17 $\pm$ 0.95 ^{bcA}	46.40 $\pm$ 1.43 ^{cdB}	43.40 $\pm$ 1.79 ^{cb}	42.25 $\pm$ 2.94 ^{dB}	34.25 $\pm$ 2.59 ^{bcC}
5 mM	58.23 $\pm$ 3.38 ^{ca}	51.97 $\pm$ 1.74 ^{dAB}	45.85 $\pm$ 3.34 ^{cBC}	41.40 $\pm$ 1.28 ^{cdC}	38.23 $\pm$ 2.37 ^{cC}
10 mM	57.73 $\pm$ 3.31 ^{ca}	52.37 $\pm$ 1.47 ^{dA}	39.20 $\pm$ 2.57 ^{cb}	46.68 $\pm$ 1.56 ^{cdB}	40.15 $\pm$ 2.51 ^{cb}
20 mM	53.30 $\pm$ 1.34 ^{bcA}	48.83 $\pm$ 2.65 ^{dA}	43.18 $\pm$ 2.37 ^{cb}	34.67 $\pm$ 1.59 ^{bcC}	36.80 $\pm$ 1.53 ^{bcC}
50 mM	45.63 $\pm$ 2.69 ^{ba}	35.87 $\pm$ 3.71 ^{bcB}	28.65 $\pm$ 1.79 ^{abBC}	27.55 $\pm$ 1.53 ^{bcC}	22.57 $\pm$ 1.75 ^{abC}
100 mM	41.03 $\pm$ 2.04 ^{ba}	31.47 $\pm$ 2.41 ^{bb}	26.83 $\pm$ 1.96 ^{ab}	23.92 $\pm$ 1.17 ^{bc}	20.78 $\pm$ 1.43 ^{aC}
200 mM	20.30 $\pm$ 4.77 ^{aA}	20.67 $\pm$ 1.32 ^{aB}	20.90 $\pm$ 0.74 ^{aB}	16.62 $\pm$ 1.68 ^{aB}	15.37 $\pm$ 1.52 ^{aB}

a,b,c,d: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

A,B,C: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

Tablo 9. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki VAP (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	76.70 $\pm$ 5.30 ^{bA}	52.71 $\pm$ 3.54 ^{bB}	50.45 $\pm$ 3.36 ^{bB}	57.41 $\pm$ 8.95 ^{bB}	46.56 $\pm$ 4.08 ^{bB}
1 mM	71.81 $\pm$ 6.95 ^{bA}	60.33 $\pm$ 4.72 ^{bAB}	57.23 $\pm$ 5.48 ^{bAB}	49.98 $\pm$ 7.35 ^{bAB}	47.86 $\pm$ 4.11 ^{bB}
5 mM	75.85 $\pm$ 6.28 ^{bA}	65.80 $\pm$ 3.25 ^{bAB}	60.03 $\pm$ 6.02 ^{bABC}	54.78 $\pm$ 3.92 ^{bBC}	51.38 $\pm$ 5.25 ^{bC}
10 mM	73.01 $\pm$ 7.80 ^{bA}	65.88 $\pm$ 5.04 ^{bA}	53.28 $\pm$ 2.63 ^{bB}	59.70 $\pm$ 7.85 ^{bAB}	53.60 $\pm$ 5.03 ^{bB}
20 mM	70.80 $\pm$ 4.47 ^{bA}	63.81 $\pm$ 3.98 ^{bA}	61.05 $\pm$ 5.08 ^{bAB}	51.65 $\pm$ 3.65 ^{bB}	52.08 $\pm$ 5.56 ^{bB}
50 mM	66.60 $\pm$ 8.53 ^{bA}	56.73 $\pm$ 5.84 ^{bAB}	49.56 $\pm$ 4.47 ^{bABC}	48.80 $\pm$ 4.97 ^{abBC}	41.33 $\pm$ 1.61 ^{bC}
100 mM	56.91 $\pm$ 2.24 ^{abA}	50.76 $\pm$ 3.56 ^{bAB}	41.26 $\pm$ 5.04 ^{abB}	40.11 $\pm$ 1.69 ^{abB}	35.86 $\pm$ 2.74 ^{abB}
200 mM	33.16 $\pm$ 1.62 ^{aA}	27.58 $\pm$ 2.28 ^{aAB}	29.00 $\pm$ 2.95 ^{aAB}	24.13 $\pm$ 2.27 ^{aB}	22.15 $\pm$ 3.11 ^{aB}

a,b: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

A,B,C: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

Zaman dilimlerine göre kontrol ve L-karnosin dozlarının STR değerleri Tablo 10’da verilmiştir. Tablo da görüldüğü gibi 50 mM L-karnosin dozunun kontrol grubuna oranla STR değerlerinde (0. saat hariç) istatistiki olarak önemli derecede bir azalmaya neden olduğ  belirlenmiştir (**p<0.001**). 100 mM L-karnosin dozunun sadece 24. saatte kontrol grubuna göre istatistiki olarak bir azalma meydana getirdiğ  tespit edilmiştir (**p<0.001**).

Zaman dilimlerine göre kontrol ve L-karnosin dozlarının WOB değerleri Tablo 11’de sunulmuştur. Tabloda görüldüğü üzere tüm zaman dilimlerinde kontrol grubu ile L-karnosin dozları arasında WOB değerleri açısından herhangi bir farklılık tespit edilememiştir.

Zaman dilimlerine göre kontrol ve L-karnosin dozlarının LIN değerleri Tablo 12’de verilmiştir. Tabloya bakıldığında gruplar arasında tüm zaman dilimlerinde herhangi bir farklılık tespit edilememiştir.

Tablo 10. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki STR (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	77.26 $\pm$ 2.60	74.55 $\pm$ 1.95 ^b	75.55 $\pm$ 0.71 ^b	74.18 $\pm$ 2.71 ^b	72.68 $\pm$ 2.80 ^b
1 mM	74.56 $\pm$ 2.57	76.58 $\pm$ 1.97 ^b	74.68 $\pm$ 2.81 ^b	74.51 $\pm$ 2.96 ^b	71.03 $\pm$ 2.98 ^b
5 mM	76.38 $\pm$ 1.93	78.45 $\pm$ 2.38 ^b	75.73 $\pm$ 2.38 ^b	74.68 $\pm$ 2.89 ^b	72.91 $\pm$ 2.51 ^b
10 mM	77.61 $\pm$ 3.93	79.17 $\pm$ 0.99 ^b	73.13 $\pm$ 2.52 ^b	75.90 $\pm$ 3.92 ^b	73.26 $\pm$ 4.13 ^b
20 mM	74.98 $\pm$ 2.00 ^A	76.26 $\pm$ 1.34 ^{bA}	73.80 $\pm$ 3.31 ^{bA}	66.75 $\pm$ 2.09 ^{abB}	69.21 $\pm$ 3.84 ^{abB}
50 mM	69.13 $\pm$ 2.56 ^A	62.83 $\pm$ 1.09 ^{aAB}	58.10 $\pm$ 2.01 ^{aBC}	57.16 $\pm$ 2.13 ^{aC}	54.31 $\pm$ 3.20 ^{aC}
100 mM	72.43 $\pm$ 1.95 ^A	63.31 $\pm$ 2.39 ^{aB}	65.03 $\pm$ 1.31 ^{abB}	59.63 $\pm$ 2.05 ^{abB}	58.36 $\pm$ 2.22 ^{abB}
200 mM	71.26 $\pm$ 3.01	74.75 $\pm$ 1.81 ^b	73.60 $\pm$ 4.50 ^b	69.01 $\pm$ 6.55 ^{ab}	69.55 $\pm$ 4.53 ^b

a,b: Aynı sütun içerisinde değişik harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0.001$).

A,B,C: Aynı satır içerisinde değişik harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0.001$).

Tablo 11. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki WOB (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	55.61 $\pm$ 2.46 ^{abA}	44.46 $\pm$ 1.78 ^B	45.48 $\pm$ 1.44 ^B	51.13 $\pm$ 5.05 ^{AB}	44.35 $\pm$ 1.48 ^B
1 mM	55.01 $\pm$ 3.02 ^{abA}	49.63 $\pm$ 2.56 ^{AB}	48.63 $\pm$ 2.66 ^{AB}	51.80 $\pm$ 4.55 ^{AB}	43.83 $\pm$ 1.83 ^{bB}
5 mM	54.73 $\pm$ 2.83 ^{abA}	49.65 $\pm$ 3.26 ^{AB}	50.91 $\pm$ 4.17 ^{AB}	48.28 $\pm$ 3.68 ^{AB}	45.86 $\pm$ 2.17 ^B
10 mM	56.46 $\pm$ 3.44 ^{ab}	52.78 $\pm$ 2.66	48.23 $\pm$ 2.33	51.33 $\pm$ 4.89	49.11 $\pm$ 3.01
20 mM	55.68 $\pm$ 2.36 ^{abA}	55.03 $\pm$ 2.52 ^{AB}	52.75 $\pm$ 2.73 ^{AB}	51.31 $\pm$ 2.71 ^B	50.25 $\pm$ 2.73 ^{AB}
50 mM	61.81 $\pm$ 4.24 ^{bA}	54.15 $\pm$ 2.77 ^{AB}	53.58 $\pm$ 3.06 ^A	52.41 $\pm$ 3.45 ^{BC}	47.83 $\pm$ 2.18 ^C
100 mM	60.06 $\pm$ 2.37 ^{bA}	54.00 $\pm$ 5.51 ^{AB}	54.15 $\pm$ 5.07 ^{AB}	53.00 $\pm$ 3.32 ^B	48.10 $\pm$ 3.82 ^B
200 mM	46.60 $\pm$ 2.18 ^a	46.31 $\pm$ 5.90	50.18 $\pm$ 6.47	46.18 $\pm$ 2.71	42.95 $\pm$ 1.91

a,b: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$).

A,B,C: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$).

Tablo 12. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki LIN (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	43.23 $\pm$ 3.12 ^A	33.26 $\pm$ 2.13 ^B	34.30 $\pm$ 1.27 ^B	38.68 $\pm$ 2.17 ^B	31.75 $\pm$ 2.10 ^B
1 mM	41.31 $\pm$ 3.52 ^A	38.21 $\pm$ 2.84 ^{AB}	36.68 $\pm$ 3.45 ^{AB}	39.95 $\pm$ 2.03 ^{AB}	31.33 $\pm$ 2.45 ^B
5 mM	42.06 $\pm$ 3.13 ^A	39.51 $\pm$ 3.62 ^{AB}	38.75 $\pm$ 3.74 ^{AB}	36.55 $\pm$ 2.17 ^{AB}	33.68 $\pm$ 2.80 ^B
10 mM	44.26 $\pm$ 3.48 ^A	41.86 $\pm$ 2.46 ^A	35.48 $\pm$ 2.66 ^B	39.85 $\pm$ 2.87 ^B	36.41 $\pm$ 2.17 ^B
20 mM	41.81 $\pm$ 2.28	40.01 $\pm$ 2.30	39.16 $\pm$ 3.35	34.35 $\pm$ 3.26	35.13 $\pm$ 3.78
50 mM	42.33 $\pm$ 2.23 ^A	34.08 $\pm$ 2.12 ^B	31.18 $\pm$ 2.23 ^{BC}	29.71 $\pm$ 1.41 ^{BC}	26.15 $\pm$ 2.22 ^C
100 mM	43.30 $\pm$ 0.67 ^A	33.55 $\pm$ 2.16 ^B	35.16 $\pm$ 3.18 ^{BC}	31.51 $\pm$ 1.86 ^{BC}	28.11 $\pm$ 2.57 ^C
200 mM	33.36 $\pm$ 2.48	32.90 $\pm$ 2.81	36.21 $\pm$ 2.21	31.73 $\pm$ 3.20	30.15 $\pm$ 2.96

A,B,C: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

Zaman dilimlerine göre kontrol ve L-karnosin dozlarının ALH değerleri Tablo 13’de verilmiştir. Tüm zaman dilimlerinde 50 (96.saat hariç), 100 ve 200 mM L-karnosin dozlarının kontrol grubuna oranla ALH değerini önemli oranda azalttığı, bu azalışın istatistiki olarak önemli (**p<0.001**) olduğu belirlenmiştir.

Zaman dilimlerine göre kontrol ve L-karnosin dozlarının BCF değerleri Tablo 14’de sunulmuştur. Bu verilere göre 0, 24 ve 48. saatlerde gruplar arasında BCF değerleri açısından istatistiksel bir farklılık tespit edilememiştir. Ancak 72. ve 96. saatlerde 200 mM L-karnosinin kontrol grubuna oranla BCF değerini istatistiki olarak önemli (**p<0.001**) lde azalttığı belirlenmiştir.

Tablo 13. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki ALH (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	4.98 $\pm$ 0.14 ^{bAB}	5.35 $\pm$ 0.17 ^{cA}	5.05 $\pm$ 0.16 ^{cAB}	4.71 $\pm$ 0.10 ^{deB}	4.58 $\pm$ 0.34 ^{cdAB}
1 mM	4.83 $\pm$ 0.10 ^b	5.13 $\pm$ 0.14 ^c	4.76 $\pm$ 0.07 ^c	5.06 $\pm$ 0.19 ^e	4.90 $\pm$ 0.23 ^d
5 mM	5.05 $\pm$ 0.23 ^b	5.30 $\pm$ 0.20 ^c	5.00 $\pm$ 0.19 ^c	4.88 $\pm$ 0.12 ^e	4.88 $\pm$ 0.18 ^d
10 mM	4.68 $\pm$ 0.17 ^{bAB}	5.05 $\pm$ 0.08 ^{cA}	4.83 $\pm$ 0.17 ^{cA}	4.68 $\pm$ 0.14 ^{deAB}	4.45 $\pm$ 0.18 ^{cdB}
20 mM	4.60 $\pm$ 0.25 ^{bAB}	4.68 $\pm$ 0.13 ^{cA}	4.46 $\pm$ 0.16 ^{cAB}	3.98 $\pm$ 0.28 ^{cdB}	4.28 $\pm$ 0.20 ^{cdAB}
50 mM	3.66 $\pm$ 0.13 ^{aAB}	3.98 $\pm$ 0.15 ^{bA}	3.48 $\pm$ 0.09 ^{bB}	3.51 $\pm$ 0.16 ^{bcAB}	3.55 $\pm$ 0.14 ^{bcB}
100 mM	3.76 $\pm$ 0.17 ^{aA}	3.46 $\pm$ 0.14 ^{bAB}	3.16 $\pm$ 0.09 ^{abAB}	2.88 $\pm$ 0.20 ^{abB}	3.01 $\pm$ 0.29 ^{bbB}
200 mM	3.15 $\pm$ 0.06 ^{aA}	4.45 $\pm$ 0.15 ^{aB}	2.76 $\pm$ 0.22 ^{aAB}	1.51 $\pm$ 0.24 ^{aC}	1.46 $\pm$ 0.37 ^{aC}

a,b,c,d,e: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

A,B,C: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

Tablo 14. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki BCF (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	9.51 $\pm$ 0.57	8.23 $\pm$ 0.51	8.21 $\pm$ 0.42	8.30 $\pm$ 0.24 ^{bc}	8.46 $\pm$ 0.41 ^b
1 mM	9.53 $\pm$ 0.51	8.83 $\pm$ 0.33	8.25 $\pm$ 0.34	8.30 $\pm$ 0.34 ^{bc}	8.36 $\pm$ 0.43 ^b
5 mM	9.52 $\pm$ 0.55 ^A	8.58 $\pm$ 0.41 ^{AB}	8.53 $\pm$ 0.34 ^{AB}	8.80 $\pm$ 0.11 ^{abB}	8.31 $\pm$ 0.30 ^{bAB}
10 mM	10.11 $\pm$ 0.48 ^A	8.76 $\pm$ 0.27 ^{AB}	8.40 $\pm$ 0.29 ^B	8.76 $\pm$ 0.26 ^{bcB}	9.21 $\pm$ 0.33 ^{bAB}
20 mM	10.05 $\pm$ 0.64	9.08 $\pm$ 0.41	9.40 $\pm$ 0.31	8.60 $\pm$ 0.16 ^{bc}	9.60 $\pm$ 0.44 ^b
50 mM	10.43 $\pm$ 0.44	9.70 $\pm$ 0.21	9.60 $\pm$ 0.61	9.38 $\pm$ 0.43 ^{bc}	9.11 $\pm$ 1.00 ^b
100 mM	10.18 $\pm$ 0.52	9.78 $\pm$ 0.31	9.53 $\pm$ 0.40	10.25 $\pm$ 0.44 ^c	9.91 $\pm$ 0.75 ^b
200 mM	10.15 $\pm$ 0.12 ^A	9.03 $\pm$ 0.82 ^A	9.98 $\pm$ 0.68 ^A	5.86 $\pm$ 1.15 ^{aB}	4.76 $\pm$ 1.01 ^{aB}

a,b,c: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

A,B: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p< 0.05**).

5.1.2. Membran Bütünlüğü (HOST) Değerleri

Zaman dilimlerine göre kontrol ve L-karnosin dozlarının HOST sonuçları Tablo 15’de sunulmuştur. Tabloda görüldüğü gibi 1, 5, 10 ve 20 mM L-karnosin dozlarının kontrol grubuna göre sayısal bir artış oluşturduğu belirlenmiştir. 100 mM L-karnosin dozunun 0. saatte, 200 mM L-karnosin dozunun ise tüm zaman dilimlerinde kontrol grubuna göre HOST değerlerini istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) derecede düşürdüğü tespit edilmiştir.

5.1.3. pH Değerleri

Zaman dilimlerine göre kontrol ve L-karnosin dozlarının pH değerleri Tablo 16’da verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi kontrol grubuna göre 20 mM L-karnosin dozunun 24, 48 ve 96. saatlerde, 50, 100 ve 200 mM L-karnosin dozlarının da tüm zaman dilimlerinde pH’yı önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir ($p<0.001$).

5.1.4. Anormal Spermatozoon Oranları

Zaman dilimlerine göre kontrol ve L-karnosin dozlarının anormal spermatozoon oranları Tablo 17’de sunulmuştur. Tabloya bakıldığında tüm saat dilimlerinde 200 mM L-karnosin dozu hariç diğer tüm dozların (100 mM, 96. saat hariç) kontrol grubuna oranla anormal spermatozoon oranını istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) oranda azalttığı belirlenmiştir.

Tablo 15. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki HOST (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	56.17 $\pm$ 4.65 ^{ba}	38.33 $\pm$ 2.56 ^{bcB}	33.33 $\pm$ 3.16 ^{bcBC}	31.83 $\pm$ 2.62 ^{bcBC}	28.50 $\pm$ 2.43 ^{bcC}
1 mM	62.17 $\pm$ 3.20 ^{ba}	47.67 $\pm$ 2.51 ^{cB}	43.17 $\pm$ 2.02 ^{cBC}	35.83 $\pm$ 3.63 ^{cCD}	34.83 $\pm$ 2.33 ^{cD}
5 mM	67.17 $\pm$ 2.96 ^{ba}	48.17 $\pm$ 3.27 ^{cBC}	45.83 $\pm$ 3.26 ^{cB}	37.00 $\pm$ 3.30 ^{cCD}	33.83 $\pm$ 2.86 ^{cD}
10 mM	59.17 $\pm$ 2.19 ^{ba}	46.00 $\pm$ 1.98 ^{cB}	40.00 $\pm$ 3.08 ^{cBC}	38.17 $\pm$ 1.77 ^{cC}	35.50 $\pm$ 2.94 ^{cC}
20 mM	58.00 $\pm$ 3.65 ^{ba}	49.83 $\pm$ 3.56 ^{cAB}	43.00 $\pm$ 3.99 ^{cB}	42.33 $\pm$ 2.91 ^{cB}	36.00 $\pm$ 2.98 ^{cB}
50 mM	56.83 $\pm$ 4.99 ^{ba}	40.67 $\pm$ 2.80 ^{bcB}	32.67 $\pm$ 3.70 ^{bcBC}	35.00 $\pm$ 3.23 ^{cBC}	28.17 $\pm$ 2.10 ^{bcC}
100 mM	37.67 $\pm$ 4.40 ^{aA}	28.67 $\pm$ 4.65 ^{baB}	22.83 $\pm$ 3.21 ^{abB}	21.17 $\pm$ 2.54 ^{abB}	17.50 $\pm$ 1.92 ^{abB}
200 mM	20.83 $\pm$ 3.92 ^{aA}	11.17 $\pm$ 1.77 ^{aB}	9.33 $\pm$ 1.11 ^{aB}	10.50 $\pm$ 1.78 ^{aB}	9.00 $\pm$ 1.52 ^{aB}

a,b,c: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

A,B,C,D: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

Tablo 16. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki pH (Ortalama $\pm$ SEM) Değerleri

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	6.76 $\pm$ 0.16 ^a	6.79 $\pm$ 0.06 ^a	6.88 $\pm$ 0.03 ^a	6.91 $\pm$ 0.04 ^a	6.84 $\pm$ 0.03 ^a
1 mM	6.84 $\pm$ 0.10 ^{aAB}	6.81 $\pm$ 0.07 ^{aAB}	6.92 $\pm$ 0.03 ^{aA}	6.90 $\pm$ 0.03 ^{aAB}	6.85 $\pm$ 0.03 ^{aB}
5 mM	6.95 $\pm$ 0.05 ^a	6.96 $\pm$ 0.04 ^a	7.00 $\pm$ 0.05 ^{ab}	6.97 $\pm$ 0.04 ^a	6.91 $\pm$ 0.04 ^a
10 mM	6.96 $\pm$ 0.17 ^{aAB}	7.09 $\pm$ 0.05 ^{abAB}	7.12 $\pm$ 0.04 ^{bA}	7.09 $\pm$ 0.06 ^{aAB}	6.97 $\pm$ 0.06 ^{abB}
20 mM	7.25 $\pm$ 0.07 ^{abAB}	7.32 $\pm$ 0.05 ^{bcAB}	7.32 $\pm$ 0.03 ^{cA}	7.20 $\pm$ 0.05 ^{aAB}	7.19 $\pm$ 0.05 ^{bB}
50 mM	7.66 $\pm$ 0.12 ^{bc}	7.62 $\pm$ 0.08 ^c	7.77 $\pm$ 0.02 ^d	7.69 $\pm$ 0.11 ^b	7.67 $\pm$ 0.04 ^c
100 mM	7.98 $\pm$ 0.11 ^c	8.02 $\pm$ 0.07 ^d	8.10 $\pm$ 0.03 ^e	8.05 $\pm$ 0.09 ^c	7.99 $\pm$ 0.04 ^d
200 mM	8.18 $\pm$ 0.16 ^{cAB}	8.29 $\pm$ 0.08 ^{dAB}	8.28 $\pm$ 0.01 ^{fA}	8.22 $\pm$ 0.09 ^{cAB}	8.10 $\pm$ 0.06 ^{dB}

a,b,c,d,e,f: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

A,B: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

Tablo 17. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Anormal Spermatozoon (Ortalama $\pm$ SEM) Oranları

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	14.25 $\pm$ 2.28 ^{aA}	14.75 $\pm$ 2.09 ^{aAB}	16.00 $\pm$ 2.12 ^{aB}	17.00 $\pm$ 2.41 ^{aB}	19 $\pm$ 2.58 ^{abB}
1 mM	5.25 $\pm$ 0.94 ^{cAB}	5.50 $\pm$ 0.64 ^{bA}	6.75 $\pm$ 0.25 ^{bAB}	7.25 $\pm$ 0.47 ^{bB}	8.50 $\pm$ 0.28 ^{cC}
5 mM	5.00 $\pm$ 0.91 ^{cA}	6.25 $\pm$ 0.47 ^{bAB}	7.75 $\pm$ 0.25 ^{bB}	8.50 $\pm$ 0.28 ^{bC}	9.00 $\pm$ 0.10 ^{cC}
10 mM	6.40 $\pm$ 0.92 ^{bcAB}	6.40 $\pm$ 0.67 ^{bA}	7.20 $\pm$ 0.58 ^{bB}	7.80 $\pm$ 0.58 ^{bAB}	8.60 $\pm$ 0.98 ^{cAB}
20 mM	6.33 $\pm$ 0.88 ^{bc}	7.00 $\pm$ 1.15 ^b	7.00 $\pm$ 2.00 ^b	7.33 $\pm$ 0.33 ^b	8.67 $\pm$ 0.33 ^c
50 mM	5.80 $\pm$ 0.37 ^{cA}	6.60 $\pm$ 0.24 ^{bAC}	7.80 $\pm$ 0.20 ^{bB}	8.40 $\pm$ 0.40 ^{bB}	8.20 $\pm$ 0.80 ^{cBC}
100 mM	7.83 $\pm$ 1.19 ^{bcAB}	8.17 $\pm$ 1.04 ^{bA}	9.83 $\pm$ 1.42 ^{bA}	10.67 $\pm$ 1.30 ^{bB}	12.50 $\pm$ 1.87 ^{bcB}
200 mM	11.50 $\pm$ 0.99 ^{abA}	14.50 $\pm$ 0.61 ^{aB}	15.50 $\pm$ 0.56 ^{aB}	17.50 $\pm$ 0.99 ^{aC}	19.50 $\pm$ 1.17 ^{aD}

a,b,c: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

A,B,C,D: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

5.1.5. Flow-Sitometrik Değerler

5.1.5.1. Ölü/Canlı Spermatozoon Oranları

Zaman dilimlerine göre kontrol ve L-karnosin dozlarının ölü spermatozoon oranlarının ortalama değerleri Tablo 18, canlı spermatozoon oranlarının ortalama değerleri Tablo 19’de sunulmuştur. Tablo 18 incelendiğinde tüm zaman dilimlerinde kontrol grubuna göre 200 mM L-karnosin dozunun ölü spermatozoon oranını önemli ($p<0.001$) ölçüde artırdığı, canlı spermatozoon oranını ise önemli ($p<0.001$) ölçüde azalttığı belirlenmiştir. 0. saat diliminde 50 mM L-karnosin dozu kontrol grubuna oranla ölü spermatozoon oranını önemli ($p<0.001$) ölçüde artırmıştır. Ayrıca 0, 24 ve 48. saat dilimlerinde 100 mM’lık L-karnosin dozu kontrol grubuna kıyasla ölü spermatozoon oranını önemli ($p<0.001$) ölçüde artırırken, 24 ve 48. saatteki canlı spermatozoon oranını önemli ($p<0.001$) ölçüde azaltmıştır.

5.1.5.2. Akrozomal Hasar Oranları

Zaman dilimlerine göre kontrol ve L-karnosin dozlarının akrozomal hasar oranlarına ait ortalama değerler Tablo 20’de sunulmuştur. Tablo incelendiğinde 1, 5, 10 ve 20 mM L-karnosin dozlarının akrozomal hasar oranını kontrol grubuna göre sayısal olarak azalttığı, 50 ve 100 mM L-karnosin dozlarının ise sayısal olarak akrozomal hasar oranını artırdığı belirlenmiştir. Buna rağmen 200 mM L-karnosin grubunda 96. saat hariç diğer tüm zaman dilimlerine kontrole göre akrozomal hasar oranında gözlenen artış istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) bulunmuştur.

5.1.5.3. Yüksek/Düşük Mitokondriyal Membran Potansiyeli Oranları

Zaman dilimlerine göre kontrol ve L-karnosin dozlarının yüksek/düşük mitokondriyal membran potansiyeli oranlarına ait ortalama değerler sırasıyla Tablo 21 ve Tablo 22’de sunulmuştur. Kontrol grubuna göre tüm zaman dilimlerinde 1 ve 5 mM L-karnosin dozlarının yüksek mitokondriyal membran potansiyeli seviyesini arttırdığı, 50, 100 ve 200 mM dozlarının ise azalttığı belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre 48. saatte 100 mM dozundaki azalışın ve tüm zaman dilimlerinde 200 mM dozundaki azalışın istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) olduğu tespit edilmiştir.

Kontrol grubuna göre 1, 5 ve 10 mM L-karnosin dozlarının 72. saat dilimi hariç diğer tüm saat dilimlerinde düşük mitokondriyal membran potansiyeli oranını sayısal olarak azalttığı belirlenmiştir. Buna karşın 100 mM L-karnosin dozunun kontrol grubuna göre 48 ve 72. saatlerde, 200 mM L-karnosin dozunun ise tüm saat dilimlerinde istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) oranda artışa neden olduğu görülmüştür.

Tablo 18. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Ölü Spermatozoon (Ortalama $\pm$ SEM) Oranları

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	22.51 $\pm$ 3.07 ^{aAB}	23.30 $\pm$ 2.87 ^{aAB}	24.80 $\pm$ 2.30 ^{aA}	35.16 $\pm$ 2.86 ^{aAB}	38.10 $\pm$ 2.24 ^{aB}
1 mM	20.91 $\pm$ 3.82 ^{abAB}	22.94 $\pm$ 2.76 ^{aAB}	23.12 $\pm$ 2.30 ^{aA}	34.27 $\pm$ 2.28 ^{aAB}	34.45 $\pm$ 2.88 ^{aB}
5 mM	23.32 $\pm$ 2.22 ^{abAB}	23.90 $\pm$ 2.75 ^{aAB}	24.56 $\pm$ 2.63 ^{aA}	32.58 $\pm$ 2.69 ^{aAB}	35.63 $\pm$ 2.11 ^{aB}
10 mM	24.23 $\pm$ 3.33 ^{abAB}	25.16 $\pm$ 3.01 ^{abA}	25.80 $\pm$ 2.47 ^{aA}	30.15 $\pm$ 2.20 ^{aAB}	36.97 $\pm$ 2.87 ^{aB}
20 mM	25.33 $\pm$ 3.26 ^{abAB}	26.75 $\pm$ 3.31 ^{abAB}	26.68 $\pm$ 2.28 ^{aA}	35.41 $\pm$ 2.53 ^{aAB}	35.67 $\pm$ 2.40 ^{aB}
50 mM	30.71 $\pm$ 3.43 ^b	31.11 $\pm$ 2.65 ^{ab}	31.89 $\pm$ 1.93 ^{ab}	34.12 $\pm$ 3.83 ^a	38.19 $\pm$ 2.80 ^a
100 mM	34.68 $\pm$ 2.89 ^{bA}	39.35 $\pm$ 3.45 ^{bAB}	39.89 $\pm$ 2.07 ^{bA}	44.66 $\pm$ 3.25 ^{abB}	49.22 $\pm$ 2.51 ^{aB}
200 mM	48.38 $\pm$ 1.71 ^{cA}	55.62 $\pm$ 3.38 ^{cA}	57.16 $\pm$ 2.94 ^{cA}	66.12 $\pm$ 2.14 ^{bAB}	73.11 $\pm$ 2.78 ^{bB}

a,b,c: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir ($p < 0.001$).

A,B: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir ($p < 0.001$).

Tablo 19. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Canlı Spermatozoon (Ortalama $\pm$ SEM) Oranları

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	74.72 $\pm$ 1.92 ^{bAB}	73.79 $\pm$ 3.14 ^{cAB}	72.51 $\pm$ 2.66 ^{cA}	60.95 $\pm$ 2.39 ^{bAB}	59.76 $\pm$ 2.41 ^{bB}
1 mM	78.73 $\pm$ 4.26 ^{bAB}	74.56 $\pm$ 2.79 ^{cAB}	73.53 $\pm$ 2.61 ^{cA}	63.06 $\pm$ 2.73 ^{bAB}	62.12 $\pm$ 2.00 ^{bB}
5 mM	73.08 $\pm$ 2.45 ^{bA}	73.06 $\pm$ 2.98 ^{bcAB}	71.91 $\pm$ 2.87 ^{cA}	64.47 $\pm$ 2.43 ^{bAB}	59.62 $\pm$ 2.99 ^{bB}
10 mM	72.61 $\pm$ 3.39 ^{bAB}	72.31 $\pm$ 3.05 ^{bcAB}	71.06 $\pm$ 2.65 ^{bcA}	66.74 $\pm$ 2.54 ^{bAB}	60.63 $\pm$ 2.12 ^{bB}
20 mM	71.21 $\pm$ 2.96 ^b	70.91 $\pm$ 3.22 ^{bc}	69.76 $\pm$ 2.19 ^{bc}	62.12 $\pm$ 2.14 ^b	61.83 $\pm$ 2.44 ^b
50 mM	68.98 $\pm$ 3.17 ^{7b}	66.41 $\pm$ 2.66 ^{bc}	65.43 $\pm$ 2.14 ^{bc}	63.49 $\pm$ 2.99 ^b	59.49 $\pm$ 2.68 ^b
100 mM	63.18 $\pm$ 3.11 ^{bA}	60.86 $\pm$ 3.63 ^{bAB}	60.00 $\pm$ 2.41 ^{bA}	51.90 $\pm$ 2.38 ^{abB}	48.34 $\pm$ 2.20 ^{abB}
200 mM	49.44 $\pm$ 1.97 ^{aA}	42.22 $\pm$ 2.21 ^{aA}	40.73 $\pm$ 3.02 ^{aA}	32.36 $\pm$ 2.94 ^{aAB}	25.25 $\pm$ 2.75 ^{aB}

a,b,c: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir ($p<0.001$).

A,B: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir ($p<0.001$).

Tablo 20. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Akrozomal Hasar (Ortalama $\pm$ SEM) Oranları

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	7.41 $\pm$ 0.82 ^{abA}	14.31 $\pm$ 2.03 ^{abB}	15.50 $\pm$ 2.38 ^{aB}	16.19 $\pm$ 1.51 ^{aB}	19.54 $\pm$ 3.51 ^{abB}
1 mM	6.81 $\pm$ 0.31 ^{aA}	13.33 $\pm$ 2.13 ^{abB}	14.64 $\pm$ 1.72 ^{aB}	14.66 $\pm$ 2.66 ^{aB}	17.65 $\pm$ 3.03 ^{aB}
5 mM	7.10 $\pm$ 0.54 ^{aA}	14.11 $\pm$ 2.24 ^{aB}	14.99 $\pm$ 1.98 ^{aB}	15.36 $\pm$ 1.98 ^{aB}	17.29 $\pm$ 2.90 ^{aB}
10 mM	6.99 $\pm$ 0.25 ^{aA}	13.33 $\pm$ 2.12 ^{aB}	15.20 $\pm$ 1.90 ^{aB}	15.53 $\pm$ 1.43 ^{aB}	17.39 $\pm$ 2.53 ^{aB}
20 mM	6.53 $\pm$ 0.42 ^{aA}	13.63 $\pm$ 1.88 ^{aB}	15.05 $\pm$ 1.45 ^{aB}	15.83 $\pm$ 2.21 ^{aB}	17.12 $\pm$ 2.28 ^{aB}
50 mM	9.51 $\pm$ 0.99 ^{abA}	17.58 $\pm$ 2.17 ^{abB}	17.83 $\pm$ 1.53 ^{aB}	18.58 $\pm$ 1.14 ^{aB}	19.33 $\pm$ 2.00 ^{abB}
100 mM	11.83 $\pm$ 1.66 ^{bcA}	24.54 $\pm$ 2.13 ^{bcB}	25.96 $\pm$ 2.98 ^{abB}	26.49 $\pm$ 3.56 ^{abB}	28.68 $\pm$ 2.60 ^{abB}
200 mM	15.43 $\pm$ 1.68 ^{cA}	33.03 $\pm$ 3.16 ^{cB}	34.03 $\pm$ 3.27 ^{bB}	36.38 $\pm$ 5.02 ^{bB}	37.04 $\pm$ 3.54 ^{bB}

a,b,c: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

A,B: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

Tablo 21. Kontrol ve L-karnosin içeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Yüksek Mitokondriyal Membran Potansiyeli (Ortalama $\pm$ SEM) Oranları

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	76.12 $\pm$ 2.27 ^{bcA}	80.98 $\pm$ 1.43 ^{bcB}	80.69 $\pm$ 2.54 ^{cB}	79,05 $\pm$ 3,01 ^{bAB}	74.67 $\pm$ 3.00 ^{bA}
1 mM	79.03 $\pm$ 1.66 ^{bcA}	81.68 $\pm$ 1.17 ^{cB}	80.70 $\pm$ 2.61 ^{cAB}	76.91 $\pm$ 4.31 ^{bAB}	77.50 $\pm$ 3.05 ^{bAB}
5 mM	80.01 $\pm$ 2.19 ^c	81.95 $\pm$ 1.30 ^c	80.74 $\pm$ 3.08 ^c	80.16 $\pm$ 3.01 ^b	74.85 $\pm$ 4.70 ^b
10 mM	78.75 $\pm$ 1.19 ^{bc}	80.86 $\pm$ 1.31 ^{bc}	80.21 $\pm$ 1.70 ^{bc}	79.46 $\pm$ 1.81 ^b	77.56 $\pm$ 3.24 ^b
20 mM	74.71 $\pm$ 2.26 ^{bcA}	79.44 $\pm$ 2.19 ^{bcB}	80.45 $\pm$ 1.89 ^{cB}	76.84 $\pm$ 2.01 ^{bAB}	76.96 $\pm$ 3.16 ^{bAB}
50 mM	70.87 $\pm$ 2.66 ^{bcA}	75.76 $\pm$ 2.37 ^{bcB}	75.61 $\pm$ 2.00 ^{bcB}	75.44 $\pm$ 3.37 ^{bAB}	73.61 $\pm$ 3.02 ^{bAB}
100 mM	67.92 $\pm$ 3.61 ^{abcAB}	69.34 $\pm$ 3.68 ^{bA}	68.15 $\pm$ 3.09 ^{bAB}	65.27 $\pm$ 3.43 ^{bB}	63.61 $\pm$ 4.23 ^{bAB}
200 mM	61.11 $\pm$ 2.87 ^{aA}	51.96 $\pm$ 2.97 ^{aAB}	45.29 $\pm$ 3.79 ^{aBC}	39.17 $\pm$ 2.63 ^{aBC}	34.12 $\pm$ 2.40 ^{aC}

a,b,c: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

A,B,C: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.001**).

Tablo 22. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Düşük Mitokondriyal Membran Potansiyeli (Ortalama $\pm$ SEM) Oranları

	Zaman Dilimleri				
	0.Saat	24.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol	16.60 $\pm$ 1.83 ^{abAB}	14.28 $\pm$ 0.96 ^{abAB}	14.14 $\pm$ 1.63 ^{aA}	14.14 $\pm$ 0.96 ^{aAB}	19.15 $\pm$ 2.77 ^{aB}
1 mM	15.90 $\pm$ 1.56 ^a	13.34 $\pm$ 0.97 ^{ab}	12.90 $\pm$ 1.02 ^a	16.70 $\pm$ 3.18 ^a	16.00 $\pm$ 1.70 ^a
5 mM	15.29 $\pm$ 1.71 ^{aA}	13.02 $\pm$ 1.65 ^{aB}	12.96 $\pm$ 1.22 ^{aAB}	14.94 $\pm$ 1.15 ^{aAB}	15.34 $\pm$ 1.95 ^{aAB}
10 mM	16.31 $\pm$ 1.77 ^{abA}	13.11 $\pm$ 1.41 ^{aB}	13.89 $\pm$ 1.61 ^{aAB}	15.43 $\pm$ 1.01 ^{aAB}	15.00 $\pm$ 1.23 ^{aAB}
20 mM	17.49 $\pm$ 0.93 ^{abAB}	14.54 $\pm$ 1.56 ^{abA}	14.89 $\pm$ 1.40 ^{aA}	17.93 $\pm$ 1.71 ^{abB}	16.58 $\pm$ 1.71 ^{aAB}
50 mM	22.78 $\pm$ 1.59 ^{ab}	19.52 $\pm$ 1.83 ^{ab}	19.76 $\pm$ 2.10 ^{ab}	19.12 $\pm$ 2.08 ^{ab}	20.70 $\pm$ 2.05 ^a
100 mM	24.36 $\pm$ 1.82 ^b	24.57 $\pm$ 3.33 ^b	27.26 $\pm$ 2.35 ^b	27.31 $\pm$ 2.47 ^b	27.05 $\pm$ 1.76 ^a
200 mM	33.17 $\pm$ 2.94 ^{cA}	43.23 $\pm$ 5.26 ^{cA}	50.96 $\pm$ 3.39 ^{cB}	59.27 $\pm$ 3.91 ^{cB}	59.85 $\pm$ 6.06 ^{bB}

a,b,c: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir ($p < 0.001$).

A,B: Aynı satır içerisinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir ($p < 0.001$).

5.1.6. Oksidatif Stres Düzeyleri

Zaman dilimlerine göre kontrol ve L-karnosin dozlarının oksidatif stres parametrelerinin (MDA, GSH, GSH-Px ve CAT) 0. ve 96. saat dilimlerine ait sonuçları Tablo 23’de sunulmuştur. Tablo incelendiğinde MDA değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark belirlenemezken, 0. saate göre 96. saatte kontrol hariç tüm gruplarda sayısal bir artışın olduğu, 100 ve 200 mM L-karnosin dozlarında gözlenen bu artışın istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir. Tabloda GSH-Px değerleri incelendiğinde 0. saatte kontrol grubuna göre 100 mM L-karnosin dozunun istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) derecede artış, 96. saatte ise önemli ($p<0.05$) oranda azalma sağladığı görülmüştür. Ayrıca 0. saate göre 1 mM ve 100 mM L-karnosin dozlarının GSH-Px düzeylerinin 96. saatte istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) oranda azaldığı belirlenmiştir.

Tablo 23. Kontrol ve L-karnosin İçeren Spermaların Kısa Süreli Saklama Esnasındaki Oksidatif Stres (Ortalama $\pm$ SEM) Düzeyleri

	Zaman Dilimleri							
	MDA		GSH		GSH-Px		CAT	
	0.Saat	96.Saat	0.Saat	96.Saat	0.Saat	96.Saat	0.Saat	96.Saat
Kontrol	4.23 $\pm$ 0.19	4.04 $\pm$ 0.47	2.28 $\pm$ 0.18	2.71 $\pm$ 0.13	31.17 $\pm$ 0.49 ^a	30.88 $\pm$ 0.48 ^a	19.26 $\pm$ 2.21	24.12 $\pm$ 6.56
1 mM	4.21 $\pm$ 0.20	4.35 $\pm$ 0.23	2.59 $\pm$ 0.23	2.64 $\pm$ 0.18	33.01 $\pm$ 0.66 ^{Aa}	28.31 $\pm$ 1.31 ^{Ba}	18.23 $\pm$ 2.35	20.27 $\pm$ 2.28
5 mM	4.11 $\pm$ 0.17	4.61 $\pm$ 0.38	2.42 $\pm$ 0.80	2.45 $\pm$ 0.16	30.88 $\pm$ 1.49 ^a	30.77 $\pm$ 0.98 ^a	18.34 $\pm$ 2.00	19.94 $\pm$ 3.63
10 mM	4.45 $\pm$ 0.21	4.75 $\pm$ 0.30	2.63 $\pm$ 0.19	2.65 $\pm$ 0.24	30.65 $\pm$ 1.03 ^a	32.85 $\pm$ 2.00 ^a	17.77 $\pm$ 3.25	15.43 $\pm$ 3.16
20 mM	4.16 $\pm$ 0.21	4.48 $\pm$ 0.34	2.52 $\pm$ 0.15	2.85 $\pm$ 0.10	30.54 $\pm$ 1.61 ^a	28.55 $\pm$ 0.72 ^a	19.84 $\pm$ 3.29	25.22 $\pm$ 2.63
50 mM	4.17 $\pm$ 0.23	4.60 $\pm$ 0.24	2.69 $\pm$ 0.32	2.85 $\pm$ 0.08	31.08 $\pm$ 1.52 ^a	31.28 $\pm$ 1.93 ^a	18.17 $\pm$ 2.43	24.02 $\pm$ 3.18
100 mM	3.75 $\pm$ 0.18 ^A	4.83 $\pm$ 0.30 ^B	2.59 $\pm$ 0.13	2.72 $\pm$ 0.31	35.16 $\pm$ 0.61 ^{Ab}	26.19 $\pm$ 1.58 ^{Bb}	18.65 $\pm$ 4.63	25.38 $\pm$ 3.86
200 mM	3.82 $\pm$ 0.17 ^A	5.08 $\pm$ 0.42 ^B	2.62 $\pm$ 0.21	2.57 $\pm$ 0.26	31.34 $\pm$ 1.66 ^a	30.53 $\pm$ 1.57 ^a	14.59 $\pm$ 1.53	24.30 $\pm$ 4.70

A,B: Aynı satır içerisinde ki farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.05**).

a,b: Aynı sütun içerisinde ki farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (**p<0.05**).

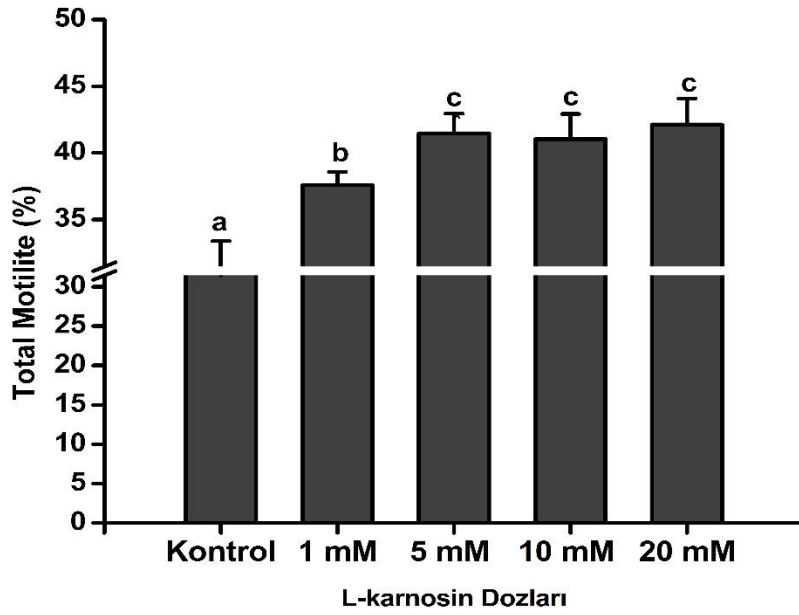
5.2. İkinci Aşama (Uzun Süreli Saklama) Sonucu Elde Edilen Bulgular

Bu aşamada birinci aşama sonrası tüm parametreler açısından genellikle kontrol grubuna göre sayısal ve/veya istatistiki yönden üstünlük gösteren 1, 5, 10 ve 20 mM L-karnosin dozları kullanılmıştır.

5.2.1. Motilite ve Kinematik Değerler

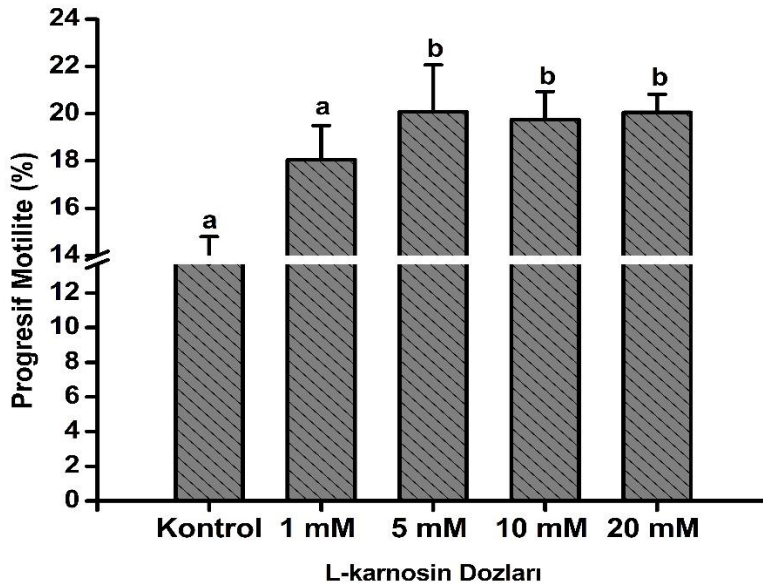
Kontrol ve L-karnosinin farklı dozları ilave edilmiş spermaların dondurma-çözdürme sonrası elde edilen total motilite oranlarının grafiksel görünümü şekil 11’de verilmiştir. Şekil incelendiğinde kontrol grubuna göre L-karnosinin 1, 5, 10 ve 20 mM dozlarının ($p<0.05$) total motilite değerini artırdığı belirlenmiştir.

Dondurma-çözdürme işlemi sonrası kontrol ve L-karnosin dozlarına ait progresif motilite değerlerinin grafiksel görünümü şekil 12’de verilmiştir. Bu değerler incelendiğinde 5, 10 ve 20 mM L-karnosin dozlarının kontrol grubuna göre progresif motilite değerini artırdığı ve bu artışın istatistiki olarak önemli ($p<0.01$) olduğu belirlenmiştir.



Şekil 11. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların total motilite değerleri(%).

a,b,c. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



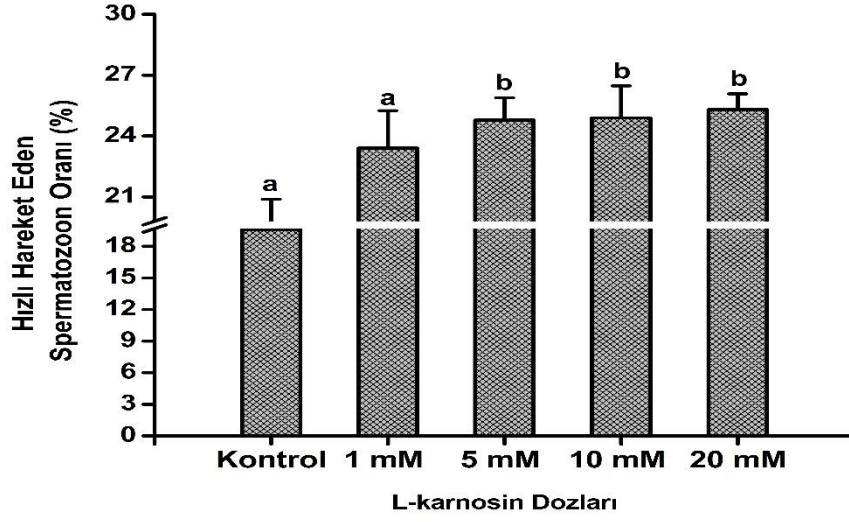
Şekil 12. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların progresif motilite değerleri(%).

a,b. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.01$).

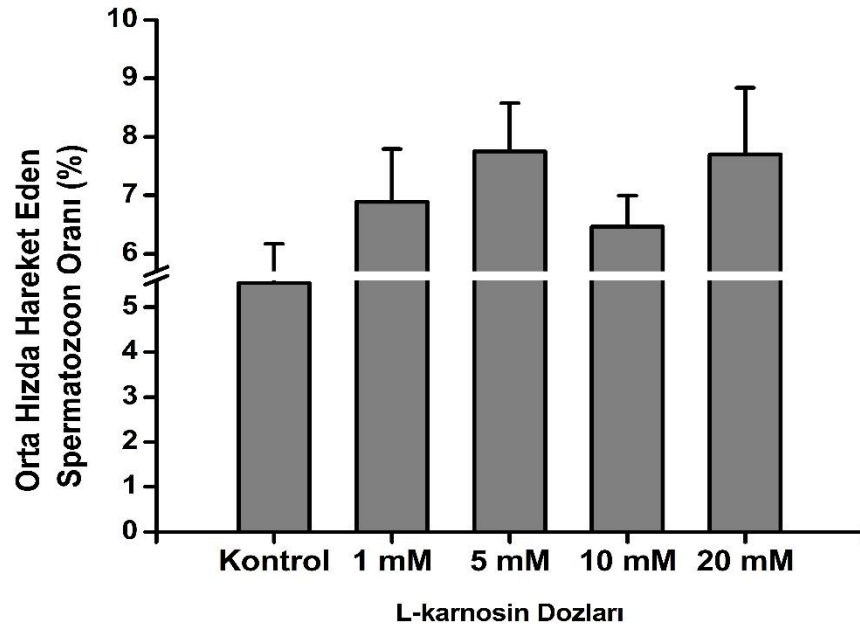
Dondurma-çözdürme işlemi sonrası kontrol ve L-karnosin dozlarına ait hızlı hareket eden spermatozoon oranlarının grafiksel görünümü şekil 13’de verilmiştir. Bu parametrede 5, 10 ve 20 mM L-karnosin dozlarının öne çıktığı, bu dozların kontrol grubuna oranla önemli (**p<0.01**) artış sağladığı belirlenmiştir. 1 mM L-karnosin içeren dozu ile kontrol grubu arasında sayısal bir farklılık belirlenirken, bu farklılığın istatistiksel açıdan önemsiz olduğu görülmüştür.

Dondurma-çözdürme işlemi sonrası kontrol ve L-karnosin dozlarına ait orta hızda hareket eden spermatozoon oranlarının grafiksel görünümü şekil 14’de gösterilmiştir. Grafikde kontrol grubuna göre en fazla 5 mM dozunda artış olduğu ancak bu artışın istatistiki olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir.

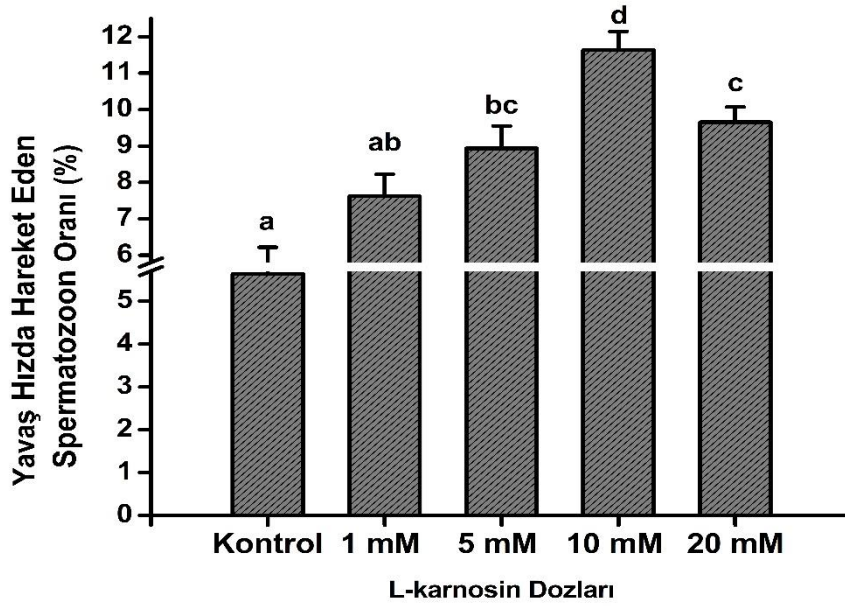
Kontrol ve L-karnosin dozlarına ait dondulma-çözdürme sonrası yavaş hızda hareket eden spermatozoon oranlarının grafiksel görünümü şekil 15’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi 5, 10 ve 20 mM L-karnosin dozları ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli (**p<0.001**) bulunmuştur. Kontrol grubu ile 1 mM L-karnosin dozu arasındaki sayısal artışın istatistiksel açıdan önemli olmadığı görülmüştür.



Şekil 13. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların hızlı hareket eden spermatozoon oranları (%).
a,b. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.01$).



Şekil 14. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların orta hızda hareket eden spermatozoon oranları (%).



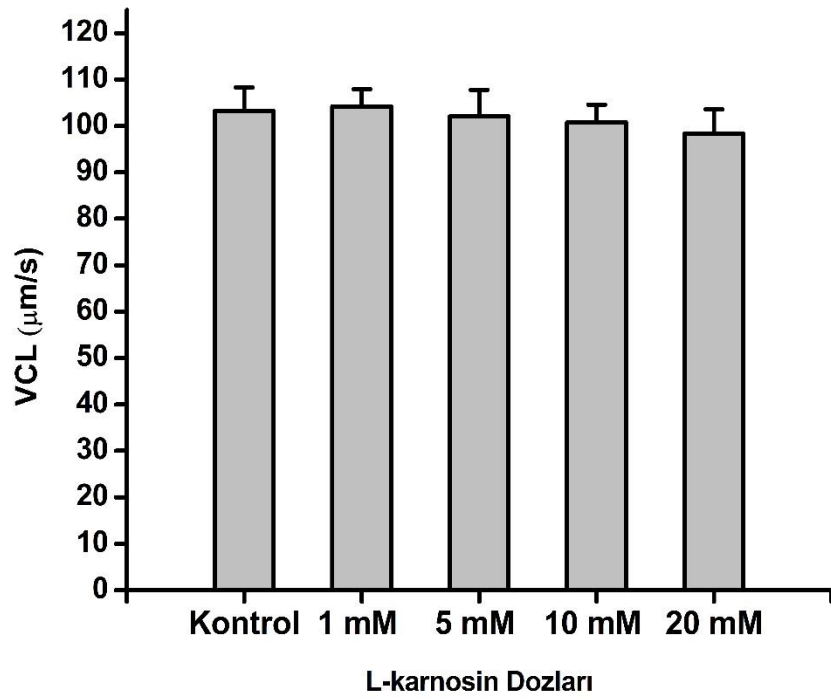
Şekil 15. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların yavaş hızda hareket eden spermatozoon oranları (%).
a,b,c,d. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$).

Dondurma-çözdürme sonrası kontrol ve L-karnosin dozlarına ait kinematik parametrelerden VCL'nin grafiksel görünümü şekil 16'da gösterilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda dondurma-çözdürme işlemi sonrası kontrol ve L-karnosin arasında istatistiksel anlamda herhangi bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir.

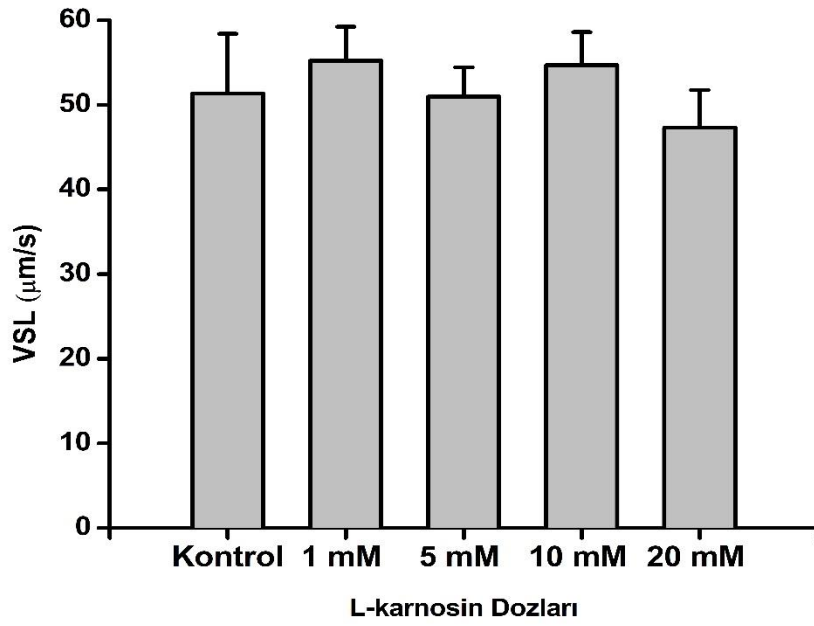
Kinematik parametrelerden VSL'ye ait değerlerin grafiksel görünümü şekil 17'de sunulmuştur. Dondurma-çözdürme sonrası yapılan değerlendirmeler sonucunda kontrol ve L-karnosin dozları arasında istatistiksel bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir.

Kinematik parametrelerden VAP değerlerinde de kontrol ve L-karnosin dozları arasında istatistiksel açıdan herhangi bir farklılığın olmadığı şekil 18'de grafiksel olarak gösterilmiştir.

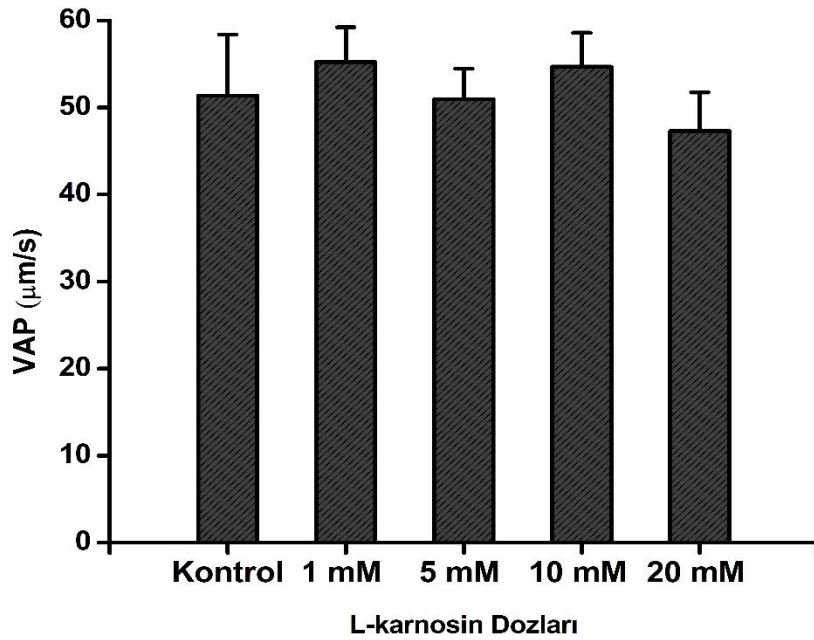
Diğer kinematik parametreler de sırasıyla STR, WOB, LIN ALH ve BCF olarak şekil 19, 20, 21, 22 ve 23’de grafiksel olarak gösterilmiştir. Dondurma-çözdürme sonrası kinematik parametrelere ait grafikler incelendiğinde kontrol ve L-karnosin dozları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir.



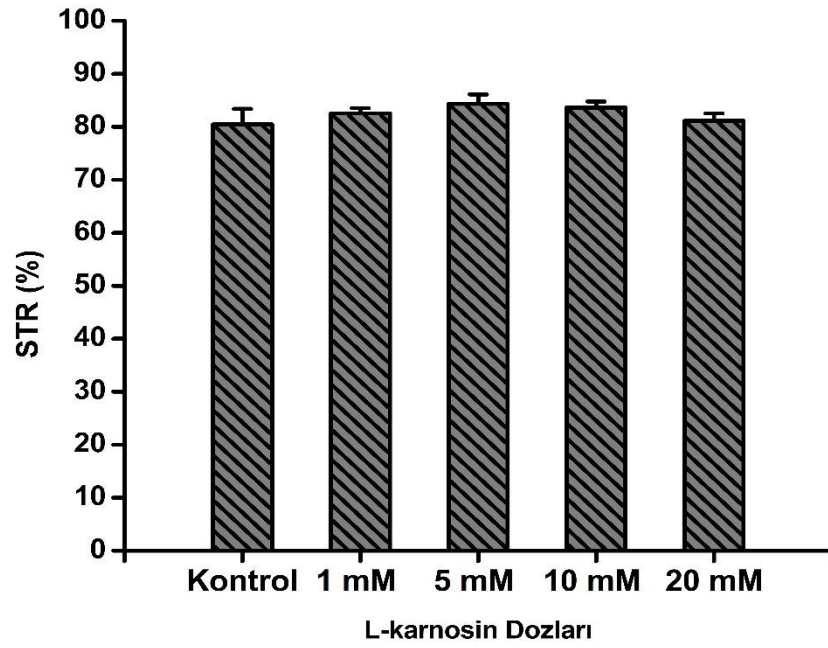
Şekil 16. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların VCL değerleri (%).



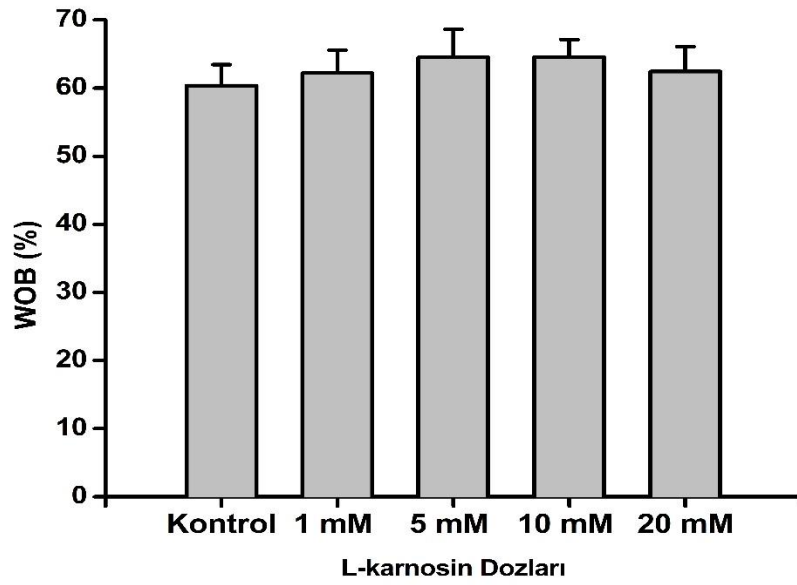
Şekil 17. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların VSL değerleri (%).



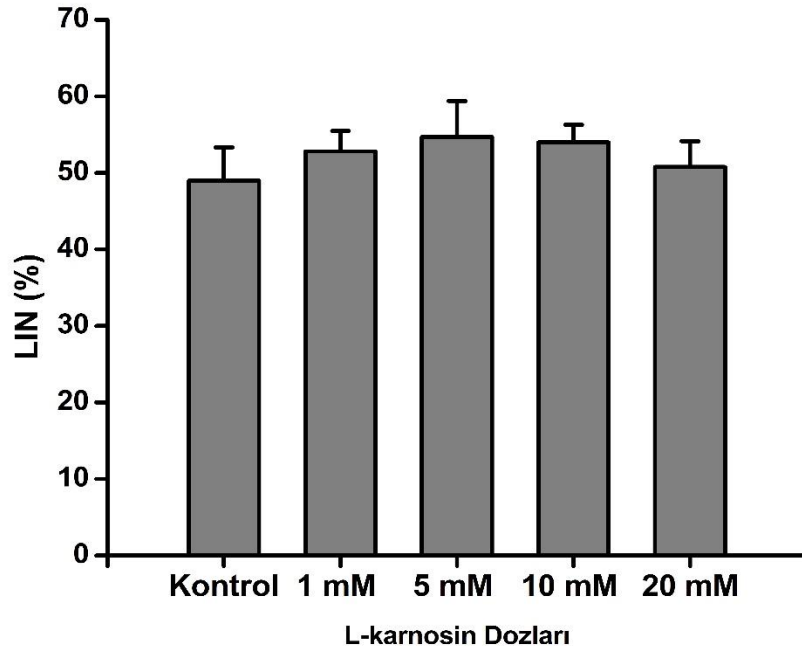
Şekil 18. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların VAP değerleri (%).



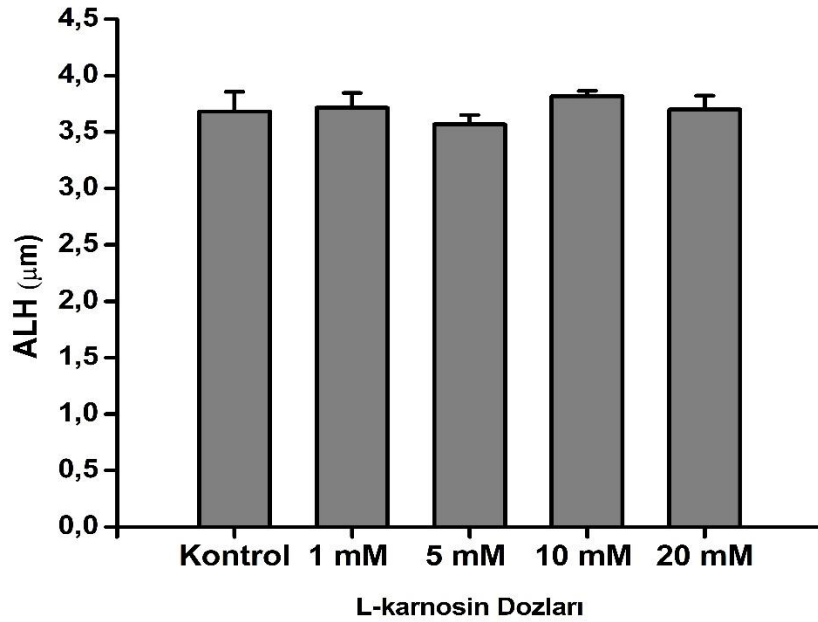
Şekil 19. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların STR değerleri.



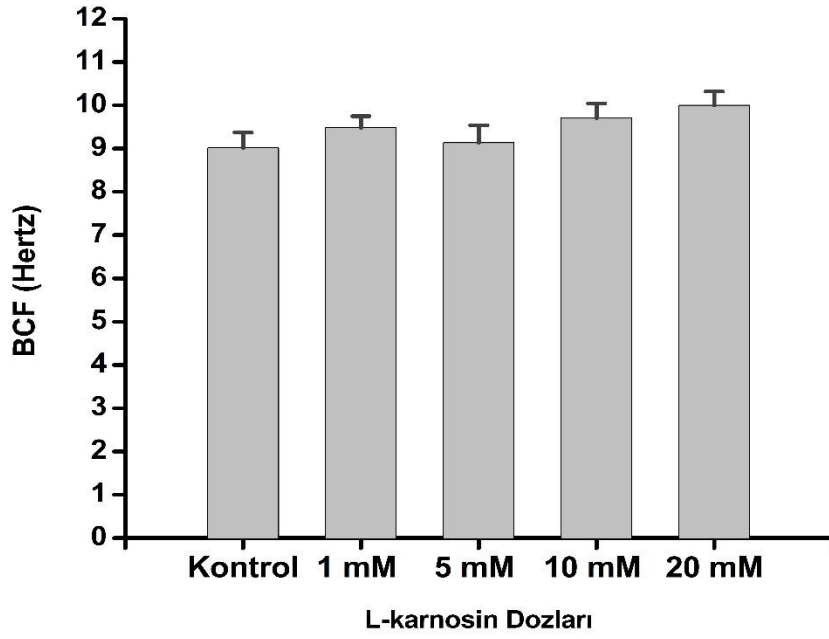
Şekil 20. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların WOB değerleri.



Şekil 21. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların LIN değerleri.



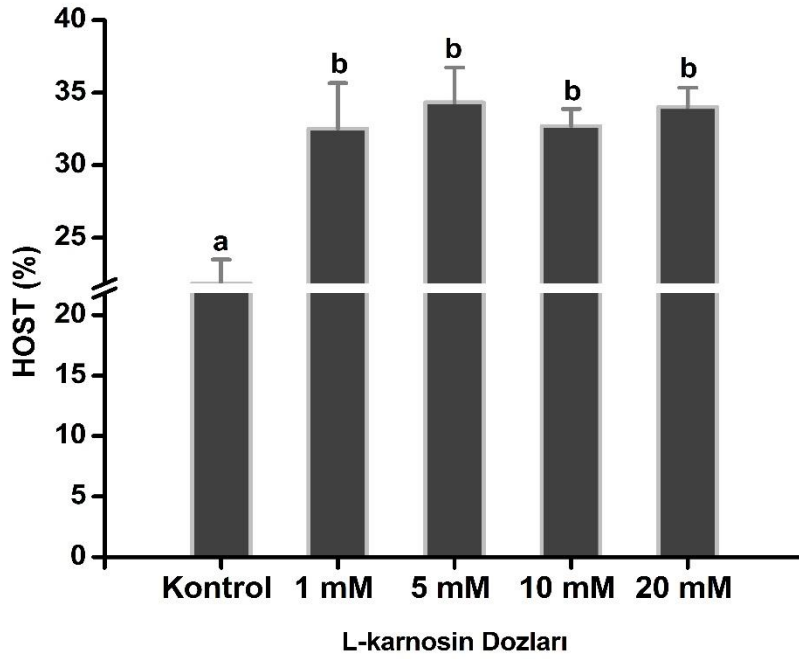
Şekil 22. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların ALH değerleri.



Şekil 23. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların BCF değerleri.

5.2.2. Membran Bütünlüğü (HOST) Değerleri

Kontrol ve L-karnosin dozlarına ait dondurma-çözdürme sonrası elde edilen membran bütünlüğü (HOST) sonuçlarının grafiksel görünümü şekil 24’de verilmiştir. Grafik incelendiğinde kontrol grubuna göre 5 mM L-karnosin dozu başta olmak üzere diğer L karnosin dozlarının spermatozoonun membran bütünlüğünü daha iyi koruyarak artış sağladığı ve bu artışların istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) olduğu görülmüştür.

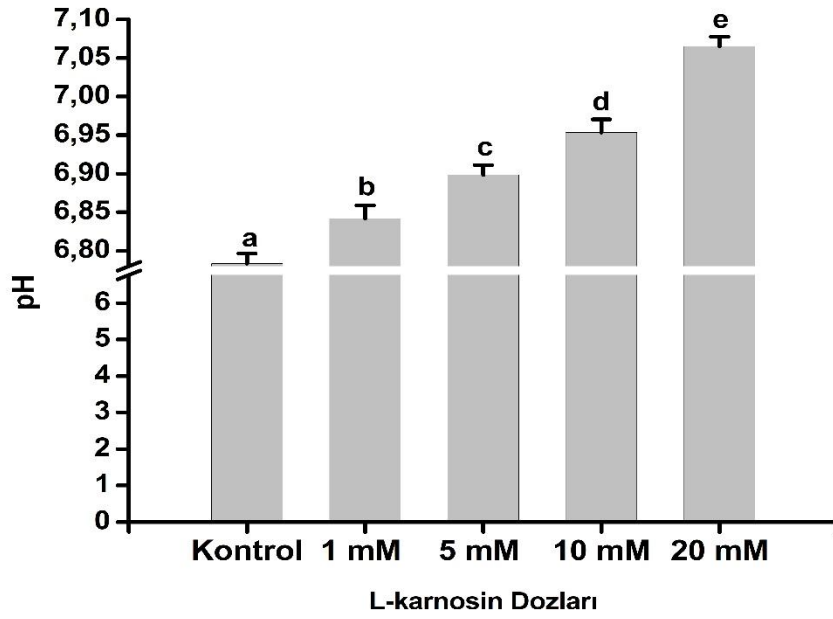


Şekil 24. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların HOST değerleri (%).

a,b. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

5.2.3. pH Değerleri

Kontrol ve L-karnosin dozlarına ait dondurmuş-çözdürmüş spermaların pH değerleri Şekil 25’de gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde L-karnosin dozlarındaki artışa paralel olarak pH’nın alkali yönde arttığı gözlenmiştir. Tüm dozların kontrole göre istatistiksel anlamda artış sağladığı tespit edilmiştir ($p<0.001$).

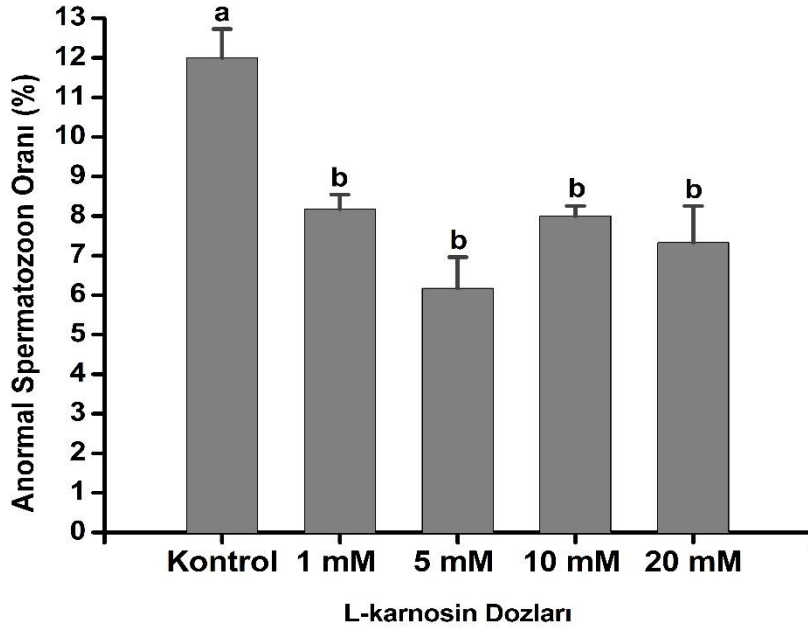


Şekil 25. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların pH değerleri.

a,b,c,d,e. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$).

5.2.4. Anormal Spermatozoon Oranları

Dondurma-çözdürme sonrası elde edilen anormal spermatozoon oranlarının grafiksel görünümü şekil 26'da verilmiştir. Şekil incelendiğinde sperma sulandırıcılarına eklenen 1, 5, 10 ve 20 mM L-karnosin dozlarının kontrol grubuna göre anormal spermatozoon oranını istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) düzeyde azalttığı, en önemli azalışın 5 mM dozunda olduğu görülmüştür.



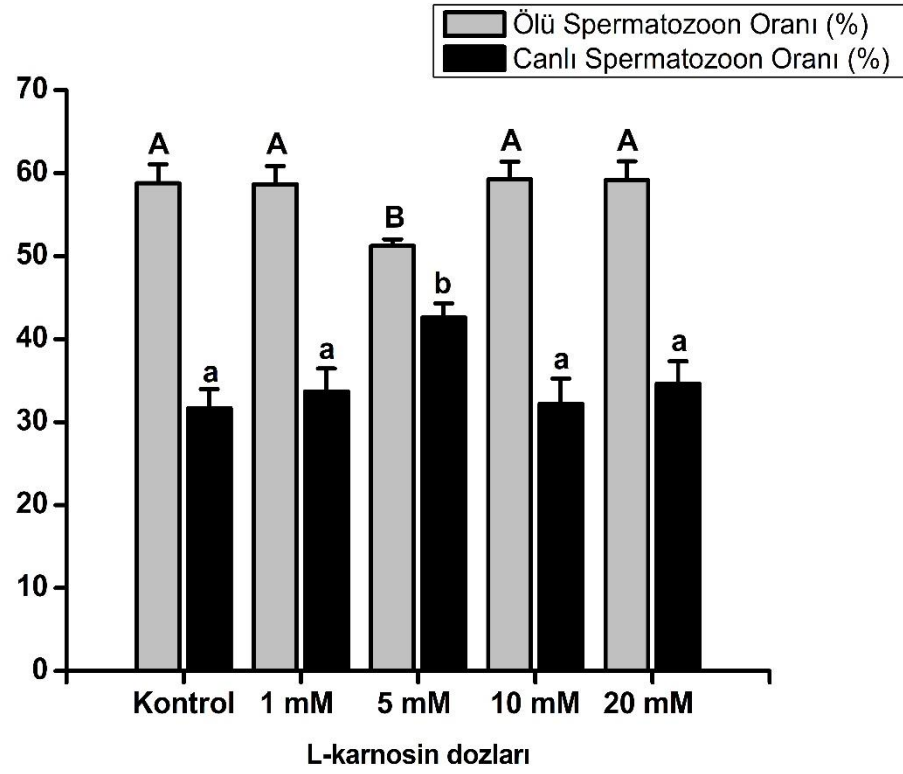
Şekil 26. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların anormal spermatozoon oranları.

a,b. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

5.2.5. Flow-Sitometrik Değerler

5.2.5.1. Ölü ve Canlı Spermatozoon Oranları

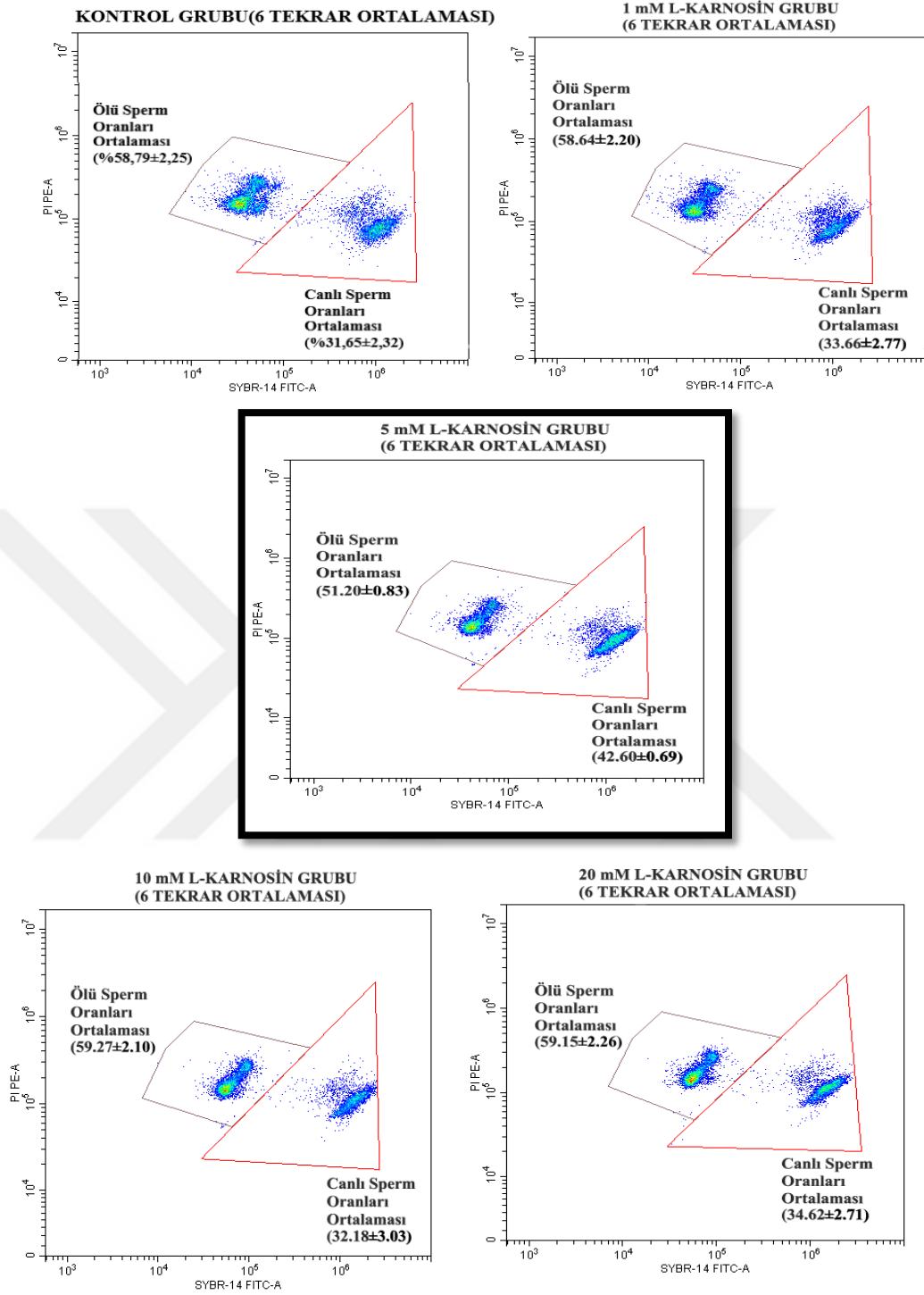
Dondurma-çözdürme işlemi sonrası kontrol ve L-karnosin içeren spermalarındaki ölü ve canlı spermatozoon oranlarının grafiksel görünüşleri sırasıyla şekil 27’de verilmiştir. Ayrıca tüm gruplar için ortalama değerlerin dot plot sitogramları şekil 28’da sunulmuştur. Veriler değerlendirildiğinde 5 mM L-karnosin dozunun, kontrol grubuna oranla ölü spermatozoon oranını önemli ($p<0.05$) ölçüde azalttığı ve canlı spermatozoon oranında önemli ($p<0.05$) ölçüde artırdığı belirlenmiştir.



Şekil 27. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermallerdeki ölü/canlı spermatozoon oranları (%).

A,B. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

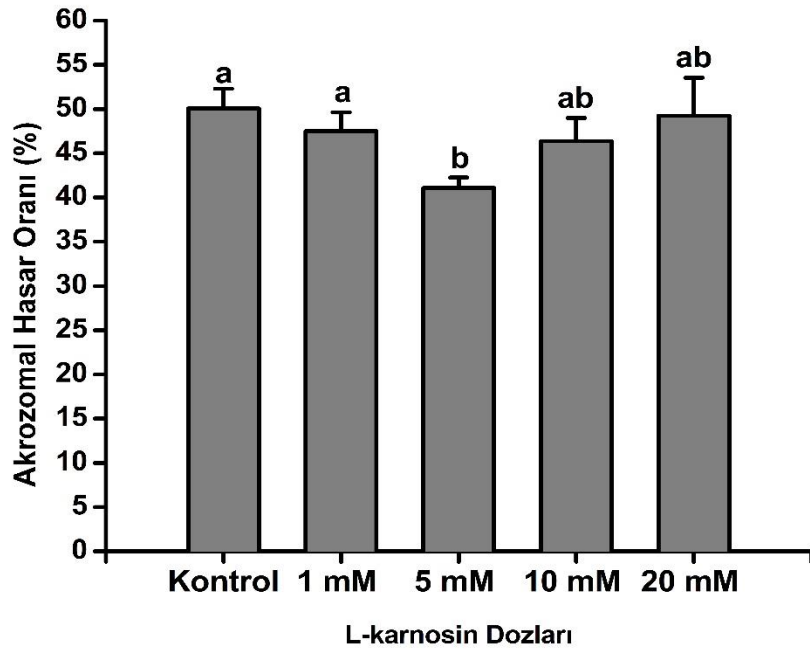
a,b. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 28. Kontrol ve L-karnosin içeren spermallerdeki ölü/canlı spermatozoon oranlarına ait dot plot görüntüleri. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir.

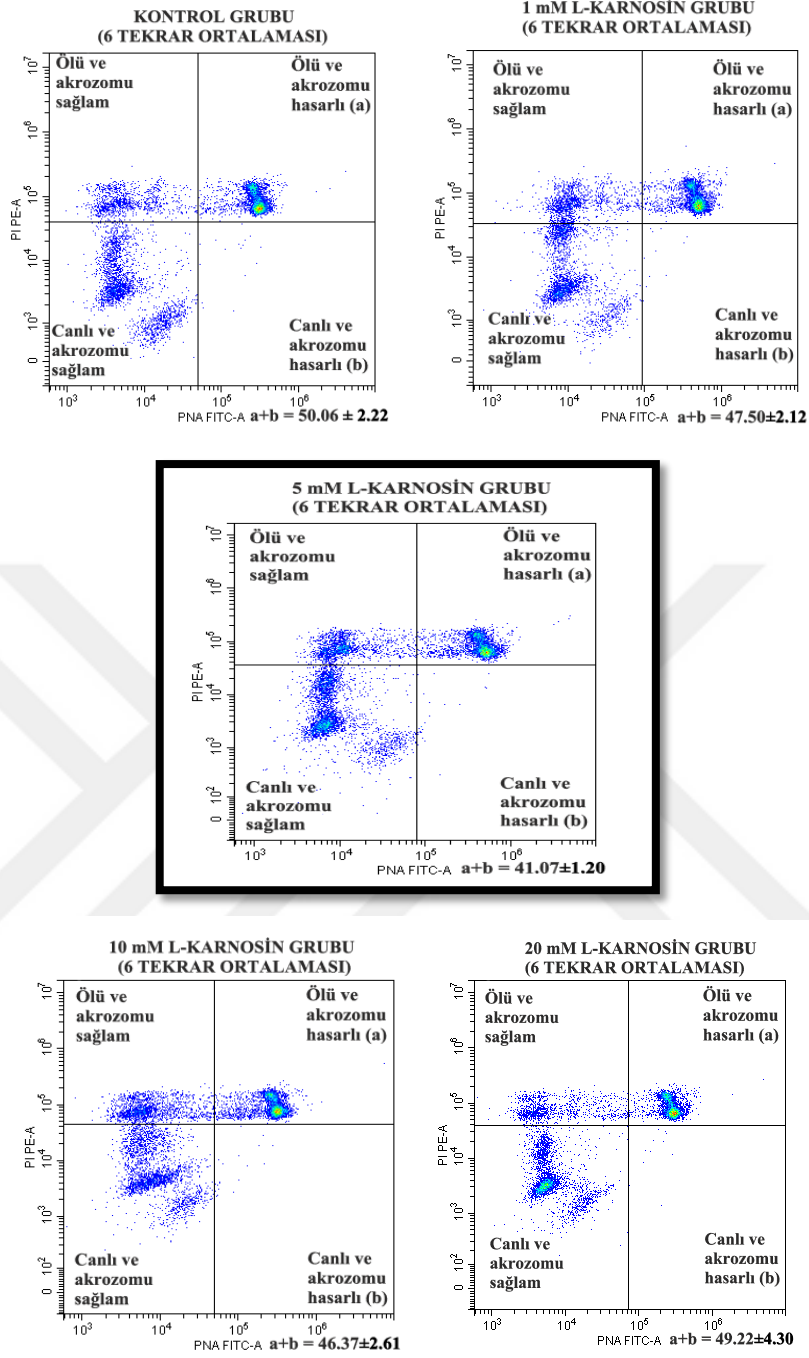
5.2.5.2. Akrozomal Hasar Oranları

Kontrol ve L-karnosin dozlarına ait akrozomal hasar oranlarının grafiksel görünümü şekil 29’da verilmiştir. Ayrıca tüm gruplar için ortalama değerlerin dot plot sitogramları şekil 30’de sunulmuştur. Şekil 30 incelendiğinde 5 mM L-karnosin dozunun kontrol grubuna göre akrozomal hasar oranını önemli ölçüde ($p<0.05$) azalttığı tespit edilmiştir.



Şekil 29. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermalardaki akrozomal hasar oranları (%).

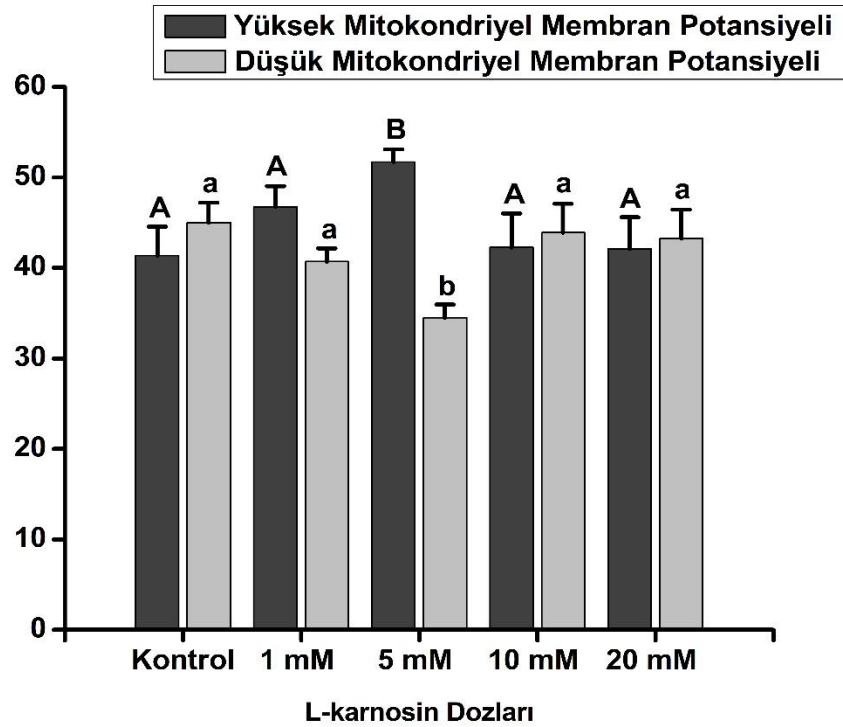
a,b. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 30. Kontrol ve L-karnosin içeren spermallerdeki akrozomal hasar oranlarına ait dot plot görüntüleri.
Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

5.2.5.3. Yüksek/Düşük Mitokondriyal Membran Potansiyeli Oranları

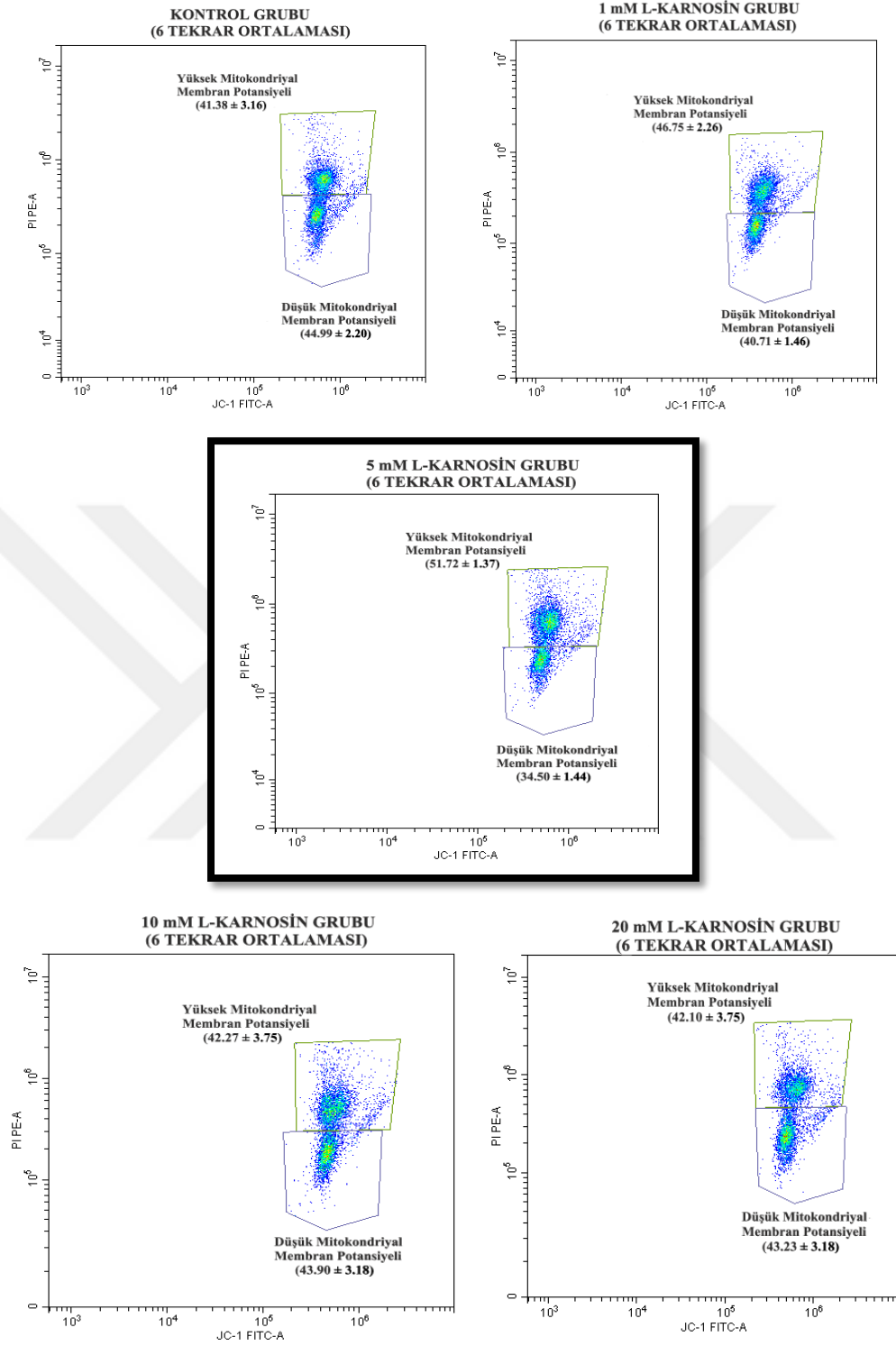
Kontrol ve L-karnosin dozlarına ait dondurma-çözdürme sonrası elde edilen yüksek/düşük mitokondriyal membran potansiyeli oranları şekil 31’de, verilmiştir. Ayrıca tüm gruplar için ortalama değerler dot plot sitogram görüntüsü olarak şekil 32’de sunulmuştur. 5 mM L-karnosin dozunun kontrol grubuna oranla yüksek mitokondriyal membran potansiyelini önemli derecede artırdığı, düşük mitokondriyal membran potansiyelini ise önemli ($p<0.05$) derecede azalttığı tespit edilmiştir.



Şekil 31. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermallerdeki yüksek/düşük mitokondriyal membran potansiyeli oranları (%).

A,B. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

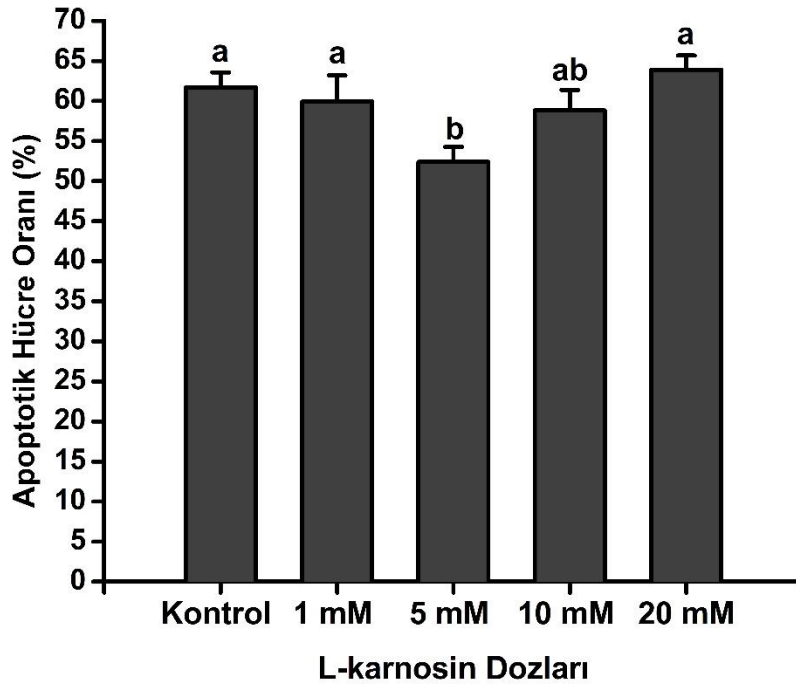
a,b. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 32. Kontrol ve L-karnosin içeren spermallerdeki yüksek/düşük mitokondriyal membran potansiyeli oranlarına ait dot plot görüntüleri. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir.

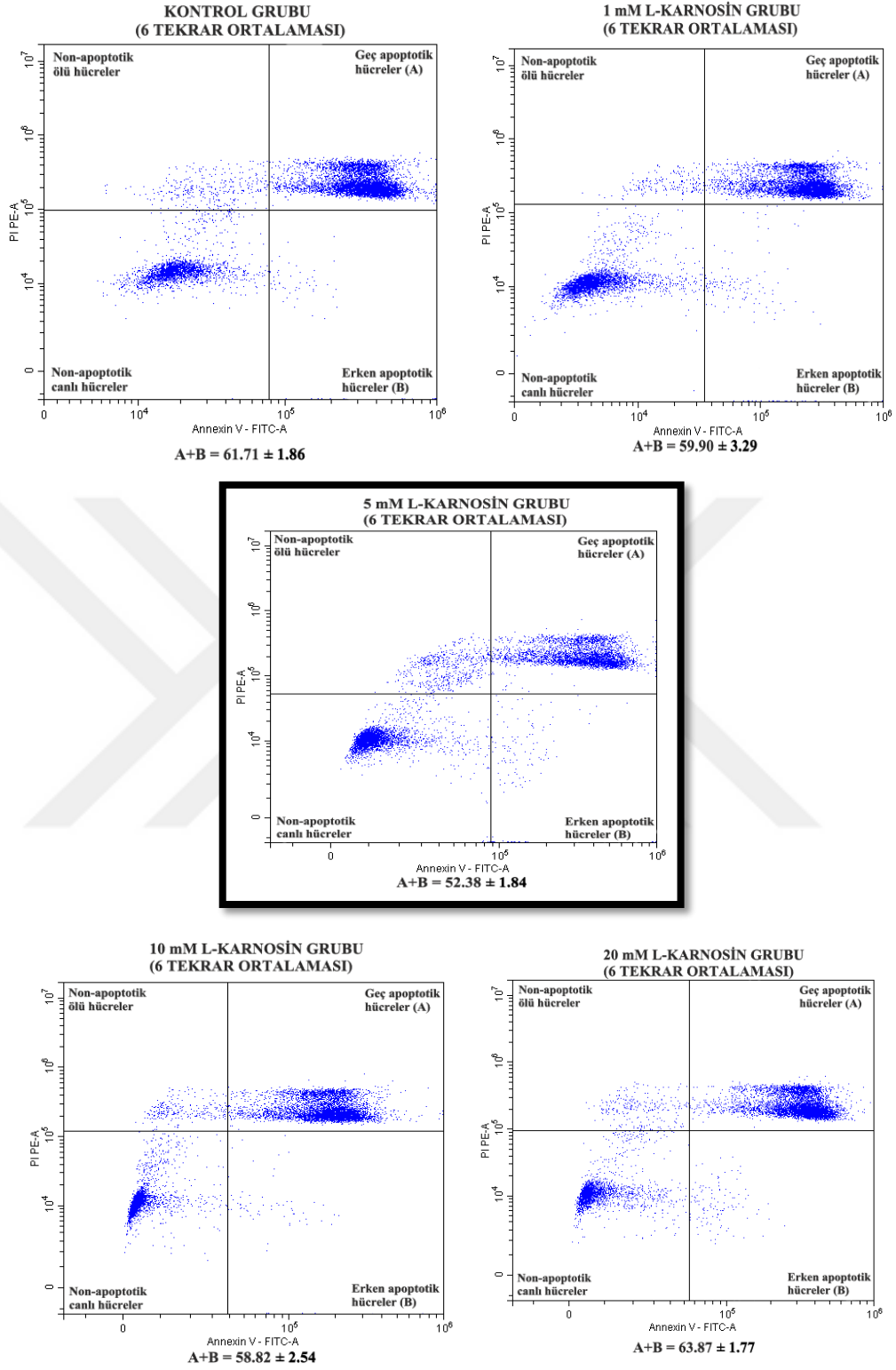
5.2.5.4. Apoptoz Oranları

Kontrol ve L-karnosin dozlarına ait dondurma-çözdürme sonrası elde edilen apoptotik hücre oranları şekil 33’de verilmiştir. Ayrıca tüm gruplar için ortalama değerleri içeren dot plot sitogramları şekil 34’de sunulmuştur. Şekil 33 incelendiğinde kontrol grubu karşılaştırıldığında apoptotik hücre oranının 5 mM L-karnosin dozunda önemli ($p<0.05$) derecede azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 33. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermallerdeki apoptotik hücre oranları (%).

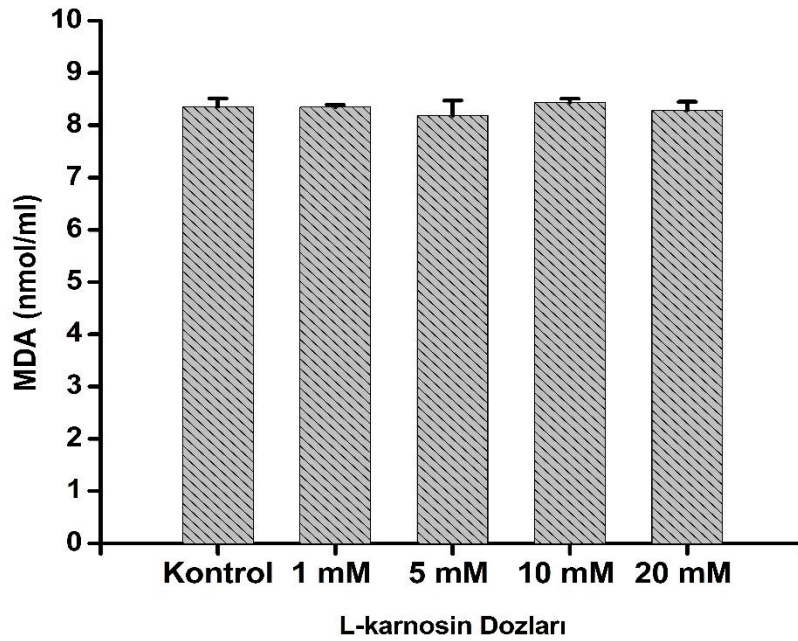
a,b. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



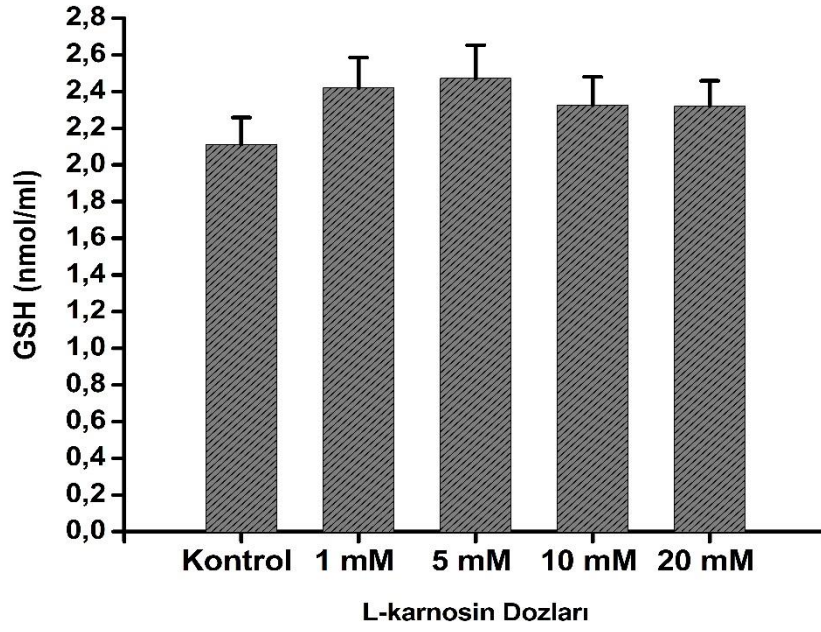
Şekil 34. Kontrol ve L-karnosin içeren spermallerdeki apoptoz oranlarına ait dot plot görüntüleri.
Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

5.2.6. Oksidatif Stres Düzeyleri

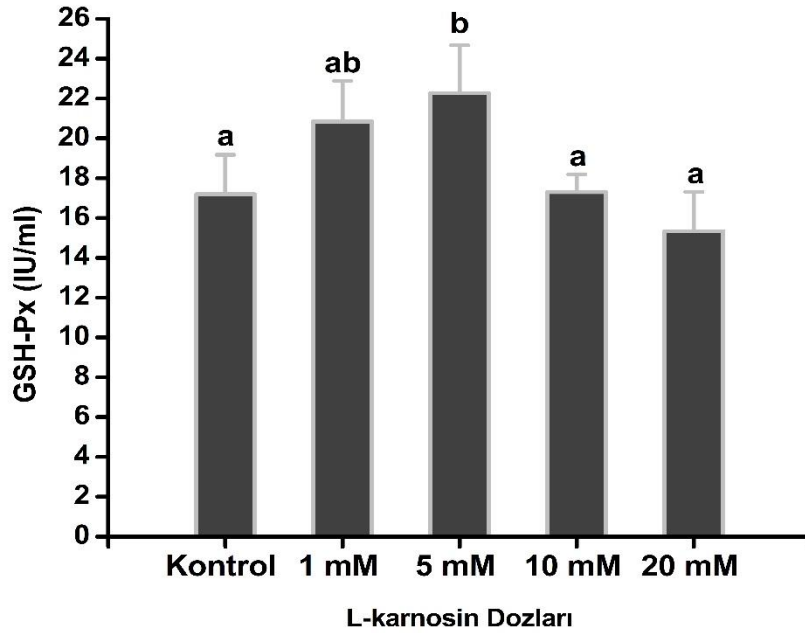
Kontrol ve L-karnosin dozlarına ait dondurma-çözdürme sonrası elde edilen MDA, GSH, GSH-Px ve CAT gibi oksidatif stres parametrelerine ait verilerin grafiksel görünümü sırasıyla şekil 35, 36, 37 ve 38’de sunulmuştur. Şekiller incelendiğinde kontrol ve L-karnosin dozları arasında MDA, GSH ve CAT düzeyleri açısından istatistiksel olarak herhangi bir farklılık tespit edilemezken, 5 mM L-karnosin dozunun kontrol grubuna oranla GSH-Px düzeyini önemli ($p<0.05$) derecede artırdığı gözlenmiştir.



Şekil 35. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermallerdeki MDA düzeyleri.

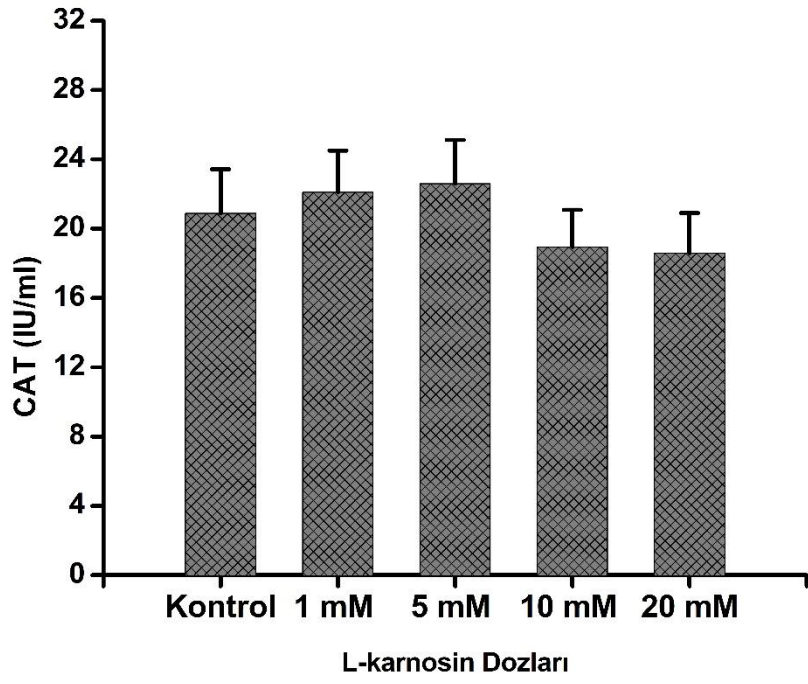


Şekil 36. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermallerdeki GSH düzeyleri.



Şekil 37. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermallerdeki GSH-Px düzeyleri.

a,b. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).



Şekil 38. Kontrol ve L-karnosin içeren dondurulmuş-çözdürülmüş spermallerdeki CAT düzeyleri.

6. TARTIŞMA

6.1. Birinci Aşama (Kısa Süreli Saklama)

Dondurulmuş-çözdürülmüş koç spermalarıyla gerçekleştirilen intraservikal tohumlamalardan elde edilen düşük gebelik oranları, 5°C'de kısa süreli saklama yönteminin daha fazla önemli hale gelmesine neden olmaktadır. Fakat 5°C'de 24 saatten daha fazla saklanan koç spermalarıyla yapılan intraservikal tohumlamalarda da gebelik oranları istenilen düzeylere ulaşamamaktadır (11). Bu nedenle spermada kısa süreli saklama soğuk ortama bağlı olarak birtakım biyokimyasal reaksiyonların şekillenmesine yol açmaktadır. Bu reaksiyonların en önemlilerinden biri ise oksidatif strestir. Oksidatif stres ROS'un artması veya antioksidan düzeyindeki azalma ile oksidatif dengesizliğin oluşması sonucunda ortaya çıkmaktadır (99). Bu süreç spermatozoon plazma zarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin yanı sıra DNA, RNA ve proteinlerde de hasara yol açabilmektedir (100, 101). Bununla birlikte fizyolojik koşullar altında ROS, spermatozoon kapasitasyonu, hipermotilite, hücresel aktivasyon, zona pellucida ile etkileşim ve akrozom reaksiyonu gibi üreme sürecini içeren birçok durum için gereklidir (102). Kısa süreli saklama esnasında artan ROS düzeyleri enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar tarafından güçlü bir şekilde süpürülebilmektedir (103). Bu bağlamda spermanın kısa süreli saklanması sırasında spermatozoonların ömrünün uzatılması amacıyla kullanılan sperma sulandırıcılarına pek çok antioksidan madde ilave edilip çalışmalar yapılmıştır. Antioksidanların katılmasında spermatozoonların LPO hasarlarına karşı korunması hedeflenmiştir. Koçlarda spermanın kısa süreli saklanması amacıyla sperma sulandırıcılarına katılan sisteamin (104), ebselen

(105), taurin (106) ve idebenon (107) gibi antioksidanların LPO miktarını azaltarak spermatozoonların ömrünün uzamasına katkı sağladığı bildirilmektedir.

Adami ve ark. (81) insan spermasına 20 ve 50 mM dozlarında L-karnosin ilavesinin total ve progresif motiliteyi kontrol grubuna oranla artırdığını belirtmişlerdir. Rocha ve ark. (46) aygırlardan aldıkları spermaların seminal plazmalarındaki karnosin seviyelerini ölçtüklerini ve düşük karnosin konsantrasyonu içeren grubun yüksek karnosin konsantrasyonu içeren gruba oranla daha iyi bir total motiliteye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Sunulan çalışmada koç spermasının kısa süreli saklanması 5 mM L-karnosin dozunun total motilite değerlerini 72. saatte kontrol grubuna göre artırdığı, bu artışın istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre 5 mM L-karnosin dozunun 96. saatte, 10 mM L-karnosin dozunun ise 24. saatte progresif motiliteyi istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca tüm zaman dilimlerinde 5 ve 10 mM L-karnosin dozlarının kontrol grubuna göre belirtilen zamanların dışında da istatistiki anlamda önemli olmamasına rağmen sayısal anlamda progresif motiliteyi artırdığı görülmüştür. Kontrol grubuna göre 1 ve 10 mM L-karnosin dozlarının 0. saat hariç diğer zaman dilimlerinde, 5 mM L-karnosin dozunun ise tüm zaman dilimlerinde hızlı motilite değerini sayısal olarak artırdığı belirlenmiştir.

Düşük dozlarda kullanılan L-karnosinin motiliteyi artırıcı etkisinin laktik asidi nötralize etme yeteneği (78), enerjinin korunması için ATP aktivasyonu (45) ve antioksidan özelliklerinden (51, 54, 55, 69) kaynaklandığı düşünülmektedir. L-karnosinin bu antioksidan etkisi lipooksidasyon son ürünü olan LPO'yu baskılayıp ROS ve peroksil radikallerini temizlemesinden ileri gelmektedir (51). Ayrıca birçok

antioksidan maddenin sahip olduğu özellikleri barındıran L-karnosinin, telomerlerin kısalmasını engelleyerek ortaya koyduğu yaşlanma geciktirici etkisi diğerk antioksidanlar da bulunmayan bir özelliktir. Bu yaşlanma karşıtı etkisi ile motilite parametrelerinin daha uzun süre korunmasını ve bu etkisini de L-karnosinin elektrofilik aldehitler ve ketonlarla reaksiyona girerek protein-peptit karbonilasyonunu önleme kabiliyetine bağılı olabileceğı düşünölmektedir (74). L-karnosinin 200 mM dozunun ise tüm zaman dilimlerinde kontrol grubuna göre total motilite, progresif motilite ve hızlı motilite değerklerini azalttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada kanıtlandığı gibi L-karnosinin yüksek dozları ortam pH'sını alkali yönde değıştirerek spermatozoonların yaşaması için gerekli olan şartların kaybolmasına sebep olmaktadır. Ayrıca L-karnosinin hem glikoliz hem de oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji üretimini azaltacak olan glikolitik yolun substratları ile reaksiyona girme özelliğı vardır. Hücresele enerji üretimi için ATP sentezinin ana mekanizması, oksidatif fosforilasyon yoludur. Bu süreç içerisinde enerji üretimini azaltacak olan bazı substratlar (Sitrata, Glukoz fosfat, Fruktoz-2-6-bifosfat) mevcuttur. L-karnosin bu substratlar ile reaksiyona girerek enerji üretiminin önünü açmaktadır (73). Bu nedenle yüksek dozlarda karnosin ilavesinin spermatozoon enerji metabolizmasında değışikliklere neden olabileceğı (45) ve bunun sonucunda motilitede azalmaya neden olabileceğı düşünölmektedir. Bu sebeplerden dolayı 200 mM L-karnosin dozunun spermatozoonlar üzerine toksik etki oluşturduğı tespit edilmiştir.

Adami ve ark., (81) insan spermasının üzerine L-karnosinin etkilerini belirlemek amacıyla, 20 ve 50 mM dozlarında L-karnosin ilavesinin kontrol grubuna oranla kinematik parametrelerden VCL, VSL , VAP ve BCF düzeyini

artırdığını bildirmişlerdir. Rocha ve ark., (46) yaptıkları çalışmada ise düşük dozlarda karnosin ilavesinin spermatozoon kinetiğini artırdığını ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada kontrol grubuna göre 1 ve 10 mM L-karnosin dozlarının 0. saat hariç diğer zaman dilimlerinde, 20 mM L-karnosin dozunun 96. saatte, 5 mM L-karnosin dozunun ise tüm zaman dilimlerinde VCL değerini artırdığı tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre 50 mM L-karnosin dozunun tüm zaman dilimlerinde VCL değerini sayısal olarak azalttığı, 100 mM ve 200 mM L-karnosin dozunun ise 96. saat hariç diğer zaman dilimlerinde istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) derecede azalttığı gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre L-karnosinin 1, 5, 10 ve 20 mM dozlarının VSL değerlerini (0. saat hariç), VAP değerlerini (0. ve 72. saatler hariç) tüm zaman dilimlerinde sayısal olarak artırdığı görülmüştür. Kinematik parametrelerdeki bu artışın L-karnosinin düşük dozlarının enerji metabolizmasını bozmadan oksidatif dengeyi koruması (45) ve mitokondriyal aktiviteyi artırmasından (81) kaynaklandığı düşünülmektedir. L-karnosinin 200 mM dozunun kontrol grubuna göre tüm zaman dilimlerinde VCL, VSL ve VAP değerlerini istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) derecede azalttığı ve toksik etki oluşturduğu belirlenmiştir. Bu azalma L-karnosinin dozunun artmasına paralel olarak spermanın pH değerinin alkali yönde yükselmesiyle ilişkilendirilebilir. Mevcut çalışmada 200 mM L-karnosin dozunun 72. ve 96. saatlerde kontrol grubuna oranla BCF değerini istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Fakat diğer dozların tüm saatlerde kontrol grubuna göre BCF değerinde sayısal bir artış sağladığı belirlenmiştir. Çalışmamız ile Adami ve ark., (81) yaptıkları çalışmanın BCF düzeylerine ait sonuçlar benzerlik göstermektedir. BCF düzeyindeki bu artışın

diğer kinematik parametrelerde olduğu gibi mitokondriyal aktivitenin artmasıyla (81) ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada tüm zaman dilimlerinde 50, 100 ve 200 mM L-karnosin dozlarının kontrol grubuna oranla ALH değerini önemli ($p<0.001$) oranda azalttığı belirlenmiştir. Koç sperma sulandırıcılarına L-karnosin katılarak kısa süreli saklanması sırasında elde edilen ALH verileri literatürdeki ilk verilerdir. Bu azalmanın yüksek dozlarda L-karnosinin spermatozoonların enerji metabolizmasında değişikliklere neden olması (45) sonucunda gerçekleşebileceği düşünülmektedir.

Kawai ve ark., (80) 1, 50 ve 100 mM dozlarında karnosini aygır spermasına ilave ettiklerinde 50 mM karnosin ilavesinin kontrol grubuna oranla spermatozoon plazma membran hasarını azalttığını belirlemişlerdir. Fattah ve ark., (33) horoz spermasının kısa süreli saklanmasında başarı sağlamak amacıyla sperma sulandırıcılarına 0, 0.5, 1, 2, 4 ve 8 mM dozlarında L-karnosin ile aynı dokudan izole edilen L-karnitin maddesini ilave ederek 48 saat süreyle sakladıkları spermalarda, 1 ve 2 mM L-karnitin içeren gruplarda membran bütünlüğünün daha iyi korunduğunu tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada 1, 5, 10 ve 20 mM L-karnosin dozlarının kontrol grubuna göre tüm zaman dilimlerinde spermatozoon membran bütünlüğünü koruyarak sayısal bir artış sağladığı belirlenirken, 200 mM L-karnosin dozunun ise istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) derecede azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Karnosinin temel antioksidan özelliklerinden olan serbest radikallere kolayca hidrojen vermesi (50), hidroksil, peroksil, süperoksit radikali ve singlet oksijen üzerine süpürücü etkisinin olması (59) ve membran

stabilite edici etkisinden dolayı (58) membran bütünlüğünün korunmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada kontrol grubuna göre 1, 5 ve 10 (48.saat hariç) mM L-karnosin dozlarındaki pH artışı istatistiki olarak önemsiz bulunurken 20 (24, 48 ve 96. saatlerde), 50, 100 ve 200 mM L-karnosin dozlarındaki artış istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) bulunmuştur. Bu artışların L-karnosin maddesinin bildirilen pH tamponlayıcı (51) ve laktik asidi nötralize etme (78) yeteneğinden ileri geldiği düşünülmektedir.

Al-Daraji ve ark., (87) ördeklerde sperma kalitesini artırmak amacıyla yaptıkları çalışmada günlük diyetle 50, 100 ve 150 mg/kg dozda L-karnitin ilavesinin kontrol grubuna kıyasla anormal spermatozoon oranını azalttığını bildirmişlerdir. Jacyno ve ark., (85) domuzlarda L-karnitinin sperma kalitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, günlük diyetle 500 mg L-karnitin ilavesinin 5 hafta boyunca toplanan spermalarda kontrol grubuna oranla anormal spermatozoon oranında azalma sağladığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda tüm saat dilimlerinde 200 mM L-karnosin dozu hariç diğer tüm dozların (100 mM, 96. saat hariç) kontrol grubuna oranla anormal spermatozoon oranını istatistiki olarak önemli ($p<0.001$) oranda düşürdüğü belirlenmiştir. Çalışmamız sonuçları ile literatür bilgi uyum göstermektedir. Anormal spermatozoon oranındaki bu azalma L-karnosinin membran stabilite edici etkisi (58) ile ilişkilendirilebilir.

Fattah ve ark., (33) horoz spermasının kısa süreli saklanması başarı sağlamak amacıyla sperma sulandırıcılarına 0, 0.5, 1, 2, 4 ve 8 mM dozlarında L-karnitin ilavesi yapmışlardır. 48 saat süreyle sakladıkları spermalarda, 1 ve 2 mM L-karnitin dozlarının, kontrol grubuna oranla canlılık, membran bütünlüğü ve

mitokondriyal aktivite parametrelerinde artışa, LPO oranında ise azalmaya sebep olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamızda kontrol grubuna göre L-karnosinin 1, 5, 10 ve 20 mM dozlarının akrozomal hasar oranını (72. saat hariç) sayısal olarak azalttığı, 1 ve 5 mM L-karnosin dozlarının yüksek mitokondriyal membran potansiyelini artırdığı (48. saat hariç), 1, 5 ve 10 mM L-karnosin dozlarının ise düşük mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı belirlenmiştir. Fattah ve ark., (33) yaptıkları çalışma ile mevcut çalışmadaki 1, 5, 10 ve 20 mM L-karnosin dozlarının oluşturduğu etkiler benzerlik göstermektedir. Spermatozoonların mitokondrileri, elektron transfer zincirinde taşınan elektronlar sayesinde oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP sentezlemektedir. İç mitokondriyal membranda beş farklı kompleksten meydana gelen çoklu alt birimler bulunmaktadır. Metabolitler, matriks içerisinde bulunur ve enerji sağlamak amacıyla iç membran üzerindeki kompleks I, III ve IV'e hidrojen iyonları ileten bir rol oynamaktadırlar. Elektron transfer zincirinin son proteinlerinden biri olan Sitokrom C, elektronları Kompleks III'ten alır ve bu elektronları sitokrom oksidaza indirger, böylece Kompleks IV'e aktarır. Kompleks IV, bu elektronlar kullanılarak ATP üretimini gerçekleştirmekte ve bu sürecin sonunda Kompleks V tarafından ATP üretilmektedir (108). Yüksek mitokondriyal membran potansiyeli üzerine belirlenen olumlu etkiler L-karnosinin Sitokrom C'yi etkilemesi sonucunda mitokondriyal fonksiyonları ve enerji üretimini artırması (109) ve membran stabilite edici etkisi (58) ile açıklanabilmektedir. Kontrol grubuna oranla 200 mM L-karnosin dozunun tüm zaman dilimlerinde ölü spermatozoon oranını, akrozomal hasar oranını (96. saat hariç) ve düşük mitokondriyal membran potansiyelini artırdığı, canlı spermatozoon oranını ve yüksek mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı tespit edilmiştir

($p < 0.001$). L-karnosinin 200 mM dozunun sebep olduğu bu olumsuz etkilerin ortam pH'sının alkali yönde yükselmesi ve spermatozoon enerji metabolizmasında değişikliklere neden olması (45) sonucunda gerçekleştiği düşünölmektedir. Bu çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100 mM L-karnosinin 0. saatteki GSH-Px düzeyinde önemli artışa, 96. saatteki düzeyinde ise önemli azalmaya neden olmuştur. MDA, GSH ve CAT değerleri bakımından her iki zaman diliminde de gruplar arasında gözlenen farklılıklar istatistiki öneme ulaşamamıştır. GSH-Px düzeyindeki önemli farklılıkların nedeni tam olarak bilinmemekte olup daha detaylı moleküler analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

6.2. İkinci Aşama (Uzun Süreli Saklama)

Dondurma-çözdürme işlemleri esnasında meydana gelen sıcaklık değişimi, memeli spermatozoonlarında fiziksel ve kimyasal strese yol açarak plazma membranındaki lipid kompozisyonunda değişikliğe neden olmaktadır (110, 111). Koç spermatozoonları yapısal özelliklerinden dolayı soğuk şoku hasarlarına karşı oldukça hassastır (14). Bu hassasiyet için, epididimal olgunlaşma esnasında koç spermatozoonlarının kolesterol:fosfolipid oranı, fosfatidilserin, kardiyolipin, fosfatidiletanolamin ve etanolamin plazmalojen konsantrasyonlarında şekillenen azalmalar (15, 16) ile doymamış yağ asidi miktarlarında meydana gelen artışlar (16) muhtemel neden olarak gösterilmektedir. Bu sebeplerden dolayı ejakölasyon sonucu elde edilen olgunlaşmış koç spermatozoonlarındaki total fosfolipid ve kolesterol düzeyleri düşük seviyede kalmaktadır. Bu durumun aksine doymamış yağ asitlerinin miktarı yüksek seviyede seyretmektedir. Koç spermatozoonlarının plazma membranlarının doymamış yağ asidi seviyesi açısından yüksek düzeyde seyir göstermesi ve termodinamik özelliğinden dolayı bu türün spermasının

dondurulması ve çözündürülmesi esnasında spermatozoonların membranlarında geriye dönüşümsüz termotropik lipid faz geçişleri (sıvı fazdan jel fazına geçmesi) meydana gelmektedir.

L-karnosin ile aynı dokudan izole edilen L-karnitin maddesi kullanılarak yapılan sperma dondurma çalışmalarına bakıldığında; horoz sperması sulandırıcısına 1-2 mM L-karnitin ilavesinin dondurma-çözdürme sonrası kontrol grubuna kıyasla total ve progresif motilitede artış, 8 mM L-karnitin ilavesinin ise motilitede azalma meydana getirdiği bildirilmiştir (88). Koçlarda spermanın dondurulabilirliği üzerine yapılan çalışmada sperma sulandırıcılarına 50 mM ve üzerindeki karnosin ilavesinin motilitede düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (83). Bir diğer çalışmada ise aygır sperma sulandırıcısına 50 mM'lık karnosin ilavesinin dondurma-çözdürme işlemi sonrasında kontrol grubuna oranla total, progresif motilite ve hızlı spermatozoon oranını artırdığı ileri sürülmüştür (80). Losano ve ark., (90) köpeklerde farklı karnosin dozlarının spermaya ilavesinin dondurulma-çözdürülme üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada dondurma-çözdürme sonrası 50 ve 100 mM karnosin ilavesinin kontrol grubuna göre total ve progresif motilite düzeylerini azalttığını bildirmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada spermalara katılan 1, 5, 10, 20 mM L-karnosin dozlarının ise $p<0.05$ düzeyinde total motiliteyi arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca dondurma-çözdürme işlemi sonrası kontrol grubuna göre 5, 10 ve 20 mM L-karnosin dozlarının progresif motilite oranını $p<0.01$ düzeyinde artırdığı gözlenmiştir. Aynı dozların hızlı hareket eden spermatozoon oranında da artış sağladığı ve artışların istatistiki olarak önemli ($p<0.01$) olduğu belirlenmiştir. Orta hızda hareket eden spermatozoon oranında en fazla 5 mM dozunda artış olduğu

ancak bu artışın istatistiki olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir. Yavaş hızda hareket eden spermatozoon oranlarının kontrol grubuna göre 5, 10 ve 20 mM L-karnosin gruplarında önemli ($p<0.001$) oranda meydana gelmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında yüksek dozlarda kullanılan L-karnosin'in sperma üzerine görülen olumsuz etkilerinden dolayı bu aşamada 50, 100 ve 200 mM L-karnosin dozları kullanılmamıştır. Çalışmalar arasındaki aynı dozlarda görülen farklı motilite sonuçlarının tür farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmada elde ettiğimiz düşük dozlarda L-karnosinin motiliteyi artırıcı etkisi membran koruyucu (58), pH tamponlama, enerjinin korunması ve lipooksidasyon son ürünü olan LPO'yu baskılaması ile açıklanabilir (51). Ayrıca L-karnosinin hidroksil serbest radikalini doğrudan nötralize etme eğiliminde olması (44) ve düşük doz L-karnosinin enerji metabolizmasını bozmadan oksidatif dengeyi koruyabilmesinin (45) motilite üzerine olumlu etki yapan diğer faktörler olduğu düşünülmektedir.

Ayır spermalarının dondurulması amacıyla yapılan bir çalışmada karnosinin 100 mM'lık dozunun kontrol grubuna oranla ALH düzeyinde artış sağladığı bildirilmiştir (80). Koçlarda spermanın başarılı bir şekilde dondurulmasında L-karnitin'in etkinliğini belirlemek amacıyla L-karnitin içeren (0, 5 ve 10 mM) tris+yumurta sarısı sulandırıcısı ve hazır sperma sulandırıcısı (optiXcell™ - IMV Technologies, L'Aigle, Fransa) olmak üzere iki farklı sulandırıcı çeşidi ile sperma dondurma işleminin gerçekleştirildiği bir çalışmada, 5-10 mM L-karnitin+tris+yumurta sarısı içeren grubun diğer sulandırıcıyı içeren gruba oranla spermatozoon kinematik parametrelerinde iyileştirmeler oluşturduğu ileri sürülmüştür (89). Köpeklerde farklı karnosin dozlarının spermaya ilavesinin dondurma-çözdürme üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada

kontrol grubuna göre 50 mM karnosin ilavesinin VAP, VSL ve VCL düzeylerinde azalmaya sebep olduğunu iddia etmişlerdir. BCF, ALH, STR ve LIN düzeylerinde ise kontrol ve karnosin dozları arasında herhangi bir farklılık tespit edilememiştir (90).

Sunulan çalışmada in vitro olarak sperma sulandırıcısına katılan L-karnosin dozlarının dondurma-çözdürme işlemi sonrası VCL, VSL, VAP, STR, WOB, LIN, BCF ve ALH değerlerini sayısal anlamda artırdığı tespit edilmiştir. Verilen literatür bilgide yüksek dozlarda L-karnosinin kinematik parametreler üzerine etkileri ortaya koyulmuştur. Bu çalışmada ise kullandığımız düşük dozların dondurma-çözdürme sonrası spermatozoon kinetiği üzerine istatistiksel anlamda herhangi bir etkisi bulunamamıştır.

Ayır spermalarının dondurulması amacıyla karnosin aminoasidinin 1, 50 ve 100 mM'lık dozlarının sperma sulandırıcılarına ilave edildiği bir çalışmada, dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinde 50 mM karnosin dozunun, kontrol grubuna oranla plazma membran hasarını azalttığı belirtilmiştir (80). L-karnitin maddesi kullanılarak horoz spermalarının dondurulması amacıyla yapılan başka bir çalışmada ise sperma sulandırıcısına 1-2 mM L-karnitin ilavesinin dondurma-çözdürme sonrası kontrol grubuna kıyasla daha yüksek membran bütünlüğü sağladığı tespit edilmiştir (88). Koçlarda spermanın başarılı bir şekilde dondurulması amacıyla kullanılan L-karnitin (0, 5 ve 10 mM) tris+yumurta sarısı sulandırıcısı ve hazır sperma sulandırıcısı (optiXcell™ - IMV Technologies, L'Aigle, Fransa) olmak üzere iki farklı kombinasyonu ile sperma dondurma işleminin gerçekleştirildiği bir çalışmada, 5-10 mM L-karnitin+tris+yumurta sarısı

içeren grubun diğer sulandırıcıyı içeren gruba oranla plazma membran bütünlüğünde iyileştirmeler sağladığı ileri sürülmüştür (89).

Yapılan bu çalışmada kontrol grubuna göre 5 mM L-karnosin dozu başta olmak üzere diğer L-karnosin dozlarının spermatozoonların membran bütünlüğünü koruyarak artış sağladığı ve bu artışın da istatistiki olarak $p < 0.05$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir. Membran bütünlüğünün korunmasında L-karnosin maddesinin membran koruyucu özelliğinin (58) etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca L-karnosinin LPO'yu ve protein oksidasyonunu inhibe etmesi, ROS'u baskılaması, peroksil ve hidroksil radikallerini temizlemesi (51), hücre içi tamponlayıcı bir madde olması (52, 53), reaktif aldehytleri süpürmesi (54, 55), nonenal ve HNE gibi gelişmiş lipid oksidasyonu ürünlerini süpürmesi (69) gibi antioksidatif etkileri sayesinde de hücre membranını koruduğu düşünülmektedir. Nitekim 5 mM L-karnosinin GSH-Px düzeyinde önemli artış sağlaması bu teoremi desteklemektedir.

Çalışmamızda L-karnosin maddesinin dozlarındaki artışa paralel olarak pH miktarının da alkali yönde arttığı belirlenmiştir. Tüm L-karnosin dozlarının hem kendi aralarında hem de kontrol ile olan karşılaştırmalarında istatistiksel anlamda farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.001$). L-karnosinin pH üzerine etkisi ile ilgili koçlarda herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bulgular literatürde ilk bulgular olarak düşünülmektedir. pH değerindeki artışın L-karnosinin bilinen pH tamponlayıcı (51) ve laktik asidi nötralize etme yeteneğinden (78) kaynaklandığı düşünülmektedir.

Horoz spermasının dondurulması amacıyla yapılan bir çalışmada sperma sulandırıcısına 1-2 mM L-karnitin ilavesinin dondurma-çözdürme sonrası

spermatozoon morfolojisi açısından herhangi bir farklılığa sebep olmadığı bildirilirken (88), bitkisel antioksidanlardan likopenin 3 farklı dozunun (800 µg, 1600 µg 3200 µg) kullanıldığı bir çalışmada, düşük dozun koçlarda dondurma-çözdürme sonrası spermatozoon morfolojisini korumada etkin bir role sahip olduğu bildirilmiştir (112). Bu çalışmada sperma sulandırıcılarına ilave edilen 1, 5, 10 ve 20 mM L-karnosin dozlarının kontrol grubuna göre dondurma-çözdürme sonrası anormal spermatozoon oranını istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) düzeyde azalttığı ve en önemli azalışın 5 mM dozunda olduğu görülmüştür. Bu parametre ile ilgili literatürde herhangi bir L-karnosin çalışmasına rastlanılmamıştır. Ancak L-karnosin ile aynı dokudan izole edilen L-karnitin ve diğer antioksidanlarla ilgili çalışmalar mevcuttur. L-karnosin maddesinin membran koruyucu etkisi (58) ve antioksidan özelliği (51, 54, 55, 69) sayesinde anormal spermatozoon oranında azalma sağladığı düşünülmektedir.

Bazı araştırmacılar (88) horoz sperması sulandırıcısına 1-2 mM L-karnitin ilavesinin dondurma-çözdürme sonrası kontrol grubuna kıyasla canlı spermatozoon oranını ve mitokondriyal aktiviteyi artırdığını, apoptotik hücre oranını ise azalttığını ileri sürmüşlerdir. Horoz spermasının dondurulması amacıyla yapılan bir başka çalışmada (86) ise 1 mM L-karnitin ilavesinin kontrol grubuna göre dondurma-çözdürme sonrası spermatozoonlarda apoptoz ve DNA hasarı oranını azalttığı, mitokondriyal aktivite oranını artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca 1 ve 5 mM L-karnitin dozlarının ise kontrol grubuna göre LPO'ya uğramamış canlı spermatozoon oranını artırdığı bildirilmiştir. Aygır spermasının dondurulması amacıyla karnosin aminoasidinin 1, 50 ve 100 mM'lık dozlarının sperma sulandırıcılarına ilave edilerek yapılan bir çalışmada 50 mM karnosin dozunun

kontrol grubuna oranla çözüm sonu mitokondriyal membran potansiyelini artırdığı rapor edilmiştir (80). Bir başka araştırmada ise 1 g/l L-karnitinin dondurulmuş-çözdürülmüş asthenozoospermik ve normozoospermik insan spermasındaki canlı spermatozoon oranında artış sağladığı bildirilmiştir (84). Günlük diyet 500 mg L-karnitin ilavesinin 5 hafta boyunca toplanan domuz spermalarındaki akrozomal hasar oranını azalttığı öne sürülmektedir (85). Benzer şekilde ördeklerde 50-150 mg/kg L-karnitin ilavesinin ölü ve akrozomal anomaliye sahip spermatozoon oranını azalttığı iddia edilmektedir (87).

Çalışmamızda L-karnosinin 5 mM dozunun kontrol grubuna göre ölü spermatozoon oranını, akrozomal hasarı, düşük mitokondriyal membran potansiyelini ve apoptoz oranını önemli ($p<0.05$) ölçüde azalttığı, canlı spermatozoon oranını ve yüksek mitokondriyal membran potansiyelini önemli ($p<0.05$) ölçüde artırdığı belirlenmiştir. L-karnosinin koç spermasının dondurma-çözdürme sonrası flow-sitometrik analizler üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir literatür bilgiye rastlanılmamıştır. Çalışmamızda bildirilen dondurma-çözdürme sonrası ölü spermatozoon oranı, akrozomal hasar oranı ve apoptoz oranı ile ilgili veriler ilk literatür bilgi olması nedeniyle önemlidir. Spermatozoonların enerji kaynağı için iki ana mekanizma vardır ve bunlar glikolitik yol ve oksidatif fosforilasyondur. Spermatozoonların kuyruk bölümünün orta kısmında mitokondri tarafından üretilen ATP'nin kuyruğun distal kısımlarına olan difüzyonu bazen yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle L-karnosin aminoasidinin düşük dozları glikolitik yol ile flageller atım için oksidatif fosforilasyonun tamamlayıcısı olarak hareket etmektedir (45). Mevcut çalışmada dondurma-çözdürme sonrası 5 mM L-karnosin dozunun kontrol grubuna göre yüksek mitokondriyal membran potansiyeli düzeyini

artırıp, düşük mitokondriyal membran potansiyeli düzeyini azaltmasına dayanak oluşturmaktadır. Bu çalışmada 5 mM L-karnosin dozu ile flow-sitometrik parametrelerde elde edilen olumlu etki L-karnosinin sağladığı uygun pH koşulları, membran koruyucu etkisi (58), DNA hasarını önleyici etkisi (61), spermatozoon enerji metabolizması üzerindeki etkisi (45) ve antioksidan özelliğinden (51, 54, 55, 69) kaynaklanmış olabilir.

Koçlarda (89) ve horozlarda (88) dondurma-çözdürme işleminin indüklediği spermatozoon hasarlarının önlenmesi amacıyla sperma sulandırıcılarına karnitin ilavesinin çözüm sonu LPO oranlarını azalttığı bildirilmiştir.

Sunulan çalışmada antioksidan parametreler açısından kontrol grubuna göre 5 mM L-karnosin dozunun MDA seviyesini sayısal olarak azalttığı, GSH düzeyi ve CAT aktivitesini sayısal olarak artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca kontrol grubuna göre 5 mM L-karnosin dozunun GSH-Px aktivitesini önemli ($p<0.05$) derecede artırdığı tespit edilmiştir. Koçlarda L-karnosin kullanılarak spermanın dondurulup-çözdürülmesi sonrası oksidatif stres düzeylerinin ölçümü ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda 5 mM dozun L-karnosinin antioksidan özelliklerini en iyi düzeyde ortaya çıkardığı tespit edilmiştir. Bu durumun L-karnosinin LPO'yu ve protein oksidasyonunu inhibe etmesi, ROS'u baskılaması, peroksil ve hidroksil radikallerini temizlemesi, reaktif aldehytleri süpürmesi, nonenal ve HNE gibi gelişmiş lipid oksidasyonu ürünlerini süpürmesi gibi antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (51, 54, 55, 69).

7. SONUÇ ve ÖNERİLER

Koç spermasının kısa süreli saklanması 1, 5, 10, 20 mM L-karnosin dozlarının total motilite, progresif ve hızlı motilite, kinematik parametrelerden VCL, VSL, VAP değerlerini ve yüksek mitokondriyal membran potansiyelini artırdığı, membran bütünlüğünü koruduğu, anormal spermatozoon oranı, akrozomal hasar ve düşük mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı belirlenmiştir. L-karnosinin 200 mM dozunun ise toksik etki göstererek parametreleri olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir.

Koç spermasının dondurulmasında ise 5 mM L-karnosin dozunun analizlerde öne çıktığı ve bu dozun total, progresif ve hızlı motiliteyi, canlı spermatozoon oranını, yüksek mitokondriyal membran potansiyelini ve GSH-Px aktivitesini önemli ölçüde artırdığı, bunun yanında spermatozoonun membran bütünlüğünü koruduğu, anormal spermatozoon oranı, akrozomal hasar, apoptotik hücre oranı, ölü spermatozoon oranı ve düşük mitokondriyal membran potansiyelini önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda tüm parametreler açısından değerlendirilen sperma numunelerinde en etkin doz olan 5 mM L-karnosinin spermatozoonlar için en uygun ortam pH'sı (6.89 ± 0.12) sağladığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, koç sperması kısa süreli olarak saklanmak istendiğinde 1 ile 20 mM arasında, uzun süreli saklanmak istendiğinde ise 5 mM L-karnosin dozunun sperma sulandırıcılarına ilave edilmesinin faydalı olacağı ve spermanın başarılı bir şekilde saklanmasına katkı sağlayacağı önerilmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Kaymakçı M, Eliçin A, Tuncel E, Pekel E, Karaca O, Işın F, et al. Türkiye’de küçükbaş hayvan yetiştiriciliği. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi 2000; 2: 765-793.
2. Günlü A, Mat B. Türkiye Ekonomisinde Koyun-Keçi Yetiştiriciliğinin Yeri ve Önemi. Kuzu ve Oğlak Kayıplarının Önlenmesinde Koyun Keçi Sağlığı ve Yetiştiriciliği 2021; 1: 3-14.
3. Akçapınar H. Koyun yetiştiriciliği. 2.Baskı ed, İsmat Matbaacılık Ltd.Şti: Ankara, 2001.
4. Bearden MT, Faquay CF. Applied Animal Reproduction. 3 rd ed, Englrwoods Cliffs: New Jersey, 1992.
5. Türkiye İstatistik Kurumu. Hayvansal Üretim İstatistikleri. <https://data.tuik.gov.tr> /Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-2022 09.02.2023
6. Ertuğrul M, Dellal G, Soysal İ, et al. Türkiye yerli koyun ırklarının korunması. Bursa Uludağ Üniv Ziraat Fak Derg 2009; 23(2): 97-119.
7. Kaya A, Birler S, Enwall L, Memili E. Determinants of sperm morphology. Animal Andrology: Theories and Applications. Wallingford, UK: CAB International, 2014; 34-56.
8. Curry M, Millar J, Watson P. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations. Biol Reprod 1994; 51(5): 1014-1021.
9. Ak K, İleri İK, Pabuccuoğlu S. Koyunlarda Reprodüksiyon Ve Sun’i Tohumlama. İçinde Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun’i Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını 2005: 138, 189-204.
10. Eppleston J, Maxwell W. Recent attempts to improve the fertility of frozen ram semen inseminated into the cervix [review].[Conference paper]. Wool Technology and Sheep Breeding (Australia), 1993; 41: 3.
11. Maxwell W, Salamon S. Liquid storage of ram semen: a review. Reprod Fertil Dev 1993; 5(6): 613-638.
12. Bailey JL, Bilodeau J, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. J Androl 2000; 21(1): 1-7.
13. Türk G. Reaktif oksijen türlerinin spermatozoon fonksiyonları üzerindeki fizyolojik ve patolojik etkileri. Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics 2015; 1(3): 26-34.
14. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci 2000; 60: 481-492.
15. Quinn P, White I. Phospholipid and Cholesterol Content of Epididymal and Jaculated Ram Spermatozoa and Seminal Plasma in Elation to Cold Shock. Aust J Biol Sci 1967; 20(6): 1205-1216.
16. Scott T, Voglmayr J, Setchell B. Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. Biochem J 1967; 102(2): 456.
17. Salamon S, Maxwell W. Storage of ram semen. Anim Reprod Sci 2000; 62(1-3): 77-111.

18. Salamon S, Maxwell W. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 1995; 37(3-4): 185-249.
19. Nur Z, Zık B, Üstüner B, Tütüncü Ş, Sağırkaya H, Özgüden CG. Effect of freezing rate on acrosome and chromatin integrity in ram semen. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2011; 58: 267-272.
20. Omur A, Çoyan K. Protective effects of the antioxidants curcumin, ellagic acid and methionine on motility, mitochondrial transmembrane potential, plasma membrane and acrosome integrity in freeze-thawed Merino ram sperm. *Vet Med* 2016; 1: 10-16.
21. Özer Kaya Ş, Gür S, Kaya E. Effect of l-arginine addition on long-term storability of ram semen. *Andrologia* 2018; 50(4): e12945.
22. Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull* 1993; 49(3): 700-718.
23. Shinde A, Ganu J, Naik P. Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: a review. *J Dent All Sci* 2012; 1(2): 63.
24. Aydılek N, Aksakal M. Testosteronun tavşanlarda karaciğer antioksidan sistemi üzerine etkisi. *Van Vet J* 2003; 14(2): 22-25.
25. Rossell J. Measurement of rancidity. *Appl. Sci. Publ. Ltd., Ripple Road, Barking, Essex, UK.* 1983; 21-46.
26. Cuvelier ME, Richard H, Berset C. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Biosci Biotechnol Biochem* 1992; 56(2): 324-325.
27. Cheeseman K, ve Slater T. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 1993; 49(3): 481-493.
28. Kim JG, Parthasarathy S. Oxidation and the spermatozoa. in *Seminars in reproductive endocrinology*. Copyright© 1998 by Thieme Medical Publishers, Inc. 1998; 235-339.
29. Türk G. Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler. *Marmara Pharm. J.* 2013; 17.2: 73-92.
30. Allai L, Druart X, Contell J, Louanjli N, Ben Moula A, Badi A, et al. Effect of argan oil on liquid storage of ram semen in Tris or skim milk based extenders. *Anim Reprod Sci* 2015; 160: 57-67.
31. Bucak MN, Akalın PP, Keskin N, Bodu M, Öztürk AE, İli P, et al. Combination of fetuin and trehalose in presence of low glycerol has beneficial effects on freeze-thawed ram spermatozoa. *Andrology* 2021; 9(3): 1000-1009.
32. Güngör İH, Tektemur A, Arkali G. et al. Effect of freeze–thawing process on lipid peroxidation, miRNAs, ion channels, apoptosis and global DNA methylation in ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2021; 33(14): 747-759.
33. Fattah A, Sharafi M, Masoudi R, et al. L-carnitine is a survival factor for chilled storage of rooster semen for a long time. *Cryobiology* 2017; 74: 13-18.
34. Zhou X, Liu F, Zhai S. Effect of L-carnitine and/or L-acetyl-carnitine in nutrition treatment for male infertility: a systematic review. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16: 383.

35. Ahmadi S, Bashiri R, Ghadiri-Anari A, et al. Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review. *Int J Reprod Biomed* 2016; 14(12): 729.
36. Özge K, Sedef EL. Biyoaktif bir gıda bileşeni L-karnitin: Beslenme ve sağlık açısından önemi ve biyoyararlılığı. *TÜBAV Bilim Dergisi* 2011; 4(2): 97-102.
37. Manee-In S, Parmornsupornvichit S, Kraiprayoon S, et al. L-carnitine supplemented extender improves cryopreserved-thawed cat epididymal sperm motility. *AJAS* 2014; 27(6): 791.
38. Boldyrev A. Carnosine: new concept for the function of an old molecule. *Biochemistry (Moscow)*. 2012; 77(4): 313-326.
39. Wu G. Important roles of dietary taurine, creatine, carnosine, anserine and 4-hydroxyproline in human nutrition and health. *Amino Acids* 2020; 1-32.
40. Horinishi H, Grillo M, Margolis FL. Purification and characterization of carnosine synthetase from mouse olfactory bulbs. *J Neurochem* 1978; 31(4): 909-919.
41. Teufel M, Saudek V, Ledig JP, et al. Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *J Biol Chem* 2003; 278(8): 6521-6531.
42. Otani H, Okumura N, Hashida-Okumura A, Nagai K. Identification and characterization of a mouse dipeptidase that hydrolyzes L-carnosine. *J Biol Chem* 2005; 137(2): 167-175.
43. Aldini G, Orioli M, Rossoni G, et al. The carbonyl scavenger carnosine ameliorates dyslipidaemia and renal function in Zucker obese rats. *J Cell Mol Med* 2011; 15(6): 1339-1354.
44. Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev* 2013; 93: 1803-1845.
45. Rocha CC, Kawai GK, Losano JD, et al. Carnosine as malondialdehyde scavenger in stallion seminal plasma and its role in sperm function and oxidative status. *Theriogenology* 2018; 119: 10-17.
46. Rocha CC. Identification and quantification of carnosine in seminal plasma, seminal characteristics and freezing of semen from stallions. *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo: São Paulo*. 2017; 91.
47. Sarkar PK, Egusa A, Matsuzaki M, Sasanami T. Effect of Anserine and Carnosine on Sperm Motility in the Japanese Quail *Poult Sci J* 2020; 0200071.
48. Vistoli G, Straniero V, Pedretti A, et al. Predicting the physicochemical profile of diastereoisomeric histidine-containing dipeptides by property space analysis. *Chirality* 2012; 24(7): 566-576.
49. Hipkiss AR, Michaelis J, Syrris P. Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide l-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. *FEBS letters* 1995; 371(1): 81-85.
50. Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC, Ames BN. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *PNAS* 1988; 85(9): 3175-3179.

51. Barca A, Ippati S, Urso E, et al. Carnosine modulates the Sp1-Slc31a1/Ctr1 copper-sensing system and influences copper homeostasis in murine CNS-derived cells. *Am J Physiol* 2019; 316(2): 235-245.
52. Quinn PJ, Boldyrev AA, Formazuyk VE. Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications. *Mol Aspects Med* 1992; 13(5): 379-444.
53. Boldyrev A. Problems and perspectives in studying the biological role of carnosine. *Biochemistry (Mosc)* 2000; 65(7): 751-6.
54. Hipkiss AR, Preston JE, Himsworth DTM, et al. Pluripotent protective effects of carnosine, a naturally occurring dipeptide. *Ann NY Acad Sci* 1998; 854(1): 37-53.
55. Hipkiss AR. Carnosine and protein carbonyl groups: a possible relationship. *Biochemistry (Mosc)* 2000; 65(7): 771-778.
56. Hipkiss AR, Preston JE, Himsworth DT, Worthington VC, Abbot NJ. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. *Neuroscience letters* 1997; 238(3): 135-138.
57. Hipkiss AR. Could carnosine be a naturally-occurring scavenger for acrolein and other reactive aldehydes in the brain? *Rejuvenation Res* 2004; 7(4): 253-256.
58. Cho C, Luk C, Ogle C. The membrane-stabilizing action of zinc carnosine (Z-103) in stress-induced gastric ulceration in rats. *Life Sci* 1991; 49(23): 189-194.
59. Xie Z, Baba SP, Sweeney BR, Barski OA. Detoxification of aldehydes by histidine-containing dipeptides: from chemistry to clinical implications. *Chem Biol Interact* 2013; 202(1-3): 288-297.
60. Babizhayev MA, Seguin MC, Gueyne J, et al. L-Carnosine (β -alanyl-L-histidine) and carcine (β -alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl-radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *Biochem J* 1994; 304(2): 509-516.
61. Mozdhan M, Szemraj J, Rysz J, Nowak D. Antioxidant properties of carnosine re-evaluated with oxidizing systems involving iron and copper ions. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 96(5): 352-360.
62. Egorov SY, Kurella EG, Boldyrev AA, Krasnovsky Jr AA. Quenching of singlet molecular oxygen by carnosine and related antioxidants. Monitoring 1270-nm phosphorescence in aqueous media. *IUBMB Life* 1997; 41(4): 687-694.
63. Hartman PE, Hartman Z, Ault KT. Scavenging of singlet molecular oxygen by imidazole compounds: high and sustained activities of carboxy terminal histidine dipeptides and exceptional activity of imidazole-4-acetic acid. *Photochem Photobiol* 1990; 51(1): 59-66.
64. Hsieh CL, Ho YC, Lai HH, Yen GC. Inhibitory effect of carnosine and anserine on DNA oxidative damage induced by Fe²⁺, Cu²⁺ and H₂O₂ in lymphocytes. *J Food Drug Anal* 2002; 10(1): 47-54.
65. Shao L, Li Q, Tan Z. L-carnosine reduces telomere damage and shortening rate in cultured normal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(2): 931-936.

66. Klebanov GI, Teselkin YO, Babenkova IV, et al. Evidence for a direct interaction of superoxide anion radical with carnosine. *IUBMB Life* 1997; 43(1): 99-106.
67. Fontana M, Pinnen F, Lucente G, Pecci L. Prevention of peroxynitrite-dependent damage by carnosine and related sulphonamido pseudodipeptides. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(3): 546-551.
68. Hipkiss AR, Worthington VC, Himsworth DT, Herwig W. Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1998; 1380(1): 46-54.
69. Zhou S, Decker EA. Ability of carnosine and other skeletal muscle components to quench unsaturated aldehydic lipid oxidation products. *J Agric Food Chem* 1999; 47(1): 51-55.
70. Hipkiss AR, Michaelis J, Syrris P, Kumar S, Lam Y. Carnosine Protects Proteins Against in vitro Glycation and Cross-Linking. *Biochem Soc Trans* 1994; 22 (4): 399S.
71. Yilmaz Z, Kalaz EB, Aydın AF, et al. The effect of carnosine on methylglyoxal-induced oxidative stress in rats. *Arch Physiol Biochem* 2017; 123(3): 192-198.
72. Hipkiss A, Brownson C. A possible new role for the anti-ageing peptide carnosine. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57(5): 747-753.
73. Holliday R, McFarland G. Inhibition of the growth of transformed and neoplastic cells by the dipeptide carnosine. *Br J. Cancer* 1996; 73(8): 966-971.
74. Hipkiss AR. Carnosine, a protective, anti-ageing peptide? *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30(8): 863-868.
75. Boldyrev AA, Dupin AM, AYa B, Babizhaev M, Severin SE. The antioxidative properties of carnosine, a natural histidine containing dipeptide. *Biochem Int* 1987; 15(6): 1105-1113.
76. Boldyrev AA, Dupin AM, Pindel EV, Severin SE. Antioxidative properties of histidine-containing dipeptides from skeletal muscles of vertebrates. *Comparative Biochemistry and physiology. Comp Biochem Physiol B* 1988; 89(2): 245-250.
77. Son DO, Satsu H, Kiso Y, Totsuka M, Shimizu M. Inhibitory effect of carnosine on interleukin-8 production in intestinal epithelial cells through translational regulation. *Cytokine* 2008; 42(2): 265-276.
78. Davey C. The significance of carnosine and anserine in striated skeletal muscle. *Arch Biochem* 1960; 89(2): 303-308.
79. Sewell DA, Harris RC, Marlin DJ, Dunnett M. Estimation of the carnosine content of different fibre types in the middle gluteal muscle of the thoroughbred horse. *Physiol J* 1992; 455(1): 447-453.
80. Kawai GKV. Effect of carnosine on the protection against cryoinjuries in semen of good and bad freezers' stallions. *Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia: São Paulo.* 2017; 89.
81. Adami LNG, de Lima BT, Andretta RR, Bertolla RP, Nichi M. Carnosine treatment during human semen processing by discontinuous density gradient. *Andrologia* 2020; 52(2): e13497.

82. Haeri SA, Rajabi H, Fazelipour S, et al. Carnosine mitigates apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from gamma-radiation-induced injury in mice. *Andrologia* 2014; 46(9): 1041-1046.
83. Sanchez-Partida LG, Setchell BP, Maxwell WMC. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9(7): 689-696.
84. Zhang W, Li F, Cao H, et al. Protective effects of l-carnitine on astheno-and normozoospermic human semen samples during cryopreservation. *Zygote* 2016; 24(2): 293.
85. Jacyno E, Kołodziej A, Kamyczek M, et al. Effect of L-carnitine supplementation on boar semen quality. *Acta Vet Brno* 2007; 76(4): 595-600.
86. Partyka A, Rodak O, Bajzert J, et al. The effect of L-carnitine, hypotaurine, and taurine supplementation on the quality of cryopreserved chicken semen. *Biomed Res Int* 2017; 7279341.
87. Al-Daraji H, Tahir A. Effect of L-carnitine supplementation on drake semen quality. *S Afr J Anim* 2014; 44(1): 18-25.
88. Fattah A, Sharafi M, Masoudi R, et al. l-Carnitine in rooster semen cryopreservation: flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology* 2017; 74: 148-153.
89. de Souza CV, Brandão FZ, Santos JDR, et al. Effect of different concentrations of l-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. *Cryobiology* 2019; 89: 104-108.
90. de Agostini L, Angrimani JD, Redondo DDSR, et al. Deleterious effect of high carnosine concentrations in extenders during sperm cryopreservation in dogs. *J Vet Andr* 2017; 2(2): 60-67
91. Mutlu E. Erişkin erkek sıçanlarda doksorubisin ile oluşturulan testis hasarı üzerine L-karnitinin etkisi. *ESOGÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü* 2013.
92. Garner DL, Johnson LA. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol reprod* 1995; 53(2): 276-284.
93. İnanç ME, Güngör Ş, Öztürk C, et al. Cholesterol-loaded cyclodextrin plus trehalose improves quality of frozen-thawed ram sperm. *Vet Med (Praha)* 2019; 64(3): 118-124.
94. Emamverdi M, Zhandi M, Shahneh AZ, et al. Flow cytometric and microscopic evaluation of post-thawed ram semen cryopreserved in chemically defined home-made or commercial extenders. *Anim Prod Sci* 2014; 55(4): 551-558.
95. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 1966; 16(2): 359-364.
96. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192-205.
97. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res Commun* 1976; 71(4): 952-958.

98. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196(2-3): 143-151.
99. Gulum M, Gümüş K, Yeni E, Doğantekin E, Çiftçi H, Akın Y, et al. Blood and semen paraoxonase—arylesterase activities in normozoospermic and azoospermic men. *Andrologia* 2017; 49(9): e12752.
100. Atig F, Kerkeni A, Saad A, Ajina M. Effects of reduced seminal enzymatic antioxidants on sperm DNA fragmentation and semen quality of Tunisian infertile men. *J Assist Reprod Genet* 2017; 34: 373-381.
101. Kamkar N, Ramezanali F, Sabbaghian M. The relationship between sperm DNA fragmentation, free radicals and antioxidant capacity with idiopathic repeated pregnancy loss. *Reprod Biol* 2018; 18(4): 330-335.
102. Banihani SA, Abu-Alhayjaa RF, Amarin ZO, Alzoubi KH. Pentoxifylline increases the level of nitric oxide produced by human spermatozoa. *Andrologia* 2018; 50(2): e12859.
103. Budai C. The protective effect of antioxidants on liquid and frozen stored ram semen. *J Anim Sci Biotechnol* 2014; 47(1): 46-52.
104. Jumintono J, Alkubaisy S, Singh K, et al. Effect of cystamine on sperm and antioxidant parameters of ram semen stored at 4 C for 50 hours. *Arch Razi Inst* 2021; 76(4): 115.
105. Bucak MN, Bodu M, Başpınar N, et al. Influence of ellagic acid and ebselen on sperm and oxidative stress parameters during liquid preservation of ram semen. *Cell J (Yakhteh)* 2019; 21(1): 7.
106. Zhang L, Wang Y, Sohail T. et al. Effects of Taurine on Sperm Quality during Room Temperature Storage in Hu Sheep. *Animals* 2021; 11(9): 2725.
107. Eslami M, Jahan-Roshan N, Farrokhi-Ardabili F. Influence of idebenone on ram semen quality stored at 4°C. *Reprod Domest Anim* 2019; 54(3): 486-497.
108. Filiz K, Sarıca Y. Mitokondri; Biyokimyası. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2003; 12(5):1-13.
109. Baek SH, Noh AR, Kim KA, et al. Modulation of mitochondrial function and autophagy mediates carnosine neuroprotection against ischemic brain damage. *Stroke* 2014; 45(8): 2438-2443.
110. Schiller J, Arnhold J, Glander HJ, Arnold K. Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy—effects of freezing and thawing. *Chem Phys Lipids* 2000; 106(2): 145-156.
111. Pérez-Pé R, Grasa P, Fernández-Juan M, et al. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2002; 61(2): 226-233.
112. Uysal O, Bucak M. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Vet Brno* 2007; 76(3): 383-390.