

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM JİNEKOLOJİ ve SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI



**FARE SPERMINİN DONDURULMASINDA SULANDIRICIYA İLAVE EDİLEN
GLUTATYON ve L-PROLINE' İN SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLER, ÇEKİRDEK
DNA BÜTÜNLÜĞÜ VE GEN EKSPRESYONU DÜZEYLERİ ÜZERİNE
MOLEKÜLER KARŞILAŞTIRMALAR**

DOKTORA TEZİ

Oğuz Kaan YALÇIN

Danışman

Prof. Dr. Cengiz YILDIZ

HATAY 2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM JİNEKOLOJİ ve SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI

**FARE SPERMİNİN DONDURULMASINDA SULANDIRICIYA İLAVE EDİLEN
GLUTATYON ve L-PROLİNE' İN SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLER, ÇEKİRDEK
DNA BÜTÜNLÜĞÜ VE GEN EKSPRESYONU DÜZEYLERİ ÜZERİNE
MOLEKÜLER KARŞILAŞTIRMALAR**

DOKTORA TEZİ
Oğuz Kaan YALÇIN

Danışman
Prof. Dr. Cengiz YILDIZ

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
19.D.019 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY 2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM JİNEKOLOJİ ve SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI

**FARE SPERMLERİNİN DONDURULMASINDA SULANDIRICIYA İLAVE EDİLEN
GLUTATYON ve L-PROLINE' İN SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLER, ÇEKİRDEK
DNA BÜTÜNLÜĞÜ VE GEN EKSPRESYONU DÜZEYLERİ ÜZERİNE
MOLEKÜLER KARŞILAŞTIRMALAR**

Doktora Tezi
OĞUZ KAN YALÇIN

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 11/07/2024 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oyçokluğu/oybirliği ile kabul edilmiştir

Tez Jürisi; Jüri Başkanı: Prof. Dr. Seyfettin GÜR

Üye: Prof. Dr. Cengiz YILDIZ

Üye: Prof. Dr. İlker YAVAŞ

Üye: Prof. Dr. Barış Atalay USLU

Üye: Doç. Dr. Altuğ KÜÇÜKGÜL

Bu tez, Enstitümüz Doğum Jinekoloji ve Suni Tohumlama Anabilim dalı' nda hazırlanmıştır.

11/07/2024

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora ve tez çalışmam boyunca hiçbir desteğini esirgemeyen, yönlendirici ve destekleyici tutumunu eksik etmeyen danışman hocam Prof. Dr. Cengiz YILDIZ' a; Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Fikret KARACA ve Prof. Dr. İlker YAVAŞ'a, tezin laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen Doç Dr. Altuğ KÜÇÜKGÜL ve Dr. Öğr Üyesi Nurdan ÇOŞKUN ÇETİN' e, teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ÖZET	XI
ABSTRACT.....	XIII
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kriyobiyojoloji.....	3
2.2. Suyun Sıvı ve Katı Fazdaki Moleküler Yapısı	4
2.3. Spermatozoon Membran Yapısı	5
2.4. Deney Hayvanı Olarak Farelerin Kullanımı	7
2.5. Fare Sperminin Spermatolojik Özellikleri ve Değerlendirilmesi	9
2.6. Farelerde Spermatogenezis	10
2.7. Motilite.....	10
2.8. Ölü sperm Oranı.....	11
2.9. Anormal Akrozom Oranı	11
2.10. Hipoozmotik Şişme Testi.....	11
2.11. Oksidatif Stres ve Antioksidan Metabolizması	12
2.12. Antioksidan	13
2.12.1. Glutasyon	15
2.12.2. Prolin.....	16
2.13. Apoptoz.....	17
2.14. Spermatogenezis Sonrası Etkili Bazı Genler	18
2.14.1. Bcl Gen Ailesi.....	19
2.14.2. PRM1 Gen Ailesi.....	20
2.15. Fare Spermi Üzerine Yapılan Araştırmalar	21

3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1. Gereç 23	
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Sperm Sulandırıcılarının Hazırlanması.....	23
3.2.1.1. Kriyoprezervasyon medyumunu (CPA) hazırlanması, L-Proline ve Glutasyon İlavesi	23
3.2.1.2. Human Tubul Fluid (HTF)	25
3.2.1.3. Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	25
3.2.1.4. Sperm Alınması ve Sulandırılması	25
3.2.1.5. Sperm Kriyoprezervasyonu	27
3.2.1.6. Payetlerin Çözdürülmesi.....	27
3.3. Spermatolojik Özelliklerin Belirlenmesi	28
3.3.1. Makler Lamı ve Sperm Konsantrasyonun Belirlenmesi.....	28
3.3.2. Motilite Muayenesi	28
3.3.3. Ölü sperm Oranının Belirlenmesi	29
3.3.4. Plazma Membran Bütünlük Testi	30
3.3.5. Anormal Akrozom Muayenesi.....	31
3.3.6. Motilite Dayanıklılık Testi Longevity	32
3.3.7. DNA Hasarının Tespiti	32
3.3.8. RNA İzolasyonu	34
3.3.9. cDNA Sentezi	34
3.3.10. Primer Tasarımı	35
3.3.11. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR):	36
3.4. İstatistiksel analiz.....	37
4. BULGULAR	38
4.1. Çalışma Gruplarında Dondurma Çözdürme Sonrası Spermatolojik Bulgular.....	38
4.2. Motilite Değerleri	39
4.3. Ölü sperm Oranı (Canlılık- Viability)	39
4.4. HOS Test Pozitif Oranı (Plazma Membran Bütünlüğü).....	40
4.5. Anormal Akrozom Oranı	40
4.6. Sperm DNA Hasarı Oranları.....	41

4.7. Motilite Dayanıklılığı (Longevity)	43
4.8. Spermatolojik Gen İfade Düzeyleri	45
5. TARTIŞMA.....	46
6.SONUÇ	53
7.KAYNAKÇA.....	54
ÖZGEÇMİŞ	65



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sperm plazma membranının fosfolipid dizisi	18
Şekil 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması	26
Şekil 2.3. İndirgenmiş Glutasyon Kimyasal Yapısı	27
Şekil 2.4. L-Proline kimyasal yapısı	28
Şekil 3.1. Sulandırıcının hazırlanması	33
Şekil 3.2. Sulandırıcının santrifüj edilmesi	33
Şekil 3.3. CD-1 ırkı erkek farelerin anesteziye alınması	34
Şekil 3.4. Payet şeklinin gösterilmesi	35
Şekil 3.5. Makler lamı	36
Şekil 3.6. Eozin-Nigrosin boyama yöntemi	38
Şekil 3.7 HOS Test yapılan fare spermi	39
Şekil 3.8 Tunel yöntemiyle DNA Hasarının belirlenmesi	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.Fare sperminin dondurulması üzerine yapılmış çalışmalar.....	20
Çizelge 3.1.Çalışma gruplarına ait solüsyonlar	31
Çizelge 3.2.HTF Formülasyonu	33
Çizelge 3.3.cDNA sentezinde kullanılan bileşenler	43
Çizelge 3.4.Çalışmada kullanılan primer setleri	43
Çizelge 3.5.Çalışmada kullanılan mastermix miktarları.....	44
Çizelge 3.6.RT-qPCR döngüleri protokolü	45
Çizelge 4.1.Çalışma grupları Dondurma Çözdürme öncesi ve sonrası belirlenen Spermatolojik Bulgular.....	47
Çizelge 4.2.Çalışma grupları Dondurma Çözdürme öncesi ve sonrası belirlenen longevity bulguları.....	47
Çizelge 4.3.Kriyoprezervasyon medyumuna ilave edilen Prolin ve Glutatyon'un Bcl-xL ve PRM1 gen ifade düzeylerine etkisi	52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bç:	Baz Çifti
BSA:	Bovine Serum Albumine (Sığır Serum Albümini)
CPA:	Cryoprotectant Agent (Kriyoprotektan ajan)
DAUM:	Deneyisel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
GSH:	Glutathione Reduced (İndirgenmiş Glutatyon)
HADYEK:	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HMKÜ:	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi
HOS:	Hypo Osmotic Swelling Test (Hipo Ozmotik Şişme Testi)
FITC:	Fluorescein isothiocyanate
H ⁺ :	Hidrojen
HTF:	Human Tubul Fluid (İnsan Ovidukt Sıvısı)
IVF:	In Vitro Fertilisation (In Vitro Fertilizasyon)
O:	Oksijen
O ₃ :	Ozon
OH:	Hidroksil
ONOO:	peroksinitrit
N:	Azot
NADPH:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NO:	Nitrik Oksit
PBS:	Phospat Buffered Saline (Fosfat Tampon solüsyonu)
PNA:	Peanut Agglutinin
PVA:	Polyvinyl alcohol (Polivinil alkol)
RNA:	Ribo Nükleik Asit
RNS:	Reactive Nitrogen Species (Reaktif Azot Türleri)
ROS:	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
Rpm:	Revolutions per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
TdT:	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TUNEL:	TdT-dUTPnick-end-labelling

Vit: Vitamin

WHO: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

YS: Yumurta Sarısı

μ : Mikro

M : Molar

$^{\circ}\text{C}$: Celcius derece

α : Alfa

β : Beta

γ : Gama

% : Yüzde

mM: Milimolar

ÖZET

FARE SPERMİNİN DONDURULMASINDA SULANDIRICIYA İLAVE EDİLEN GLUTATYON ve L-PROLINE' İN SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLER, ÇEKİRDEK DNA BÜTÜNLÜĞÜ VE GEN EKSPRESYONU DÜZEYLERİ ÜZERİNE MOLEKÜLER KARŞILAŞTIRMALAR

Sunulan çalışmada, fare sperminin dondurulabilirliği üzerine %18 Raffinoz + %3 yağsız süt tozu içeren sperm kriyoprezervasyon medyumuna ilave edilen farklı dozlardaki L-proline (1 mM, 5 mM, 25 mM, 50 mM) ve indirgenmiş glutatyon (2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM) 'un etkileri araştırıldı. Araştırmada fare spermlerinin dondurulmasında antioksidan ilavesiz %18 Raffinoz + %3 yağsız süt tozu kombinasyonu kontrol grubu olarak tutuldu. Araştırmada 9 ayrı araştırma grubunda 14-16 haftalık yaşta CD-1 ırkı erkek fareler kullanıldı (n:8). Farelerden elde edilen spermler kontrol ve deneme grubu medyumları içerisinde sulandırıldı. Sulandırılmış spermler 10 dakika inkübe edildikten sonra 0.25 ml hacimli payetlere doldurularak sıvı azot buharında donduruldu ve sıvı azot içerisinde muhafaza edildi. Dondurulmuş spermler 37 °C su banyosunda 30 saniye boyunca çözündürüldü. Çözündürülen payetlerde motilite, ölü sperm oranı, plazma membran bütünlüğü, anormal akrozom oranı, motilite dayanıklılığı, DNA hasar oranı, Bcl-xL ve PRM1 gen ifade düzeyleri yönünden analizler yapıldı. Dondurma çözündürme sonrası kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek motilite, en düşük ölü sperm oranı sırasıyla 49.38 ± 2.4 ve 15.38 ± 1.22 ile 5mM Glutatyon grubunda elde edildi ($p < 0.05$). Sağlam plazma membran oranları 5 mM Prolin ve 5mM Glutatyon gruplarında kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). En düşük anormal akrozom oranı 5.00 ± 0.68 ile 2.5mM Glutatyon grubunda olup, Kontrol grubuyla arasında önemli bir fark belirlenmiştir ($p < 0.05$). Motilite dayanıklılık (longevity) süresi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 5. saate kadar 5mM Glutatyon grubunda belirlendi ($p < 0.05$). Dondurma çözündürme sonrası kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en düşük DNA hasarı 4.00 ± 0.57 ile 5mM Proline grubunda bulundu ($p > 0.05$). Gen ifade düzeyi bakımından kriyoprezervasyon medyumuna Glutatyon ilave edilmesi kontrol grubuna göre antiapoptotik yolda görev alan Bcl-xL gen ifadesini daha fazla yükselttiği tespit edildi ($p > 0.05$). Bununla birlikte Glutatyon ilavesi Prolin'e göre Bcl-xL gen ifadesini anlamlı düzeyde arttırmıştır ($p < 0.05$). Proline ya da Glutatyon ilavesi PRM1 gen ifadesini etkilememiştir ($p > 0.05$).

Sonuç olarak fare sperm sulandırıcısına 5 mM Glutasyon ilavesinin dondurup özdürme sonrası motilite, canlı spermatozoon, plazma membran bütünlük oranlarını ve motilite dayanıklılığını artırdığı, anti apoptatik Bcl-xL gen ifadesini yükselttiği ve böylece fare spermlerinin dondurulmasında sulandırıcılarda başarılı bir şekilde kullanılabileceği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Fare Sperm, Kriyoprezervasyon, Glutasyon, L-Prolin, Gen ifadesi



ABSTRACT

MOLECULAR COMPARISONS OF GLUTATHIONE AND L-PROLINE ADDED TO EXTENDERS DURING FREEZING OF MOUSE SPERM ON SPERMATOLOGICAL PROPERTIES, DNA INTEGRITY AND GENE EXPRESSION LEVELS

The study investigated the effects of adding different concentrations of L-Proline (1 mM, 5 mM, 25 mM, 50 mM) and reduced Glutathione (2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM) to a sperm cryopreservation medium containing 18% Raffinose + 3% skim milk powder on the freezability of mouse spermatozoa. Mouse spermatozoa freezing without antioxidant addition served as the control group using the 18% Raffinose + 3% skim milk powder combination. Male CD-1 mice aged 14-16 weeks were used across 9 experimental groups (n=8). Spermatozoa obtained from the mice were diluted in both control and experimental medium groups. Diluted spermatozoa were incubated for 10 minutes, loaded into 0.25 ml straws, and then frozen in liquid nitrogen vapor and stored in liquid nitrogen. After thawing in a 37°C water bath for 30 seconds, analyses were conducted on motility, percentage of dead spermatozoa, plasma membrane integrity, abnormal acrosome rate, motility longevity, DNA damage rate, and expression levels of Bcl-xL and PRM1 genes in the thawed straws.

Compared to the control group post-thawing, the highest motility ($49.38 \pm 2.4\%$) and lowest percentage of dead spermatozoa ($15.38 \pm 1.22\%$) were observed in the 5 mM Glutathione group ($p < 0.05$). Higher rates of intact plasma membrane were found in the 5 mM Proline and 5 mM Glutathione groups compared to the control group ($p < 0.05$). The lowest abnormal acrosome rate ($5.00 \pm 0.68\%$) was noted in the 2.5 mM Glutathione group, significantly lower than the control group ($p < 0.05$). Motility longevity up to the 5th hour was observed in the 5 mM Glutathione group compared to the control group ($p < 0.05$). The lowest DNA damage ($4.00 \pm 0.57\%$) post-thawing was found in the 5 mM Proline group, although statistically insignificant ($p > 0.05$). Addition of Glutathione to the cryopreservation medium enhanced the anti-apoptotic pathway-associated Bcl-xL gene expression compared to the control group ($p > 0.05$), and significantly more than Proline ($p < 0.05$). Neither Proline nor Glutathione addition affected PRM1 gene expression ($p > 0.05$).

In conclusion, supplementation of 5 mM Glutathione to the mouse sperm extender improved post-thaw motility, viability, plasma membrane integrity, and motility longevity. It also increased Bcl-xL gene expression involved in the anti-apoptotic pathway, suggesting effective utilization of Glutathione in extenders for successful cryopreservation of mouse spermatozoa.

Key Words: Mouse Sperm, Cryopreservation, Glutathione, L-Proline, Gene expression



1.GİRİŞ

Biyoteknolojinin farklı türleri direk veya terapötik amaçlı klonlanmasına kadar uzanan başarılı süreci ile, çeşitli hücrelerin ve gametlerin hijyenik olarak elde edilmesi, başarıyla çoğaltılması ve dondurulması işlemleri biyoteknoloji alanına büyük katkılar sunmaktadır. Günümüzde gelişen teknoloji ile birçok hayvan türünde sperm ve embriyo başarıyla dondurulmakta, dişilerin dondurulmuş spermle suni döllemesinden çok sayıda yavru elde edilebilmektedir. Ayrıca transgenezis ve mutagenezis metodları ile üretilen mutant hayvan ırklarının ve nesli tükenmekte olan birçok hayvan türünün genetik kaynakları bu yollarla korunabilmektedir. Bu amaçla mutant ve mutant olmayan birçok tür için sperm bankaları ve bununla ilgili konsorsiyumlar oluşturulmaktadır (Yıldız, 2013).

Spermin dondurularak saklanması önem arz etmesinin nedenleri arasında: Evcil ve yabani hayvan türlerinde genetik çeşitliliğin korunması (Wildt, 1992), genetik olarak üstün türlerin dağılımının kolaylaştırılması (Hafes ve Hafes, 2013), infertilitenin tedavisi (Tash, 2003; Agarwal, 2004), insan sağlığı ve hastalığına ilişkin olarak genetiği değiştirilmiş hayvan modellerinin gen bankacılığının yapılması (Critser ve Russel, 2000) sayılabilir.

Gamet hücrelerin dondurulması genetik kaynakların saklanması ve daha kolay yönetimini sağlamaktadır. Fare ve rat embriyosunun dondurularak saklanması, insan hastalıkları odaklı mutant hayvan modellerinde genetik çeşitliliğin korunmasında bugüne kadar uygulanan tek pratik koruma yöntemi olmuştur. Transgenesis veya gen hedefleme yoluyla ortaya çıkan yeni mutantların sayısı arttıkça, gamet bankacılığına duyulan ihtiyaç da artmıştır. Dolayısıyla, kemirgenlerin gamet hücrelerinin saklanması değerli bir teknik haline getirmiştir. Ayrıca dişi üreme sorunlarının karakteristik olduğu ırkların korunması için spermin dondurularak saklanması vazgeçilmez hale gelmektedir. Sperm kriyoprezervasyonu aynı zamanda embriyo kriyoprezervasyonuna göre daha uygun maliyetlidir. Tek bir erkek bireyden alınan sperm, tek bir dişi donörden alınan embriyolardan 20 kat daha fazla yavru oluşturma potansiyeline sahiptir (Sztein ve ark., 1997; Sharp ve Mobraaten, 2022).

Bu çalışmada, dondurma medyumuna Glutatyon (2.5 mM, 5 mM, 10 mM ve 20 mM) ve Prolin (1 mM, 5 mM, 25 mM ve 50 mM) eklenmesinin fare spermlerinin dondurma çözündürme

sonrası spermatolojik özellikleri, çekirdek DNA bütünlüğü, Bcl-xL ve PRM1 gen ifade düzeyleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1.1.1.Kriyobiyojoloji

Yunanca kryos (soğuk), bios (hayat) ve logos (bilim) kelimelerinden türetilen kriyobiyojoloji düşük sıcaklığın canlıları nasıl etkilediği ile ilgilenen bilim dalıdır. Kriyobiyojoloji, hücresel biyojoloji, teriyogenoloji, moleküler biyojoloji, mühendislik ve matematik, veteriner tıp ve beşerî tıp gibi birçok disiplini içermektedir (Benson ve ark., 2012). Spermatozoonun kriyoprezervasyon süreci haploid olan bu hücrelerin karmaşık yapısı, spermatozoon aktivasyonu ve kapasitasyon mekanizmaları nedeniyle yukarıda belirtilen tüm disiplinleri kapsar (Gao ve Christer, 2000).

Canlı hücre ve dokuların dondurulması, hücrelerin normal fizyolojik aktivitelerini sürdürmek için gerekenden daha düşük sıcaklıklara kontrollü bir şekilde soğutulması sonucu ortaya çıkar. Kriyoprezervasyon sırasında canlı hücrelerin ve dokuların yaşamına yönelik zorluk, bunların kriyojenik sıcaklıklarda (-190°C 'nin altında) depolanmaya dayanma yeteneklerinin olmamasından kaynaklanır. Aslında, hücrenin biri soğuma sırasında, diğeri ısınma sırasında olmak üzere iki kez geçmesi gereken düşük sıcaklıktaki (-15 ila -130°C) bir ara bölge içindeki kütle ve enerji taşınmasıyla ilişkili durum hücrelerin zarar görmesine neden olur (Gao ve Christer, 2000).

Erkek gamet hücrelerinin dondurulmasında plazma membranı, akrozom, DNA yapılarında oluşabilecek hasarlara engel olmak için kriyoprotektif maddeler kullanılmaktadır. Sulandırıcıya katılan bu maddeler spermin dondurulması sırasında suyun sıvı halden katı hale geçişi sürecinde hacim ve iyon miktarı değişimlerinde azaltma etkisi gösterir (Critser ve ark., 1988).

Uzun süreli saklanan hücrelerde sıvı nitrojen sıcaklığında (-196°C) tüm kimyasal ve biyolojik reaksiyonlar neredeyse durmuştur. -196°C 'de meydana gelebilecek tek reaksiyon kozmik radyasyondan kaynaklanan reaksiyondur. Bu sıcaklıktaki bir ortamda 200-400 rad dozundaki radyoaktivite maruziyeti hücre popülasyonunun %63'üne zarar verebilir (Elkind ve Withmore, 1967). Dünya yılda 0,1 rad kozmik radyasyona maruz kalmaktadır. Bu, donmuş

memeli hücresinin -196°C 'de 2000-4000 yıl boyunca maruz kalacağı radyasyon miktarına karşılık gelir. Teorik olarak -196°C 'de 4000 yıl boyunca saklanabilen bir hücre için biyolojik zamanın durduğu düşünülebilir (Mazur, 1984). -80°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda saklanan hücreler, ortamda tam olarak donmamış, farklı iyon konsantrasyonlarına sahip çözünen maddelerin bulunması nedeniyle hücresel aktivitelerini sürdürür ve zamanla bozulurlar. Hücre ölümü sıcaklığa, dondurulan hücrenin ait olduğu hayvanın cinsine, hücre tipine ve dondurucu ortama bağlı olarak herhangi bir zamanda gerçekleşebilir (Mazur, 1984).

Erkek gamet hücresi olan spermatozoonların sulandırılması, soğutulması, dondurulması ve çözündürülmesi süreçlerindeki sıcaklık, ozmotik basınç ve iyon değişimi farklılıklarının oluşması ve kimyasal ve mekanik etkenlere maruziyet sonucunda spermatozoonlarda fonksiyonel ve morfolojik bozuklukların yanısıra genetik materyalde hasarlar ortaya çıkabilmektedir. Oluşan hasarların etkilerini azaltmak için kriyoprotektan maddeler kullanılması, sıcaklık değişimi için geçen sürenin optimizasyonu, suyun kristalizasyonuna müdahale edilmesi gibi yöntemler çalışmalara yön vermiştir (Vajta ve Kuwayama 2006).

Dondurma ve çözdürme işlemleri sonrası hücre sağ kalımı, hücre içinde oluşan buz kristalleriyle ilişkilidir. Spermin dondurulmasında plazma membran, DNA, akrozom gibi yapılarda oluşabilecek hasara engel olmak için kriyoprotektan maddeler kullanılmaktadır (Critser ve ark., 1988). Kriyoprotektanlar koruyucu etkilerini ortamdaki iyon miktarını azaltarak ve donmamış fraksiyonu artırarak gösterirler (At, 1996). Hücrenin dondurulması esnasında oluşan intrasellüler kristal oluşumu, çözüm esnasında oluşan dekrizalizasyon ve gelişen membransel destabilizasyona karşı kriyoprotektanlar koruyuculuk sağlarlar (Bucak ve tekin, 2007). Ancak hem hücre içine girebilen hem de hücre içerisine giremeyen kriyoprotektanların spermatozoonlar üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Bu zararların ozmotik basınç değişikliklerinin bir sonucu olarak fiziksel hasarlardan ya da hücredeki bileşiklerin biyokimyasal bozukluklarından kaynaklandığı bildirilmiştir (Wowk ve ark., 2000).

2.1.1.2.Suyun Sıvı ve Katı Fazdaki Moleküler Yapısı

Yaşamın ana kaynağı olan su, ortamdaki enerji miktarına bağlı olarak değişikliklere uğrar ve sıvı, katı ve gaz halleri arasında faz geçişleri meydana gelir. Su molekülleri memelilerin

vücut sıcaklığında sıvı fazdadır ve hemen hemen her canlı hücrede çok önemli görevler üstlenirler.

Su molekülü, negatif yüklü bir oksijen atomuna 104.52° açıyla bağlanan iki hidrojen atomundan ve 95.84 pikometre uzunluğunda kovalent bağlarla oluşur (Benedict ve ark., 1956). Sıvı fazdaki su molekülleri arasında hidrojen bağları oluşur. Suyun akışkan yapısı, bu bağların sürekli olarak kopup yeniden birleşmesine dayanmaktadır ve yaşayan organizmalardaki su sıvı formdadır. Ancak soğuma sırasında oksijen ve hidrojen arasındaki kovalent bağlar kısalır ve hidrojen bağları kuvvetlenir. Dolayısıyla simetrik bir şekilde sıralanma ve genişleme eğilimindedirler. Bazı durumlarda protein moleküllerinin normal fonksiyonlarını yerine getirebilmesi, yüzeylerinde su moleküllerinin varlığına bağlıdır. Su ile protein yüzeyi arasındaki bağ, suyun hidrojen atomundaki protonun proteine verilmesiyle oluşur (Petukhov ve ark., 2004).

Hücrelerin dondurulma işlemi sırasında hücre dışı ortamdaki solüsyon kendiliğinden veya etkiye ile -5°C ve -10°C aralığında kristalleşir. Hücre dışı ortam kristalleşirken hücre içi ortam henüz donmamıştır. Hücre dışı suyun katı faza geçmesi nedeniyle ortamda bulunan maddelerin yoğunluğunda artış olur. Bu durum bazı maddelerin hücre içi ve dışı ortamda farklı yoğunlukta bulunmalarına yol açar. Meydana gelen farklılık nedeniyle suyun dışarı çıkması ile bu kez de hücre içinde bulunan erimiş maddelerin yoğunluğundan yükselme ve kristallenme meydana gelir. Bu süreçler hücrelerin dondurulmasında olduğu gibi çözündürülmesinde de ters yönde meydana gelir. Hücrenin membran bütünlüğü ve normal yapısı, hücrenin metabolik fonksiyonları için mutlak gereklidir (Bucak ve Tekin, 2007). Kristalleşmenin neden olduğu durum, hücrede ozmotik büzüşmeye ve membran lipid fazında değişimlere yol açmaktadır (Woods ve ark., 2000).

2.1.1.3. Spermatozoon Membran Yapısı

Spermatozoon, testisin seminifer tübülleri içinde birbirini takip eden mitotik, mayotik ve mayotik-sonrası aşamalardan geçen spermatogenez sürecinin son ürünüdür (Eddy ve O'Brien, 2006). Mitotik faz sırasında, germ hattı kök hücrelerinin spermatogonyal popülasyonu artırmak için bir dizi bölünmeye uğrar. Mayotik faz, son hücre döngüsü S fazı ile başlar ve haploid spermatidler üretmek için DNA replikasyonu olmadan hızla meydana gelen iki mayotik

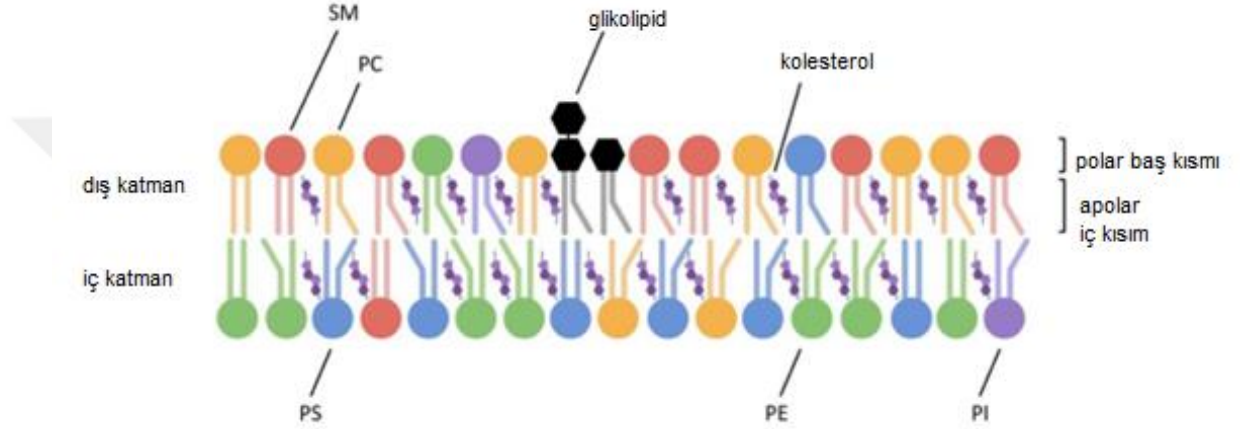
bölünme gerçekleşir. Bu iki aşama erkek gamet gelişimi için hayati önem taşıırken, mayoz-sonrası aşamada spermatozoon formu oluşur. Mayoz-sonrası aşamada spermatidlerde akrozom oluşumu, kromatin yoğunlaşması, kuyruk gelişimi ve sitoplazmanın büyük kısmının kaybı yoluyla spermatozoon yeniden şekillenir. Bu olaylar, yapı ve işlev açısından oldukça farklılaşmış ancak gelişimsel olarak totipotent olan ve bir sonraki neslin oluşmasını sağlayacak süreci başlatmak için bir yumurta ile birleşebilen bir hücreyle sonuçlanır (Plant ve Zeleznik, 2014).

Spermatozoon membranı çeşitli fosfolipidler ve proteinlerden oluşan akışkan mozaik membran yapısına sahiptir (Single ve Nicholson, 1972). Hücre membranının temel olarak hücreyi dış ortamdan ayırma, hücre içi homeostazisi sağlama ve hücre içi ile dış ortam arasında madde değişimi görevleri vardır. Oositin spermatozoon tarafından döllenmesinde ise spermatozoon membranı fonksiyonel görevler üstlenir. Spermatozoonların baş kısmındaki membran yüzeyi heterojendir ve çeşitli yüzey bölgeleri mikroskopik olarak gözlemlenebilir (Gadella, 2008). Membran yapısında yer alan ana yapısal bileşenler fosfolipitler, glikolipitler, transmembran proteinleri, periferik proteinler ve kolesteroldür. Parks ve Graham' a göre (1992) Membran bütünlüğü aşağıdaki faktörlere bağlıdır:

- Lipitlerin yana doğru yer değiştirmesini önlemek için lipitler arasındaki bağlarla membran bütünlüğünün korunması;
- Lipitlerin stabilitesini korumak için, hücre iskeletinin yapı taşlarına bağlanmaları;
- Hücre içi ve dış ortam arasında difüzyonun sağlanmasına ve hücre içi dengelerin devam ettirilmesinde görev alan membran proteinlerinin varlığı (Parks ve Graham, 1992).

Hücre zarında zincir şeklinde birbirine bağlanan farklı tipteki fosfolipitlerin oluşturduğu iç ve dış olmak üzere iki katman vardır. Fosfatidilkolin ve sfingomiyelin gibi pozitif yüklü fosfolipidler ağırlıklı olarak hücre zarının dış yaprağında bulunurken, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve fosfatidilinositol gibi anyonik fosfolipitler hücre zarının iç katmanında bulunurlar. Bu iki fosfolipid tabakası arasındaki etkileşimler, kolesterol ve proteinler tarafından transmembran kanallarının oluşturulmasında görev alır (Parks ve Graham, 1992). Akışkan ve değişken membran yapısını sağlayan fosfolipitler, toplam membran lipitlerinin %65-70'ini

oluşturur (Holt, 2000). Glikolipidler genellikle plazma membranının dış yaprakçıklarında bulunur ve membran stabilitesini korur ve hücreler arası iletişimde rol alır. Kolesterol molekülleri fosfolipid çift katmanı üzerinde rastgele dağılır, fosfolipidleri birbirine bağlar ve zarın akışkanlığını sınırlandırır. Kapasitasyon sırasında, sperm plazma membranı ilk önce önemli bir kolesterol kaybına uğrar, buna fosfolipidlerde bir azalma ve fosfolipidlerin asimetrik dağılımının kaybı eşlik eder (Shan ve ark., 2021).



Şekil 1.1.: Sperm plazma membranının fosfolipid dizisi. Sfingomiyelin (SM) VE Fosfatidilkolin (PC) esas olarak dış yaprakta bulunurken, fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilinozitol (PI) ve özellikle fosfatidilserin (PS) iç yaprakta bulunur (Shan ve ark., 2021).

2.1.1.4. Deney Hayvanı Olarak Farelerin Kullanımı

Hayvan deneyleri, yeni bilgiler edinmek veya insan tıbbı, veteriner tıp, diş hekimliği ve yaşam bilimlerinde sorunları çözmek amacıyla genellikle laboratuvarında hayvanlar üzerinde yapılan bilimsel çalışmaları ifade eder (Fox, 2015). Hayvan deneylerine ilişkin ilk referanslara M.Ö. üçüncü ve dördüncü yüzyıllardaki Yunan filozof-doktorların yazılarında rastlanır. Aristoteles (M.Ö. 384-322), hayvanlar arasındaki iç organlara ait farklılıkları ortaya çıkaran incelemeleri yapan ilk kişiydi. Domuzlarda trakea' nın bir hava tüpü, akciğerlerin ise pnömatik organlar olduğunu tespit etti (Fisher, 1881). Alexis Carrel 1912' de organların transplantasyonu üzerine yaptığı çalışmalardan dolayı Nobel Ödülü'nü aldığında "uygulamalı cerrahi biliminin gelişiminin hayvan deneylerinden alınan derslere bağlı olduğunu bir kez daha kanıtladınız." cümlelerine yer vermiştir (Troehler, 1981). Böylece, çok eski çağlardan günümüze kadar devam eden hayvan deneyleri, biyolojik ve tıbbi araştırma ve eğitimde bilimsel yöntemin temel

yaklaşımlarından biri oldu. Laboratuvar hayvanları hekimliği alanındaki ilk veteriner hekim 1915 yılında Amerikan Tıbbi Araştırmalar Enstitüsünde Dr. Simon D. Brimhall oldu (Cohen, 1959). 1963 yılına gelindiğinde Dr. Bennet Cohen tarafından Laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımıyla ilgili ilk kitap “The Guide for Care and Use of Laboratory Animals” yazıldı (Fox JG, 2015).

Mikroskobun geliştirilmesiyle (1677) başlayan spermin keşfi, 18. Yüzyıla kadar Lazzaro Spallanzani’ nin spermatozoonların soğuk koşullar altında hareketliliğini koruyabildiğini açıklayan ilk belgelenmiş gözlemiyle devam etti (Spallanzani, 1787). Gliserol’ ün kriyoprotektan özelliğinin 1949 yılında Polge ve arkadaşları tarafından keşfedilmesi, spermin dondurulması alanında önemli bir gelişme olarak değerlendirildi (Nur ve Ak, 2003). İlk defa bir embriyo (fare) Whittingham ve arkadaşlarının 1972 yılında yaptıkları bir çalışmada yavaş dondurma işlemi uygulanarak başarılı bir şekilde donduruldu (Sztein ve ark., 2018). Bu önemli gelişmenin ardından kriyobiyoloji alanında pek çok önemli gelişmeler yaşandı. Bunların arasında, donma hızının ve hücre içi buz oluşumunun donma hasarında etkili olduğu (Mazur, 1972) ve her hücre tipinin en az zararla dondurulması konusunda kendine özgü bir şekilde sıcaklık- zaman eğrisine ihtiyaç duyulduğu gösterildi (Leibo, 2004).

Uluslararası Laboratuvar Hayvanları Komitesi’ nin açıklamalarına göre, bilgi üretiminin yoğun olduğu ülkelerde, fareler en çok kullanılan deney hayvanıdır. Farelerin deney hayvanı olarak kullanılma nedenleri arasında; diğer hayvanlara nazaran daha ekonomik bir şekilde yetiştirilebilmesi, gebelik sürelerinin ve jenerasyon aralığının kısa olması ve yapay mutasyonlar oluşturulabilmesi gibi sebeplerden ötürü biyomedikal ve genetik alanında en çok çalışma yapılan memeli türü olması önemli rol oynamaktadır (Tuffery, 1967).

Fare spermi dışında birçok memelinin spermi 1950’ li yıllara kadar başarıyla donduruldu ve çözdürme sonrası canlılık bildirildi. Fare sperminin başarılı bir şekilde dondurulması ise 1990 yılında 3 bağımsız grup tarafından eş zamanlı olarak rapor edildi (Okuyama, 1990; Tada ve ark., 1990; Yokoyama ve ark., 1990). Dünyadaki diğer laboratuvarlar bu bulguları tekrarladı ve çözdürme sonrası canlılık bildirdi ancak raporlar hibrit farelerden alınan sperm örnekleriyle sınırlı kaldı (Bath, 2003).

Taze sperm kullanılarak yapılan in vitro fertilizasyonun etkinliğinin genetik kökene göre oldukça değişken olduğu gösterilmiştir. Örneğin soy içi (inbred) bir hattın (BALB/C)

fertilizasyon oranları (iki hücreli embriyo gelişimi), hibrit bir hattın (B6C3F1) fertilizasyon oranlarından daha düşüktür (Kawase ve ark., 2004). Yine Kawase ve arkadaşlarının (2004) yaptığı çalışmaya göre dondurulmuş çözündürülmüş sperm kullanılarak yapılan IVF gelişim oranları soyiçi türlerde (BALB/C) hibrit türlere (B6C3F1) oranla daha da düşmüştür. Soyiçi türler için (C57BL/6) sperm kriyoprezervasyon protokollerindeki başarı pipetleme, santrifüj, kriyoprezervasyon medyumunun eklenmesi ve/ veya uzaklaştırılması ve soğuk şoku gibi adımlara karşı aşırı hassasiyetleri nedeniyle sınırlı kaldı (Willoughby ve ark., 1996; Katkov ve Mazur, 1998; Agca ve ark., 2003).

2.1.1.5.Fare Sperminin Spermatolojik Özellikleri ve Değerlendirilmesi

2.4.1. Fare Sperminin Spermatolojik Özellikleri

Epididimal fare spermi, *in vitro* deneylerde ejaküle edilmiş sperm yerine kullanılmaktadır. Ejaküle edilmiş fare sperminin toplanması, epididimal sperm elde etmekten çok daha zor ve pahalıdır (Li ve ark, 2015). Ayrıca çeşitli memeli türlerinin spermeleri suni vajen ve elektro-ejakülasyon yoluyla toplanabildiği halde, fare spermi toplamak için suni vajen mevcut değildir ve elektro-ejakülasyon yoluyla toplanan fare spermelerinin canlılığı düşük ve *in vitro* fertilizasyon oranları düşüktür (Tecirlioğlu ve ark., 2002). Kauda epididimlerden elde edilen fare spermi motilite, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, hiperaktivite ve ooisitini fertilizasyonu yeteneğine sahiptir (Chang, 1984). Böylece fare kauda epididimlerden elde edilen spermin, olgun spermin gerekli tüm işlevlerine sahip olduğu görülmektedir.

Epididimal sperm morfolojik olarak ejaküle edilmiş sperme benzese de aralarında farklılıklar vardır. Ejakülasyon esnasında epididimal sperm, erkek cinsiyet bezlerinin salgılarıyla karışır. Yardımcı cinsiyet bezleri tarafından salgılanan proteinler spermatozoonu çeşitli şekillerde etkiler. Farelerde kauda epididimlerden izole edilen spermatozoonlardan 2850 çeşit protein tanımlanmıştır (Chauvin ve ark., 2012). Bazı proteinler spermatozoon membranındaki yapılarla etkileşime girerek kapasitasyonu engeller. Seminal bezden salgılanan SVS2 proteininin *in vitro* epididimal sperm kapasitasyonunu inhibe etmek için fare sperminin postakrozomal bölgesindeki gangliosid GM1'e bağlandığı rapor edilmiştir (Kawano ve ark., 2008).

2.1.1.6.Farelerde Spermatogenezis

Spermatogenezis farelerde ortalama 35 gün sürmektedir. Kemirgenlerin testislerinde doğumdan sonra spermatojenik kök hücre (SSC) aktivitesi, seminifer tübüllerin bazal membranında izole bir şekilde yer alan spermatogonyalarda şekillenmektedir. Bu hücrelere üç günde bir bölünen ve fare testisindeki toplam germ hücrelerin %0.03 ünü oluşturan A_{single} (A_s) spermatogonia adı verilir. A_s ' nin mitoz bölünmesi ile bir çift spermatogonya (A_{paired}) üretilir. İki yeni A (kendini yenileyen bölünme) üretmek için sitokinezi tamamlar veya intrasitoplazmik bir köprü ile bağlı kalır ve bir sonraki bölünmede dört adet A_{al4} spermatosit üretir. Spermatositler bir veya daha fazla mitotik bölünme geçirerek 8,16 veya 32 adet farklılaşmamış A_{al} spermatositleri oluşturur (Rooji ve Griswold, 2012). Primer spermatositlerde gerçekleşen iki mayotik bölünme ile sekonder spermatositler ve yuvarlak spermatidler oluşur; bunlar, olgun sperm üretmek için spermiogenez (morfolojik farklılaşma) geçirir. Böylece mitotik ve mayotik bölünme yoluyla, fare testisindeki nispeten küçük bir kök hücre havuzundan, her gün testis parankiminin gramı başına 40 milyon spermatozoon üretilir (Fayomi ve Orwig, 2018).

2.1.1.7.Motilite

Erkek gamet hücresi olan spermatozoonun oosite ulaşmak için aktif hareketle ilerlemesi gerekir. Spermatozoon tarafından gerçekleştirilen bu aktif hareket, spermin potansiyel fertilitésinin değerlendirilmesindeki en önemli parametrelerden biridir (Amelar ve ark., 1980). Dünya Sağlık örgütü' ne göre sperm hareketi hızlı ilerleyen hareketli, yavaş ilerleyen hareketli, ilerlemeyen hareketli ve hareketsiz olmak üzere dört kategoriye ayrılır ve hem manuel değerlendirmelerde hem de bilgisayar destekli değerlendirmelerde bu hareket biçimlerinden yararlanılır (WHO, 2021).

- Progresif Motilite: Spermatozoa doğrusal veya geniş bir daire şeklinde aktif olarak hareket eder. Dünya Sağlık Örgütüne göre progresif motilite, Progresif olarak hareket eden spermatozoonun 37°C' de >25 m/sn hızla ilerlemesi hızlı, daha düşük hızda ilerlemesi yavaş olarak değerlendirilir.
- Progresif olmayan motilite: İlerlemenin olmadığı diğer tüm hareketlilik modellerini ifade eder. Küçük daireler halinde hareket, kuyruk hareketlerinin başın yerini

değiştirmemesi veya yalnızca kuyruk hareketlerinin gözlemlenebildiği durumları ifade eder.

- İmmotil: Hareket gözlenmez.

2.1.1.8.Ölü sperm Oranı

Canlı spermatozoonların membranlarından geçmeyen bazı maddeler, spermatozoonlar ölüp membran bütünlüğü bozulduğunda geçebilmektedir (Jeyendran ve ark., 1984). Ölü sperm oranını belirlemek için eosin-nigrosin, eosin, fast green gibi boyalardan faydalanılır (Tekin 1990). Baş kısmı boya alan spermatozoonlar ile boya almayan spermatozoonların değerlendirilmesiyle spermadaki ölü sperm oranı belirlenir (Somfai ve ark. 2002, Tekin 1990).

2.1.1.9.Anormal Akrozom Oranı

Fare sperminde anormal akrozoma sahip spermatozoonların oranının belirlenmesi, düşük fertilite yeteneği ve kalıtsal bozukluk taşıyabilmesi nedeniyle önem arz etmektedir. Anormal akrozoma sahip fare spermatozoonlarının morfolojik olarak belirlenmesinde sıvı fikzasyon, trypan mavisi, florasin boyama (PNA-FITC) yöntemleri kullanılmaktadır (Lybaer ve ark., 2009, Somfai ve ark., 2002, Tekin 1990).

2.1.1.10.Hipoozmotik Şişme Testi

Spermatozoon membran bütünlüğünün belirlenmesinde supravital boyama ve HOS Test kullanılmaktadır. HOS test spermatozoon analizlerinde tamamlayıcı bir test olarak kullanım alanı bulmaktadır (Neild ve ark., 1999). Alternatif bir yöntem olarak kriyoprezervasyon işlemi sonucunda spermatozoonlarda ortaya çıkan membran yıkımını belirlemek için de kullanılmaktadır (Correa ve Zavos 1994, Thundathil ve ark., 2002, Tartaglione ve Ritta 2004).

Hipoozmotik ortamda bulunan spermatozoon içine suyun girer. Bu durum hipoozmotik stres oluşturmaktadır. Aktif olarak membranında bozukluk olmayan spermatozoon plazma membranı, HOS test uygulaması süresince intraselüler ve ekstraselüler sıvı arasında ozmotik basıncı dengede tutmaya çalışmaktadır. Bu esnada spermatozoonun içerisine su girerek

hacminde artış şekillendirir böylece spermatozoon yapısında şişme başlayarak kuyruğunda kıvrılma gözlenir (Correa ve Zavos 1994; Nie ve Wenzel, 2001; Jeyendran ve ark., 1984; Sliwa, 1993).

Hipoozmotik ortamda bulunan spermatozoonların kuyruk yapılarında; kuyruğun esnemesi ile kıvrılması, kısalması ve kalınlaşması ve kuyrukta fibrillerin değişik derecelerde kıvrımlı bir hal alması gibi kuyruk tipleri ortaya çıkmaktadır (Jeyendran ve ark., 1992). Hipoozmotik bir solüsyonda spermatozoon kuyruğunda şişmenin görülmesi plazma membranından su geçişinin doğal olarak oluştuğunun göstergesidir (Jeyendran ve ark., 1984).

HOS testinde spermatozoonların kuyruklarında meydana gelen kıvrılma görülmesinin nedeni kuyruk membranının sağlam olduğunu göstermektedir. Fonksiyonel olarak ejakülasyon sonucu elde edilmiş spermatozoonda eğer kuyruk sağlam ise baş kısmında bulunan plazma membranı da sağlamlığını korumaktadır (Jeyendran ve ark., 1992).

HOS testinin uygulanması sonucunda insanlar ve hayvanlar arasında farklı sonuçlar elde edilmiştir (Kumi-Diaka 1993, Nie ve Wenzel 2001, Lagares ve ark., 2000). İnsanlarda 150 mOsm (Jeyendran ve ark., 1984), boğalarda 150 mOsm (Kathiravan ve ark., 2008), koçlarda 100 mOsm (Aisen ve ark., 2005), aygırlarda 25–100 mOsm (Neild ve ark., 1999), köpeklerde 60 mOsm (Kumi-Diaka, 1993), tavşanlarda 60 mOsm (Ducci ve ark., 2002) ve alabalıklarda ise 100 mOsm (Cabrita ve ark., 1999) değerinde sperm kuyruklarında kıvrılmalar gözlenmektedir. Farklı ırklardaki deney hayvanlarının hipoozmotik basınca verdikleri tepkilerde birbirinden farklıdır (Songsasen ve Leibo, 1997).

2.1.1.11.Oksidatif Stres ve Antioksidan Metabolizması

Hücre metabolizması sonucu kararsız yapıda serbest radikaller (Reaktif oksijen türleri (ROS) ve Reaktif azot türleri (RON)) oluşur. Hidroksil iyonu (OH), süperoksit radikali (O_2^-), azot oksit (NO), ozon (O_3), hidrojen peroksit (H_2O_2), nitroz öksit (NO), peroksinitrit ($ONOO^-$) molekülleri ROS ve RON ürünleridir (Agarwal ve ark., 2008). Bu moleküller ortamdaki diğer moleküllerle reaksiyona girerek oksidasyona neden olur. Başta lipitler, nükleik asitler, proteinler ve hücrede bulunan diğer bileşenler ile etkileşime girerek zarar verme potansiyeline sahiptir. Hücre membranında bozulma, enzim aktivitesinde değişiklik, DNA hasarı ve buna bağlı mutasyonlar veya işlev kaybı gibi homeostazisi bozacak zararlara neden olurlar.

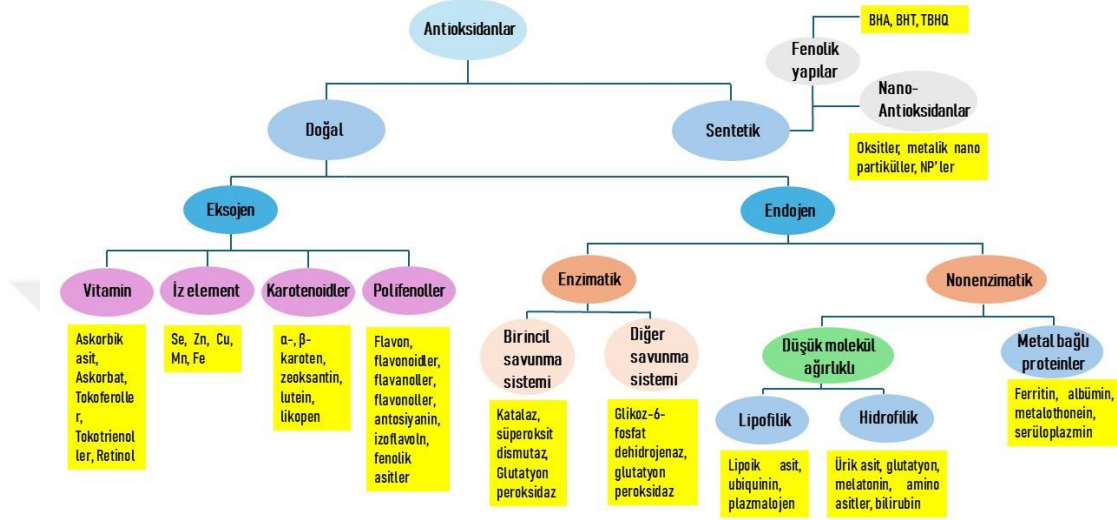
Mitokondri, Peroksizomlar, Lipoksigenazlar, NADPH oksidaz, Sitokrom p450 Endojen ROS kaynaklarıdır. Başta mitokondrilerde olmak üzere hücre metabolizmasının bir sonucu olarak ROS üretilir ve belirli bir düzeyde ROS hücre içi olaylar için gereklidir. Hücrelerde gerçekleşen oksijenli solunum, katabolik ve anabolik işlemler sonucunda fizyolojik olarak, iskemi, travma intoksikasyon ve radyoaktivite gibi etkenler sonucu patolojik olarak ROS oluşur. Ayrıca stres, yaşlanma, uzun süreli metabolik hastalıklar, oksidan enzimlerin aktivitesi (Ksantin Oksidaz, Triptofan dioksigenaz, Siklooksigenaz, Lipooksigenaz) sonucu ve fagositik hücrelerin aktivasyonu ROS üretimini artırabilen durumlardır (Lambert ve Brand, 2009; Agarwal ve ark., 2006). Hücreler ve dokularda ROS oluşumundaki artışa ve/ veya antioksidan sistemdeki yetersizliğe bağlı olarak oksidatif stres gelişir (Lobo ve ark., 2010).

Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin hücre içi ve hücre dışı ortamda belirli bir düzeyde bulunması fizyolojiktir. Sperm fonksiyonları üzerinde ROS' un faydalı ve zararlı etkileri vardır. Bu etkiler ROS düzeyine göre değişmektedir. Belirli bir düzeydeki ROS kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve spermatozoonun hiperaktivasyonu gibi önemli üreme süreçlerini düzenlemektedir (Barati ve ark., 2020). Sperm içerisindeki ROS' un başlıca kaynağı spermatozoonlar ve lökositlerdir (Garrido ve ark., 2004). Spermatozoonların nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve mitokodriyal düzeyde NADPH' ye bağlı oksidoredüktaz ile ROS oluşturulduğu düşünülmektedir (Gavella ve Lipovac, 1992). Aerobik solunum sonucu en yaygın olarak ortaya çıkan H_2O_2 ve NO radikallerinin kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve penetrasyon aşamalarında rol oynadığı gösterilmiştir (Agarwal ve ark., 2008).

2.1.1.12. Antioksidan

Hücrelerde bulunan DNA, protein, lipid gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunu engelleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidan denir. ROS hücre içindeki yapılarla (DNA, Protein, Lipit) reaksiyona girmeden antioksidanlar tarafından nötralize edilirler. Antioksidanlar enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere iki grupta sınıflandırılabilir. Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz ve Glutasyon Redüktaz (GPx) enzimatik antioksidanlara örnek verilebilir. Bazı Aminoasitler, Lipoik asit, Ubiquitin, Plazmalojen, Ürik asit, Glutasyon, Melatonin, Albümin, Hemogloblin, Serüloplazmin, Transferrin, Bilirubin, Glikoz ve Ürat enzimatik olmayan endojen antioksidanlardır. Enzimatik olmayan ekzojen antioksidanlara

Vitaminler (Askorbik asit, Tokoferoller, Retinol), İz elementler (Selenyum (Se), Çinko (Zn), Bakır (Cu), Manganez (Mn), Demir (Fe)), Karotenoidler (α - ve β - karoten, Zeoksantin, Likopen) ve Polifenoller örnek verilebilir (Flieger ve ark., 2021).



Şekil 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması (Flieger ve ark., 2021).

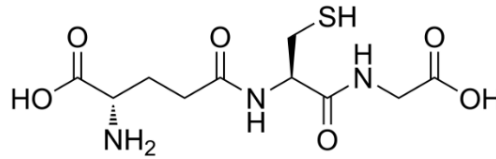
Askorbik asit, α -Tokoferol, Koenzim Q, karotenler, glutasyon ve iz elementler direkt olarak serbest radikallerin etkisizleştirilmesinden sorumludur.

Antioksidanlar ROS'ların zararlı etkilerini 4 mekanizma ile önlemektedirler. Bu mekanizmalar,

- **Süpürme etkisi (Scavenging):** ROS'ların daha düşük etkiye sahip moleküle dönüştürülerek etkisiz hale getirilmesidir (Halliwell, 2024).
- **Söndürme Etkisi (Quenching):** Enzimatik olmayan vitaminler, flavonoidler ve mannitol gibi moleküllerin ROS' lara hidrojen aktararak inaktive edilmesidir (Martinez ve ark., 2022).
- **Zincirleme reaksiyonları kırma etkisi (Chain Breaking):** ROS' ların ağır metaller ve bazı moleküller (hücre dışı ortamdaki serüloplazmin ve hemoglobin) tarafından bağlanarak inaktive edilmesidir (Gülçin, 2020)
- **Onarma Etkisi (Repair):** ROS' lar tarafından oksidatif hasara uğramış moleküllerin onarılmasıdır (Pudlarz ve ark., 2022).

2.1.1.13. Glutasyon

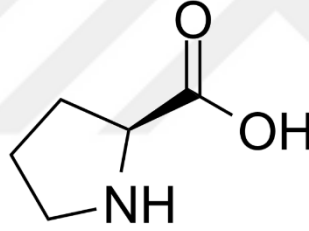
Glutasyon, hücreleri serbest radikaller, inorganik peroksitler gibi reaktif oksijen türleri ve ağır metallerin toksik etkilerinden koruyan bir antioksidandır (Pompella ve ark., 2003). Hayvanlarda, bitkilerde, mantarlarda ve bazı bakterilerde bulunur. Glutasyon γ -glutamil-sisteinil-glisin bilimsel adıyla tarif edilen tripeptid yapıdadır, suda çözünür. Hücrelerde indirgenmiş (GSH) ve oksitlenmiş (GSSG) formlarında bulunur. İndirgenmiş glutasyon antioksidan savunma sisteminde rol oynamak dışında proteinlerdeki sülfidril gruplarının indirgenmiş halde tutulması, aminoasit taşınımı, ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere indirgenmesi ve protein ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi dahil olmak üzere hücre içi olaylarda fizyolojik fonksiyonlara sahiptir (Kenan ve Keskin, 2014; Mullineaux PM, 1997). Hücrelerdeki GSSG/ GSH oranı hücrel oksidatif stresin bir ölçüsüdür ve sağlıklı hücre ve dokularda indirgenmiş glutasyon %90 ve üzeri oranda bulunur (Halprin ve Okinawa, 1967).



Şekil 2.3. İndirgenmiş Glutasyon Kimyasal Yapısı (medchemexpress.com)

2.12.2. Prolin

Non esansiyel aminoasitlerden olan Prolin, 20 aminoasitten biridir. Diğer tüm aminoasitler birincil amin grubu ($-NH_2$) taşıırken, amin grubu içermeyen tek aminoasittir. Bu yüzden iminoasit olarak da adlandırılır. Halka şeklinde bir glutamat türevidir ve radikal grubun amino ve α -karbon grubuna aynı anda bağlanmasıyla halka şeklinde bir yapı oluşturur ve bu durum Prolin aminoasitini diğer aminoasitlerden farklı kılar (Wikipedia.com, pubchem, Panteghini ve ark., 2004). Prolin proteinlerdeki α -heliks ve β -tabaka yapıları ile uyum göstermez. Bu yüzden genellikle polipeptit zincirin yapısında katlanma bölgelerinde bulunur. L-prolin, C vitamininin kollajenin yapısına katılımıyla oluşan ve mekanik özelliklerini belirleyen L-hidroksiprolin' in öncüsüdür. Sentezlenmesi ve yıkımı alfa-ketoglutarat üzerinden olur (Rhoads ve ark., 1968, Wu ve ark., 2016).



Şekil 2.4. L-Prolin kimyasal yapısı (medchemexpress.com)

L-Prolin, proteinlerin yapısına katılarak aynı zamanda karbon ve azot metabolizmasında, ozmotik ve oksidatif strese korunmada, proteinlerin üç boyutlu katlanmasında, hücre sinyalizasyonunda, apoptoz sürecinde, yara iyileşmesi, antioksidatif reaksiyonlarda ve bağışıklığın sağlanmasında rol oynar (Blake ve ark., 1976, Phang ve ark., 2008; Szabados ve Savoure, 2010; Wu ve ark., 2011). L-Prolin ve hidroksiprolin kollajen ve süt proteinlerinde en çok bulunan aminoasittir ve vücuttaki proteinlerin sentezindeki gereksinimi diğer tüm aminoasitler arasında en fazladır (Wu ve ark., 2011). L-Prolin oksidatif stres ve beslenme stresi durumlarında hücre içi redoks ortamını etkileyerek hücrenin hayatta kalmasını ve hücrenin ölmesi sürecinde etkilidir. Prolin insanlarda ve hayvanlarda redoks reaksiyonlarına katılan P5C (prolin-5-karboksilat) ve serbest radikallerin kaynağıdır (Pandhare ve ark., 2009; Phang ve ark., 2008). L-Prolin ayrıca oviduct sıvısında serbest olarak farelerde $\approx 140 \mu M$, insanlarda $\approx 150 \mu M$, tavşanlarda $\approx 100 \mu M$, koyunlarda $50-300 \mu M$ ve sığırlarda $\approx 200 \mu M$ yoğunluğunda bulunur

(Aguilar ve Reyler, 2005, Çetin ve ark., 2005). Embriyonik kök hücreler de dahil olmak üzere hücrelerin farklılaşmasında rol oynar (Pistollato ve ark., 20210). Arginaz aktivitesi içermeyen doku ve hücrelerde (örneğin domuz plasentası ve neonatal domuzların enterositleri), prolin, ornitin ve dolayısıyla poliaminlerin (putresin, spermidin ve spermin) sentezi için tek substrattır (Wu ve ark., 2000; Wu ve ark., 2005).

2.1.1.14. Apoptoz

Nekrozdan farklı olarak oluşan hücre ölümü Kerr ve ark. (1972) tarafından Yunancada yaprak dökümü veya ayrılarak düşmek (ptosis) anlamına gelen ‘‘apoptoz’’ olarak tanımlanmıştır. Apoptoz programlanmış hücre ölümü çeşitlerinden biridir. Programlanmış hücre ölümü Skalka ve ark (1976) tarafından uyarılan lenfositlerin DNA’ larında yaklaşık 200 bp uzunluklarda parçalara ayrıldığına gösterilmesi ile ortaya konulmuştur. Elde edilen DNA, agaroz jel elektroforezinde yürütüldüğünde, apoptotik hücrelere özgü bir durum olan merdiven görüntüsü şeklinde bantlar görülmektedir (Aydemir ve Fışkın, 2006; Robertson ve ark, 2000). İnsanlarda Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) geninin lenfomada hücre ölüm sisteminde rol aldığına ortaya konulması programlanmış hücre ölümüne yönelik çalışmaları arttırmıştır (Lane, 2008).

Apoptoz, fetusta gelişim sürecinde yapışık halde bulunan el ve ayak parmaklarının ayrılması, yaşlanmayla birlikte organlarda görülen atrofiler, laktasyon döneminin sona ermesi ile meme bezlerinin gerilemesi ve kan hücrelerinin uygun oranda sabit tutulması, menstrual dönemde endometriyum tabakasının dökülmesi süreçlerinde fizyolojik olarak gözlenmektedir. Hipoksi, iskemi, radyasyon, travma ve kemoterapi aracılığı ile oluşan hücrelerdeki ölümler ise patolojik apoptoz olarak tanımlanabilir (Cohen 1993; Elmore, 2007; Öktem ve ark., 2001).

2.13.1. Apoptotik Hücrelerde Gözlenen Değişiklikler

Apoptoz, hücrelerde genetik olarak kodlanmış ve hücrenin kendini yok etmek için bir takım metabolik olayların başladığı bir olaydır. Apoptozun başladığı hücre diğer hücrelerle bağlantılarını koparır, büzülür, kromatinde yoğunlaşma şekillenerek piknotik bir görünüm şekillenir. DNA nükleozomlardan kesilerek agaroz jel elektroforezinde merdiven bant

görünümü alır. Hücre membranı yapısında bulunan fosfatidilserin membranın iç yüzeyinden dış yüzeyine yerleşir. Çekirdekte küçülme meydana gelerek sonrasında parçalara ayrılır. Hücre, membranla sarılı yumaklar halinde ayrılarak apoptotik cisimcikleri oluşturur. Bu cisimcikler makrofajlar tarafından tanınarak fagosite edilir ve yangı gözlenmez (Bellamy ve ark., 1995; Ellis ve ark., 1991).

Hücrede apoptozun düzenlenmesinde p53, kaspaz, sitokrom-c, Bcl-2 ailesi proteinleri, kalsiyum ve mitokondriler rol oynar. Apoptoz süreci boyunca hücre içine kalsiyum girişi olur ve kalsiyum iyonları endonükleazların, proteazların, transglutaminazların aktivasyonunda ve apoptoz sürecinin gen düzenlenmesinde rol oynar (Orrenius ve ark., 2003; Martin ve ark., 2005).

Erişkin memelilerde spermatogenezis sürecinde germinatif hücrelerin kaybı önemli rol oynamaktadır. Testislerdeki spermatozoonların %25 ile %75' lik kısmı dejenere olarak ölmektedir. Gonadotropinler veya testosteron eksikliği testislerdeki germinal hücrelerin kaybına neden olmaktadır. Apoptoz veya DNA hasarı erkek infertilitesinde belirleyici faktörlerdendir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda apoptozun spermatogenezis sürecinde ve germinal hücrelerin ölümünde önemli rol oynadığı ve çoğu memeli türünde spermatogenezisin düzenlenmesindeki mekanizmalardan biri olarak kabul görmüştür (Weng ve ark., 2002; Ok ve Öz, 2007; Sakkas ve ark., 2007).

2.1.1.15.Spermatogenezis Sonrası Etkili Bazı Genler

Çeşitli hücre tiplerinde veya dokularda gözlenen biyolojik, fizyolojik ve fizyopatolojik durumlar gen anlatımındaki kalitatif ve kantitatif farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Araştırılan genlerin normal ile patolojik, sağlıklı hücre veya doku arasında ifade düzeylerinin karşılaştırılması, hücrenin fizyolojisinin, sağlığının ve kalitesinin anlaşılmasına ilişkin önemli bilgiler vermektedir. Sonuçta normal ve patolojiyle ilişkili gen ifade düzeylerindeki değişimlerin belirlenmesi kullanılacak yeni metod, yöntem, yeni tedavi ve teşhislerin tanımlanmasına imkân vermektedir. Yüksek ökaryotlarda biyolojik gelişim, hücresel büyüme ve korunması farklı gen anlatımları, ifadeleri ile meydana gelmektedir. Son dönemdeki teknolojik ilerlemeler, biyolojik ve patolojik durumlarla ilgili transkripsiyonel cevaplardan sorumlu binlerce genin ve gen ifadelerinin bu amaçla kullanılması büyük önem arz etmektedir.

(Kömürcü ve Erginel, 2011). Sunulan çalışmada sperm dondurma medyumuna ilave edilen L-prolin ve glutatyon'un gen düzeyinde fayda ve etkilerini ortaya koyabilmek için Bcl-xL ve PRM1 genlerinin ifade düzeylerine bakılmıştır.

2.1.1.16.Bcl Gen Ailesi

Bcl-2 proteini apoptozisin düzenlenmesinde önemli rol oynar. BCL2-like 1 geni tarafından kodlanan Bcl-2 proteini (B-cell lymphoma-2) mitokondride bulunan bir transmembran molekülüdür (Korsmeyer 1995; Yang ve Korsmeyer 1996). Bu protein, hücrenin dış membranında, nükleus membranında, endoplazmik retikulum membranında ve mitokondriyal membranda lokalizedir (Stanley ve Korsmeyer, 1992).

Bcl-2 antiapoptotiktir. Apoptotik hücre ölümünü baskılamak, hücre proliferasyonunu etkilemeden hücrenin yaşam süresini uzatmak görevi vardır. Bcl-2 protein ifadesi, esansiyel büyüme faktörlerinin olmadığı durumlarda bile, hücrenin G0 fazında kalarak apoptotik hücre ölümünün baskılanmasına neden olur (Stanley ve Korsmeyer, 1992). Bcl-2 ile homolog sekansa sahip bir grup gen tariflenmiş ve bunlara Bcl-2 gen ailesi adı verilmiştir. Bcl-2 gen ailesi proteinleri, α -sarmal kısımlarını içeren ve BH alanı (BH1, BH2, BH3, BH4) olarak adlandırılan benzer protein yapılarına sahiptir. Bcl-2 ile ilgili proteinler, yapısal ve işlevsel durumlarına göre Bcl-2, Bax, Bik olmak üzere 3 grupta sınıflandırılmıştır (Wickremasinghe ve Hoffbrand 1999).

Bcl-2 alt grubu Bcl-2, Bcl-2 like 1 (Bcl-XL) ve Bcl-W' proteinlerinden oluşur. Bcl-2 ilişkili protein A1 (BFL-1) ve MCL-1 proteinleri de Bcl-2 izoformlarından. Bütün Bcl2 üyesi proteinler mitokondride bulunurlar. Antiapoptotik aktivitesi olan bu proteinler mitokondrinin membranındaki geçirgenliği düzenlerler (Stanley ve Korsmeyer, 1992, Tilokani ve ark., 2018).

Bax alt grubu Bax ve Bak üyelerinden oluşur ve proapoptotiktir. Yapısal olarak difteri toksini ile oldukça benzerlik gösterir. Bu toksin, lizozomal zarlarda mRNA çevirimi (translokasyon) baskılayıcı adenosin 5'-difosfat ribozile edici polipeptid A alt ünitesinin sitoplazmaya geçmesini sağlayacak büyüklükte kanallar oluşturarak hücreyi öldürür. Bax

proteini ise sitoplazmada serbest halde bulunurken hücrede apoptoz sinyaline yanıt oluştuğunda mitokondriyal membran geçirgenliğini bozarak etkisini gösterir (Jeng ve ark., 2018).

Bik alt grubu Bik, Bid ve Bim olmak üzere 3 proteinden oluşur ve proapoptotik etki gösterir (Rosse ve ark., 1998). Bcl-xL apoptozun baskılanması için anahtar rol üstlenmesinin yanı sıra birçok hücre içi fonksiyonun düzenlenmesinde rol alır. Proliferatif olmayan nöronların sağkalımı için gereklidir ve nöron yaralanmalarında koruyucu rol oynar. Nöronların büyümesini ve sinir ağlarının doğru oluşumunun teşvik edilmesinde rol oynar. Bcl-xL ayrıca Ca^{2+} nin mitokondriye taşınmasını teşvik ederek ATP üretiminin artırılmasına neden olabilir. Ek olarak Bcl-xL' yi hedeflemenin otoimmün hastalıklar ve yaşlanmada potansiyel değeri olduğu gösterilmiştir.

2.1.1.17.PRM1 Gen Ailesi

Fare genomu 2,5 milyar baz uzunluğunda olup, 2,9 milyar baz uzunluğundaki insan genomundan yaklaşık yüzde 14 daha kısadır (NIH, 2002). Spermatogenez esnasında paternal genomun fonksiyonel olarak durağan kaldığı düşünülmektedir. Spermatozoon DNA' sı somatik hücrelerden farklı olarak histon yerine protaminler ile paketlenmektedir. Bu durum, spermin taşıdığı genetik materyal hacminde önemli bir azalma sağlamaktadır. Ayrıca paternal genomun korunabilmesi için genetik materyalin sıkıca paketlenmesi gerektiği düşünülmektedir (Balhorn, 2007). Histon/ Protamin oranında veya P1/ P2 oranındaki anormallikler ile sperm DNA hasarı arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (Agarwal ve Said, 2003; Aoki ve ark., 2005; Chevalier ve ark., 1987).

Protaminler, birçok hayvan ve bitkinin son evre spermatidlerinde sentezlenen ve DNA' ya bağlanarak genomun yoğunlaşmasını sağlayan, arjinin aminoasiti açısından zengin proteinlerdir. Omurgalılarda haploid genom başına 1 ile 15 arasında protamin geni bulunur ve bunlar aynı kromozom üzerinde kümelenir. Protamin P1 tüm memelilerde sperm DNA paketlenmesinde rol oynarken, protamin P2 yalnızca primatların, bazı kemirgenlerin ve plasentalı memelilerin sperminde bulunur. Arjinin ve sistein aminoasiti yönünden zengin P1 50 aminoasitten oluşur (Balhorn, 2007). P2 histidin aminoasiti yönünden zengindir ve canlı türüne bağlı olarak 54-63 civarında aminoasit içerir (Dadoune, 2003). İnsanlarda P1 ve P2 genleri benzer şekilde 16p13.2' deki 16. kromozom üzerinde bir kümede aynı yerde bulunur (Wykes ve

Krawetz, 2003). Benzer şekilde düzenlenmiş bir protamin kümesi, faredeki 16. kromozomda bulunur ve PRM1 geni tarafından ifade edilir (Reeves ve ark., 1989).

2.1.1.18. Fare Spermi Üzerine Yapılan Araştırmalar

Fare sperminin dondurulma yeteneği birçok türe göre oldukça düşüktür. Bununla birlikte kriyoprezervasyonun başarısı ile ilgili olarak kullanılan fare ırkı, seçilen kryoprotektan madde, kriyoprezervasyon medyumuna eklenen karbonhidratlar, lipidler, aminoasitler ve antioksidanların oldukça önemli etkileri bulunmaktadır (Evans ve Maxwell 1987; Tada ve ark., 1990; Takeshima ve ark., 1991; Dewit ve ark., 2000; Yıldız ve ark., 2007; Takeo ve Nakagata, 2010).

Çizelge 2. 1. Fare sperminin dondurulması üzerine yapılmış çalışmalar

Araştırmacı	Yıl	Araştırmanın Amacı	Kullanılan Sulandırıcı	Sonuç
Okuyama ve ark.	1990	Fare sperminin kriyoprezervasyonu ile embriyo eldesi	%3 Yağsız Süt Tozu ve %18 Raffinoz	Çözdürme sonrası dişilerin tohumlanması ve 10 saat sonra flushing ile toplanan embriyoların blastocyst aşamasına kadar kültüre edilmesi ve yalancı gebe farelere aktarılması sağlanmıştır.
Yokoyama ve ark.	1990	Farklı oranlarda raffinoz ve gliserolün sperm kriyoprezervasyonu üzerindeki etkileri	%20 Raffinoz + %5 Gliserol	%37 fertilizasyon elde edilmiştir.
Tada ve ark.	1990	Farklı fare ırklarının sperminin dondurulmasında farklı oranlarda raffinoz ve gliserol ilavesinin etkileri	%18 Raffinoz + %1,75 Gliserol	Çözdürme sonrasında farklı fare ırklarına göre %13-65 fertilizasyon
Penfold ve Moore	1993	CBA ırkı fare sperminin dondurulmasında YS-Tes-Tris SLS ve Gliserol ilavesinin ve farklı sıcaklık-zaman ortamlarında etkisi	Tris, Gliserol, Yumurta Sarısı ve Sodyum dodesil sülfat	Çözdürme sonrasında %59 oranında fertilizasyon ve %17 doğum oranı elde edilmiştir.
Sztejn ve ark.	2001	%3 yağsız süt içerisinde kryoprotektanların farklı kombinasyonlarının motilite üzerindeki etkisi	Gliserol, propandiol, formamid, DMSO, laktoz, mannitol, sukroz, trehaloz, raffinoz,	Çözdürme sonrasında Raffinoz + Yağsız süt tozu karışımından sırasıyla %23 motilite ve %42 membran bütünlüğü tespit etmişlerdir
Yıldız ve ark.	2007	Kriyoprezervasyon protokollerinin	%3 Yağsız Süt tozu ve 0.2M Raffinoz içeren	0.3 M Raffinoz ve 0.1 M Fruktoz ilavesi çözdürme sonrası motilite

		optimize edilmesi üzerine kriyoprotektanların değişen kombinasyonları ve konsantrasyonlarının test edilmesi	sulandırıcıya ilave olarak Glikoz, fruktoz, propilen glkol, gliserol ve sodyum piruvat	(%33.2±2.7) membran bütünlüğü (%40.3±2.3) oranlarını iyileştirdiği, DNA Hasar (%5.1±1.3.) oranını düşürdüğü sonucuna varıldı.
Takeo ve Nakagata	2010	Fare sperminin dondurulmasında Glutamin ilavesinin kryoprezervasyon üzerine etkisi	%18 raffinöz + %3 yağsız süt tozuna ilave edilen 100 mM/L glutamin ve metil-β-cyclodextrin	Dondurup çözöürölen sperm kontrol grubuna kıyasla fertilizasyon kapasitesinde artış
Yıldız ve ark.	2010	Fare sperminin dondurulmasında çeşitli soğuma hızları ve ozmotik stres maruziyetinin çözüm sonu sperm kalitesi ve DNA bütünlüğünün karşılaştırılması	%18 raffinöz + %3 yağsız süt tozu	-100 °C/dk donma hızında dondurulan spermin -5 °C/dk/dk hızında dondurulan sperme göre çözüm sonunda daha iyi sonuçlar vermiştir. %23.2±2.7 motilite, %39.8±3.3 membran bütünlüğü ve %8.4±1.1 DNA hasar oranı bulunmuştur.
Bertoldo ve ark.	2014	Fare sperminin dondurulmasında sulandırıcıya ilave edilen metformin' in çözüm sonu sperm fertilite yeteneğı incelenmiştir.	%22.5 raffinöz, %3 yağsız süt tozuna ilave 50, 500 ve 5000 µM dozlarında metformin ilavesi.	5000 µM ilave edilen grupta çözüm sonrası fertilizasyon oranlarında artış ve anormal zigot oranında düşüş bildirildi.
Raspa ve ark.	2017	Dondurulmuş spermlerin kuru buz içerisinde saklanması ve nakledilebilirliğinin araştırılması	%18 raffinöz, %3 yağsız süt tozu	-196 °C de depolanan spermin -80 °C deki kuru buz içerisinde döleme yeteneğinde önemli bir kayıp olmaksızın 7 gün boyunca depolanabileceğini bildirmişlerdir.
Shi ve ark.	2018	Fare sperminin dondurulmasında sulandırıcıya monothioglycerol, quercetin ilavesinin kryoprezervasyon üzerine etkisi	%18 raffinöz, %3 yağsız süt tozu	C57BL/6 fare spermlerini %18 raffinöz + %3 yağsız süt sulandırıcısına monothioglycerol (0.5 mM), glutatyon (0.5 mM) ve quercetin (25 µM) ayrı ayrı ilave edip dondurma sonrası yapılan motilite muayenesinde kontrol grubuna göre önemli oranda yükselme tespit etmişlerdir
Yıldız ve Erol	2024	Fare sperminin dondurulmasında sulandırıcıya LDL ilavesinin kryoprezervasyon üzerine etkisi	%18 raffinöz, %3 yağsız süt tozu	Fare spermine %2.5 düşük yoğunluklu lipoprotein ilavesinin dondurma sonrası spermatolojik kalite parametrelerini iyileştirdiğı ve fare sperminin dondurulması ve korunmasında soğuk şokuna karşı yüksek oranda koruyucu etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.1.1.Gereç

Sunulan tez çalışması için Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi (HMKÜ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK) 2019/07-13 numaralı etik kurul onayı alındı. 14-16 haftalık yaşta CD1 ırkı erkek fareler kullanıldı. Deneysel Araştırmalar Uygulama Merkezi (DAUM) ile HMKÜ Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalına bağlı laboratuvarında yürütüldü.

3.1.1.2.Yöntem

Çalışmada kullanılacak laboratuvar hayvanlarının bakımı, kullanım şartlarına (12 saat aydınlık: 12 saat karanlık ve $24\pm3^{\circ}\text{C}$) uygun olacak bir şekilde yürütülmüştür. Deneysel uygulama boyunca fareler için standart ticari fare yemi (pellet yem) ve musluk suyu ise *ad libitum* düzeyde sağlanmıştır. Yapılan araştırmada kontrol grubu da dahil olmak üzere 9 grupta, her bir grup için 8'er adet toplam 72 adet CD1 ırkı erkek fare kullanılmıştır (n:8).

3.1.1.3.Sperm Sulandırıcılarının Hazırlanması

3.1.1.4.Kriyoprezervasyon medyumunu (CPA) hazırlanması, L-Proline ve Glutatyon İlavesi

Spermatozoonların dondurulmasında Nakagata (2000)'ya göre Raffinose-Skimmed Milk (CPA) sulandırıcısı kullanıldı. Kriyoprezervasyon medyumunu olarak %18 D-Raffinoz Pentahydrate (A18313 Alfa Aesar) ve %3 Yağsız süt tozu (Difco, IE) kullanıldı. Raffinoz $+40^{\circ}\text{C}$ ' sıcaklıktaki endotoxin içermeyen saf su (HyClone SH30529) ile çözündürüldü. Oda sıcaklığına düşen medyuma yağsız süt tozu ilave edildi. CPA Düz tabanlı 2 ml hacimli mikrosantrifüj tüplerine (Eppendorf 0030123620) 1 ml homojen hale gelen CPA aktarıldı ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika boyunca 14.000 rcf değerinde santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant yeni santrifüj tüplerine aktarıldı ve sulandırıcı şeffaf renk olana kadar işlem tekrarlandı. Toplanan

CPA 0.45 μm por genişliğine sahip filtrelerden (Sartorius, Almanya) bir enjektör yardımıyla geçirildi. Elde edilen, filtreden geçirilmiş son sulandırıcıların içerisinde ayrı ayrı 1mM, 5mM, 25mM, 50mM dozunda sırasıyla L-Proline (P5607, Sigma) ve 2.5mM, 5mM, 10mM, 25mM dozunda sırasıyla indirgenmiş Glutasyon (G6013, Sigma) ilave edilerek araştırmaya ait çalışma gruplarının solüsyonları elde edildi. Çalışmada fare spermlerinin dondurulmasında L-Proline ve Glutasyon ilavesiz %18 Raffinoz + %3 yağsız süt tozu kombinasyonu kontrol grubu olarak tutuldu. Finalde araştırma grupları Çizelge 3.1.' deki gibi özetlendi. Toplamda 9 ayrı araştırma grubu oluşturuldu.



Şekil 3.1. %18 raffinoz + %3 yağsız süt tozu içeren sulandırıcının hazırlanması.



Şekil 3.2. Mikrosantrifüj tüplerine konulan sperm sulandırıcılarının +4°C' de 14000 rcf değerinde santrifüj Edilmesi

Çizelge 3.1. Çalışma gruplarına ait solüsyonlar

•	%18 Raffinoz + %3 Yağsız Süt Tozu	+	---	Kontrol
•	%18 Raffinoz + %3 Yağsız Süt Tozu	+	1 mM	L-Proline
•	%18 Raffinoz + %3 Yağsız Süt Tozu	+	5mM	L-Proline
•	%18 Raffinoz + %3 Yağsız Süt Tozu	+	25mM	L-Proline
•	%18 Raffinoz + %3 Yağsız Süt Tozu	+	50mM	L-Proline
•	%18 Raffinoz + %3 Yağsız Süt Tozu	+	2.5mM	Glutathione Reduced
•	%18 Raffinoz + %3 Yağsız Süt Tozu	+	5mM	Glutathione Reduced
•	%18 Raffinoz + %3 Yağsız Süt Tozu	+	10mM	Glutathione Reduced
•	%18 Raffinoz + %3 Yağsız Süt Tozu	+	20mM	Glutathione Reduced

3.1.1.5.Human Tubul Fluid (HTF)

Çalışmada kullanılan Human Tubul Fluid (HTF) (Quinn ve ark., 1985) kompozisyonu Çizelge 3.1. 'de gösterilmiştir. Tabloda gösterilen kimyasallar endotoksin içermeyen steril saf su (HyClone SH30529) içerisinde çözündürülerek 100 ml hacme göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2. HTF Formülasyonu

HTF (Human Tubul Fluid)		
Kimyasallar	Miktar (100 ml için)	Ürün
NaCl	0.5938gr	Sigma S5886
KCL	0.035gr	Sigma P5405
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.03gr	Sigma C7902
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.00493gr	Sigma M7774
KH ₂ PO ₄	0.00503gr	Sigma P5655
NaHCO ₃	0.2101gr	Sigma S5761
Glukoz	0.05gr	Sigma G6152
Sodium Lactate	342 µl	Sigma L7900
Sodium Pyruvate	0.00363gr	Sigma P4562
Penicillin-G	0.0075gr	Sigma P7794
Streptomycin	0.005gr	Sigma S9137
Phenol red (0.5%)	40µl	Sigma P0290

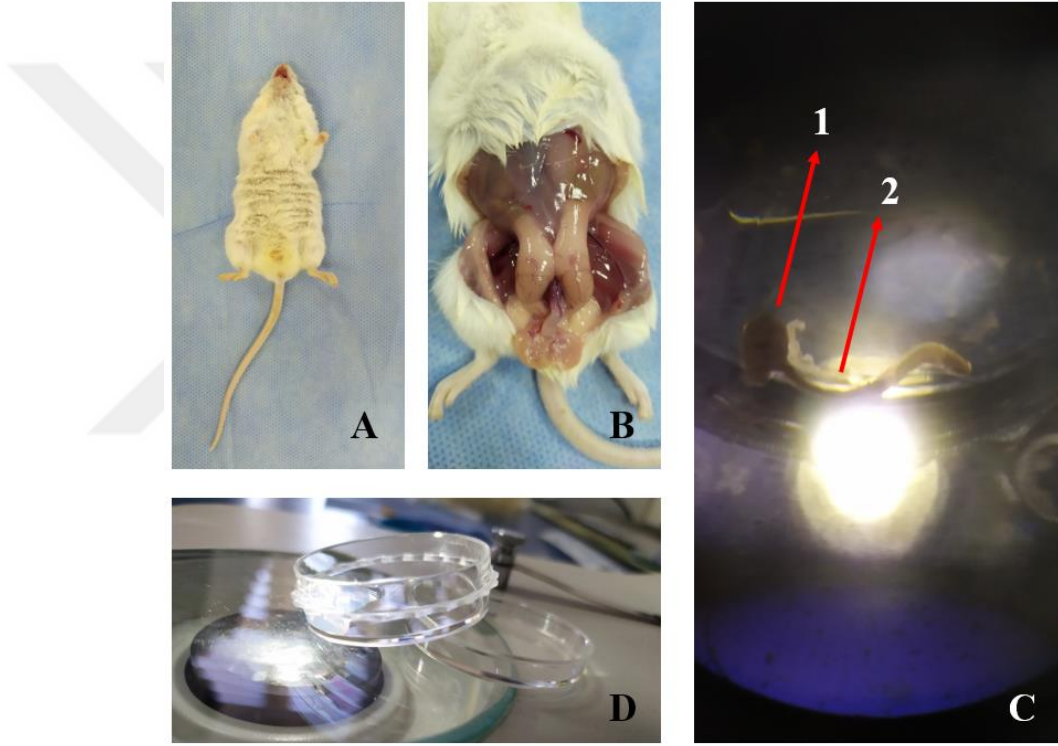
3.1.1.6.Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)

Çalışmada kullanılan hazır PBS tabletler (P4417 Sigma) steril distile su ile 1x yoğunluğunda hazırlandı. 100 ml hacimli eşit parçalara bölünerek otoklavlandı. Hazırlanan stok çözelti 6 aydan uzun olmamak kaydıyla kullanıldı.

3.1.1.7.Sperm Alınması ve Sulandırılması

Çalışmada kullanılan CD-1 ırkı erkek fareler ksilazin/ ketamin ile anestezi altına alındıktan sonra servikal dislokasyon yöntemi ile kurban edildi ve Laminer akış kabini içerisinde Abdominal bölge %80 etil alkol ile temizlendi. Steril şartlarda cerrahi yöntemlerle ürogenital bölgeye ulaşıldı. Bunun için küt uçlu cerrahi makas ile vertical ensizyonla peritona ve iç organlara ulaşıldı. Ürogenital bölgede testislere ulaşıldıktan sonra kauda epididimler yağ

ve çevre dokularından arındırılarak daha önce 37°C' ye ısıtılmış 1 ml CPA (kontrol veya antioksidanlardan biri bulunan) içeren 60x15mm petri kaplarına alındı. Bir fareden alınan bir çift kauda yalnız bir araştırma grubu için kullanıldı. Kauda epididimler stereo mikroskop (Euromex/ Nexius Zoom, NL) altında düz uçlu forseps ile sabitlenerek, 27 Gauge iğne ve mikrocerrahi makası ile birkaç kez perfore edildi. Kauda epididimler 37°C sıcaklıkta 10 dakika boyunca inkübe edilerek, epididimlerde depo edilen spermin sulandırıcıya içerisine çıkması sağlandı.

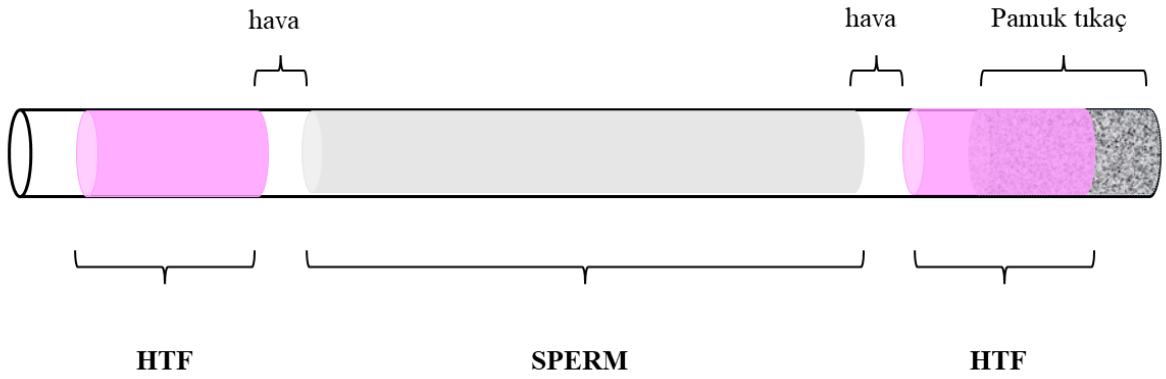


Şekil 3.3. CD-1 ırkı erkek farelerin anesteziye alınması ve bölgenin sterilizasyonu (A). Ürogenital bölgeye ulaşılması (B). Epididimal dokunun (1. Kauda epididim, 2. Duktus Deferens) CPA içerisine alınması (C). Epididimal dokunun perfore edilmesi ve sperm dışarı çıkışı (D).

İnkübasyon işlemi bittikten sonra yoğunluk ve progresif motilite değeri belirlenmek üzere 10µL sperm alınarak 37°C sıcaklıkta 90µL HTF ile karıştırıldı. İnkübatör içerisinde 37°C sabit sıcaklıkta tutulan Makler lamı (Sefi Medical, IL) ile yoğunluk ve progresif motilite değerleri belirlendi. Yoğunluğu $50-100 \times 10^6/\text{ml}$ ve motilite değeri %70 ve üzeri olan sperm numuneleri kriyoprezervasyon işlemine tabî tutuldu.

3.1.1.8.Sperm Kriyoprezervasyonu

Sunulan tez çalışmasında sperm numuneleri 0.25 ml' lik payetlere (IMV, FR) 150 μ L yüklendi. Böylece her payetteki tohumlama dozu 7-10x10⁶ sperm olarak ayarlandı. Payetlerin sıvı azot içerisinde yüzmelerini önlemek ve spermin payetlerin pamuklu kısımlarına temasını engellemek için sırasıyla 50 μ L HTF, 10 μ L hava, 150 μ L sperm, 10 μ L hava ve 50 μ L HTF çekildikten sonra uçları sıcak pres (İmpulse sealer FS-200) ile kapatıldı.



Şekil 3.4. Nakagata 2000' e göre payet şeklinin gösterilmesi

İçerisinde 3.5 cm sıvı azot ve sıvı azot seviyesinden 6 cm yukarıdaki rafa dizilen payetler strafor kutunun (Genişlik:Yükseklik:Derinlik 270x220x270mm) ağzı kapatıldıktan sonra 10 dk boyunca sıvı azot buharında bekletildi. Sürenin ardından sıvı azot içerisine daldırılan payetler yine 5 dakika bekletildikten sonra sıvı azot içerisinde gobletlere yüklenerek sıvı azot tankına aktarıldı. Sıvı azotun bulunduğu bütün aşamalarda kriyojenik eldiven ve koruyucu gözlük kullanıldı. Her araştırma grubuna ait sperm numuneleri farklı renklerde payet, goblet ve kanisterlerde depolandı.

3.1.1.9.Payetlerin Çözdürülmesi

Çalışmada dondurulmuş sperm numuneleri her seferde tek payet olacak şekilde 37°C su banyosuna aktarılaraq (Yarıçap:Yükseklik 60x210 mm) (dekonjelatör, CITO 026897, IMV, FR) 30 saniye süreyle çözdürüldü. Payetler çözdürüldükten sonra kâğıt havlu ile kurulanarak presli uçlarından kesildi. Pamuklu kısım sitile yardımıyla ilerletilerek payet içeriğinin dışa

akması sağlandı. Karbondioksitli inkübatör içerisinde 37°C ve %5 CO₂ ortamda bekletilen ve HTF içeren 1.5 ml' lik santrifüj tüplerin içerisine çözdürülen payet (sperm+sulandırıcı) içeriği aktarıldı.

3.1.1.10. Spermatolojik Özelliklerin Belirlenmesi

3.1.1.11. Makler Lamı ve Sperm Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Sunulan tez çalışmasında sperm konsantrasyonunun belirlenmesinde Makler lamı (Sefi-Medical Instruments, IL) kullanıldı. Makler lamı toplamda 2 parça camdan oluşur. Üst kısım, ortasında her biri 0.1mm x 0.1mm' lik 100 kareye bölünmüş lameldir. Alt kısım, örneğin bırakıldığı sabit hacimli bir kuyucuktan oluşan, kenarlarında 4 adet quartz pin bulunan cam tabandan oluşur. Lamel kapatıldığında numunenin bırakıldığı alan 10µm derinliğe sahiptir. Değerlendirmeler 20x büyütme katsayısına sahip objektifle yapılır. Sperm yoğunluk değerlendirmesi üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Sayım için, inkübe edilmiş spermden 10 µl alınarak 90 µl fizyasyon medyumunu (10 mM Formaldehit içeren PBS) ile 1:10 oranında sulandırılarak hareketsiz hale gelmeleri sağlandı. Elde edilen karışımdan 10 µl alınarak makler lamına yerleştirildi ve 200 kat büyütme altında 10 karede sayım yapıldı. Sayımlar her numune için 3 defa tekrarlanarak ortalamaları alındı. Çıkan sonuç 10 kat sulandırma oranından dolayı 10 ile çarpıldı. Mililitre başına milyon cinsinden nihai sonucu hesaplamak için 100.000 ile çarpıldı.



Şekil 3.5. Makler lamı

3.1.1.12. Motilite Muayenesi

Çalışmada motilite değerinin belirlenmesi, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1999 el kitabına göre Makler lamı kullanılarak değerlendirildi. İnkübatörde 37°C' ye ısıtılan makler

lamı üzerine 20µL sperm örneği aktarıldı ve ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta 200 kat büyütme altında incelendi. Değerlendirmeler HTF içerisinde inkübasyon süresi tamamlandıktan hemen sonra yapıldı. Makler lamı üzerinde 100 adet küçük karede ileri doğru düzgün doğrusal hareket eden spermatozoonların diğer hareket biçimlerini (dairese hareket eden, sabit ancak kuyruk hareketleri olan, hareketsiz) gösteren spermatozoonlara oranı sayılarak yüzdelik olarak belirlendi. Her örneğin değerlendirilmesi için 3 tekrar yapılarak ortalaması alındı.

3.1.1.13.Ölü Sperm Oranının Belirlenmesi

Çalışmada ölü sperm oranının belirlenmesi Eosin- Nigrosin boyama yöntemi Agarwal ve ark. (2016) 'na göre yapıldı. Sperm örnekleri %1 Eosin ve %10 Nigrosin boyası ile muamele edildikten hemen sonra yayma froti hazırlanarak sıcak zeminde kuruması sağlandı. Solüsyonların hazırlanması için 0.5 gr Eosin-Y 50 ml distile suda çözdürüldükten sonra 0.45 µm por büyüklüğüne sahip filtreden geçirildi. Balon joje içerisine 5gr Nigrosin boyası ilave edildikten sonra 50 ml distile su ilave edilerek 80 °C su banyosunda karıştırılarak çözülmesi sağlandı. Hazırlanan %10 Nigrosin solüsyonu 0.45 µm por büyüklüğüne sahip filtreden geçirildi. Eosin ve Nigrosin solüsyonu 3 aydan uzun olmamak kaydıyla buzdolabında +4°C' de muhafaza edildi ve kullanılacağı zaman oda ısısına, sperm numunesiyle muamele edileceği zaman ise 37°C' ye ısıtıldı.

Canlı spermatozoon oranlarının belirlenmesi için 37°C sıcaklıktaki lam üzerine sperm numunelerinden 10µL alındı ve 20µL %1 Eosin solüsyonu ilave edilerek 5sn boyunca karıştırıldıktan sonra 20µL %10 Nigrosin ilave edilerek tekrar karıştırıldı. Bu karışımdan hemen 20µL alınarak başka bir lamda sürme froti hazırlanarak sıcak zeminde kuruması sağlandı. Frotiler 400kat büyütme altında incelenerek 400 adet spermatozoon sayıldı. Ölü spermatozoonların baş kısmı kırmızı veya koyu pembe görünürken, canlı spermatozoonların baş kısmı beyaz renkte gözlemlendi.

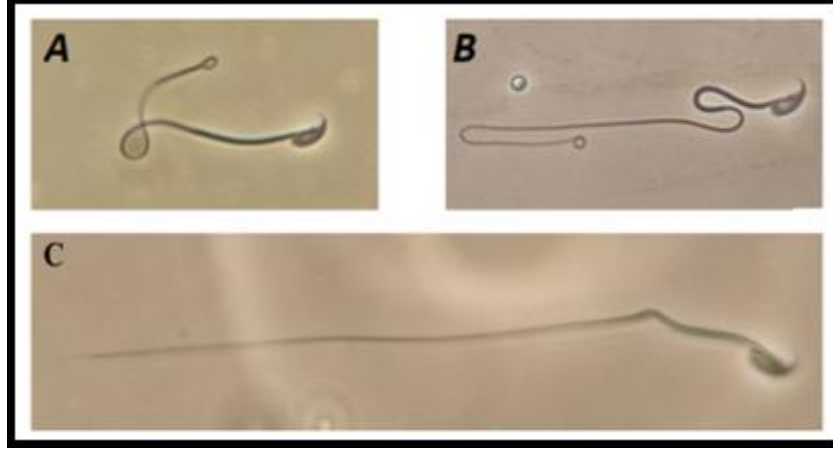


Şekil 3.6. Eozin-Nigrosin boyama yöntemi sonucu canlı spermatozoon (A), ölü spermatozoon (B)

3.1.1.14. Plazma Membran Bütünlük Testi

Çalışmada spermatozoonların plazma membran bütünlüğü veya sağlamlığı Hipo Ozmotik Şişme Testi (HOST) ile belirlendi. Jeyendran ve ark. (1984) 'nın yaptığı çalışmaya göre 100 mOsm değerinde, düşük ozmotik basınca sahip HOS solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan solüsyonun ozmotik basıncı ozmometre ile ölçüldü (osmomat 3000, Gonotec, USA). Bunun için 0.55g Sodyum Sitrat + 1.1g Fruktöz 100 ml distile suda çözdürüldü ve 0.45 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek steril borosilikat cam şişeye aktarıldı. HOS testi ile sperm analizi için; 37°C inkübatörde 100µL HOS solüsyonu içerisine 10µL Sperm örneği ilave edilerek 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası lam üzerine 20 µL örnek alınarak üzeri lamel ile kapatıldı. Hazırlanan preparat faz kontrast mikroskopta 400 kat büyütmede incelendi.

İncelemelerde kuyruk kısmı şişmiş/ kıvrılmış olan spermatozoonlar HOS+ ve sağlam olarak kabul edilirken, kuyruk kısmında değişme olmayan spermatozoonlar HOS- olarak değerlendirildi. Her örnekten toplam 200 spermatozoon sayılarak yüzde değerleri kaydedildi (Sayılan HOS pozitif spermatozoon/ toplam spermatozoon) x 100).



Şekil 3.7. HOS Test yapılan fare spermi. **A** ve **B** membran bütünlüğü sağlam HOS pozitif spermatozoon. **C** membran bütünlüğünü yitirmiş HOS negatif spermatozoon.

3.1.1.15. Anormal Akrozom Muayenesi

Çalışmada spermatozoonlara ait akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi Somfai ve ark. (2002) göre yapıldı. Aşağıdaki formülasyona göre hazırlanan hancock solüsyonundan Eppendorf tüpe 500 µl alındı üzerine 50 µl sperm eklenerek spermatozoonların tespit edilmesi sağlanmıştır (Hancock, 1952). Bu karışımdan lam üzerine 50 µl alınarak üzerine lamel kapatılarak 1000 kat büyütme oranında immersiyon yağı ile morfolojik incelemeler gerçekleştirildi (Günay ve ark., 2003). Toplam 300 adet spermatozoon incelenerek akrozom hasarına sahip spermatozoonlar % olarak belirlendi.

1. Solüsyon

NaCl	1.13 g
H ₂ O	62.50 ml

2. Solüsyon

a) Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	2.71g
H ₂ O	62.50 ml
b) K ₂ HPO ₄	2.78g
H ₂ O	62.50 ml

2. solüsyonu hazırlamak için 25ml (a) + 10 ml (b) karıştırılır

Ana solüsyonu hazırlamak için

1. solüsyon	18.75 ml
2. solüsyon	12.50 ml
Formalin	7.80 ml
H ₂ O	62.50ml

3.1.1.16.Motilite Dayanıklılık Testi Longevity

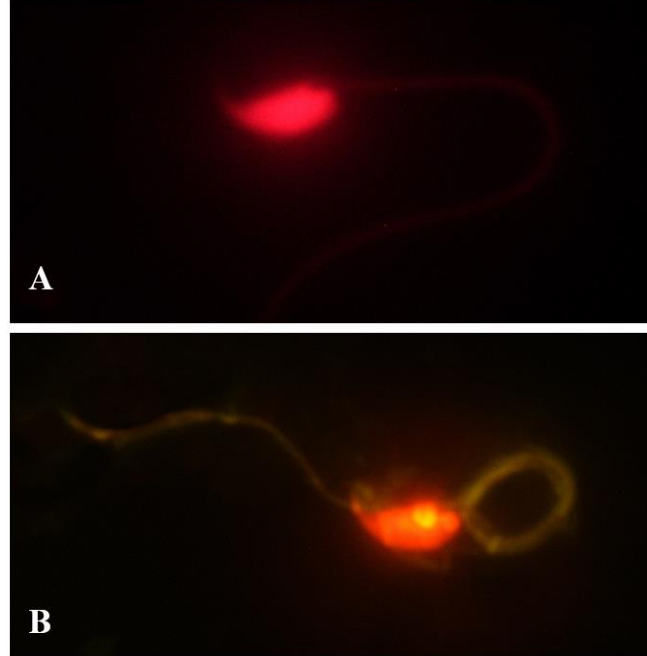
Çalışmada, sıfırıncı saatteki motilite muayeneleri yapılan sperm örnekleri 37°C inkübatörde inkübasyona bırakılarak 60 dakikada bir defa olmak üzere motilite muayeneleri tekrarlandı. Her bir sperm örneğinin motilite değeri %0.00 olana kadar işlem tekrarlandı. İnkübe edilen sperm örneklerinden 10µL alınarak 37°C' ye ısıtılmış makler lamına aktararak 200 kat büyütme altında faz kontrast mikroskop (Olympus CX21, JP) kullanılarak progresif motilite değerleri hesaplandı. Progresif motilite değeri Makler lamında sahada 100 adet küçük karede, ileri doğru doğrusal hareket eden spermatozoonlar ile toplam sayılan ve diğer hareket biçimini gösteren (dairese, titreme, hareketsiz) spermatozoonların oranlanmasıyla yüzdelik değer hesaplandı.

3.1.1.17.DNA Hasarının Tespiti

Çalışmada sperm örneklerindeki bireysel DNA hasarının tespit edilmesinde indirekt TUNEL yöntemi (ApopTag S7110, Sigma) kullanıldı. Test, Üreticinin el kitabına göre gerçekleştirildi. Foto-hassas kimyasalların tepkimeye girmesini önlemek için deneyler karanlık ortamda gerçekleştirildi. Bunun için; mikrosantrifüj tüpü içerisine 4×10^6 adet spermatozoon ve 500 µL %0.01 PVA içeren PBS ile hücre süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan hücre süspansiyonu 750g x 5dk boyunca santrifüj edilerek yıkandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra dibe çöken spermatozoonlar üzerine %0.01 PVA içeren PBS ilave edilerek en düşük ayarda vortex ile hücre süspansiyonunun homojen olması sağlandı. Yıkama işlemi toplamda 3 defa tekrarlandı. Sperm peletine 500 µL %0.02 TRİTON-X-100 ve %0.02 Paraformaldehit içeren PBS ilave edilerek spermatozoonlar geçirgenleştirildi. Vortex uygulandıktan sonra oda ısısında 40dk boyunca inkübasyonun ardından 750g x 5dk boyunca yapılan santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra %0.01 PVA içeren PBS ile 3 defa yıkandı. DNA kırıklarındaki 3'-OH uçlarına TdT enzimi kataliziyle digoxigenin-11-d-uridine triphosphate etiketlenerek nükleotit heteropolimerleri oluşturuldu. Bunun için süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra peletin üzerine 75 µL Ekilibrasyon tamponu eklendi, 20 sn sonra 16 µL TdT enzim ve 38 µL Reaksiyon tamponu eklendi. Nemlendirilmiş bir ortama alınarak 37°C' de 2 saat boyunca inkübe edildi. Süre sonunda tepkimelerin durdurulması için 500 µL %3 Stop/ wash solüsyon ile

10 dk boyunca muamele edilerek süre sonunda 750g x 5dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 500 µL %0.02 TRİTON-X-100 içeren PBS ilave edilerek yıkandı ve santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Nükleotit heteropolimerleri, Antidigoksinin Fab-Floresin İzotiyosiyanat (FITC) ile lokalize edilmesi için 1saat boyunca karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası santrifüj uygulandı ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet PBS ile 4 defa yıkandı. Negatif hücrelerin belirlenmesi için karşı-boyama amacıyla hücre süspansiyonuna 10 µl Propidium İodide (1 µg/ ml) (PI) ilave edildi ve 1 saat inkübasyona bırakıldı.

DNA kırığına sahip hücrelerin görüntülenmesi amacıyla, numuneler inkübasyonun hemen ardından floresan mikroskopta (Eclipse Ni, Nikon) 200 kat ve 400 kat büyütme altında incelendi. Lam üzerine 20 µl örnek alınıp lamel kapatıldı ve 300 kat büyütme altında FITC/PI filtreleri (excitation 490nm & emission 520 nm dalga boyu) kullanıldı. DNA kırığı olan spermatozoonlar yeşil renkte floresan görüntü verirken hasarlı olmayan spermatozoonlar kırmızı renkte floresan görüntü verdi. Yeşil floresan veren spermatozoonlar DNA hasarlı + olarak kabul edildi ve her bir numune için 400 spermatozoon sayıldı. Yeşil floresan veren spermatozoonlar ile toplam sayılan spermatozoonlar (yeşil + kırmızı) oranlanarak sonuçlar yüzdelik olarak hesaplandı.



Şekil 3.8. Tunel yöntemiyle DNA Hasarının belirlenmesi: normal spermatozoon(A), Tunel pozitif DNA Hasarlı Spermatozoon (B)

3.1.1.18.RNA İzolasyonu

Sunulan tez çalışmasında sperm numunelerinden RNA izolasyonu için sperm süspansiyonu nükleaz-içermeyen mikrosantrifüj tüplerine alınarak steril PBS ile yıkandı. Ardından $+4^{\circ}\text{C}$, $150 \times g$ 'de, 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet, somatik hücre kontaminasyonunu önlemek amacıyla lizis tamponu (%0.05 sodium dodecyl sulphate ve %0.25 Triton-X-100) ile $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dk muamele edildi. Bu süspansiyondan 10 μL alınarak Makler lamında 200 kat büyütme altında yoğunluk belirlendi. Somatik hücrelerin lize olduğunu doğrulamak için de yine 10 μL örnek alınarak sürme frotiler hazırlandı ve Eosin-Nigrosin ile boyanarak 100x objektif ile somatik hücre varlığına bakıldı, negatif olarak doğrulanan örnekler ile işleme devam edildi.

Ön işleme tabi tutulan taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş çalışma gruplarına ait sperm örneklerinin total RNA izolasyonu, Trizol yöntemiyle (Thermo Fisher Scientific, UK) üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Bunun için 10×10^6 hücre 1000 μL Trizol ile muamele edildi. Homojenata 200 μL kloroform ilave edilerek 20 defa kuvvetlice çalkalandı ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından $+4^{\circ}\text{C}$, $14000 \times g$ 'de, 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir nükleaz-içermeyen tüpe transfer edilerek eşit hacimde izopropanol ilave edildi, ardından 20 defa kuvvetlice çalkalandı. RNA'nın çökmesi için $+4^{\circ}\text{C}$, $14000 \times g$ 'de, 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet etanol ile yıkandı. Ardından RNA pelletleri kurutuldu ve 50 μL nükleaz-içermeyen su ile resüspanse edildi. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonu ve A_{260}/A_{280} absorbans oranı nükleik asit ölçer (NanoDrop™ 1000, Thermo Fisher Scientific, USA) ile belirlendi. İzole edilen örnekler kullanılabilecek kadar -80°C 'de muhafaza edildi (Simms ve ark., 1993).

3.1.1.19.cDNA Sentezi

Çalışmada elde edilen total RNA'nın 1 μg 'ı cDNA sentez kiti (abm, Kanada, Katalog no: G236) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda komplementer DNA (cDNA)'ya çevrildi.

Çalışmaya başlanmadan önce, biyogüvenlik kabini izopropil alkol ve etil alkol karışımı (1:19, v/v) ile dezenfekte edildikten sonra UV-B ışığıyla 30 dk sterilize edildi. Steril kabin içerisinde soğutuculu tüp standı kullanılarak Çizelge 3.3. 'te belirtilen içerikler eklendi. Otomatik pipet ile karışım nazıkçe homojenize edildi ve 2000 rpm'de 5 sn santrifüj edildi. Hemen ardından thermal cycler (BioRad, C1000) cihazı kullanılarak 50°C'de 15 dk cDNA sentezi gerçekleştirildi. Reaksiyonun durdurulması için 85°C'de 5 dk inkübe edildi. Yeni sentezlenen cDNA örnekleri kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Çizelge 3.3. cDNA sentezinde kullanılan bileşenler

İçerik	Miktar
5X Revers Transkriptaz Tamponu	4 µL
dNTP	1 µL
Random Primerler	1 µL
Total RNA or poly(A) + mRNA	Değişken (1 ng - 2 µg/reaksiyon)
Revers Transkriptaz (RTaz)	1 µL
Nükleaz içermeyen H ₂ O	20 L'ye tamamlanana kadar

3.1.1.20. Primer Tasarımı

Mus Musculus'un protaminasyon yolağında görev alan Protamin 1 (PRM1) ve anti-apoptozis yolağında görev alan B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) genlerinin ekspresyon miktarları kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) metodu ile analiz edildi. Referans gen olarak GAPDH geni kullanıldı. Bu genlere özgü primerlerin tasarımında The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)'tan yararlanıldı. Primerlere ait sekans dizileri Çizelge 3.4. 'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primer setleri

Gen Kısaltması	Gen adı	Primerlerin Dizisi (5'-3')		Assay ID	Ürün Uzunluğu (bp)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F:	TCCCGTAGAGATCCACAAAAGT	NM_001289726.1	104
		R:	GCCTGCTTACCACCTTCTT		
PRM1	Protamine 1	F:	GAAGATGTCGACAGACGGAG	NM_013637	120
		R:	ATGGACTTGCTATTCTGTGCATC		
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large	F:	GACAAGGAGATGCAGGTATTGG	NM_001289716.1	124
		R:	TCCCGTAGAGATCCACAAAAGT		

3.1.1.21.Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR):

Sunulan tez çalışmasında hedef gen bölgelerinin kantitatif eş zamanlı ters transkriptaz (RT-qPCR) amplifikasyonunu (BioRad, CFX96 Real time PCR System,) gerçekleştirmek için ikili tekrarlar halinde reaksiyonlar hazırlandı. Reaksiyon için ticari prob (HOT FIREPol, Solis Biotec, AB) kullanıldı. Reaksiyon için kullanılan bileşenler Çizelge 3.5.'te gösterilmiştir.

Eva Green qPCR mix içeriği:

- 10X Ters Transkripsiyon Tamponu
- 12.5 mM MgCl₂
- dUTP içeren dNTP karışımı
- Eva Green boyası (mutajenik ve sitotoksik olmayan SYBR Yeşil benzeri)
- GC-artırıcı (GC = Guanin Sitozin içeriği)
- Pasifik Mavisi Boyası
- H₂O

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan mastermix miktarları

Reaktifler	Hacim	Final konsantrasyon
HOT FIREPol® EvaGreen®qPCR mix	4 µL	1X
Forward primer (10 µM)	0.2-0.4 µL	100-200nM
Reverse primer (10 µM)	0.2-0.4 µL	100-200nM
cDNA	1 µL	
H ₂ O	20 µL'ye tamamlanana kadar	
Toplam Hacim	20 µL	

Strip PCR tüplerine (Thermo Fisher) yukarıdaki bileşenler eklendikten sonra üzeri ısıya dayanıklı, cihazla uyumlu kapaklar ile kapatılmış ve ardından uygun programda çalıştırılmıştır. Eş zamanlı PCR cihaz koşulları ve döngülerin protokolü Çizelge3.6 'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. RT-qPCR döngüleri protokolü

Döngü adımı	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
İlk Reaksiyon	95°C	10dk	1
Denatürasyon	95°C	15dk	40
Bağlanma	60°C	20sn	
Uzama	72°C	30sn	

RT-qPCR analizi sonucu elde edilen Ct değerleri GAPDH referans genine ait Ct değerleri ile karşılaştırılarak normalize edildi. Tüm primer setleri için her reaksiyonun etkinliği standart eğri ölçülerek, her bir amplikonun doğruluğu, erime eğrisi analizi yapılarak doğrulandı. Bcl-xL ve PRM1 hedef genlerinin relatif ekspresyon seviyeleri Livak ve Schmittgen (2001)’e göre $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak hesaplandı.

3.1.1.22. İstatistiksel analiz

Uygulamalar, “Fare spermlerinin dondurulmasında sulandırıcıya ilave edilen farklı antioksidan ve aminoasitlerin spermatolojik özellikler, çekirdek DNA bütünlüğü ve gen ekspresyonu düzeyleri üzerine moleküler karşılaştırmalar” başlıklı tez çalışması kapsamında motilite, viability (canlılık), Akrozom, HOS test, Uzun Ömürlülük (Longevity) ve Tunnel özelliklerinin karşılaştırılması için varyans analizi testi uygulanmıştır. Karşılaştırma yapılan tüm özellikler için Levene Homojenlik ve Kolmogorov-Smirnov ile özelliklerin homojenlik ve normallik varsayımları test edilmiş olup, özelliklerin homojen ve normal dağılıma sahip olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p>0.05$). Gruplar arası farklılık için yapılan varyans analizi sonucunda özelliklerin her biri için grupların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Bu kapsamda gruplar arasındaki farklılıkların test edilmesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1.1.1.Çalışma Gruplarında Dondurma Çözdürme Sonrası Spermatolojik Bulgular

Çalışma gruplarında dondurulup çözündürülme sonrası motilite, ölü sperm, plazma membran bütünlüğü, anormal akrozom ve DNA hasarı oranları çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışma grupları Dondurma Çözdürme öncesi ve sonrası belirlenen Spermatolojik Bulgular

Gruplar	Motilite (%)	Ölü sperm (%)	Sağlam Plazma Membran (%)	Anormal Akrozom Oranı (%)	DNA Hasarı (%)
Taze	85.00 ± 2.67 ^a	7.75 ± 1.25 ^a	91.75 ± 0.92 ^a	4.88 ± 0.64 ^a	0.38 ± 0.26 ^a
Kontrol	28.75 ± 2.06 ^c	41.50 ± 2.50 ^c	42.25 ± 2.76 ^{cd}	13.5 ± 0.50 ^b	5.13 ± 0.77 ^{bc}
1 mM Prolin	30.63 ± 3.05 ^c	41.38 ± 2.36 ^c	52.50 ± 4.71 ^{bc}	6.75 ± 1.06 ^{ab}	5.38 ± 0.60 ^{bc}
5 mM Prolin	43.13 ± 4.22 ^b	42.00 ± 5.51 ^c	58.38 ± 2.60 ^b	6.88 ± 1.11 ^{ab}	4.00 ± 0.57 ^b
25 mM Prolin	29.38 ± 4.48 ^c	42.63 ± 5.70 ^c	40.63 ± 4.19 ^d	6.63 ± 0.98 ^{ab}	7.13 ± 0.88 ^{cd}
50 mM Prolin	14.38 ± 2.90 ^d	64.07 ± 5.22 ^d	25.00 ± 2.19 ^e	6.90 ± 1.17 ^{ab}	11.09 ± 1.44 ^e
2.5mM Glutasyon	48.75 ± 3.63 ^b	20.00 ± 1.39 ^b	55.63 ± 4.29 ^b	5.00 ± 0.68 ^a	5.63 ± 0.84 ^{bc}
5 mM Glutasyon	49.38 ± 2.40 ^b	15.38 ± 1.22 ^{ab}	57.25 ± 2.53 ^b	6.63 ± 0.78 ^{ab}	6.50 ± 0.42 ^c
10 mM Glutasyon	48.33 ± 3.33 ^b	24.67 ± 4.14 ^b	54.17 ± 3.81 ^b	8.17 ± 1.05 ^{ab}	9.17 ± 1.01 ^d
20 mM Glutasyon	26.00 ± 2.45 ^c	45.40 ± 3.40 ^c	43.20 ± 4.41 ^{cd}	5.40 ± 1.03 ^{ab}	12.20 ± 1.62 ^e

a-e: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler istatistiki açıdan önemlidir (p<0.05). (n=8)

4.1.1.2.Motilite Değerleri

Taze ve dondurulup çözündürülme sonrası çalışma grupları arasında belirlenen motilite oranları çizelge 4.1.' de verilmiştir. En yüksek motilite değeri 85.00 ± 2.67 ile taze sperm örneklerinde bulunmuştur. Kriyoprezervasyon sonrası çalışma gruplarında ise, 28.75 ± 2.06 ' lık kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek motilite değerleri 49.38 ± 2.4 ile 5mM Glutasyon grubunda tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Tüm çalışma grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında en düşük motilite değeri 14.38 ± 2.9 ile 50 mM Prolin grubunda saptandı ($p<0.05$). Prolin ilaveli çalışma grupları kendi içinde değerlendirildiğinde en yüksek motilite 43.13 ± 4.22 oran ile 5mM prolin grubunda bulundu. Diğer bir ifadeyle, kriyoprezervasyon medyumuna Prolin aminoasiti ilave edilen çalışma grupları kendi arasında kıyaslandığında en yüksek motilite oranı 43.13 ± 4.22 ile 5mM Proline grubunda bulunurken en düşük motilite oranı $14,38 \pm 2.9$ ile 50 mM Prolin grubunda tespit edilmiştir ($p<0.05$). Glutasyon ilaveli çalışma grupları kendi içinde değerlendirildiğinde en yüksek motilite oranı 49.38 ± 2.4 ile 5mM Glutasyon grubunda saptanırken, en düşük motilite oranı 26.00 ± 2.45 ile 20mM Glutasyon grubunda belirlendi ($p<0.05$). Glutasyon ilaveli çalışma grupları kendi içinde değerlendirildiğinde en yüksek motilite oranı 49.38 ± 2.4 ile 5mM Glutasyon grubunda bulunurken, en düşük motilite oranı 26.00 ± 2.45 ile 20mM Glutasyon çalışma grubunda tespit edildi ($p<0.05$).

4.1.1.3.Ölü sperm Oranı (Canlılık- Viability)

Çalışma gruplarından elde edilen ölü sperm oranlarını gösteren sonuçlar çizelge 4.1.'de verilmiştir. Gruplar arası değerlendirmede en düşük ölü sperm oranı 7.75 ± 1.25 ile taze spermelerde belirlenirken, dondurup çözdürme sonrası en düşük ölü sperm oranı 15.38 ± 1.22 ile 5mM Glutasyon grubunda, en yüksek ölü sperm oranı ise 64.00 ± 5.22 ile 50 mM Prolin grubunda tespit edilmiştir ($p<0.05$). Ölü sperm oranları bakımından 7.75 ± 1.25 sonucu ile Taze sperm ile 15.38 ± 1.22 ile 5mM Glutasyon grubu arasında önemli istatistiki farklılıklar bulunmamıştır ($p<0.05$).

Çalışma grupları ölü sperm oranları açısından kendi içerisinde değerlendirildiğinde, Prolin aminoasiti ilave edilen çalışma gruplarında, sırasıyla 41.38 ± 2.36 , 42.00 ± 5.51 ve 42.63

$\pm 5.7'$ lik oranlar ile 1mM Prolin, 5mM Prolin, ve 25mM Prolin grupları arasında önemli bir fark bulunmazken ($p>0.05$), bu gruplar ile 64.00 ± 5.22 ile 50 mM Prolin grubu arasında önemli fark bulunmuştur ($p<0.05$). Glutasyon ilave edilmiş çalışma gruplarında ölü sperm oranları karşılaştırıldığında, sırasıyla 20.00 ± 1.39 , 15.38 ± 1.22 , 24.67 ± 4.14 ile 2.5mM Glutasyon, 5mM Glutasyon, 10mM Glutasyon grupları arasında fark tespit edilmezken ($p>0.05$), bu gruplar 45.40 ± 3.4 ile 20mM Glutasyon grubu arasında önemli istatistiki farklar bulunmuştur ($p<0.05$).

4.1.1.4.HOS Test Pozitif Oranı (Plazma Membran Bütünlüğü)

Çalışmada Taze ve dondurma çözündürme sonrası gerçekleştirilen plazma membran bütünlüğü değerlendirmesinde (HOST) belirlenen değerler çizelge 4.1.' de gösterilmiştir. Plazma membran bütünlüğü sağlam olan pozitif spermatozoon oranı 91.75 ± 0.92 ile Taze spermelerde en yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Dondurma çözündürme sonrası en yüksek sağlam membran bütünlüğü değeri 58.38 ± 2.6 ile 5mM Proline grubunda belirlenirken, 25.00 ± 2.19 ile en düşük 50 mM Prolin grubunda saptanmıştır ($p<0.05$). 5 mM Prolin ve 5mM Glutasyon grupların sağlam plazma membran oranları kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 5 mM Prolin ve 5mM Glutasyon grupları arasında istatistiki bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$).

Sağlam plazma membran bütünlüğü açısından, 42.25 ± 2.76 'lık oranla Kontrol grubu, 58.38 ± 2.60 'lık 5mM Proline ile ve 2.5 mM, 5 mM ve 10 mM (sırasıyla 55.63 ± 4.29 , 57.25 ± 2.53 ve 54.17 ± 3.81) Glutasyon gruplarından daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$).

4.1.1.5.Anormal Akrozom Oranı

Çalışma gruplarından elde edilen anormal akrozom oranlarını gösteren sonuçlar çizelge 4.1.' de verilmiştir.

Gruplar arası değerlendirmede en düşük anormal akrozom oranı 4.88 ± 0.64 ile Taze spermelerde bulunurken, en yüksek anormal akrozom oranı ise 13.50 ± 0.5 ile Kontrol grubunda bulunmuştur ($p<0.05$). Dondurulmuş çözündürmüş sperm örneklerine ait çalışma

grupları kendi arasında kıyaslandığında anormal akrozom oranları bakımından en düşük oran 5.00 ± 0.68 ile 2.5mM Glutasyon grubunda tespit edilmiştir. Buna ek olarak Kontrol grubuyla 2.5mM Glutasyon grubu arasında önemli bir fark belirlenmiştir ($p < 0.05$).

Prolin aminoasidi ilave edilmiş gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında 6.75 ± 1.00 , 6.88 ± 1.11 ve 6.63 ± 0.98 ile sırasıyla 1mM, 5mM ve 25mM Prolin grupları arasında önemli bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0.05$).

Glutasyon antioksidanı ilave edilmiş gruplar kendi içinde kıyaslandığında 6.63 ± 0.78 , 8.17 ± 1.05 ve 5.40 ± 1.03 ile sırasıyla 5mM, 10mM ve 25mM Glutasyon grupları arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

4.1.1.6.Sperm DNA Hasarı Oranları

Çalışma gruplarından elde edilen DNA hasar oranlarını gösteren sonuçlar çizelge 4.1.' de verilmiştir. Yapılan değerlendirmede, DNA hasarı açısından 0.38 ± 0.26 lık oranla (taze sperm grubu) ile diğer tüm çalışma grupları arasında önemli istatistiki farklılıklar bulundu ($p < 0.05$). Diğer bir ifadeyle kriyoprezervasyon işleminin spermatozoonlarda DNA hasar oranlarını kontrol grubu dahil bütün çalışma gruplarında arttırdığı belirlendi ($p < 0.05$).

Dondurup çözme sonrası, çalışma grupları arasındaki değerlendirmelerde en düşük DNA hasarı 4.00 ± 0.57 ile 5mM Proline grubunda, en yüksek DNA hasarı 12.20 ± 1.62 ile 20mM Glutasyon grubunda bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu sonuç sulandırıcıya uygun miktarlarda ilave edilen Prolinin (5mM) donma aşamasında ortaya çıkan soğuk olumsuz etkilerine karşı DNA bütünlüğünü diğer çalışma gruplarına göre daha iyi bir şekilde koruyabildiğini gösterdi, ancak Kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı farklılık bulunmadı ($p > 0.05$).

Prolin grubu kendi arasında karşılaştırıldığında en yüksek DNA hasarı 11.09 ± 1.44 ile 50mM Prolin grubunda meydana gelmiş ve bu grup ile 1Mm, 5Mm ve 25Mm Proline (5.38 ± 0.6 , 4.00 ± 0.57 ve 7.13 ± 0.88) grupları arasında önemli istatistiki farklar bulunmuştur ($p < 0.05$).

Glutasyon grubu kendi arasında karşılaştırıldığında 2.5 mM ve 5mM Glutasyon ilavesinin (5.38 ± 0.6 , 4.00 ± 0.57), 10mM ve 20mM Glutasyon ilavesinden (9.17 ± 1.01 , ve 12.2 ± 1.62) hücreyi DNA hasarlarına karşı daha iyi koruduğu belirlendi ($p < 0.05$).



4.1.1.7.Motilite Dayanıklılığı (Longevity)

Dondurma çözündürme sonrası birer saatlik zaman aralığıyla gerçekleştirilen motilite dayanıklılık sonuçları Çizelge 4.2’ de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Çalışma grupları Dondurma Çözdürme öncesi ve sonrası belirlenen longevity bulguları

	0.Saat	1.Saat	2.Saat	3.Saat	4.Saat	5.Saat	6.Saat	7.Saat	8.Saat
Taze	85.00 ± 2.67 ^a	80.00 ± 3.66 ^a	62.50 ± 3.66 ^a	32.50 ± 2.50 ^a	35.00 ± 2.67 ^a	20.00 ± 2.67 ^a	17.5 ± 3.13 ^a	10.0. ± 2.67 ^a	2.50 ± 1.64 ^a
Kontrol	28.75 ± 2.06 ^d	16.25 ± 2.63 ^{cd}	7.50 ± 1.64 ^{cd}	5.00 ± 1.89 ^{cd}	3.75 ± 1.83 ^{cd}	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
Proline 1mM	30.63 ± 3.05 ^{cd}	21.25 ± 2.27 ^c	15.00 ± 1.89 ^c	10.00 ± 2.67 ^{bc}	5.00 ± 1.89 ^{cd}	5.00 ± 1.89 ^{bc}	1.88 ± 1.32 ^b	1.88 ± 0.32 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
Proline 5mM	43.13 ± 4.22 ^{bc}	20.00 ± 2,67 ^c	5.63 ± 2.58 ^{cd}	4.38 ± 1.75 ^{cd}	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
Proline 25mM	29.38 ± 4.48 ^{cd}	20.00 ± 3.78 ^c	6.88 ± 2.49 ^{cd}	0.00± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
Proline 50mM	14.38 ± 3.05 ^e	7.50 ± 3.13 ^d	3.75 ± 2.63 ^d	1.88 ± 0.32 ^{cd}	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^b	0.00± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
Glutasyon 2.5mM	48.75 ± 3.63 ^b	37.5 ± 3.13 ^b	30.00 ± 4.23 ^b	26.88 ± 3.13 ^a	17.50 ± 2.50 ^b	6.88 ± 2.10 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
Glutasyon 5mM	49.38 ± 2.4 ^b	34.38 ± 3.95 ^b	26.25 ± 3.75 ^b	15.00 ± 3.27 ^b	8.13 ± 2.30 ^c	6.88 ± 1.62 ^b	1.88 ± 0.32 ^b	0.63 ± 0.03 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
Glutasyon 10mM	48.33 ± 3.33 ^b	38.33 ± 3.07 ^b	26.67 ± 4.94 ^b	16.67 ± 6.67 ^b	10.00 ± 3.65 ^c	6.67 ± 3.33 ^b	3.33 ± 0.33 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
Glutasyon 20mM	26.00 ± 2.45 ^d	16.0 ± 5.1 ^{cd}	8.00 ± 5.83 ^{cd}	4.00 ± 1.4 ^{cd}	3.8± 2.45 ^{cd}	0.00 ± 0.00 ^c	0.00± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b

a -d : Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler istatistiki açıdan önemlidir (p<0.05). (n=8)

Dondurma çözölürme işleminden sonra birinci saatte, en yüksek motilite dayanıklılık değeri $38,33 \pm 3,07$ ile 10 mM Glutasyon grubunda belirlendi. Birinci saatteki motilite değeri $37,5 \pm 3,13$, $34,38 \pm 3,95$ ve $38,33 \pm 3,07$ ile sırasıyla en yüksek 2.5 mM, 5 mM ve 10 mM Glutasyon gruplarında olup, kontrol grubuyla da aralarında önemli bir fark tespit edildi ($p < 0.05$).

İkinci ve üçüncü saatteki en yüksek motilite dayanıklılık değeri 2.5 mM, 5.0 mM ve 20 mM Glutasyon grubunda belirlendi ve Kontrol grubuyla ile arasındaki fark önemli bulundu ($p < 0.05$). Dikkat çekici olarak, üçüncü saatin sonunda 2.5 mM Glutasyon taze sperm ile benzer bulundu ($p > 0.05$).

Dördüncü saatte 5 mM Proline, 25 mM Proline ve 50 mM Prolin grubunda motilite sonlandı. En yüksek motilite değeri 17.50 ± 2.5 ile 2.5 mM Glutasyon grubunda belirlendi kontrol grubuna kıyaslandığında istatistiki açıdan önemli bir fark bulundu ($p < 0.05$).

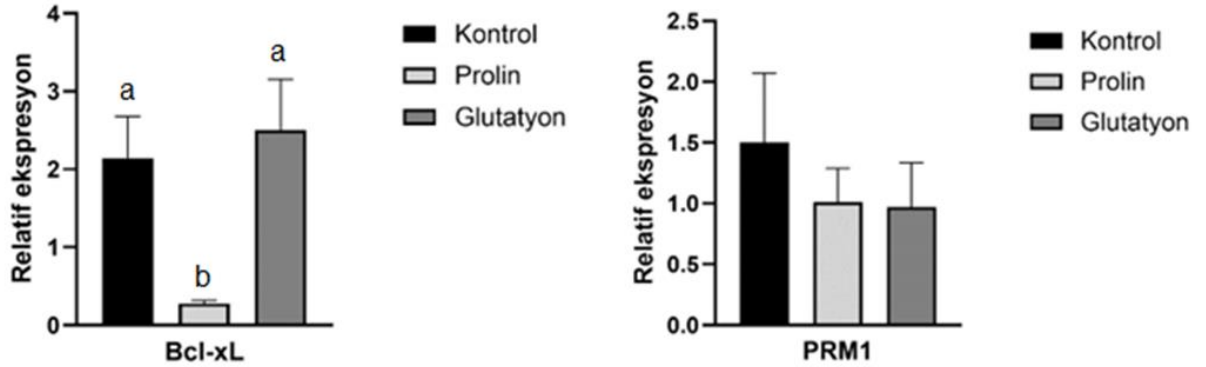
Beşinci saatte Kontrol ve 20 mM Glutasyon grubuna ait motiliteler sonlanırken, 6.88 ± 2.1 , 6.88 ± 1.62 , 6.67 ± 3.33 ile sırasıyla 2.5 mM, 5 mM ve 10 mM Glutasyon gruplarında yüksek kaldı ve kontrol grubuna kıyaslandığında bu gruplarda motilite önemli düzeyde yüksek bulundu ($p < 0.05$). Buna ek olarak, beşinci saatte 5.0 ± 1.89 motilite ile 1 mM prolin grubu kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde yüksek bulundu ($p < 0.05$).

Altınca saatte 1.88 ± 1.32 , 1.88 ± 0.32 ve 3.33 ± 0.33 ile sırasıyla 1 mM Prolin, 5 mM Glutasyon ve 10 mM Glutasyon motilite devam etti ve kontrol grubuna kıyasla aralarında önemli düzeyde fark tespit edilemedi ($p > 0.05$). Taze spermier ait 6. 7. ve 8. saatlerdeki motilite değeri sırasıyla 17.50 ± 3.13 , 10.0 ± 2.67 ve 2.5 ± 1.64 olarak belirlendi ve bu saatlerdeki motilite değeri diğer tüm araştırma gruplarından daha yüksek bulundu ($p < 0.05$).

Yedinci saatte 1 mM Prolin ve 5 mM Glutasyon grubu dışındaki hiçbir grupta motilite saptanmadı. Yedinci saatte motilite değeri 1.88 ± 0.32 ve 0.63 ± 0.03 ile sırasıyla 1 mM Prolin ve 5 mM Glutasyon gruplarında belirlenip, tüm çalışma grupları arasında istatistiki bir fark görölmedi ($p > 0.05$). Sekizinci saate bütün çalışma gruplarına ait motilite değeri 0.00 bulundu.

4.1.1.8.Spermatolojik Gen İfade Düzeyleri

Çalışma gruplarından elde edilen gen ifade düzeylerini gösteren sonuçlar Şekil 4.3.'te verilmiştir. Kriyoprezervasyon medyumuna Glutatyon ilave edilmesi kontrol grubuna göre antiapoptotik yolakta görev alan Bcl-xL gen ifadesini daha fazla yükselttiği tespit edilmiştir ($p>0.05$). Diğer bir ifadeyle sperm sulandırıcısına Glutatyon ilavesinin kriyoprezervasyon hasarlarına karşı oluşan antiapoptotik Bcl-xL gen ifadesini kontrol grubuna göre daha iyi yükselttiği bulunmuştur. Bununla birlikte Glutatyon ilavesi Prolin ilavesine göre antiapoptotik Bcl-xL gen ifadesini anlamlı düzeyde artırmıştır ($p<0.05$). Kriyoprezervasyon medyumuna Prolinin eklenmesinin Kontrol ve glutatyon gruplarına göre herhangi bir antiapoptotik etki göstermediği tespit edilmiştir ($p<0.05$). Sperm hücrelerinin yapım aşamasında aktive olan Protaminasyon yolağında görev alan PRM1 geninin ekspresyon düzeyi ise, kriyoprezervasyon ortamına Prolin ya da Glutatyonn eklenmesinden etkilenmemiştir ($p>0.05$).



Çizelge 4.3. Kriyoprezervasyon medyumuna ilave edilen Prolin ve Glutatyon'un Bcl-xL ve PRM1 gen ifade düzeylerine etkisi

5. TARTIŞMA

Spermatozoonların kriyoprezervasyon sürecinde fiziksel, kimyasal ve oksidatif strese bağlı olarak oluşan ısı şoku, hücre içi buz kristal oluşumu, ani ozmotik değişim ve lipid peroksidasyonu sonucunda şekillenen Reaktif oksijen türlerinden ve Reaktif azot türlerinden dolayı meydana gelen hücre hasarlarını ve ölümlerini azaltmak için dondurma medyumlarında koruyucu kriyoprotektan ve antioksidan maddeler kullanılmaktadır (Ball ve ark., 2001; Bhattacharya, 2018; Sieme ve ark., 2016; Silvestre ve ark., 2021). Kriyoprotektan amaçlı kullanılan maddeler ortamdaki iyon miktarını azaltarak, ozmotik değişimi dengeli tutarak ve donmamış fraksiyonu artırarak etki gösterirler (Polge ve ark., 1949; Wattson 1995).

Prolin aminoasiti ve Glutasyon tripeptidi kriyoprezervasyon alanında hücre koruyucu özelliği ile bilinen iki önemli antioksidandır. Bu çalışmada CD-1 ırkı fare sperminin dondurularak saklanması kriyoprezervasyon medyumuna farklı oranlarda L-Proline ve indirgenmiş Glutasyon ilave edilmesinin koruyucu etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmada dondurulma çözündürülme sonrası hareket ve canlılık kriterleri olarak kabul edilen en yüksek motilite, en düşük ölü sperm, plazma membran bütünlüğü ve motilite dayanıklılığı oranı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 5mM Glutasyon ve 5 mM Proline gruplarında bulunmuştur ($p<0.05$; Tablo 4.1.). Diğer bir ifadeyle, kriyoprezervasyon medyumuna ilave edilen prolin ve glutasyon' un dondurup çözdürme sonrası spermden canlılık değerlerini (motilite, viabilite, plazma membran bütünlüğü ve motilite dayanıklılığı) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli oranda koruduğu belirlenmiştir ($p<0.05$; Çizelge 4.1.).

Benzer şekilde Fare sperminin başarılı bir şekilde dondurulmasında farklı sulandırıcılar, farklı fare ırkları ve kriyoprezervasyon teknikleri test edilmiş ve birbirinden çok farklı sonuçlar elde edilmiştir. Yıldız ve ark. (2010) CD-1 ırkı farelerin spermlerini %18 raffinoz + %3 yağsız süt tozu sulandırıcısı kullanarak, kriyotüplerde dondurup çözdürme sonrası %23 motilite ve %36.2 membran bütünlük oranı elde etmişlerdir. Liu ve ark. (2017) C57BL/6 ve DBA/2 ırkı farelerde raffinoz + yağsız süt tozu sulandırıcısı kullanarak spermi payet yöntemiyle dondurup çözdürme sonrasında sırasıyla %15 ve %17 motilite, %30 ve %48 membran bütünlük oranları belirlemişlerdir. Szeite ve ark. (2001) C57BL/6J ve CB6F1 ırkı fare spermlerini raffinoz + yağsız süt tozu sulandırıcısı kullanarak kriyotüplerde dondurup çözdürme sonrası sırasıyla %15 ve %23 motilite, %37 ve %42 ölü sperm oranı

tespit etmişlerdir. Sunulan araştırmada dondurulup çözödürölen payetlerde tespit edilen %49.38 $\pm$ 2.4 motilite ve %15.38 $\pm$ 1.22 ölü sperm oranları Sztein ve ark. (2001)'dan daha iyi bulunmuştur. Araştırmalar arasındaki sonuçların farklı olmasının nedenleri arasında başta kullanılan antioksidan maddenin etkileri, seçilen fare ırkı, sulandırılmış spermin paketleme şekli ve kriyoprezervasyon süreçlerindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünölmektedir. Birçok araştırmacı kullanılan fare ırkının spermin dondurma başarısı üzerinde önemli bir faktör olduğunu tespit etmişlerdir (Tada ve ark. 1990, Takeshima ve ark. 1991, Yıldız ve ark. 2007). Benzer şekilde koç (Molinia ve ark., 1994), sığır (Garcia ve Graham 1989), köpek (Yıldız ve ark. 2000) ve insan gibi (Critser ve ark, 1988; McGonagle ve ark., 2002) farklı türlerde farklı kryoprotektanlar, şekerler ve antioksidanların birlikte kullanımının spermatolojik parametreler üzerinde koruyucu ve geliştirici etkileri rapor edilmiştir. Ayrıca yakın zamanda Yıldız ve Erol (2024) sulandırıcıya %2.5 düşük yoğunluklu lipoprotein ilavesinin dondurma sonrası spermatolojik kalite parametrelerini iyileştirdiğı ve fare sperminin dondurulması ve korunmasında soğuk şokuna karşı yüksek oranda koruyucu etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Shi ve ark. (2018) C57BL/6 fare spermelerini %18 rafinoz + %3 yağsız süt sulandırıcısına monothioglycerol (0.5 mM), Glutasyon (0.5 mM) ve quercetin (25 μ M) ayrı ayrı ilave edip dondurma sonrası yapılan motilite muayenesinde kontrol grubuna göre önemli oranda yükselme tespit etmişlerdir.

Prolin aminoasiti kullanılarak fare sperminin dondurulmasında bir ilk olan bu çalışmadan farklı olarak, farklı türlere ait spermelerin dondurulmasında Prolin koruyucu amaçla kullanılmış olup, motilite ve canlılık gibi sperm parametreleri üzerine olumlu etkilere sahip olduğu daha önce ortaya konulmuştur. Bu bağlamda sperm sulandırıcısına prolin ilavesinin insan (Moradi ve ark., 2022), boğa (Ramazani ve ark., 2023), koç (Sangeeta ve ark., 2015a), teke (Zhao ve ark, 2023), ve domuz (Liu ve ark., 2023) spermelerinin dondurup çözödürme sonrası motilite ve canlılık üzerine koruyucu etkilerini bildirmişlerdir. Ayrıca, Zhang ve ark (2022) keçi sperminin kryoprezervasyon sonrası yapılan muayenede 2 mM prolin ilavesini motilite ve membran bütönlüğü kontrol grubuna göre önemli oranda koruduğunu bildirmişlerdir. Moradi ve ark (2021) insan sperm sulandırıcısına 4 mmol/L L-prolin ilavesinin kontrol grubuna göre motilite ve viabiliteyi önemli oranda koruduğunu rapor etmişlerdir. Sangeeta ve ark (2015b) koç sperm sulandırıcısına ilave ettikleri 25 mM L-prolin kontrol grubuna göre lipid peroksidasyonunu düşöürerek kryoprezervasyon sonrası motilite ve viabiliteyi önemli oranda koruduğunu tespit etmişlerdir.

Glutasyon (GSH), domuz, koyun ve sığır olmak üzere birçok türün spermalarında derin dondurulmuş veya kısa süreli soğutulmuş olarak çalışılmış enzimatik olmayan bir antioksidan çeşididir. Glutasyon antioksidan etkisini, yapısındaki sistein aminoasitinden türetilen –SH grubu ile ROS' u doğrudan nötralize ederek veya Vit E ve Vit C gibi diğer antioksidanları aktif formda tutarak gösterir (Silvestre ve ark. 2021, Chodakowska ve ark. 2018). Ayrıca Glutasyon hasarlı proteinleri, nükleik asitleri ve peroksidasyona uğramış lipidleri onararak ve proteinlerin sülfhidril gruplarının indirgeyici durumunu koruyarak hücreleri korumaktadır (Agarwal ve ark. 2006, Muftuoglu ve ark. 2014, Samuelsson ve ark. 2011). Glutasyon, sığır (Oliveira ve ark. 2013), aygır (Sharabassy ve ark. 2019), eşek (Yáñez-Ortiz ve ark. 2021) köpek (Lucio ve ark. 2016), koç (Silva ve ark. 2011), teke (Gadea ve ark. 2013), domuz (Yeste ve ark. 2014), fare (Takeo ve ark., 2011) gibi türlerde antioksidan özelliğinden dolayı spermın dondurularak muhafaza edilmesinde olumlu koruyucu etkileri rapor edilmiştir. Bazı araştırmacılar kriyoprezervasyon medyumuna eklenen glutasyonun yüksek konsantrasyonlarında zararlı veya zararsız herhangi bir etki bulamadıklarını rapor etmişlerdir (Foote ve ark. 2002, Câmara ve ark. 2011, Campuzano ve ark. 2014). Benzer şekilde, Tuncer ve ark (2010)'ı boğa spermının dondurulması üzerine yaptıkları bir çalışmada, süt tozu tabanlı ticari Liciphose (IMV, Fransa) sulandırıcısına ilave edilen 0.4 mM GSH nin motilite değerleri açısından kontrol grubu ile benzer bulmuşlardır ($p>0.05$). Diğer bir kısım araştırmacılar ise kriyoprezervasyon medyumuna GSH ilavesinin motilite ve viabiliti gibi spermatolojik parametreler üzerine olumlu etkilerinin olduğunu rapor etmişlerdir (Aurich ve ark, 1997; Munsı ve ark, 2007; Estrada ve ark, 2017; Takeo ve ark, 2011; Zou ve ark, 2011). Kalthur ve ark (2011) sperm dondurma medyumuna vitamin E ilavesinin donma hasarlarına karşı motilite ve canlılık değerlerini koruduğunu tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada da benzer şekilde, uygun miktarlarda Glutasyon (5mM) ve Prolin (5mM) ilavesinin spermatozonların kriyoprezervasyonunda önemli koruyucu etkiye sahip oldukları belirlenmiştir ($p<0.05$). Mehdipour ve ark (2020)'ı farklı antioksidan olarak horoz sperm sulandırıcısına krosin ve naringen flavonoidleri ilavesinin kriyoprezervasyon sonrası progresif motilite ve canlılık değerlerini kontrol grubuna göre önemli oranda koruduğunu bildirmişlerdir ($p<0.05$).

Sunulan çalışmada, çözündürme sonrası en yüksek akrozom hasarı 13.5 ± 0.5 değeri ile kontrol grubunda, en düşük akrozom hasarı oranı ise 5.00 ± 0.68 ile 2.5 mM Glutasyon grubunda tespit edilmiştir. Buna ek olarak fare spermının dondurulmasında 2.5 mM

Glutasyon kullanımının donma hasarlarına karşı akrozom bölgesini daha iyi koruduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1). Dondurma aşamalarında antioksidanların fosfolipidlerle etkileşime girerek hücreyi koruduğu da rapor edilmiştir (Rudolph ve ark, 1986; Aitken ve Baker, 2006; Zeitoun ve Al-Damegh, 2015). Akrozom bütünlüğü fertilizasyon sırasında zona pellusidanın eritilip geçilmesi açısından önemlidir. Kriyoprezervasyon işlemi akrozom membranındaki lipid-lipid ve lipid-protein bağlarını bozduğu için bu durum fertilitiyi düşürmektedir (Isachenko ve ark, 2008).

Yapılan çalışmada, Kontrol grubunun belirlenen 13.5 ± 0.5 'luk akrozom hasar oranı, Liu ve ark (2018)'nın C57BL/6J ve DBA/2J ırkı farelerde raffinöz+yağsız süt tozu sulandırıcısı kullanarak dondurup çözündürme sonrası sırasıyla %15.6 ve %20.4 olarak belirledikleri akrozom hasarı oranlarından daha düşük bulunmuştur. Bu farklılığın muhtemelen kullanılan fare ırkından kaynaklandığı ifade edilebilir. Birçok araştırmacı kullanılan fare ırkının spermin dondurma başarısı üzerinde önemli bir faktör olduğunu bildirmişlerdir (Tada ve ark, 1990; Takeshima ve ark, 1991; Yıldız ve ark, 2007). Ek olarak Zhang ve ark (2022)'ı keçi spermasının kriyoprezervasyon sonrası yapılan muayenede 2 mM prolin ilavesinin akrozom bölgesini kontrol grubuna göre daha iyi olarak koruduğunu rapor etmişlerdir ($p < 0.05$).

Normal bir fertilizasyon ve embriyonik gelişme için sperm ve oositteki çekirdek DNA materyalinin sağlam olması gerektiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Aitken ve Baker 2006; Li ve Lloyd 2020). Kriyoprezervasyon işlemi sırasında yükselen serbest oksijen radikalleri miktarı spermatozoondaki özellikle lipid, protein ve DNA yapıları bozmaktadır (Lone ve ark 2019). Bununla birlikte sperm DNA' sındaki hasarların spermatozoondaki birçok genlerin fonksiyonlarının kaybına ve erken embriyonik ölümlere neden olduğu bilinmektedir (Aitken ve Baker 2006; Li ve Lloyd 2020).

Yapılan çalışmada taze sperm (0.38 ± 0.26) ile tüm çalışma grupları arasında TUNEL+ spermatozoon oranları bakımından önemli istatistiksel farklılıklar bulunmuştur ($p < 0.05$). Diğer bir ifadeyle kriyoprezervasyon işlemi spermatozoonlarda hasarlı DNA oranını artırmıştır. Sunulan çalışmada tespit edilen bu durum, daha önce bildirilen kriyoprezervasyon sürecinin sperm DNA hasarını artırdığı bilgisini desteklemektedir (Yıldız ve ark, 2000; Yıldız ve ark, 2013; Li ve Lloyd, 2013). Buna rağmen sperm kriyoprezervasyon sürecinde meydana gelen hasarlar da dahil olmak üzere sperm DNA

parçalanmasının etiyolojisinde yer alan kesin mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamıştır (Thompson, 2009). Kriyoprezervasyon işleminin kaspaz aktivasyonunu artırmasından dolayı, kriyoprezervasyon sürecinde apoptotik olayların sperm DNA' sının parçalanmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Çünkü apoptoz spermatogenez boyunca meydana gelen fizyolojik bir süreçtir. Apoptoz sırasında endonüklezlar tarafından DNA' nın parçalanmaya başlamasının ardından hücrelerin tamamen yok edilmediği, abortif apoptoz spermde DNA ahsarı sergileyen sperm oluşumunda rol oynar (Sakkas, 2003). Kriyoprezervasyon sırasında meydana gelen oksidatif stresin DNA hasarına neden olabileceği bildirilmiştir (Irvine ve ark., 2000; Baumber ve ark., 2003; Peris ve ark., 2007). Spermatozoon kendisini oksidatif stresten korumaya yardımcı olacak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemine sahiptir. Bununla birlikte ortamdaki ROS spermatozoonun antioksidan savunma sistemlerini aştığında oksidatif stres oluşur ve kriyoprezervasyon esnasında zarar meydana getirebilir. Dondurulmuş - çözündürülmüş sperm örneklerine ait çalışma grupları kendi aralarında DNA hasarları açısından karşılaştırıldığında en düşük DNA hasarı %4 ile 5mM Proline grubunda, en yüksek olarak 20 mM Glutasyon (%12.20) ve 50 mM L-Proline (%11.09) gruplarında bulunmuştur. Bu durum uygun antioksidan ve doz seçiminin kriyoprezervasyon sırasında sperm DNA bütünlüğü üzerinde önemli bir faktör olduğunu göstermiştir ($p < 0.05$; Tablo 4.1.). Genel olarak prolinin, glutasyonun ve diğer antioksidanların DNA bütünlüğünün korunması üzerine olumlu etkileri birçok araştırmalarda bildirilmiştir. Shi ve ark. (2018) C57BL/6 fare spermlerini %18 rafinoz + %3 yağsız süt sulandırıcısına monothioglycerol (0.5 mM), glutasyon (0.5 mM) ve quercetin (25 μ M) ilave edilmiş gruplarda kontrol grubundan daha düşük DNA hasarı oranı tespit etmişlerdir (MTG, $8.1\% \pm 1.5\%$; GSH, $9.0\% \pm 1.5\%$ ve quercetin, $8.3\% \pm 1.3\%$ ve kontrol $14.6\% \pm 2.5\%$) ($p < 0.05$).

Rudolph ve ark. (1986)'ı Proline' in fosfolipidlerle etkileşime girerek dondurma aşamalarında hücre membranlarını ve fonksiyonlarını koruduğunu bildirmişlerdir. Kalthur ve ark. (2011) sperm dondurma medyumuna Vitamin E antioksidan ilavesinin donma hasarlarına karşı DNA' yı koruduğunu rapor etmişlerdir. Ek olarak, Ramazani ve ark. (2023)'ı boğa spermi için Tris-Yumurta sarısı sulandırıcısına ilave edilen 10, 20, 40, ve 60 mM L-proline'in DNA hasarlarına karşı spermatozoonları koruduğunu tespit etmişlerdir. Rezaei ve ark. (2020)'ı fare sperm sulandırıcısına 5 mM L- karnitin ilavesinin

kryoprezervasyon sonrası kromatin ve akrozom bütünlüğünü kontrol grubuna göre daha iyi koruduğunu bildirmişlerdir.

Fare sperm sulandırıcısına Glutatyonn ilavesi Prolin ilavesine göre antiapoptatik Bcl-xL gen ifadesini anlamlı düzeyde artırmıştır ($p<0.05$; çizelge 4.3). Diğer bir ifadeyle, sperm kriyoprezervasyon medyumuna Prolinin eklenmesinin koruyucu bir antiapoptotik etki göstermediği tespit edilmiştir ($p<0.05$). Buna ek olarak, spermatozoonların testiste yapım aşamasında Protaminasyon yolağında görev alan PRM1 geninin ekspresyon düzeyleri ise, kriyoprezervasyon medyumuna Prolin ya da Glutasyon ilave edilmesinden etkilenmemiştir ($p>0.05$). Somatik hücrelerde bulunan ve DNA' nın paketlenmesinde görev yapan histon proteinlerinin yerini spermatozoonlarda protamin adı verilen sperm hücresine özgü proteinler oluşturmaktadır (Mascorro ve ark., 2000; Ward ve Coffey, 1991; Oliva, 2006). Gelişimini tamamlamış haploid spermatozoonun transkripsiyonel olarak uyku halinde olduğu, dolayısıyla spermatozoonlarda PRM1 gen ifadesinin olmadığı bildirilmiştir (Ward ve Zalensky, 1996). Bu nedenle, muhtemelen PRM1 geni spermin yapım aşamasındaki değişken faktörlere bağlı olarak ifade düzeylerin değişebileceği ve bunun sperm kalitesini etkileyebileceği düşünülebilir. Bu çalışma olgun sperm hücreleri üzerinde gerçekleştirildiğinden, kryoprezarvasyonun meydana getirdiği oksidatif, ısı ve ozmotik stres gibi ani olumsuz etkileri PRM1 gen ifadelerinde bir değişmeye neden olmamıştır. Bununla birlikte, kryopreservasyon medyumuna bilinen faydalı etkilerinden dolayı antioksidan ilavelerinin apoptozdan sorumlu gen yolaklarını baskıladığı, buna karşın anti apoptatik genlerin ifadelerini de artırdığı ve bu yanıtın antioksidan çeşidine göre de farklılaştığı çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Jung ve ark, 2021; Valadbeygi ve ark, 2016; Aliakbari ve ark, 2016). Çalışmamızda glutasyon grubunda Bcl-xL gen ifadelerinde prolin grubuna göre tespit ettiğimiz olumlu etkilere benzer şekilde, Zhang ve ark (2022) keçi spermasının kryoprezervasyon sonrası yapılan muayenede 2 mM prolin ilavesinin apoptotik yolakta sorumlu Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 gen ifade düzeylerinde düşme, böylece ilişkili olarak sperm kalitesinde ilerleme rapor etmişlerdir. Rezaei ve ark (2020) fare sperm sulandırıcısına 5 mM L- karnitin ilavesinin Bax gen ifadesini düşürdüğü, antiapoptotik Bcl-2 gen ifadesinin kontrol grubuna göre önemli oranda arttığını bildirmişlerdir. Maryan ve ark (2023) insan spermini Menthol-based Hydrophobic Deep Eutectic Solvent kroprotektant tabanlı solüsyonuna gliserol ve prolin ilavesinin katılmayan kontrol gruba göre fertilitateyle ilişkili TRPV1, TRPV4, SPACA3, ve OGG1 gen ifadelerinin daha yüksek olduğunu rapor etmiştir.

Santonastaso ve ark. (2021) insan spermininkriyoprezervasyon medyumuna kurkumin ilavesinin antiapoptotik glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) gen ifadesini artırdığı ve DNA hasarını düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Mehdipour ve ark (2020) horoz sperm sulandırıcısına krosin ve naringen flavonoidleri ilevesinin kriyoprezervasyon sonrası sperm kalitesi ve fertilityi artırdığı, pro-apoptotik yolakta görev alan CASPASE 3 gen ifadesini düşürdüğü ve anti-apoptotic (Bcl-2) gen ifadesini yükselttiğini tespit etmişlerdir. Yakın zamanda, Şakar ve ark (2022) fare sperminin dondurulmasında sulandırıcıya 50 µM koenzim Q10 ilave edilen grupta, kontrol grubuna kıyasla çözündürme sonrasında anti stres NRF2 gen ifade düzeyinde artış bildirmişlerdir. Nuclear transcription factor erythroid-derived 2-like 2 (NRF2) geni, proteini yaralanma ve inflamasyonun tetiklediği oksidatif hasara karşı koruma sağlayan antioksidan yanıtın oluşturulmasında rol oynayarak hücrenin korunmasında görev aldığı bilinmektedir (Gold ve ark, 2012; Nitru ve Jaiswal, 2013). Nitru ve Jaiswal (2013) yaptıkları çalışmada NRF2 gen ifadesinin Bcl-xL tarafından kontrol edildiğini ve hücre sağ kalımında rol oynadığını bildirmişlerdir.

6.SONUÇ

Sonuç olarak; Fare sperminin kriyoprezervasyonunda sulandırıcıya ilave edilen 5 mM Glutasyon ilavesinin dondurup çözdüme sonrası motilite, canlılık, plazma membran bütünlüğü ve motilite dayanıklılığını koruduğu ve anti apopttik Bcl-xL gen ifadesini aktive ederek yükselttiği tespit edildi.



7.KAYNAKÇA

1. **Agarwal A, Said TM.** Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Human reproduction update, **2003**, 9(4), 331-345.
2. **Agarwal A, Ranganathan P, Kattal N,** Pasqualotto F, Hallak J, Khayal S & Mascha E, Fertility after cancer: a prospective review of assisted reproductive outcome with banked semen specimens. Fertility and sterility, **2004**, 81(2), 342-348.
3. **Agarwal A, Gupta S, Sikka S.** The role of free radicals and antioxidants in reproduction. Current opinion in obstetrics and gynecology, **2006**, 18(3), 325-332
4. **Agarwal A, Makker, K., & Sharma, R.** Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. American journal of reproductive immunology, **2008** 59(1), 2-11.
5. **Agarwal A, Gupta S ve Sharma, R.** Eosin-Nigrosin staining procedure. In Andrological Evaluation of Male Infertility, Springer, Cham.,**2016**, 73-77.
6. **Agca Y, Gilmore J, Byers M,** Woods EJ, Liun J & Critser JK, Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. Biology of Reproduction, **2002**, 67(5), 1493-1501.
7. **Aguilar J ve M Reyley,** The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects. Animal Reproduction, **2018**, 2-2:91-105.
8. **Aitken RJ ve Baker MA.** Oxidative stress, sperm survival and fertility control. Molecular and cellular endocrinology, **2006**, 250(1-2), 66-69.
9. **Aliakbari F, Gilani MAS, Amidi F, Baazm M, Korouji M, Izadyar F, Abbasi M.** Improving the efficacy of cryopreservation of spermatogonia stem cells by antioxidant supplements. Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells"), **2016**, 18(2), 87-95.
10. **Amelar RD, Dubin L, Schoenfeld C.** Sperm motility. Fertility and sterility, **1980**, 34(3), 197-215.
11. **Anderson Mary E.** Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. Chemico-biological interactions **1998**, 111: 1-14.
12. **Aoki VW, Liu L, Carrell D.** Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. Human Reproduction, **2005**, 20(5), 1298-1306.
13. **At P.** Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. Biotechnol. Adv., **1996**, 14, 127-149.
14. **Aurich JE, Schönherr U, Hoppe H,** Aurich C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. Theriogenology, **1997**, 48(2), 185-192.
15. **Aydemir Ea., Fişkın K.** The antitumoral and biochemical effects of gossypol on human cervix cancer cell line ME-180. International Journal of Hematology and Oncology, **2006**, 33(1), 178-184.
16. **Balhorn R.** The protamine family of sperm nuclear proteins. Genome biology, **2007**, 8, 1-8.
17. **Ball BA, Medina V, Gravance CG,** Baumber J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. Theriogenology, **2001**, 56(4), 577-589.
18. **Barati E, Nikzad H, Karimian M.** Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. Cellular and Molecular Life Sciences, **2020**, 77, 93-113.
19. **Bath ML.** Simple and efficient in vitro fertilization with cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. Biology of reproduction,**2003** 68(1), 19-23.
20. **Bellamy CO, Malcolmson RD, Harrison DJ, Wyllie AH.** Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. **1995**, In Seminars in cancer biology (Vol. 6, No. 1, pp. 3-16). Academic Press.
21. **Benedict WS, Gailar N, Plyler EK.** Rotation-vibration spectra of deuterated water vapor. The Journal of Chemical Physics, **1956**, 24(6), 1139-1165.

22. **Benson JD, Woods EJ, Walters EM, Critser JK.** The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, **2012**, 78(8), 1682-1699.
23. **Bucak MN, TEKİN N.** Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2007**, 54(1), 67-72.
24. **Bunge RG ve Sherman JK.** "Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa." *Nature* 172.4382 **1953**, 767-768.
25. **Bertoldo MJ, Guibert E, Tartarin P, Guillory V ve Froment P.** Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Cryobiology*, **2014**, 68(2), 262-268.
26. **Bhattacharya S.** Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. *Cryopreservation Biotechnology in biomedical and biological sciences*, **2018**, 7-19.
27. **Blake RL, Hall JG, Russell ES.** Mitochondrial proline dehydrogenase deficiency in hyperprolinemic PRO/Re mice: Genetic and enzymatic analyses. *Biochemical Genetics*, **1976**, 14(9), 739-757.
28. **Cabrera E, Alvarez R, Anel E, Herraiz MP.** The hypoosmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. *Animal reproduction science*, **1999**, 55(3-4), 279-287.
29. **Câmara DR, Mello-Pinto MMC, Pinto LC, Brasil OO, Nunes JF, Guerra MMP.** Effects of reduced glutathione and catalase on the kinematics and membrane functionality of sperm during liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, **2011**, 100(1), 44-49.
30. **Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Tamayo-Canul J, López-Urueña E, de Paz, P, Anel ve ar.** Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. *Animal reproduction science*, **2014** 151(3-4), 137-147.
31. **Chao DT, Korsmeyer SJ.** "BCL-2 family: regulators of cell death." *Annual review of immunology* 16. *Blood*, **1998**, 395-419.
32. **Chang MC.** The meaning of sperm capacitation. A historical perspective. *Journal of andrology*, **1984**, 5(2), 45-50.
33. **Chauvin T, Xie F, Liu T, Nicora CD, Yang F, Camp DG, Roberts KP.** A systematic analysis of a deep mouse epididymal sperm proteome. *Biology of reproduction*, **2012**, 87(6), 141-1.
34. **Chen C, Dickman MB.** Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2005**, 102(9), 3459-3464.
35. **Chen K, Mai Z, Zhou Y, Gao X, Yu B.** Low NRF2 mRNA expression in spermatozoa from men with low sperm motility. *The Tohoku journal of experimental medicine*, **2012**, 228(3), 259-266.
36. **Chen XJ, Zhang Y. Jia GX, Meng QG, Bunch TD, ve ark.** Effect of melatonin supplementation on cryopreserved sperm quality in mouse. *Cryoletters*, **2016**, 37(2), 115-122.
37. **Chevaillier PH, Mauro N, Feneux D, Jouannet P, David G.** Anomalous protein complement of sperm nuclei in some infertile men. *The Lancet*, **1987**, 330(8562), 806-807.
38. **Cohen BJ,** The evolution of laboratory animal medicine in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **1959**, 135(3), 161-164.
39. **Cohen JJ.** Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *American College of Physicians, CHEST*, **1993**, 103: 99-101.
40. **Correa JR, Zavos PM.** The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, **1994**, 42(2), 351-360.
41. **Critser JK & Russell RJ,** Genome resource banking of laboratory animal models. *Ilar Journal*, **2000**, 41(4), 183-186.
42. **Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD.** Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertility and Sterility*, **1988**, 50(2), 314-320.

43. **Çetin I, de Santis MSN, Taricco E, Radaelli T, Teng C, Ronzoni S, Pardi G ve ark.,** Maternal and fetal amino acid concentrations in normal pregnancies and in pregnancies with gestational diabetes mellitus. *American journal of obstetrics and gynecology*, **2005** 192(2), 610-617.
44. **Dadoune JP.** Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microscopy research and technique*, **2003**, 61(1), 56-75.
45. **Dewit M, Marley WS, Graham JK.** Fertilizing potential of mouse spermatozoa cryopreserved in a medium containing whole eggs. *Cryobiology*, **2000**, 40(1), 36-45.
46. **Eddy EM, O'brien D.** The spermatozoon. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, **2006**, 1, 3-54.
47. **Elkind MM, Whitmore GF.** Radiobiology of cultured mammalian cells, **1967**
48. **Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR.** Mechanisms and functions of cell death. *Annual review of cell biology*, **1991**, 7(1), 663-698.
49. **Elmore S.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, **2007**, 35(4), 495-516.
50. **El-Sharabassy AA, Mekkawy M, Solouma G, Amer A, Ahmadi E, El-Nady IA, Abou-Aiana RM.** Influence of glutathione addition to an extender on the cooled-stored stallion spermatozoa. *Assiut Veterinary Medical Journal*, **2019**65(162), 171-178.
51. **Estrada E, Del Álamo MMR, Rodríguez-Gil JE, Yeste M.** The addition of reduced glutathione to cryopreservation media induces changes in the structure of motile subpopulations of frozen-thawed boar sperm. *Cryobiology*, **2017**, 78, 56-64.
52. **Fayomi AP, Orwig KE.** Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem cell research*, **2018**, 29, 207-214.
53. **Flieger J, Flieger W, Baj J, Maciejewski R.** Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials*, **2021** 14(15), 4135.
54. **Fisher GL,** Historical and bibliographical notes. XII. Herophilus and Erasistratus. The Medical School of Alexandria. Bc 320-250. *Ann. Anat. Surg.*, **1881** (4), 28.
55. **Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT.** Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal reproduction science*, **2002** 71(1-2), 13-23.
56. **Fox JG.** Laboratory animal medicine, Elsevier. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA, **2015**
57. **Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A..** Sperm chromatin. *Archives of andrology*, **2000**, 45(3), 215-225.
58. **Gadea J, Gumbao D, Gómez-Giménez B, Gardón JC.** Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. *Reproductive biology*, **2013**, 13(1), 24-33.
59. **Gadella BM.** Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Animal reproduction science*, **2008**, 107(3-4), 229-236.
60. **Gaffney EA, Gadêlha H, Smith DJ, Blake JR, Kirkman-Brown JC.** Mammalian sperm motility: observation and theory. *Annual Review of Fluid Mechanics*, **2011** 43, 501-528.
61. **Gao D, Critser JK.** Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR journal*, **2000**, 41(4), 187-196.
62. **Garcia MA, Graham EF.** Development of a buffer system for dialysis of bovine spermatozoa before freezing. II. Effect of sugars and sugar alcohols on posthaw motility. *Theriogenology*, **1989**, 31(5), 1029-1037.
63. **Gavella M, Lipovac V.** Nadh-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Syst Biol Reprod Med.* **1992**, 28(2);135-41.
64. **Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J.** Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl.* **2004**, 6(1);59-65.
65. **Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, Dawson KT.** Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, **2012**, 367(12), 1098-1107.

66. **Gulcin İ.** Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. Archives of toxicology, **2020**, 94(3), 651-715.
67. **Günay Ü, Zekariya, N, SOYLU MK.** Dondurulmuş-Çözündürülmüş Köpek Spermasının Boyama ve Fikzasyon İşlemlerinden Sonra Değerlendirilmesi. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, **2003**, 22(1-2-3), 27-31.
68. **Hafez ESE & Hafez B,** Reproduction in farm animals. John Wiley & Sons. **2013**
69. **Halprin KM, Ohkawara A.** The measurement of glutathione in human epidermis using glutathione reductase. J. Investig. Dermatol, **1967**, 48: 149-152.
70. **Halliwell B.** Understanding mechanisms of antioxidant action in health and disease. Nature Reviews Molecular Cell Biology, **2024**, 25(1), 13-33
71. **HANCOCK JL.** The morphology of bull spermatozoa. Journal of Experimental Biology, **1952**, 29.3: 445-453.
72. **Hetts SW.** To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. Jama, 1998, 279(4), 300-307.
73. **Holt WV.** Basic aspects of frozen storage of semen. Animal reproduction science, **2000**, 62(1-3), 3-22.
74. <https://en.wikipedia.org/wiki/Proline> Erişim Tarihi: 10.11.2023
75. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/614> Erişim Tarihi 10.11.2023
76. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1912/ceremony-speech/> Erişim saati ve tarihi 02:51 30.12.2023
77. https://www.medchemexpress.com/L-Glutathione_reduced.html Erişim Tarihi: 15.04.2024 02:54
78. https://www.medchemexpress.com/L-Pyrrolidine-2-carboxylic_acid.html Erişim Tarihi: 15.04.2024 02:54
79. **Isachenko E, Isachenko V, Weiss JM, Kreienberg R, Katkov II, Schulz M, Sanchez R.** Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. Reproduction, **2008**, 136(2), 167.
80. **Jeng PS, Inoue-Yamauchi A, Hsieh JJ, Cheng EH.** BH3-dependent and independent activation of BAX and BAK in mitochondrial apoptosis. Current opinion in physiology, **2018**, 3, 71-81.
81. **Jung SE, Oh HJ, Ahn JS, Kim YH, Kim BJ, Ryu BY.** Antioxidant or apoptosis inhibitor supplementation in culture media improves post-thaw recovery of murine spermatogonial stem cells. Antioxidants, **2021**, 10(5), 754.
82. **Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M,** Crabo BG ve ark. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. Reproduction, **1984**, 70(1), 219-228.
83. **Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJD.** The hypoosmotic swelling test: an update. Archives of andrology, **1992**, 29(2), 105-116.
84. **Kawano N, Yoshida K, Iwamoto T, Yoshida M.** Ganglioside GM1 mediates decapacitation effects of SVS2 on murine spermatozoa. Biology of reproduction, **2008**, 79(6), 1153-1159.
85. **Kalthur G, Raj S, Thiyagarajan A,** Kumar S, Kumar P, Adiga SK. Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage. Fertility and sterility, **2011**, 95(3), 1149-1151.
86. **Kathiravan P, Kalatharan J, Edwin MJ, Veerapandian C.** Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. Animal Reproduction Science, **2008**, 104(1), 9-17.
87. **Katkov II, Mazur P.** Influence of centrifugation regimes on motility, yield, and cell associations of mouse spermatozoa. Journal of andrology, **1998** 19(2), 232-241.
88. **Kawase Y, Aoki Y, Kamada N,** Jishage KI & Suzuki H, Comparison of fertility between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization with a partial zona pellucida incision by using a piezo-micromanipulator in cryopreserved inbred mouse spermatozoa. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, **2004** 43(1), 21-25.

89. **Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer.* **1972**, 26 (4) 239-257.
90. **Korsmeyer SJ.** Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. **1992**
91. **Korsmeyer SJ.** "Regulators of cell death". *Trends in Genetics.* **1995**, 11 (3): 101–105. doi:10.1016/S0168-9525(00)89010-1. PMID 7732571
92. **Kömürcü-Bayrak E, Erginel-Ünaltuna N.** Gen anlatımı analiz yöntemlerine genel bakış. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **2011**, 1(2), 28-35.
93. **Kumar V, Abbas AK, Aster JC.** Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9th ed., Elsevier Saunders, Philadelphia, **2015**
94. **Krishnan N, Dickman MB, Becker DF.** Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, **2008**, 44(4), 671-681
95. **Lambert AJ, Brand MD.** Reactive oxygen species production by mitochondria. *Mitochondrial DNA: Methods and Protocols*, **2009**, 165-181.
96. **Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM.** Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Human reproduction*, **2000**, 15(8), 1717-1722
97. **Leibo SP.** The early history of gamete cryobiology. In 'Life in the Frozen State'. 1st edn. (Eds BJ Fuller, N. Lane, and EE Benson.) **2004**, pp. 347–370. ISBN: 978-0-415-24711-9 Ebook isbn: 978-0-203-647073 DOI: 10.1201/9780203647073.ch11
98. **Li H, Hung PH, Suarez, SS.** Ejaculated mouse sperm enter cumulus-oocyte complexes more efficiently in vitro than epididymal sperm. *PLoS One*, **2015**, 10(5), e0127753.
99. **Li MW, Lloyd KK.** DNA fragmentation index (DFI) as a measure of sperm quality and fertility in mice. *Scientific reports*, **2020**, 10(1), 3833.
100. **Li M, Wang D, He J. Chen L,** Li H. Bcl-XL: A multifunctional anti-apoptotic protein. *Pharmacological research*, **2020**, 151, 104547.
101. **Liu C, Feng H, Han J,** Zhou H, Yuan L, Pan H, Li, X ve ark. Effect of L-proline on sperm quality during cryopreservation of boar semen. *Animal Reproduction Science*, **2023**, 258, 107359.
102. **Liu J, Mochida K, Hasegawa A,** Inoue K, Ogura A. Identification of quantitative trait loci associated with the susceptibility of Mouse spermatozoa to cryopreservation. *Journal of Reproduction and Development*, **2017**.
103. **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $\Delta\Delta$ CT method, *Methods*, **2001**, 25(4), 402-408.
104. **Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* **2010**;4(8):118-126.
105. **Lone SA, Mohanty TK, Baithalu RK, Yadav HP.** Sperm protein carbonylation. *Andrologia*, **2019**, 51(4), e13233.
106. **Lucio CDF, Silva LCG, Regazzi FM,** Angrimani DDSR, Nichi M, Assumpção MEO, & Vannucchi CI. Effect of reduced glutathione (GSH) in canine sperm cryopreservation: In vitro and in vivo evaluation. *Cryobiology*, **2016**, 72(2), 135-140.
107. **Lybaert P, Danguy, A, Leleux F,** Meuris S, Lebrun P. Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Histology and histopathology.* **2009**
108. **Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R.** Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Human Reproduction*, **2005**, 20(12), 3459-3468.
109. **Martínez C, Goncalves LCP, Premi S, Augusto FA, Palmatier MA.** Triplet-energy quenching functions of antioxidant molecules. *Antioxidants*, **2022**, 11(2), 357.
110. **Maryan HS, Ghasemian F, Bahadori MH.** Effects of cryopreservation in the presence of Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs) on sperm parameters. *Cryobiology*, **2023**, 112, 104550.

111. **Mazur P, Leibo SP, and. Chu EHY.** A two-factor hypothesis of freezing injury: evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Experimental cell research*, **1972**, 71.2, 345-355.
112. **Mazur P.** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology-cell physiology*, **1984**, 247(3), C125-C142.
113. **McGonagle LS, Goldstein M, Feldschuh J, Foote RH.** The influence of cryoprotective media and processing procedures on motility and migration of frozen-thawed human sperm. *Asianjournal of andrology*, **2002**, 4(2), 137-142.
114. **Mehdipour M, Daghigh Kia H, Najafi A, Mohammadi H, Álvarez-Rodriguez M.** Effect of crocin and naringenin supplementation in cryopreservation medium on post-thaw rooster sperm quality and expression of apoptosis associated genes. *Plos one*, **2020**, 15(10), e0241105.
115. **Miller D.** RNA in the ejaculate spermatozoon: a window into molecular events in spermatogenesis and a record of the unusual requirements of haploid gene expression and post-meiotic equilibration. *Molecular human reproduction*, **1997**, 3(8), 669-676.
116. **Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME.** Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in medical sciences*, **2018**, 63(1), 68-78
117. **Molinia FC, Evans G, Casares PQ, Maxwell WMC.** Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, **1994**, 36(1-2), 113-122.
118. **Moradi B, Faramarzi A, Ghasemi-Esmailabad S, Aghaz F, Hashemian AH, Khazaei M.** L-proline as a novel additive to cryopreservation media improved post-thaw quality of human spermatozoon via reducing oxidative stress. *Andrologia*, **2022**, 54(1), e14301.
119. **Muftuoglu M, Mori MP, de Souza-Pinto NC.** Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. *Mitochondrion*, **2014**, 17, 164-181.
120. **Mullineaux PM,** Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defence* **1997**: 667-713.
121. **Munsi MN, Bhuiyan MMU, Majumder S, Alam MGS.** Effects of exogenous glutathione on the quality of chilled bull semen. *Reproduction in domestic animals*, **2007**, 42(4), 358-362.
122. **Nakagata N.** Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Mammalian Genome*, **2000**, 11, 572-576.
123. **Nakagata N, Takeshima T.** Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1 hybrid strains. *Experimental Animals*, **1993** 42(3), 317-320.
124. **Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A.** Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, **1999**, 51(4), 721-727.
125. **Nie G, Wenzel JGW.** Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*, **2001**, 55(4), 1005-1018.
126. **NIH National Human Genome Research Institute,** The Mouse Genome And The Measure of Man, [NIH News Advisory](https://www.genome.gov/10005831/2002-release-the-mouse-genome-and-the-measure-of-man)) <https://www.genome.gov/10005831/2002-release-the-mouse-genome-and-the-measure-of-man> Erişim Tarihi ve Saati 19.05.2024 09:00
127. **Niture SK, Jaiswal AK.** Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance. *Free Radical Biology and Medicine*, **2013**, 57, 119-131.
128. **Nur Z, Ak K.** Donmuş spermanın saklanması ve eritilmesi, *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med*, **2003**, 22(1-2-3), 97-102
129. **Ok E, Öz ZS.** Sperm hücrelerinde apoptoz. *Androloji Bülteni*, **2007**, cilt 30: 215-218.
130. **Okuyama M.** In vitro fertilization (IVF) and artificial insemination (AI) by cryopreserved spermatozoa in mouse. *J Fertil Implant*, **1990**, 7, 116-119.
131. **Oliva R.** Protamines and male infertility. *Human reproduction update*, **2006**, 12(4), 417-435.
132. **Oliveira RA, Wolf CA, de Oliveira VMA, Gambarini ML.** Addition of glutathione to an extender for frozen equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, **2013**, 33(12), 1148-1152.
133. **Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P.** Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nature reviews Molecular cell biology*, **2003**, 4(7), 552-565.

134. **Öztürk AE, Bucak MN, Bodu M, Başpınar N, Çelik İ, Shu Z, Gao D, Keskin N.** Cryobiology and cryopreservation of sperm. *Cryopreservation-Current Advances and Evaluations*, **2019**, 75116.
135. **Öktem S, Özhan HM, Özol D.** Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, **2001**, 2 (1): 91- 95.
136. **Pandhare J, Donald SP, Cooper SK, Phang JM.** Regulation and function of proline oxidase under nutrient stress. *Journal of cellular biochemistry*, **2009**, 107(4), 759-768.
137. **Panteghini M, Pagani F, Yeo KTJ, Apple FS, Christenson RH., ve ark.** Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. *Clinical chemistry*, **2004**, 50(2), 327-332.
138. **Parks JE, Graham JK.** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, **1992**, 38(2), 209-222.
139. **Penfold LM ve Moore HDM.** A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. *Reproduction*, **1993**, 99(1), 131-134.
140. **Petukhov M, Rychkov G, Firsov L, Serrano.** H-bonding in protein hydration revisited. *Protein science*, **2004**, 13(8), 2120-2129.
141. **Phang JM, Donald SP, Pandhare J, Liu Y.** The metabolism of proline, a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. *Amino acids*, **2008**, 35, 681-690.
142. **Pistollato F, Persano L, Rampazzo E, Basso G.** L-Proline as a modulator of ectodermal differentiation in ES cells. Focus on “L-Proline induces differentiation of ES cells: a novel role for an amino acid in the regulation of pluripotent cells in culture. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **2010**, 298(5), C979-C981.
143. **Plant TM, Zeleznik AJ.** Knobil and Neill's physiology of reproduction. **2014**, 4. Basım, Elsevier Academic Press UK Londra
144. **Polge C, Smith AU, Parkes AS.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, **1949**, 164(4172), 666-666.
145. **Polge C, Audrey US, Alan SP.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, **1949**, 164.4172, 666-666.
146. **Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF.** The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical pharmacology*, **2003**, 66(8), 1499-1503. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00504-5](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00504-5)
147. **Pudlarz A, Ranoszek-Soliwoda K, Karbownik S, Czechowska E, Tomaszewska E ve ark.** Antioxidant enzymes immobilized on gold and silver nanoparticles enhance DNA repairing systems of rat skin after exposure to ultraviolet radiation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2022**, 43, 102558.
148. **Quinn P, Kerin JF, Warnes GM.** Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertility and sterility*, **1985**, 44(4), 493-498.
149. **Ramazani N, Mahd Gharebagh F, Soleimanzadeh A, Arslan HO, Keles E, ve ark.** The influence of L-proline and fulvic acid on oxidative stress and semen quality of buffalo bull semen following cryopreservation. *Veterinary Medicine and Science* **2023**. <https://doi.org/10.1002/vms3.1158>
150. **Raspa M, Guan M, Paoletti R, Montoliu L, Ayadi A, Marschall S, EMMA/Infrafrontier Technical Working Group, Fray M, Scavizzi F.** Dry ice is a reliable substrate for the distribution of frozen mouse spermatozoa: A multi-centric study. *Theriogenology*, **2017**, 96, 49-57.
151. **Reeves RH, Gearhart JD, Hecht NB, Yelick PC, Johnson P, O'Brien SJ.** The gene encoding protamine 1 is near the proximal end of mouse chromosome 16 where it is tightly linked to the gene encoding protamine 2. *J Hered*, **1989**, 80, 442-446.
152. **Rezaei N, Mohammadi M, Mohammadi H, Khalatbari A, Zare Z.** Acrosome and chromatin integrity, oxidative stress, and expression of apoptosis-related genes in cryopreserved mouse epididymal spermatozoa treated with L-Carnitine. *Cryobiology*, **2020**, 95, 171-176.

153. **Rhoads RE, Udenfriend S.** Decarboxylation of alpha-ketoglutarate coupled to collagen proline hydroxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1968**, 60(4), 1473-1478.
154. **Robertson JR.** Nuclear events in apoptosis. (2000) *J Struct Biol*, 129, 346-358.
155. **Rooij DG, Griswold MD.** Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. *Journal of andrology*, **2012**, 33(6), 1085-1095.
156. **Rosse T, Olivier R, Monney L,** Rager M, Conus S, ve ark. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, **1998**, 391(6666):496-9.
157. **Roszkowski M ve Mansuy IM.** High efficiency RNA extraction from sperm cells using guanidinium thiocyanate supplemented with tris (2-carboxyethyl) phosphine. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **2021**, 9, 648274.
158. **Rudolph AS, Crowe JH, Crowe LM.** Effects of three stabilizing agents proline, betaine, and trehalose on membrane phospholipids. *Archives of biochemistry and biophysics*, **1986**, 245(1), 134-143.
159. **Sakkas D, Bizzaro D, Manicardi CG.** Chromatin damage and male infertility. In: *The genetics of male infertility*. Humana press, Totowa New Jersey, **2007**, 304-306.
160. **Samuelsson M, Vainikka L, Öllinger K.** Glutathione in the blood and cerebrospinal fluid: a study in healthy male volunteers. *Neuropeptides*, **2011**, 45(4), 287-292.
161. **Sangeeta S, Arangasamy A, Kulkarni S, Selvaraju S.** Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. *Animal reproduction science*, **2015a**, 161, 82-88.
162. **Sangeeta S, Kulkarni S, Arangasamy A, Selvaraju S.** Effect of amino acids on sperm motility, velocity parameters, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at cooled and post-thawed ram epididymal semen. *Indian J Anim Sci*, **2015b**, 85(7), 729-735.
163. **Santonastaso M, Mottola F, Iovine C, Colacurci N, Rocco L.** Protective effects of curcumin on the outcome of cryopreservation in human sperm. *Reproductive Sciences*, **2021**, 28, 2895-2905.
164. **Sezer K, Keskin M.** Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü. *FÜ Sağ. Bil. Vet. Dergisi* **2014**, 28.1: 49-56.
165. **Shan S, Xu F, Hirschfeld M, Brenig B.** Sperm lipid markers of male fertility in mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**, 22(16), 8767.
166. **Sharp JJ & Mobraaten LE.** To save or not to save: the role of repositories in a period of rapidly expanding development of genetically engineered strains of mice. In *Transgenic Animals* (pp. 525-532), **2022**, CRC Press.
167. **Shi X, Hu H, Ji G, Zhang J, Liu R, Zhang H, Li M.** Protective effect of sucrose and antioxidants on cryopreservation of sperm motility and DNA integrity in C57BL/6 mice. *Biopreservation and biobanking*, **2018**, 16(6), 444-450.
168. **Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF.** Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal reproduction science*, **2016**, 169, 2-5.
169. **Silva SV, Soares AT, Batista AM,** Almeida FC, Nunes JF, Peixoto CA, Guerra MMP. In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reproduction in domestic animals*, **2011**, 46(5), 874-881.
170. **Silvestre MA, Yániz JL, Peña FJ,** Santolaria P ve Castelló-Ruiz M. Role of antioxidants in cooled liquid storage of mammal spermatozoa. *Antioxidants*, **2021** 10(7), 1096.
171. **Simms D, Cizdziel PE, Chomczynski P.** TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*, **1993**, 15(4), 532-535.
172. **Skalka M, Matyašová J, Čejková M.** DNA in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments. *FEBS letters*, **1976**, 72(2), 271-274.
173. **Singer SJ, Nicolson GL.** The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes: Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids. *Science*, **1972**, 175(4023), 720-731.

174. **Sliwa L.** Usability of the hypoosmotic swelling" Water-test"--a simple method to assess sperm membrane integrity in mouse spermatozoa. *Folia Biologica*, **1993**, 41(1-2), 29-31.
175. **Sztejn JM, Farley JS, Young AF, Mobraaten LE.** Motility of cryopreserved mouse spermatozoa affected by temperature of collection and rate of thawing. *Cryobiology*, **1997**, 35(1), 46-52.
176. **Somfai T, Bodo SZ, Nagy SZ, Gocza E, Ivancsics J ve ark.** Simultaneous Evaluation of Viability and Acrosome Integrity of Mouse Spermatozoa Using light Microscopy, *Biotechnic & Histochemistry*, **2002**, 77 (3), 117-120.
177. **Songsasen N, Leibo SP.** Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Cryobiology*, **1997**, 35(3), 240-254.
178. **Spallanzani Lazzaro.** Opuscles de physique, animale et végétale. Vol. 2. chez PJ Duplain, **1787**.
179. **Szabados L, Savouré A.** Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, **2010**, 15(2), 89-97.
180. **Sztejn JM, Noble K, Farley JS, Mobraaten LE.** Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, **2001**, 42(1), 28-39.
181. **Sztejn JM, Takeo T, Nakagata N.** History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, **2018**, 82: 57-63.
182. **Şakar Eraslan A, Yalçın OK, Mazi A, Yıldız C.** The Effect of Coenzyme Q10 Added to Extender on The Endoplasmic Reticulum Stress Pathway in Freezing Mouse Sperm, 4th International Conference of Food, Agriculture and Veterinary Sciences. **2022**, Van turkey
183. **Tada N, Sato M, Yamanoi J, Mizorogi T, Kasai K, Ogawa S.** Cryopreservation of Mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *Journal of Reproduction and Fertility*, **1990**, 89 511–516.
184. **Takeo T, Nakagata N.** Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin. *Biology of reproduction*, **2011**, 85(5), 1066-1072.
185. **Takeshima T, Nakagata N, Ogawa S.** Cryopreservation of Mouse spermatozoa. *Jikken Dobutsu*, **1991**, 40 493–497.
186. **Tartaglione CM, Ritta MN.** Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, **2004**, 62(7), 1245-1252.
187. **Tash JA, Applegarth LD, Kerr SM, Fins JJ, Rosenwaks Z, Schlegel PN,** Postmortem sperm retrieval: the effect of instituting guidelines. *The Journal of urology*, **2003** 170(5), 1922-1925.
188. **Tecirlioglu RT, Lacham-Kaplan O, Trounson AO.** Effects of electrical stimulation and seminal plasma on the motility of mouse sperm. *Reproduction, Fertility and Development*, **2002**, 14(8), 471-478.
189. **Tekin N.** Erkek Üreme Organlarının Muayenesi (Androlojik Muayeneler), In "Theriogenology" Ed. E Alaçam, 53-67, Nurol Matbaacılık AŞ, Ankara, **1990**.
190. **Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ.** Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect. *Theriogenology*, **2002**, 58(1), 87-102.
191. **Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J.** Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in biochemistry*, **2018**, 62(3), 341-360.
192. **Troehler U.** Surgery and life. The extraordinary career of Alexis Carrel. *Medical History*, **1981** 25(3), 340.
193. **Tuffery AA.** The Mouse In "The UFAW Handbook on the Careand Management of Laboratory Animals"Ed. by W Lane-Petter, AN Worden, BF Hill, JS Paterson, HG Vevers, 288-310, Third Edition E. & S. Living Stone Ltd, Edinburg and London, **1967**
194. **Tuncer PB, Bucak MN, Büyükleblebici S, Sarıözkan S, Yeni D, Eken A ve ark.** The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology*, **2010**, 61(3), 303-307.

195. **Valadbeygi A, Naji T, Gholami M.** Supplementation freeze-thawed media with selenium protect adipose-derived mesenchymal stem cells from freeze-thawed induced injury. *Cryobiology*, **2016**, 73(2), 135-139.
196. **Vajta G, Kuwayama M.** Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 2006, 65(1), 236-244.
197. **Lane D.** Differentiating life and death: An inflammatory affair. *PeerJ Preprints*, **2018**, 6, e27080v1.
198. **Ward WS, Coffey DS.** DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*, **1991**, 44(4), 569-74.
199. **Ward WS, Zalensky AO.** The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, **1996**, 6(2-3).
200. **Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, **1995**, 7(4), 871-891.
201. **Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, Oehninger S.** Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Molecular human reproduction*, **2002**, 8(11), 984-991.
202. **Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P.** Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269 C. *Science*, **1972**, 178.4059: 411-414.
203. **Wickremasinghe R, Gitendra A, Victor H.** Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 93.11 **1999**: 3587-3600.
204. **Wildt DE,** Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. *Animal reproduction science*, **1992**, 28(1-4), 247-257.
205. **Willoughby CE, Mazur P, Peter AT, Critser JK.** Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, **1996** 55(3), 715-727.
206. **Woods EJ, Gilmore JA, Liu J.** Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membran permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum. Reprod*, **2000**, 15: 335-343.
207. **Woolley DM.** Motility of the Spermatozoa at surfaces, *Reproduction*, **2003**, 126, 259-270
208. **World Health Organization,** WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1999**
209. **World Health Organization,** WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. 6th edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK, **2021**
210. **Wowk B, Leitl E, Rasch CM, Mesbah-Karimi N, Harris SB, Fahy GM.** Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*, **2000**, 40(3), 228-236.
211. **Wu G, Bazer FW, Hu J, Johnson Ga, Spencer TE.** Polyamine synthesis from proline in the developing porcine placenta. *Biol Reprod*, **2005** 72:842–850
212. **Wu G, Flynn NE, Knabe DA.** Enhanced intestinal synthesis of polyamines from proline in cortisol-treated piglets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2000**, 279:E395–E402
213. **Wu G, Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Kim SW, ve ark.** Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino acids*, **2011**, 40, 1053-1063.
214. **Wu N, Yang M, Gaur U, Xu H, Yao Y, Li D.** Alpha-ketoglutarate: physiological functions and applications. *Biomolecules & therapeutics*, **2016**, 24(1), 1.
215. **Wykes SM, Krawetz SA.** The structural organization of sperm chromatin. *Journal of Biological Chemistry*, **2003**, 278(32), 29471-29477.
216. **Yamauchi Y, Riel JM, Ward MA.** Paternal DNA damage resulting from various sperm treatments persists after fertilization and is similar before and after DNA replication. *Journal of andrology*, **2012**, 33(2), 229-238.

217. **Yáñez-Ortiz, I, Catalán J, Mateo-Otero Y, Dordas-Perpinyà M, Gacem S, Yeste N, Miró J.** Extracellular reactive oxygen species (ROS) production in fresh donkey sperm exposed to reductive stress, oxidative stress and NETosis. *Antioxidants*, **2021**, 10(9), 1367.
218. **Yang E, Korsmeyer SJ.** Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*, **1996**, 88(2)-386-401
219. **Yeste M, Estrada E, Pinart E, Bonet S, Miró J, Rodríguez-Gil JE.** The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. *Cryobiology*, **2012**, 68(2), 251-261.
220. **Yıldız C, Erol İ.** The Effects on Post-Thaw Sperm Quality and Nuclear DNA Integrity of Supplementation of Low-Density Lipoprotein to Freezing Extender in the Mouse. *Van Veterinary Journal*, **2024**, 35(1), 94-100.
221. **Yıldız C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T.** Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, **2000**, 54, 579-585.
222. **Yıldız C, Ottaviani P, Law N, Ayearst R, Liu L ve McKerlie C.** Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction*, **2007**, 133(3), 585-595.
223. **Yıldız C, Law N, Ottaviani P, Jarvi K, McKerlie C.** Comparison of sperm quality and DNA integrity in mouse sperm exposed to various cooling velocities and osmotic stress. *Theriogenology*, **2010**, 74(8), 1420-1430.
224. **Yıldız C, Mullen B, Jarvi K, McKerlie, Lo KC.** Effect of different cryoprotectant agents on spermatogenesis efficiency in cryopreserved and grafted neonatal mouse testicular tissue. *Cryobiology*, **2013** 67(1), 70-75.
225. **Yokoyama M, Akiba H, Katsuki M, Nomura T.** Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa. *Experimental Animals*, **1990**, 39(1), 125-128.
226. **Zeitoun MM, Al-Damegh MA.** Effect of nonenzymatic antioxidants on sperm motility and survival relative to free radicals and antioxidant enzymes of chilled-stored ram semen. *Open Journal of Animal Sciences*, **2014**, 5(01), 50.
227. **Zhang W, Min L, Li Y, Lang Y, Hoque SM, Adetunji AO, Zhu Z.** Beneficial Effect of Proline Supplementation on Goat Spermatozoa Quality during Cryopreservation. *Animals*, **2022**, 12(19), 2626.
228. **Zhao J, Meng P, Jin M, Ma X, Ma H ve ark.** Combined addition of L-carnitine and L-proline improves cryopreservation of dairy goat semen. *Animal Reproduction Science*, **2023**, 257, 107325.
229. **Zou J, Wei L, Li D, Zhang Y, Wang G ve ark.** Effect of glutathione on sperm quality in Guanzhong dairy goat sperm during cryopreservation. *Frontiers in Veterinary Science*, **2021**, 8, 771440.

ÖZGEÇMİŞ

İlköğrenimini Fatih İlköğretim Okulunda, ortaöğrenimini Yüzüncüyıl Ortaokulunda tamamladı. Atatürk Anadolu Lisesinden 2011 yılında mezun oldu. Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesini 2011 yılında kazandı ve 2017 yılında mezun oldu. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doğum Jinekoloji ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalında doktora eğitimine başladı. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi' nde açılan sınavı kazanarak 2019 yılında araştırma görevlisi olarak atandı. Halen görevine devam etmektedir.

