



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



SPERMANIN DONDURULMASINDA HYALURONİDAZ VE ARJİNİN ETKİLERİ

Yüksek Lisans Tezi

Awo Abdoulaye GBADAMONSI

Zootečni Anabilim Dalı

İzmir

2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

SPERMANIN DONDURULMASINDA HYALURONİDAZ VE ARJİNİN ETKİLERİ

Awo Abdoulaye GBADAMONSI

Danışman: Prof. Dr. Nedim KOŞUM

Zootečni Anabilim Dalı
Hayvan Yetiştirme Yüksek Lisans Programı

İzmir
2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

Awo Abdoulaye GBADAMONSI tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “Spermanın Dondurulmasında Hyaluronidaz ve Arjinin Etkileri” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08/09/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Nedim KOŞUM

.....

Raportör Üye : Prof. Dr. Turğay TAŞKIN

.....

Üye : Prof. Dr. Mehmet KOYUNCU

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Spermanın Dondurulmasında Hyaluronidaz ve Arjinin Etkileri” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

08/09/2020



Awo Abdoulaye GBADAMONSI

ÖZET**SPERMANIN DONDURULMASINDA HYALURONİDAZ VE
ARJİNİN ETKİLERİ**

GBADAMONSI, Awo Abdoulaye

Yüksek Lisans Tezi, Zootekni Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nedim KOŞUM

Eylül 2020, 41 sayfa

Hayvan ıslahında en yaygın olarak kullanılan ıslah yöntemi, yapay tohumlamadır. Ancak yapay tohumlamanın başarısı, kullanılan spermanın kalitesine bağlıdır. Dolayısıyla bu çalışmada sperma kalitesini iyileştirmek ve/veya geliştirmek için başta teke sperması olmak üzere dondurulmuş - çözdürülmüş küçükbaş hayvanların spermasında L-arjinin ve hyaluronidaz etkilerini incelemek amaçlanmıştır. Bu çalışmada, 2010 yılından itibaren bu konuda yapılan araştırmaların sonuçları kullanılmıştır. Bu amaçla birçok tür hayvanda dondurulmuş- çözdürülmüş sperma kalitesi, özellikle sperma motilitesi ve/veya lipid peroksidasyon verilerini içeren makaleler seçilmiştir. Makaleler incelendiğinde sulandırıcılara 0.5 mM L-arjinin ilavesinin % 6 - 15 ek sperma motilitesi sağladığı görülmektedir. L-arjininin ürettiği Nitrit Oksit ve spermin sayesinde enerji ihtiyacı arttırmakta, böylece gerek seminal plazmadaki gerekse spermatozoon içindeki lipid peroksidasyonu azaltılmaktadır. 20 µL hyaluronidaz, seminal plazmada var olan besin maddelerini ve enzimleri parçalayarak bir yandan enerji kaynağı arttırmakta, diğer yandan seminal sıvısının kıvamını (vizkozite) azaltmaktadır. Dolayısıyla seminal plazmadaki peroksidasyon, dondurulma- çözdürülme stresini azaltır ve çözdürülmüş sperma kalitesini yükseltmektedir. Spermasının dondurulmasında sulandırıcılara 0.5 ml L-arjinin ve 20 µL hyaluronidaz ilavesi ile çözdürülmüş sperma kalitesi iyileştirilebilir.

Anahtar sözcükler: L-arjinin, hyaluronidaz, dondurulmuş- çözdürülmüş sperma.

ABSTRACT
EFFECTS OF HYALURONIDASE AND ARGININE ON
CRYOPRESERVATION OF SEMEN

GBADAMONSI, Awo Abdoulaye

M.Sc. in Animal Science

Supervisor: Prof. Dr. Nedim KOŞUM

September 2020, 41 pages

Artificial insemination is the most widely used technic in animal breeding. However, the success of artificial insemination depends on the quality of semen used. Therefore, in this study, it was aimed to examine the effects of L-arginine and hyaluronidase on frozen - thawed semen, in the order to improve semen quality. In this study, the results of reseaches on this subject since 2010 were used. For this purpose, papers containing data like frozen-thawed semen quality, especially sperm motility and / or lipid peroxidation were selected. Examination of the articles showed that the addition of 0.5 mM L-arginine to the extenders provides 6 - 15% additional semen total motility compared the controle group. This extra semen motility is provided by Nitrite Oxide and spermine produced by L-arginine. Nitrite Oxide and spermine participate in the increasing of energy, reducing the lipid peroxidation in both seminal plasma and spermatozoon. 20 µL of hyaluronidase added in extender, breaks down the nutrients and enzymes that exist, increases the energy source and decreases the viscosity of the seminal plasma. Therefore, the reduction of lipid peroxidation in seminal plasma reduces freezing-thawing stress and improves thawed semen quality. In conclusion, the addition of 0.5 ml L-arginine and 20 µL hyaluronidase to extenders can improve frozen - thawed semen quality.

Key words: L-arginine, hyaluronidase, frozen-thawed semen.

ÖNSÖZ

İnsanların hayvansal protein gereksiniminin karşılanmasında keçi gibi küçükbaş hayvan türlerinin önemli yeri bulunmaktadır. Keçi yetiştiriciliğinde elde edilen temel ürünler olan et ve süt önemli hayvansal protein kaynaklarıdır. Keçi yetiştiriciliğinin ekonomik olarak sürdürülmesinde temel koşul, üremenin düzenli biçimde sağlanmasıdır. Süt ve et üretiminin devamlılığı, üremenin sürdürülmesine bağlıdır. Düzenli üreme için temel koşullardan biri ise doğal aşım ya da yapay tohumlamanın gerçekleşmesidir.

Yapay tohumlamanın başarısı, sperma kalitesine bağlı olduğundan dolayı uzun yıllardır sperma kalitesini iyileştirmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Sperma kalitesinin gelişmesinde bire bir madde ilavesinin etkisi incelenir. Spermada birden fazla madde (amiasit, enzim, vb) bulunduğu için, aminoasit ve enzim kombinasyonunun, sperma dondurulmasını iyileştirebileceği düşünülmektedir.

“Spermasının Dondurulmasında Hyaluronidaz ve Arjinin Etkileri” başlıklı tez çalışmasının temel amacı; dondurulmuş sperma kalitesini geliştirerek yapay tohumlamanın başarısını artırmaktır. Bunun için sulandırıcıya arjinin ve hyaluronidaz ilavesi yapılmaktadır.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü’nde hocam Sayın **Prof. Dr. Nedim KOŞUM**’un kontrol altında planlanıp yürütülmüştür.

Awo Abdoulaye GBADAMONSI

08/09/2020 İZMİR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	iii
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)	xviii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR	3
2.1. Arjininin Sperma Özellikleri Üzerine Olan Etkisi	3
2.2. Hyaluronidaz Üreme Hücrelerin Parametreleri Üzerinde	7
3. YAPAY TOHURLAMA	9
3.1. Yapay Tohumlama Tarihçesi	9
3.2. Keçilerde Yapay Tohumlama Özellikleri	10
4. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN BAZI TEKNİK TERİMLER	11
4.1. Spermanın Dondurularak Saklaması İşlemi	12
4.1.1. Spermanın kısa süreli saklaması işlemi	12
4.1.2. Spermanın kısa süreli saklaması işlemi	12
4.2. Sperma Sulandırıcılarında Kullanılan Maddeler	12
5. ARJİNİN TANIM VE İŞLEVLERİ	15
5.1. Metabolizma ve Spermatogenez İşlevleri	15
5.2. Nitrik Oksit Prekürsörü	16
5.3. Enzim Taşıma	16
5.4. Döllenmede L-arjininin İşlevi	17
5.5. Arjininin Etki Mekanizması	17
5.5.1. Nitrik Oksit (NO)	18
5.5.2. Polyaminler: spermin, spermidin ve putresin	20
5.6. Sperma Üzerinde Kullanılan L-arjinin Dozları	22

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

6. HYALURONİDAZ ENZİMİNİN TANIMI VE İŞLEVLERİ	23
6.1. Memeli Hayvanlarda Hyaluronidaz.....	24
6.2. Hyaluronidaz Enziminin Kullanım Alanları.....	24
6.3. Hyaluronidaz'ın Etki Mekanizması.....	24
6.4. Sperma Üzerinde Hyaluronidaz Enzimi Kullanım Miktarı	25
7. ARJİNİN VE HYALURONİDAZ ENZİMİ KOMBİNASYONU	26
8. TARTIŞMA VE SONUÇ	27
9. ÖNERİLER	31
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	32
TEŞEKKÜR	40
ÖZGEÇMİŞ.....	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
5.1 Arjinin yapısal birleşimi.....	15
5.2 L-arjinin ve ürettiği çeşit metabolitler.....	18
5.3 L-arjinin, ürettiği çeşit metabolitler ve kullanılan enzimler.....	18
5.4 L-arjinin'den Nitrik Oksit metabolizması	19
5.5 Nitrik Oksit ve süperoksit anyonu reaksiyonu.....	19
5.6 L-arjinin'den spermin ve spermidin metabolizması.....	21
5.7 L-arjinin'den L-glutamik asit üretimi.....	21
6.1 Memeli hayvanlarda hyaluronidaz.....	23
6.2 Bakterilerde hyaluronidaz.....	23
6.3 Sülüklerde hyaluronidaz.....	23
6.4 Farklı hyaluronidazların parçaladığı yerleri.....	23

ÇİZELGELER DİZİNİÇizelgeSayfa

8.1 Sperma dondurulmasında bazı antioksidanların etkileri27

8.2 Sperma dondurulmasında L-arjinin ve metabolitlerin etkileri28



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
kg	Kilogram
mg	Miligram
mM	Milimol
ml	Mililitre
nM	Nanomol
<u>Kısaltmalar</u>	
ANOVA	(Analysis of Variance) Varyans Analizi
ATP	(Adenosine TriPhosphate) Adenozin trifosfat
DNA	(Desoxyribonucleic Acid) Dezoksiribonükleik Asit
FAO	(Food and Agriculture Organisation of United Nation) Birleşik Milletler'in Tarım ve Gıda Örgütü
IU	(International Unit) Uluslararası Birim
UV	Ultra Violet ışığı
NAME	N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester
DMS	Dimethyl sulfoxide
GAG	Glikozaminoglikan
BSA	Boğa serum albümin

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
RNS	Reactive Nitrogene Species
ROS	Reactive Oxygene Species
DMA	Dimethylamide
NO	Nitrik Oksit
NOs	Nitrik Oksit sentaz

1. GİRİŞ

Yapay Tohumlama, biyoteknolojinin hayvan ıslahında kullanılan en eski, yaygın, kolay ve ekonomik yöntemidir (Hafeez, 2008; Bittencourt et al., 2018). Gebelik elde edebilmek için erkek hayvandan alınan spermalar, uygun yöntem ve teknikler ile dişi üreme kanalına konulması olarak bilinen yapay tohumlamada üç farklı sperma çeşitliği kullanılmaktadır (Washaya et al., 2019). Bunlar; taze sperma, kısa süreli saklanmış sperma ve dondurulmuş-çözdürülmüş spermadır (Koşum and Wassmuth, 2000; Kaymakçı, 2016). Ancak, yapılan araştırmalarda keçi ve koyun başta olmak üzere küçükbaş hayvanlarda diğer hayvanlara göre, örneğin sığırlarda, yapay tohumlama ile beklenen başarıya ulaşamadığı ortaya çıkmaktadır. Sadece taze sperma ile yapay tohumlama yapıldığında elde edilen sonuçların doğal aşım ile elde edilen gebelik oranına yakın olduğu belirtilmiştir. Fakat elde edilen gebelik oranı, kısa süre saklanmış ya da dondurulmuş-çözülmüş sperma ile doğal aşıma göre daha düşüktür (Salomon and Maxwell, 1995; 2000; Gbadamonsi vd., 2020). Ancak yapay tohumlamanın en büyük avantajı, uygulamada bir yandan erkek damızlıklardan etkin yararlanma diğer yandan ise elit hayvanların spermalarının istenen her zaman mevcut olmasıdır. Spermaların her koşulda kullanılabilmesi ya da yararlanılabilmesinin temeli; onların dondurulmasıdır (Benson et al., 2012; Alcak et al., 2017; Naresh and Atreja, 2015).

Yapay tohumlamayı başarılı yapan en önemli özelliklerden birisi, sperma kalitesidir (Ünay vd., 2014). Spermada kalite denildiğinde; spermatozoon sayısı ve motilitesi yüksek, ölü sperm oranı ve DNA bozukluğu düşük olma anlaşılır. Sperma yapay vajina ya da elektroejakülasyon yöntemi ile erkek hayvandan aldıktan sonra, gerek vücut dışında uzun sürede spermatozoonların canlı kalabilmesi için, gerekse çok sayıda dişiyi tohumlayabilmek olasılığı arttırabilmek için, spermanın sulandırılması gerekmektedir (Bozkurt ve Tekin, 2002). Ancak, sperma sulandırmada sulandırıcı olarak kullanılan maddelerin arasında peroksidasyon gibi çok sayıda reaksiyon ortaya çıkmakta ve spermatozoonlar toksit etkiye maruz kalmaktadır (Watson, 1995; Tuncer vd., 2005). Sperma sağımı sonrasında spermanın morfolojik özelliklerinin kötüleşmesine neden olmaktadır. Bu durumun iyileştirilebilmesi veya geliştirilebilmesi birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir.

Bu çalışmada; arjinin ve hyaluuronidaz enziminin spermanın makroskopik ve mikroskopik parametreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla konuyla ilgili yüksek lisans ve doktora tezlerinin yanı sıra bilimsel makalelerden de yararlanılmıştır. Son olarak da konuyla ilgili bazı somut önerilere yer verilmiştir.



2. LİTERATÜR

2.1. Arjininin Sperma Özellikleri Üzerine Olan Etkisi

Hayvanların sperma parametreleri üzerinde arjininin etkilerini incelenmek için, iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Bunların birincisi; erkek hayvanlardan alınan spermaya sonradan arjinin eklenmesi, ikincisi ise hayvan vücuduna ya ağız yoluyla (yem ile karıştırarak) ya da enjekte edilerek verilmesidir.

Funahashi (2002), domuz sperma kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve nitrik oksit üretimi üzerinde arjinin etkisini belirlemek amacıyla bir çalışma yapmıştır. Çalışmada yedi Berkshire erkek domuzdan masaj yöntemi kullanılarak alınan spermayı dört kez sulandırmıştır. Trehaloz içerilen sulandırıcı ile alınan sperma sulandırıldıktan sonra seminal plazma ayrılmak için sperma yıkanmış ve santrifüj edilmiştir. L-arjinin etkisine bakabilmek için 10^6 spermatozoon/ml peletlerde 0.1- 2 mM/l eklenmiştir. Sonuçta L-arjinin, ürettiği Nitrik Oksit sayesinde sperma kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonunu uyardığı saptanmıştır.

Ahangar et al. (2017), horozlarda L-arjinin ilavesinin sperma kalitesi, testosteron yoğunluğu ve testislerin doku özellikleri üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada, hayvan materyali olarak yirmi adet 37 haftalık erkek etlik piliç kullanılmıştır. Sekiz hafta süren denemede hayvanlar dört gruba (0; 1.35; 2.33 ve 3.22 g/kg) ayrılmış ve rasyonda L-arjinin oranı farklı muameleler uygulanarak beş kez tekrarlanmıştır. Araştırma sonucunda, sperma kalitesi, testosteron düzeylerini belirlemek için, sperma ve kan örnekleri bireysel olarak alınmıştır. En sonunda testisleri ağırlığı ve dokularının özelliklerini değerlendirmek için erkek hayvanların testisleri de alınmıştır. Sonuç olarak rasyonda 2.33 g/kg L-arjinin ilavesi bir yandan sperma hacmi, bir yönde hareket eden spermatozoonların oranı ile testisi ağırlığını arttırmıştır. Diğer yandan tuba seminiferous kalınlığı, sertoli ve spermatogoni hücre sayıları ve horozların testosteron serum konsantrasyonu yükselmiştir. Rasyonda 3.22 g/kg L-arjinin kullandığında, yapılan histoloji testleri sonucunda leydig hücre sayısı, spermatid ve sperm hücre sayısı ile seminifer tüp lümen kalınlığının da arttığı gözlemlenmiştir. Kısacası rasyona L-arjinin ilavesi başta sperma özellikleri olmak üzere üreme parametrelerini iyileştirilmektedir.

Ozer Kaya et al. (2020), spermatolojik parametreleri, seminal plazmanın Nitrik Oksit düzeyleri ve arjinaz enzimi faaliyetleri üzerinde L- arjininin etkileri ortaya konulması amacıyla yapılan çalışmada, 2- 3 yaşlarında ve 50- 60 kg olan 10 baş Akkaraman koçu kullanılmıştır. Kullanılan hayvanlar 2 gruba (kontrol ve muamele grubu) ayrılmıştır. Kontrol grubuna ait hayvanlar tuzlu fizyolojik solüsyonu (plasebo etkisi oluşturma) periton içi yoluyla enjekte alınırken diğer hayvanlar 5 g/kg L-arjinin alınmıştır. Bu muameleden sonra sırasıyla; 1., 4., 24., 48., 72., 96., ve 120., saatlerde tüm hayvanlardan yapay vajinayla sperma alınmıştır. Nitrik Oksit düzeyleri, sperma hacim, motilite, pH, anormal sperm oranı ve yoğunluk olmak üzere elde edilen verileri tekrarlanan verilerde iki yönlü ANOVA ile istatistik değerlendirme yapılmıştır. Denemenin sonunda, enjeksiyonla verilen L-arjinin hayvanların spermasında kontrol grubuna göre seminal plazmada Nitrik Oksit düzeyleri ve arjinaz faaliyetleri ile sperma parametreleri; özellikle sperma hacim, motilite (bireysel ve kitle motilite), sperma yoğunluğunda bir artış gözlenmiştir. Anormal spermatozoon oranında ise kontrol grubundaki hayvanların spermasına göre bir azalma meydana gelmiştir. Sonuç olarak koçlarda üreme döneminde L-arjinin enjeksiyonu sperma kalite özellikleri ve tüm üreme parametrelerini iyileştirilebilmektedir.

Yang et al. (2019), Farelerde leydig hücrelerinde T - 2 Toksin tarafından testosteron üretiminin azaltılmasına karşı L-arjininin koruyucu etkileri üzerine bir çalışma yapmıştır. Bu amaçla farelerde leydig hücrelerinde, l-arjinin, T-2 toksin kullanılarak testosteron yoğunlukları ve enzim faaliyetleri değerlendirilmiştir. Sonuçta 10 nM T-2 toksin testosteron üretimini azaltmaktadır. 1 mM L-arjinindeki azalma, erkek farelerde leyding hücrelerinin sayısında artışa neden olmaktadır.

Ozer Kaya et al. (2019), “Koçlarda ereksiyon süresi sperma kalitesi ve Seminal Plazma Arjinaz Etkinliği üzerinde L-arjinin Etkisi bir çalışma” adlı araştırma yürütülmüştür. Bu çalışmada, 2 ve 3 yaşlarında, 50- 60 kg arasında ağırlığa sahip 12 baş Akkaraman koç, hayvan materyali olarak kullanılmıştır. Koçlar iki gruba ayrılmıştır. Kontrol grubunu oluşturan birinci gruptaki 6 adet koça 7 hafta süreyle 48 saatte bir kas içi klorid solüsyonu uygulanmış, ikinci grubu oluşturan 6 koça ise birinci gruptakine benzer süre ve sıklıkta 5 mg/kg L-

arjinin enjekte edilmiştir. L-arjinin, hayvanlar üzerindeki etkilerini belirlemek için bir hafta süreyle deneme grubundaki bütün hayvanlardan sperma örnekleri alınmıştır. Zar bütünlüğü ile ilgili verileri Hypo-Osmotic Swelling (HOS) testinden elde edilen tüm veriler ANOVA testi ile istatistik olarak değerlendirilmiştir. Deneme sonucunda uygulama grubundaki kontrol grubuna karşılaştırıldığında hayvanların ereksiyon sürelerinde 4., 5., 6., ve 7., haftalarda azalma, zar bütünlüğünde ise bir artış belirlenmiştir. Anormal spermatozoon oranında ise yalnız 2., haftada bir azalma saptanmıştır. Sperma motilitesinde (bireysel ve kitle motilitesi) 3., 5., ve 6., haftalarda artış izlenmiştir. Deneme sonucunda elde edilen bulgular, koçlara L-arjinin enjeksiyonunun ereksiyon süresini azalttığı halde sperma özelliklerini iyileştirdiğini göstermiştir.

Patel et al. (1998), sperma metabolizma aktiviteleri üzerinde L-arjininin etki mekanizmasını araştırmışlardır. Bunun için “Arjinin teke epididimal spermasının glikolizini etkinleşmesi” adlı bir çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmada, kesimhaneden teke testis örnekleri alınmıştır. İlk bölümde L-arjininin etkilerine bakmak üzere, keçi epididimal sperma üzerinde, çeşitli arjininin oranını glikoz, früktoz ve pirüvat tüketimini incelemiştir. Sonra teke epididimal spermanın glikolizi üzerinde aminoasitler etkilerinin incelenmesi amacıyla sperma üzerinde L-arjinin, L- lizin ve L-ornithin uygulanmıştır. Sonuç olarak teke epididimal spermasında, L-arjinin glikoliz reaksiyonunu ve reaksiyonunda L-arjinini tüketmediği saptanmıştır. Dolayısıyla L-arjinin varlığı küçük oranda bile sperma metabolizması ve spermatojenez iyileştirilir. Öte yandan sperma motilitesine önemli enerji kaynağı olan ATP sentezi arttırılmaktadır.

Siddique and Atreja (2013) araştırmalarında, L-arjinin ve Spermine-NONOate'nin etkileri Murrah erkek mandasında sperma motilitesi, yaşama gücü ve lipid peroksidasyonu etkilerinin belirlenmesini hedeflemişlerdir. Çalışmalarında, araştırmacılar manda spermasının dondurulmasında L-arjinin ve Spermine-NONOate'nin etkilerini ortaya konulmasını amaçlamışlardır. Denemede hayvan materyali olarak üç adet Murrah mandası kullanılmıştır. Hayvanlardan haftada iki kez yapay vajina ile sperma alınmıştır. Denemede, % 80 ve üzeri düzeyde sperma motilitesi olan sperma örnekler kullanılmıştır. Dondurulmak üzere alınan sperma, biri kontrol olmak üzere üç gruba eşit olarak

aylaştırılmıştır. Deneme gruplarında ayrılan spermaların bir bölümüne 1 mM L-arjinin ve diğerine 10^{-2} mM Spermine-NONOate eklenerek sıvı azotta dondurulmuştur. Deneme sonucunda, Murrah mandasında sperm motilitesi en yüksek spermine-NONOate (% 42.33) grubunda belirlenmiş, bunu sırasıyla; L-arjinin (% 38.33) ve kontrol (% 32.33) grupları izlemiştir. Çalışmada yer alan deneme gruplarında L-arjinin ve Spermine-NONOate eklenmiş spermaların lipid peroksidasyonunun sırasıyla 3.11 nmol/hücre ve 3.5 nmol/hücre düzeyinde arttığını belirlenmiştir. Dolayısıyla Murrah mandasının sperma dondurulmasında L-arjinin ve spermine-NONOate başta sperma motilitesi, yaşama gücü, zar bütünlüğü olmak üzere sperma parametreleri ve lipid peroksidasyonu durumu iyileştirmesinde önemli rol oynamıştır.

Özer Kaya vd. (2018), koç spermasının L-arjinin eklenerek dondurulmasının etkilerini belirlenmek amacıyla bir araştırma yapmışlardır. Araştırmada kullanılan altı baş Akkaraman koçtan yapay vajina kullanarak haftada bir sperma alınmıştır. Sperma dondurulmasında en uygun arjinin dozunun saptanması amacıyla beş farklı doz (0.1 mM; 0.5 mM; 1 mM; 5 mM ve 10 mM) kullanılmıştır. Her doz bir deneme grubunu temsil edecek şekilde, kontrol grubuyla birlikte toplam 6 grup oluşturulmuştur. Elde edilen sperma örneği eşit düzeyde altı gruba paylaştırılarak, beşinde farklı dozlarda arjinin spermaya eklenmiş ve kontrol grubundaki sperma ise sulandırılarak nitrojen sıvısında dondurulmuştur. Sperma çözündürüldükten sonra sperma parametreleri; sperma motilitesi, zar bütünlüğü ve arjinaz aktivitesine bakılmıştır. Elde edilen veriler SPSS programı kullanılarak t-test, Shapiro-Wilk normality analizi, ANOVA ve post hoc Duncan test ile istatistik olarak değerlendirilmiştir. Çözdürülmüş sperma motilitesi ile ilgili en yüksek oran, 0.5 mM arjinin grubunda elde edilmiştir. Zar bütünlüğü ile ilgili ise yalnız 0.5 mM arjinin eklenmesi grubunda bir yükselme izlenmiştir. Deneme sonucunda, koç spermasına 0.5 mM düzeyinde arjinin eklenmesinin, sperma kalitesini iyileştirdiği belirlenmiştir.

de Andrade et al. (2018), tarafından yürütülen çalışmada dondurulmuş at spermasının motilitesi, hiperaktivasyonu, peroksidasyonu ve zar bütünlüğü üzerinde nitrik oksitin etkilerini belirlemesi amaçlanmıştır. Bunun için üç aygırdan 3 kez alınan sperma örnekleri dondurulmuş, çözündürüldükten sonra

eklenen 1 mM L-arjinin, 10 mM L-NAME ve 100 mM mavi metilenin etkileri incelenmiştir. Deneme sonucunda, mavi metilenin aygırlarda sperma motilitesi, akrozom reaksiyonu, lipid peroksidasyonu ve nitrik oksit üretimini azalttığı belirlenmiştir.

2.2. Hyaluronidaz Üreme Hücrelerin Parametreleri Üzerinde

Kershaw-Young et al. (2013) yaptığı bir çalışmada, Alpaka seminal plazma ve sperma işlevi viskozitesi üzerinde glikosaminoglikan enzimleri ve proteazların etkilerini araştırmıştır. Çalışmada; sperma işlevini bozmadan seminal plazmanın vizkozitesini azaltmak veya ortadan kaldırmak hedeflenmiştir. Bu amaçla hyaluronidaz, kondroitinaz ABC ve keratanaz olmak üzere glikozanimoglikan (GAG) enzimleri, papain ve proteinaz K gibi proteazlar seminal plazma üzerinde uygulanmıştır. Denemede kullanılan dört baş Alpakadan yapay vagina kullanarak sperma örneği alınmıştır. Alınan sperma sulandırıldıktan sonra 5 eşit hacme bölünmüştür. Her hacimde bir deneme grubunu temsil edecek şekilde, 20 µL boğa serum albümin (BSA) (kontrol grubu), hyaluronidaz, kondroitinaz ABC, hyaluronidaz + kondroitinaz ABC ve papain eklenmiş ve 2 saat boyunca 37 °C'de ılık suyunda inkübasyon edilmiştir (deneme 1). İkinci denemede beş baş Alpakadan alınan sperma örneği sulandırıldıktan sonra 4 hacme bölünerek, her birinde 20 µL boğa serum albümin (BSA) (kontrol grubu), proteinaz K ve papain eklenmiş ve 2 saat boyunca 37 °C'de ılık suyunda inkübasyon edilmiştir. Veriler, Linear mixed model regresyonu GENSTAT' ta ve post hoc test ile istatistik olarak değerlendirmiştir. Deneme sonucunda hyaluronidaz ve kondroitinaz ABC'in seminal plazmadaki vizkozitesini azaltmıştır (% 62 ve % 65 vs % 60). Papain (30 dakikada) ve proteinaz K (60 dakikada), seminal plazmadaki vizkozitesini tamamen ortadan kaldırmıştır. Ancak proteinaz K olumsuz yönde sperma parametrelerini etkilediği belirlenmiştir.

de Moura et al. (2017), “Yumurta (oocyte) soyulması için düşük düzeyde hyaluronidaz döllenme oranı ve embriyo kalitesi iyileştirilebilir” adlı bir çalışma yürütülmüştür. Çalışmada, üreme desteklenen teknikler altında muamele alınan 22 kadından 192 yumurta kullanılmıştır. Denemede kullanılan 104 yumurtadan oluşturan birinci gruptakilere sulandırılmış hyaluronidaz (8 IU/ml) enjekte edilirken, 88 yumurtadan oluşturan ikinci gruptakilere normal hyaluronidaz (80

IU/ml) enjekte edilmiştir. Veriler Wilcoxon testi ile istatistik olarak değerlendirilmiştir. Deneme sonunda sulandırılmış hyaluronidaz enjekte edilen birinci gruptaki yumurtalarda dölleme oranı, ikinci gruptakilerden daha yüksek (% 92.3 vs % 80.6) bulunmuştur. Elde edilen gebelik oranı % 59.1 olarak belirlenmiştir. Sulandırılmış hyaluronidaz (8 IU/ml) kullanımının yumurta (oocyte) soyulması, dölleme oranının artırılması ve kısırlık düzeyinin azaltılması açısından yarar sağlayabileceği belirtilmiştir.



3. YAPAY TOHURLAMA

3.1. Yapay Tohumlama Tarihçesi

Bildiğimiz yapay tohumlama; yapay döllemeden kökeni almaktadır. Yapay döllemenin nasıl gerçekleştirildiği pek çok araştırmacının ilgisini çekmiştir. 1651 yılında Willam Harvey (1578 - 1657) kurbağa ve tavuklar gibi yumurtlayarak çoğalan hayvanların (oviparous) döllemesi ile ilgili ilginç ve detaylı gözlemler yapmıştır. Daha sonra Marcello Malpighi (1628 - 1694), Dutch Jan Swammerdam (1637 - 1680) ve Alman August Johann Rosel von Rosenhof (1705 -1759) böcek, kurbağa ve diğer oviparlarla tohumlama gerçekleştirmeye çalışmışlardır. 1677 yılında Van Leeuwenhoek Antoni'nin (1632 - 1723) sperma hücre gözlemi ve fotoğraflaması ile yapay dölleme ivme kazandırmıştır. 1734 - 1742 yıllarında, Fransız biyoloji uzmanı René Antoine de Raumur (1683 - 1757) ispatlanmış sonuç elde etmediği halde, kurbağalarda dölleme ile ilgili çeşitli deneme ve uygulamalar yapmıştır. Başarılı olmamasına rağmen kullandığı yöntem, uygulamalarla ilgili karşılaştığı sorunları dile getirerek, Spallazani'na yardımcı olmuştur. 1761 yılında Spallazani (1729 - 1799) organizma üzerinde mikroskobik araştırmalara başlamıştır. Mikroskobik araştırmalar esnasında döllemenin gerçekleşebilmesi için erkekten elde edilen spermaya gereksinim olduğuna ikna olduktan sonra, kurbağalarda yapay dölleme çalışmalarına başlamış ve başarılı olmuştur. Yumurtlayarak çoğalan hayvanlarda yapay dölleme olabiliyorsa diğer hayvanlarda da olabilir yaklaşımından hareketle, 1784 yılında dişi köpek apartmanda birkaç gün içerisinde kapattıktan sonra çiftleşme isteğini (kızgınlık) fark etmiş ve bir genç erkek köpekten bir kovada aldığı sperma vagina yoluyla enjekte edilmiştir. Enjeksiyon işleminden 62 gün sonra dişi köpek yavrulmuş ve ilk kez hem oviparous hem de viviparous hayvanlarda yapay dölleme başarıyla gerçekleştirilmiştir (Orland, 2017; Ombelet and Van Robays, 2015). Yapay tohumlamada, döllemenin gerçekleşmesi için erkek üreme hücresi (spermatozoon) ile dişi üreme hücresinin (ovum) birleşmesi gerektiğine tüm araştırmacılar ikna edilmiş ve pek çok hayvan türünde yapay tohumlama çalışmaları başlamıştır. Biyolog Walter Heape (1855 - 1925), 1897 yılında köpek, tavşan ve atlarda yapay tohumlama kullanarak yavrular elde etmiştir. Yapay tohumlama, 1899 yılında Ilya Ivanov tarafından bilimsel bir konuya dönüştürülmüş, sulandırıcılar geliştirilmiş ve kullanılan yapay tohumlama

tekniklerinin belirtilmiştir. Sığır, koyun ve keçi başta olmak üzere geviş getiren hayvanlarda ise ilk yapay tohumlama 1912 yılında Nishikawa tarafından gerçekleştirilmiştir (Foote, 2011).

Türkiye’de ilk yapay tohumlama, yerli ırkların performanslarının iyileştirilebilmesi amacı ile 1926 yılında Milovanov adlı bir Rus veteriner hekimi tarafından Karacabey çiftliğinde atlarda yapılmıştır. 1930 - 1939 yılları arasında, Bursa ve Balıkesir bölgesinde geviş getiren hayvanlardan özellikle sığır ve koyunlarda yürütülen ıslah çalışmalarının sayesinde ilk yapay tohumlama başarılı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, Karacabey Esmeri Sığır ve Karacabey Merinosu Koyun ırkları elde edilmiştir. 1970 yılında Ankara’da Lalahan Zootečni Araştırma Enstitüsünde İsveçli Polson tarafından dondurulmuş sperma üretilmiştir (Gökçen, 1998).

3.2. Keçilerde Yapay Tohumlama Özellikleri

Yapay tohumlamanın amacı, tekelerden alınmış spermayı keçinin üreme kanalına (vagina, döl yatağı ağzı veya döl yatağı) yerleştirerek çok sayıda hayvanın gebe kalmasını sağlamaktır. Ancak küçükbaş hayvanların üreme organları büyükbaş hayvanlardakine göre daha küçük olduğundan, spermayı dar ve kıvrımlı döl yatağı ağzını geçerek döl yatağı, döllenmenin gerçekleştirdiği yere bırakmak oldukça güçtür. Bunun için laparoskopik destekle yapay tohumlama yöntemi geliştirilmiştir. Ancak keçilerde koyunlara göre beklenen yüksek gebelik oranı elde edilememiştir (Faigl et al., 2012). Yapılan bazı çalışmalar, laparoskopik tohumlamanın bazı hayvanlarda kısırlığa neden olduğu şeklinde bulgulara rastlanılmıştır.

Tekelerin sperma sıvısında kowper bezi tarafından salgılanan bir enzim (fosfolipaz A) bulunmaktadır. Bu enzim, sulandırıcıda bulunan yumurta sarısı ile hidroliz reaksiyonu gerçekleştirerek lizolesitini üretmektedir. Lizolesitin düzeyine göre spermanın ölümüne neden (spermaları zehirleyerek) olmaktadır (Roy, 1957; Rita et Salomon, 1982). Dolayısı ile teke spermasının yıkamasını veya santrifügasyonu gerektiğini belirtilmiştir (Tabarez et al., 2017).

4. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN BAZI TEKNİK TERİMLER

Akrozom reaksiyonu: Döllenmeyi gerçekleştiren en önemli reaksiyonlardan birisidir. Bu reaksiyonda, akrozomun yapısında bulunan eozin, hyaluronidaz ve diğer maddeler hücre dışına çıkartılır. Bu reaksiyon, peroksitler tarafından uyarılmaktadır.

Kapasitasyon: Dişi üreme kanalında, spermatozoon tarafından yumurtayı dölleme yeteneği kazanması için spermatozoonların olgunlaşmasını sağlayan biyolojik ve fizyolojik değişiklikleri oluşturmaktadır. Bu kapasitasyon olayı ile spermatozoonlar hareketlik ve dölleme yeteneği kazanır (Kaymakçı, 2016; Singh et al., 2017).

Sperma motilitesi: Spemada bulunan spermatozoonların hareketleri ifade etmektedir. Ancak spermada çeşit spermatozoonların hareketleri gözlenmektedir. Bunlar; ileri veya geri düz hareketler yapan spermatozoonlar, dairesel hareket yapanlar, baş veya kuyruk hareketi gösteren spermatozoonlar ve titreşim hareketi gösteren spermatozoonlardır. Döllenmenin gerçekleşebilmesi için düz ve ilerleyen spermatozoonlar istenilmektedir (Singh et al., 2017).

Peroksidasyon: Peroksitler ve süperoksit anyonları tarafından doymamış yağların oksidasyon yapılması reaksiyonudur. Bu reaksiyon düzeyine göre spermatozoonlar hem yararlı hem de zararlı etki görebilmektedir. Düşük düzeyde üretilen peroksitler sperma kapasitasyonunu uyarmaktadır. Yüksek düzeyde üretilen peroksitler, sperma zarlarına olumsuz etki göstermekte, bunun sonucunda sperma motilitesinde bir kayıp oluşmaktadır (Watson, 1995).

Sperma dondurulması (kryoprezervasyon): Spermanın saklama yöntemlerinden biri olup, uzun sürede ve düşük sıcaklıkta (-70 °C veya -196 °C) spermatozoonların sıvı nitrojende saklanması işlemidir (Kaymakçı, 2016).

Antioksidan: Oksidasyon reaksiyonunu engelleyen, durduran veya ayarlayan maddelerdir.

Döllenme: Spermatozoonun (haploid hücre) yumurtaya (haploid hücre) girmesi, kaynaşması ve sonunda zigot (diploid hücre) elde edilmesi işlemlerdir.

Döllenmede başarı; kapasitasyon süresi, sperma motilitesi ve akrozom reaksiyonuna bağlıdır (Kaymakçı, 2016).

4.1. Spermanın Dondurularak Saklaması İşlemi

Evcil hayvanların spermalarının istendiği zaman ve kolaylıkla ulaşılabilmesi amacıyla saklamasına yönelik teknikler geliştirilmiştir. Bu teknikler, biyoçeşitliliğin korunmasına ve elit sürülerin yavrularının üretilmesine olanak sağlamaktadır. Sperma saklaması teknikleri kısa (sıvı halinde saklanma) ve uzun sürede saklama veya dondurulma (kryoprezervasyon) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Decuadro-Hansen, 2004; Kaymakçı, 2016; Leboeuf, 1995). Her iki sperma saklaması tekniğinde benzer sperma alma, sperma sulandırma, alıştırma (ekilibrasyon), payetleme ve sperma saklanması aşamalar izlenmektedir.

4.1.1. Spermanın kısa süreli saklaması işlemi

Yapay vagina veya elektroejakülasyon yöntemi kullanılarak elde edilen sperma, mikroskopik ve makroskopik kontrolden geçirilmektedir. Sperma, makroskopik ve mikroskopik açıdan kontrol edildikten sonra sulandırma aşamasına geçilir. Sulandırıcılar, sulandırma aşamasında spermalara ilave edilir. Bundan sonra elde edilen karışım (sperma+ sulandırıcılar) dinlendirilir. Bu işleme ekilibrasyon adı verilmekte ve otuz (30) dakika sürmektedir. Ekilibrasyon sonrasında sulandırılmış sperma +4 °C, 15 °C veya 15 - 20 °C saklanmaktadır (Decuadro-Hansen, 2004; Kaymakçı, 2016).

4.1.2. Spermanın kısa süreli saklaması işlemi

Kısa süreli saklanma uygulamaları gibi, sperma alma ve muayeneden geçirdikten, sulandırma ve alıştırma (ekilibrasyon) aşamaları tamamlandıktan sonra elde edilen sperma karışımı yavaş yavaş azot buharında ve sonra azot sıvısında -196 °C de dondurulmaktadır.

4.2. Sperma Sulandırıcılarında Kullanılan Maddeler

Bir yandan spermayı peroksidasyon, soğuk şoku, oksidatif stres gibi dış etmenlerden koruyabilmek için ve diğer yandan spermaya enerji sağlayabilmek üzere, sulandırıcılarda bazı katkı maddeleri kullanılmaktadır. Bu maddelere örnek

olarak; antibiyotikler, kryoprotektanlar, lipoproteinler, tampon solüsyonu, enerji kaynakları ve antioksidanlar sayılabilir.

➤ **Antibiyotikler,**

Spermanın bakterilerle bulaşmasının önlenmesi veya yok edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. En çok kullanılan antibiyotikler, Penicellin ve Streptomycindir.

➤ **Kryoprotektanlar,**

Kryoprotektanlar spermanın dondurulması sonrasında ortaya çıkan olumsuz etkilerden spermayı koruyan maddelerdir. Bunlar hücre zarından geçebilen kryoprotektanlar ve geçemeyen kryoprotektanlar olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Zarlardan geçebilen kryoprotektanlar, çok küçük ağırlık ve hacime sahip olduğundan dolayı kolayca zarlardan geçebilirler. En çok kullanılanlar gliserol ve dimethyl sulfoxidedir (DMSO). Zardan geçemeyen kryoprotektanlar ise çok ağır ve büyük olan moleküllerden oluşmaktadır. Bunlar; disakaritler; glikoz, trehaloz ve früktoz gibi, amidler; dimethylamid (DMA)'dır.

➤ **Lipoprotein**

Lipoprotein, yağ ve proteinlerin birleşimi ile oluşan ve birden fazla işlev yapan maddelerdir. Bu maddeler hem spermanın koruması işlev görür, hem de sperm hücrelerinin gerekli enerji ihtiyaç duyduğu anda enerji vermektedir. Sperma sulandırıcılarda kullanılan lipoproteinler olarak lesitin, albümin, yumurta sarısı ve yağsız inek sütü sayılabilir (Decuadro-Hansen, 2004).

➤ **Tampon solüsyonu**

Spermanın dondurulma ve çözündürülmesi sırasında, asitliğin değişkenliğini önlenmek amacıyla kullanılan solüsyondur. Kısacası sulandırıcılar; ortamın asitliğini dengede tutar bir solüsyondur. Buffer (tampon) olarak Tris ve sitrik asit kullanılmaktadır.

➤ **Enerji kaynakları**

Spermatozoonlara enerji vermek amacıyla sulandırıcılara eklenen maddelerdir. En sık kullanılan enerji kaynakları; glikoz, früktoz ve glütamindir (Kaymakçı, 2016).

➤ **Antioksidanlar**

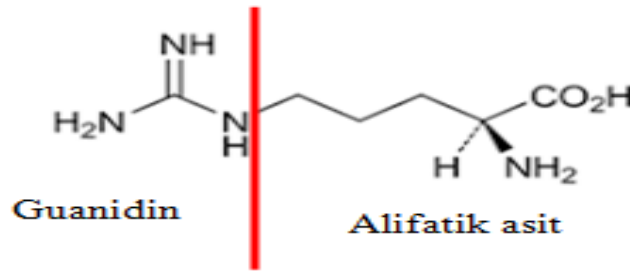
Antioksidanlar, oksidatif stres ve peroksidasyon oluşumunu önlemek veya durdurmak için kullanılan maddelerdir. En sık kullanılan antioksidanlar; likopen, sisteamin, glutatyon, trehaloz ve taurindir (Bucak vd, 2007; Ömür, 2015; Alcak et al., 2016; Toker et al., 2016; Rather et al., 2016; Peker Alkalin et al., 2016).



5. ARJİNİN TANIM VE İŞLEVLERİ

Arjinin, tüm memeli hayvanlarda sperma başta olmak üzere doku ve hücrelerin çoğunda bulunan bir aminoasittir. Arjinin, 22 proteinojenik aminoasitten bir tanesidir. Bu aminoasit, alifatik asit düz zincirinin sonuna bağlanan bir guanidin gruptan oluşmaktadır (Şekil 5.1) (Cristian et al., 2004; Srivastava et al., 2006). Sperm hücresinin çekirdekte en büyük kısım ve protein temel bileşim maddesi olan Arjininina farklı türevleri vardır. Bunlar; L-arjinin, L-nitroarjinin, L-homoarjinin ve D-arjinindir (Radany and Atherton, 1981).

Arjinin, kedi dışında tüm memeli hayvanların tükettikleri yemlerden alabilmekte ya da temin edebilmektedir. Bir başka arjininin kaynağı, hücrelerin çoğunda bulunan glutamattır. Arjininin bir başka kaynağı ise böbreklerde bulunan Citrulline argininosuccinate synthetase ve argininosuccinate lyase enzimlerinin sayısında arjinine dönüştürülmesidir (Brosnan,2003).



Şekil 5.1 Arjinin kimyasal yapısı

5.1. Metabolizma ve Spermatogenez İşlevleri

L-arjinin, vücutta depolanmamasına rağmen tüm organların içi ve doku ve organların arasındaki, en önemli biyolojik ve fizyolojik olaylarda rol oynamaktadır (Brosnan, 2003; Ozer Kaya et al., 2019). L-arjinin'in görevlerinden bir tanesi sperma metabolizmasıdır. Sperma metabolizmasında, L-arjinin besin maddelerini mobilize etmek (anabolizm) ve spermatozoonlar besin maddesine ihtiyaç duyduklarında katabolizma ile bu gereksinimi karşılarlar (Srivastava et al.,

2006). Metabolizma işlevinde, L- arjinin olmak üzere animoasitler substratler arzu etmek ve organların arasında enzimler taşımaktadır (Brosnan, 2003).

Spermatogenez gerçekleştirebilmesi için, şeker (glikoz), yağ gibi enerji kaynaklarını toplayarak gerekli enerjiyi sağlar ve böylece L-arjinin spermatozoon oluşumuna izin vermektedir (Perera et al., 1996). Başka deyişle glikojenik bir aminoasit olan L-arjinin, glikojenez mekanizmasıyla çok fazla miktarda glikol molekülü vermektedir.

5.2. Nitrik Oksit Prekürsörü

Peroksidasyon Reaktiv Oxygene species (ROS) üretilen biyolojik ve fizyolojik bir süreç olan doku ve hücrelerden doğal olarak oluşmaktadır. Bu peroksidasyon özellikle sperma olmak üzere hücrelerin dondurulması esnasında, sıcaklık şoku yüzünden, UV veya bir oksidatif stres olayı ortaya çıktığında, peroksidasyonun gerçekleştirmesini (olmasını) hızlandırmakta ve sonuç olarak ROS üretimini arttırmaktadır (Bandy et al., 2017). Bu peroksidasyon sırasında peroksitler ve reaktiv oxygene species (ROS) üretilmektedir. Peroksitler ve diğerleri spermatozoonların özelliklerinin bozulmasına neden olmaktadır (Srivastava et al., 2000; 2006). L-arjinin peroksidasyonu durdurabilmek için Nitrik Oksit Sentaz (NOs) enzimi kullanarak Nitrik Oksit (NO) üretmektedir.

NO yarı yaşam (yarı ömrü) olan bir Reactive Nitrogen Speccies (RNS) biridir. Nitrik Oksitler spermalara hem yararlı ve hem de zararlı olabilmektedir. Nitrik Oksidin yararlı etkisi, sperma fosfo-lipid membranlarındaki peroksidasyon indirgenmektedir. Nitrik Oksidin zararlı etkisi ise, yüksek oranda NO mitokondrilerdeki dioksijenlere saldırıp hücreleri öldürmektedir. L-arjinin tarafından üretilen NO peroksitler ile bağlanarak anlamlı şekilde peroksidasyonu azaltmakta veya durdurmaktadır. Böylece L-arjinin peroksidasyona karşı spermatozoonları korunmaktadır (Srivastava et al., 2000).

5.3. Enzim Taşıma

L-arjininin işlevlerinden bir tanesi de; doku ve hücrelere enzimleri taşımaktır. L-arjinin glükogenez, spermatogenez gibi önemli olan fizyolojik ve patolojik olayları gerçekleştirebilmek için gerekli enzimleri toplamaktadır

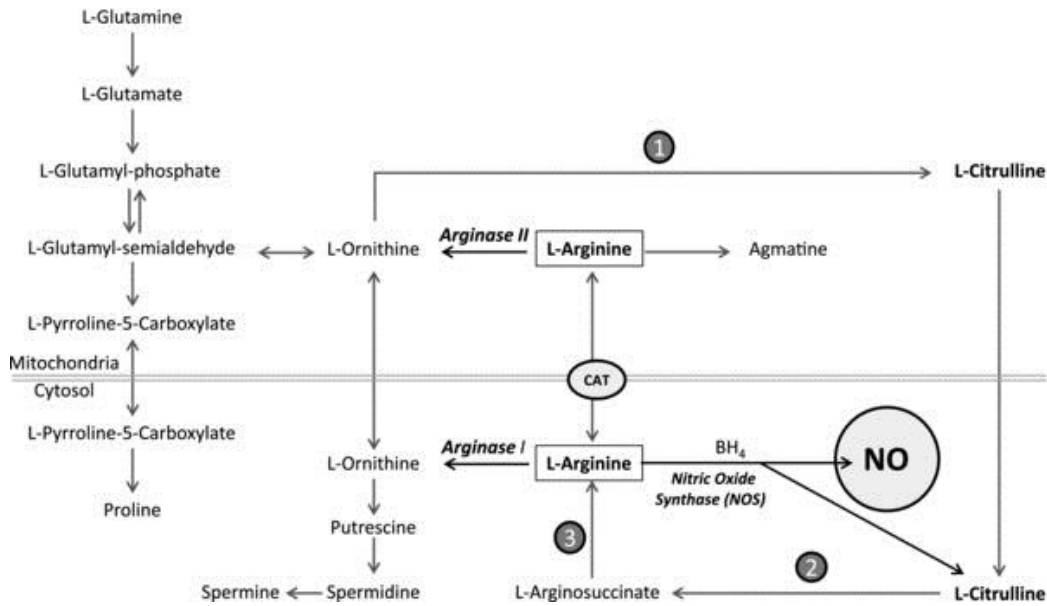
(Brosnan, 2003). L-arjinin başta prolaktin, antidiüretik hormon (ADH), büyüme hormonu olmak üzere bazı hormonların ve spermin, spermidin gibi polyaminlerin sentezinde önemli rol oynamaktadır (Özer Kaya vd., 2018; Zhang et al., 2019; Ozer Kaya et al., 2020).

5.4. Döllenmede L-arjininin İşlevi

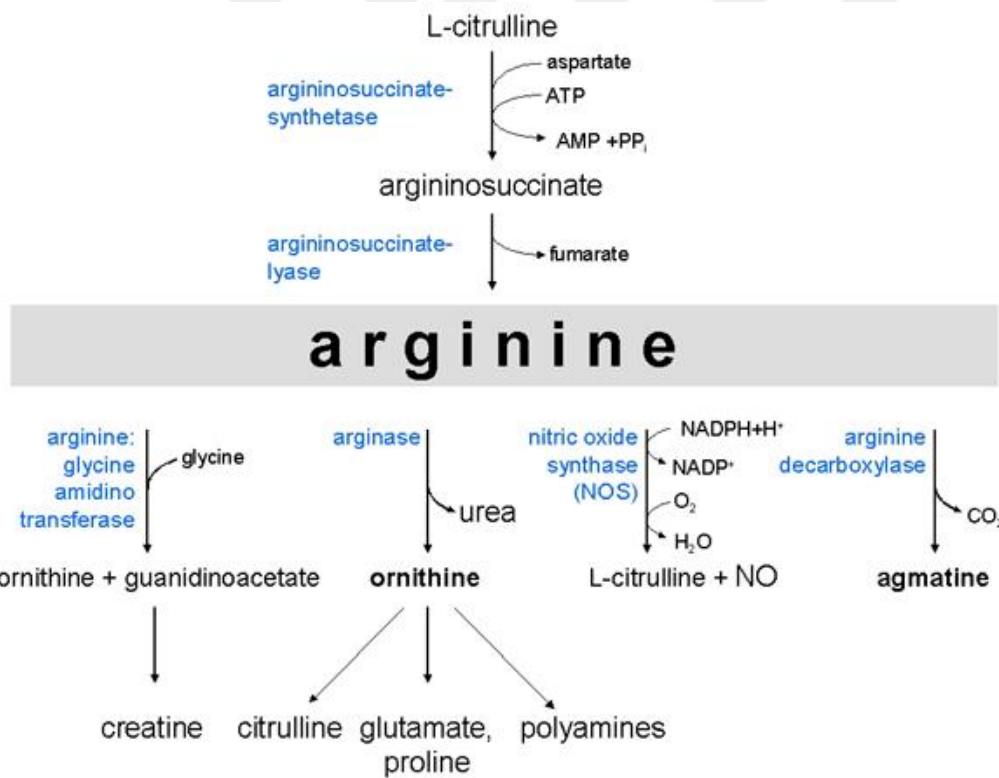
Sperm ve yumurtanın bileşimi yani döllenmenin gerçekleştirilebilmesi için en önemli ve zorunlu olan etmenler sperma motilitesi, kapasitasyon ve membran bütünlüğüdür. L-arjinin enerji sağlayarak sperma motilitesindeki kayıpları önlemektedir. L-arjinin, Nitrik Oksit sayesinde oksidatif stresleri ve peroksidasyonun düzeylerini azaltmaktadır. Oksidatif stresler ve peroksidasyon, sonucu üretilen maddeler (peroksitler, süperoksit anyonlar) sperma motilitesinin azalması ve spermatozoonların ölümünden sorumlu olan maddelerdir.

5.5. Arjininin Etki Mekanizması

L-arjinin işlevlerinin yerine getirilebilmesi için bazı faktörler önemli olmaktadır. Bu etmenlerden sıcaklık ve pH ihmal edilmemeli ve optimum şartlarda tutulmalıdır. Örnek olarak Radany and Atherton (1981)'a göre L-arjinin spermatozoon hareketliğine olumlu etki (motilitesi) sağlayabilmesi için 7- 8 arasında değişen bir pH ortamda bulunması gerekmektedir. Ancak L-arjininin ürettiği metabolitler işlevleri nitrik Oksit (NO), L-glutamik asit (glutamat), prolin, spermin, spermidin ve prutesin başta olmak üzere polyaminler, sitrulin (citrulline), agmatin ve ornitindir (Şekil 5.2 ve 5.3).



Şekil 5.2 L-arjinin ve ürettiği çeşit metabolitler (Anonim).

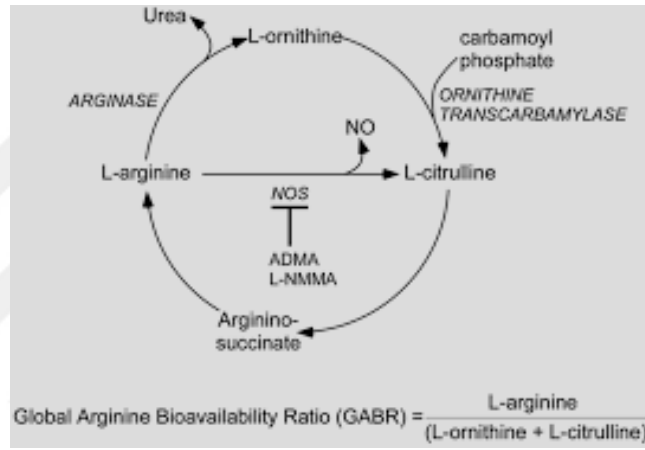


Şekil 5.3 L-arjinin, ürettiği çeşit metabolitler ve kullanılan enzimler (Anonim).

5.5.1. Nitrik Oksit (NO)

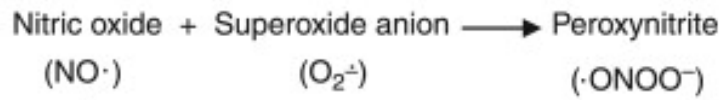
NO, L-arjinin prekürsör olarak spermatozoonlarda bulunan Nitrik Oksit Sentaz (NOs) enziminin denetimi altında üretilmektedir (Şekil 5.4). Nitrik oksit

sentaz enzimi tarafından NO miktarı ayarlanmaktadır. Yetersiz miktarda süperoksit anyonlar daha güçlü olmakta ve peroksidasyon etkisi ortaya çıkmaktadır. Yüksek miktarda NO mitokondrilerdeki dioksitleri yok etmekte ve spermatozoonların ölümüne neden olmaktadır (Srivastava et al., 2006). Ancak NO stres oksidasyonu ve peroksidasyonun azaltılmasında ilginç bir rol oynamaktadır. NO ile stres oksidasyonunda üretilen süperoksit anyonları (O_2^-) oksijene bağlanarak peroksinitrit ($ONOO^-$) üretilip peroksidasyonu indirgemektedir (Şekil 5.4). Dolayısıyla sperma ölümüne yol açan süperoksit anyonları ortadan kaldırılmaktadır. NO Fe^{3+} iyonu biyolojik reaksiyonunda Fe^{2+} 'ye indirgenmiştir. Akrozom reaksiyonu engellenen Fe^{3+} azaltılarak döllenmeyi kolaylaştırılmaktadır.



Şekil 5.4. L-arjinin'den Nitrik Oksit metabolizması.

Nitrik Oksit(NO) ile süperoksit anyonlarından (O_2^-) elde edilen peroksinitrit ($ONOO^-$) güçlü bir antioksidandır. Bu antioksidanlar, stres ve diğer oksidasyonlara karşı tepki vermektedir (Ignarro, 2000; Akyol et al., 2001).



Şekil 5.5. Nitrik Oksit ve süperoksit anyonu reaksiyonu.

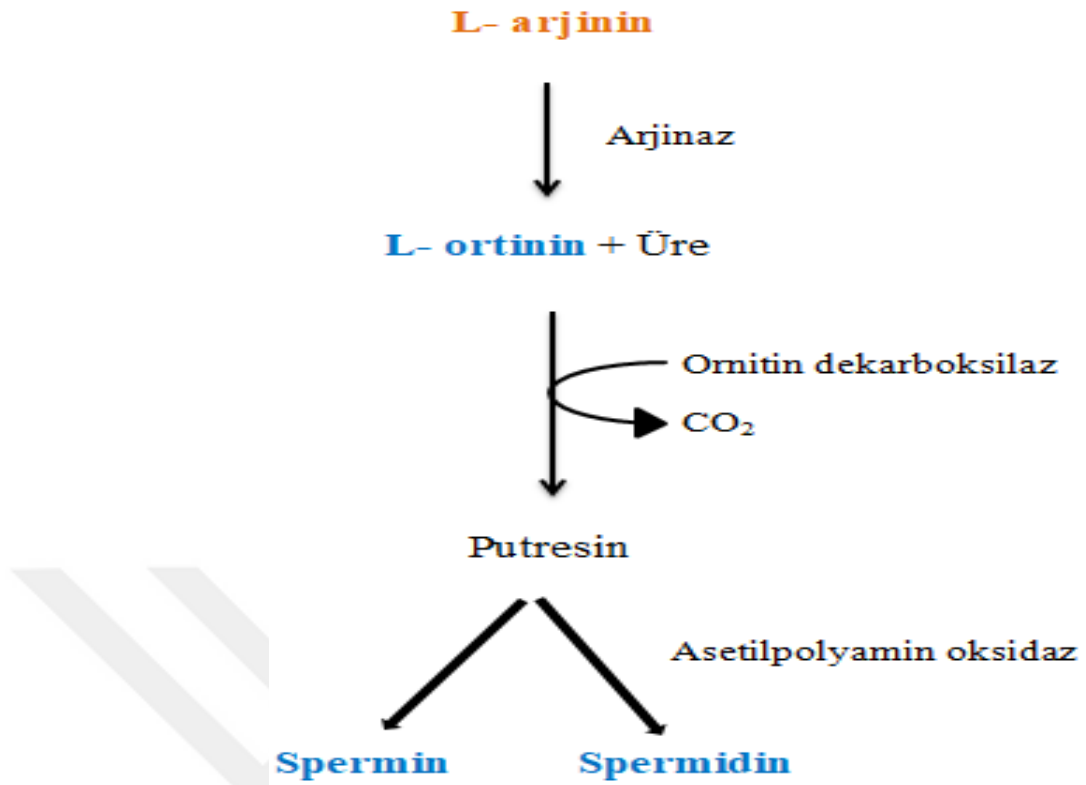
Diğer yandan cGMP (cyclic guanosine monophosphate) sentezini iyileştirilip enerji kaynakları (ATP) yükseltilmektedir. NO spermatozoonların mitokondrilerinde glikoz metabolizmasını arttırmaktadır. Dolayısıyla enerji eksikliği yüzünden sperma motilitesi kaybını da ortadan kaldırmaktadır (Srivastava et al., 2006).

5.5.2. Polyaminler: spermin, spermidin ve putresin

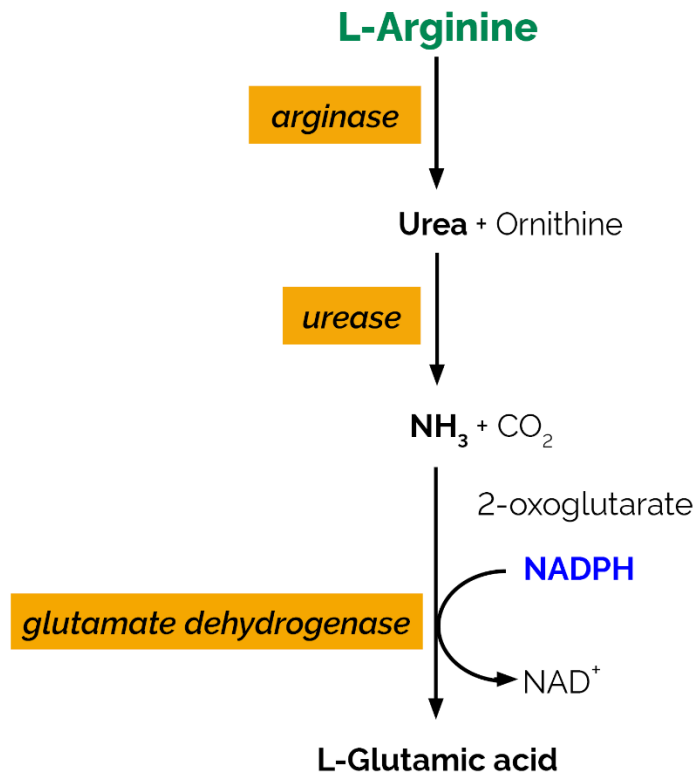
Polyaminler küçük polikasyonlardan oluşmaktadır. Spermin, spermidin ve putresin olmak üzere polyaminler, metabolizma ve hücre büyümesi gibi gerekli ve önemli hücrelerin işlevleriyle ilgilidir (Yuan et al., 2018). Spermin, spermidin ve putresin boğa, koç, horoz ile diğer hayvanlar türlerinde spermatozoon olmak üzere hücrelerin çoğunda bulunmaktadır. Böylece sperma kalitesi ile polyaminlerin konsantrasyonu arasında olumlu bir ilişki bulunmuştur. Yüksek oranda hareket eden spermatozoon içeren spermanın, fazla spermin içerdiği belirtilmiştir. Bir başka deyişle spermin spermatozoonlara hareketlerinde sağlamasında önemli rol oynamaktadır (Melendrez et al., 1992). Polyaminler özellikle, spermin ve spermidin, bakterilerin çoğalmasını kontrol etmektedir. Spermin ve spermidin her türlü strese karşı direnç kazandırmakta ve hücrelerin ölümünü engellemektedir (Singh et al., 2017).

Polyaminler, L-arjinin metabolitlerden biri olan özellikle ornitin'den elde edilmektedir. L-arjinin arjinaz enzimi tarafından parçalanıp ornitin ile üretilmektedir. Daha sonra Ornitin dekarboksilaz Ornitin'i değiştirerek putresin üretilmektedir. Putresin, asetilpolyamin oksidaz enzimi ile spermin ve spermidine dönüştürülür (Şekil 5.6).

Spermin hem hücre içindeki hem de hücre dışındaki çeşit oksidasyonların ürettiği ROS oranını azaltmaktadır. Tüm oksidasyon türlerinin düzeyi indirgenerek, spermin bir anlamda hiperaktivasyonu önlemektedir. Diğer yandan spermin sperma motilitesini iyileştirmede DNA bütünlüğü, membran bütünlüğü ve spermatozoon canlılığını korumaktadır (Setyawan et al., 2016). Spermin cAMP, enerji kaynağı inisiyasyonunda (hazırlanmasında) önemli görev yapmaktadır.



Şekil 5.6 L-arjinin'den spermin ve spermidin metabolizması.



Şekil 5.7 L-arjinin'den L-glutamik asit üretimi.

5.6. Sperma Üzerinde Kullanılan L-arjinin Dozları

L-arjinin'in etkilerine bakabilmek üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlar hayvan vücuduna L-arjinin enjekte edilmesi (Ozer Kaya, et al., 2019; Zhang et al., 2019; Ozer Kaya et al., 2020), yemlere katılması (Ahangar et al., 2017) ve ejakulata L-arjinin ilave edilmesidir (Özer Kaya vd., 2018).

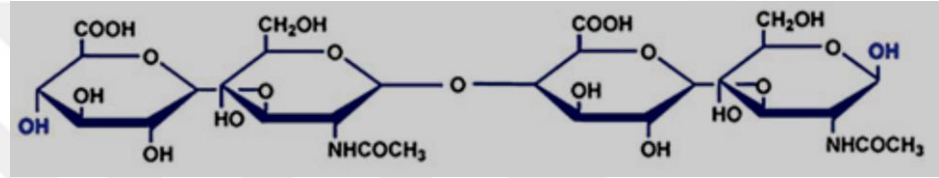
Hayvanlara L-arjinin verebilmek için ya yem ile karıştırmak ya da enjeksiyon yolu ile hayvan vücuduna vermek gerekir. Horozlarda 2.33 g/kg L-arjinin yemle karıştırarak bir yanda sperma hacimi ile motilitesi ve öbür yanda testis ağırlığını arttırdığı saptanmıştır (Ahangar et al., 2017). Koçlarda ise 7 hafta boyunca 5 mg/kg L-arjinin iki günde bir ve kas içinde enjekte edilerek ereksiyon süresi ve anormal spermatozoon oranı düşürülmüştür. Aynı zamanda, sperma motilitesi, sperma yoğunluğu ve membran bütünlüğünü arttırdığı saptanmıştır (Ozer Kaya et al., 2019). Ancak Benedetti et al. (2012) anormal spermatozoon oranı ile oksidatif stres arasında önemli ilişki bulunduğunu bildirmiştir. Başka bir deyişle spermada anormal spermatozoon oranı yüksek olduğunda, oksidatif stres düzeyi de yüksek demektir.

Özer Kaya vd., (2018)'in Akkaraman koçları üzerinde yaptığı bir çalışmanın sonucuna göre çeşitli L-arjinin dozları spermalara ilave edilerek en uygun doz $5 \cdot 10^{-4}$ M bulunmuştur. Bu L-arjinin dozu ile hem sperma motilitesi hem membran bütünlüğü olmak üzere sperma kalitesinin iyileştirilebileceği belirtilmiştir.

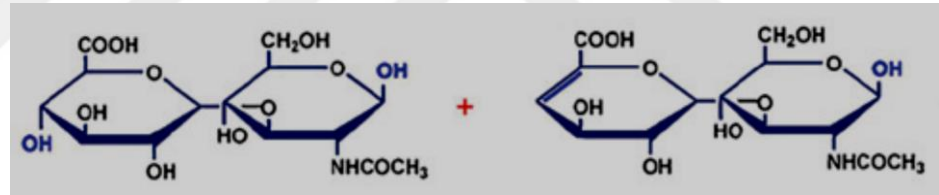
Mandalarda yapılan bir araştırmada, sperma dondurulmak üzere 10^{-3} M oranında L-arjinin sulandırıcıya katılarak dondurulmuş, daha sonra çözölmüş sperma özellikleri (sperma motilitesi, ölü spermatozoon oranı (%)) saptanmış ve bu özellikleri iyileştirdiği belirlenmiştir (Siddique and Atreja, 2013). Boğalarda da 1 mM L-arjinin spermalara katılarak sperma kapasitasyonu, motilitesi, canlı sperma oranı ve membran bütünlüğünü geliştirdiği gözlenmiştir (Maciel Jr. et al, 2018). Dolayısıyla daha önceki çalışmalara dayanarak küçükbaş hayvanlarda özellikle koyunlarda sperma dondurulmasında en uygun L-arjinin dozu 0.5 mM olarak belirtilmiştir. Büyükbaş hayvanlarda ise en uygun L-arjinin dozu 1 mM olarak tanımlanmıştır.

6. HYALURONİDAZ ENZİMİNİN TANIMI VE İŞLEVLERİ

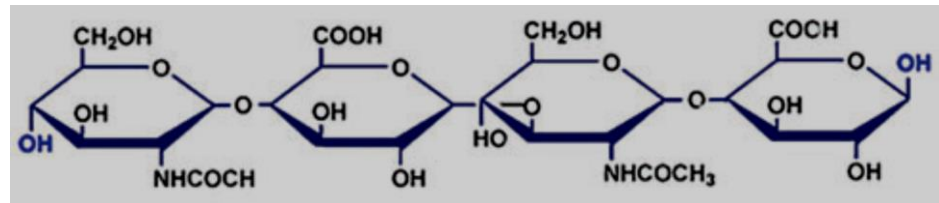
Hyaluronidaz, bir endoglycosidaz olan ve glikosaminoglikanlar özellikle hyaluronik asidi (hyaluronan) parçalayabilen bir enzimdir. Deri ve bağ dokusunda geçirgenliğin yükseltilmesi kabiliyetine sahip olan hyaluronidaz, koç ve boğalar olmak üzere memeli hayvanların çoğunun testislerinde yüksek miktarda bulunan bir enzimdir (Necalas et al., 2008; Cavallini et al., 2013; Lafarge, 2018; Üçgül vd., 2018). Hyaluronidaza üç farklı türde rastlanmaktadır. Bunlar, memeli hayvanlar, bakteriler ve sülüklerdir (Şekil 6.1 – 6.3). Ancak bu hyaluronidaz çeşitleri birbirlerinden hem yapı bakımından hem de hyaluronik asit parçalama biçimleri bakımından farklıdır (Şekil 6.4).



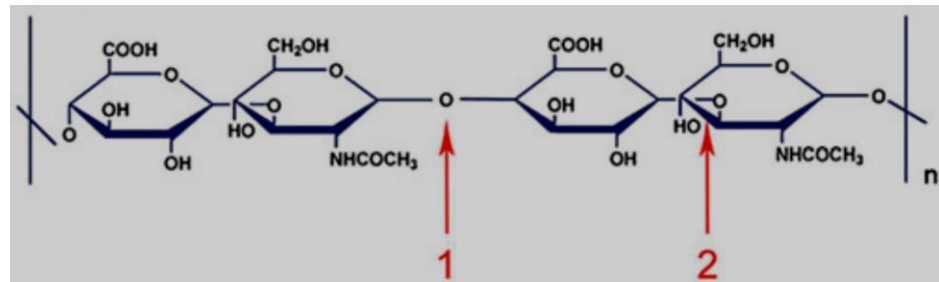
Şekil 6.1 Memeli hayvanlarda hyaluronidaz (Cavallini et al., 2013)



Şekil 6.2 Bakterilerde hyaluronidaz (Cavallini et al., 2013)



Şekil 6.3 Sülüklerde hyaluronidaz (Cavallini et al., 2013).



Şekil 6.4 Farklı hyaluronidazların parçaladığı yerleri (Cavallini et al., 2013).

6.1. Memeli Hayvanlarda Hyaluronidaz

Memeli hayvanlarda, hyaluronidaz enzimi, organ ve dokuların çoğunda bulunmaktadır. Hem erkek üreme organlarında (testisler) hem de dişi üreme organlarında (yumurtalık yolu), karaciğer ile kan serumunda hyaluronidaz bulunmaktadır (Marei et al., 2016; Meyer, 2001; Martin-DeLeon, 2010). Memelilerde bulunan hyaluronidaz, bir glikosidaz enzim türü olan hyaluronik asidi tetrasakaritlerden parçalamasının dışında kondroitin, kondroitin-4,6-sülfat, ve dermatan sülfat parçalayabilmektedir (Martin-DeLeon, 2010; Cavallini et al., 2013). Ancak başta yumurtalık yolu olmak üzere somatik dokularda iki farklı hyaluronidaz enzimi bulunmaktadır. Birincisi; hyaluronidaz 1 (hyal 1) ve ikincisi ise hyaluronidaz 2 (hyal 2)'dir. Bu iki hyaluronidaz 1 ve 2 görevlerinde tamamlayıcı olarak çalışmaktadır. Hyal 1 ve hyal 2 büyük molekül hyaluronik asit, tetrasakaritlerden parçalanmaktadır. Ancak hyal 2 hyaluronik asit lerin küçük parçalarını hücrelerin içlerinde taşıdıktan sonra hyal 1 elde edilen bu parçaları kullanarak tetrasakaritleri üretmektedir (Marei et al., 2016).

6.2. Hyaluronidaz Enziminin Kullanım Alanları

Hyalunoridaz enzimi çok çeşitli alanda kullanılmaktadır. Bu alanlardan biri olan tıpta, doku veya hücrelerde ilaçların hızlı ulaşması için hyaluronidaz ile ilaçlar karıştırılarak kullanılmaktadır (Cavallini et al., 2013). Estetik alanda, hyaluronik asit cildin parlaklaştırılması, su tutulması ve yavaş yaşlanmasında önemli görev yapmaktadır. Böylece, insanlar cildini her zaman parlak tutabilmek için eksojen hyaluronik asidi enjeksiyonu yaptırmaktadır. Ancak hyaluronik asitin (hyaluronan) etkilerini azaltmak ya da yok etmek için deri altına hyaluronidaz enjekte edilmektedir. Üreme alanında, seminal plazma viskozitesini azaltmak üzere alınan spermalar hyaluronidaz içeren maddeler ile sulandırılmaktadır (Kerzhaw-Young et al., 2013) .

6.3. Hyaluronidaz'ın Etki Mekanizması

Memeli hayvanlarda bulunan hyaluronidaz bir glikosidaz türü olan ando- β -N-asetilhekzosaminidazdır. Bu hyaluronidaz türü, hyaluronik asidin β -1,4-glycosidik bağlantıları parçalayarak tetrasakkaritleri üretmektedir. Ancak memeli hayvanların hyaluronidaz enzimi hyaluronik asit parçalanmasının dışında

kondroitin, kondroitin-4,6-sülfat ve dermatan sülfat parçalanması kabiliyetine sahiptir. Bu hyaluronidaz türü, memeli hayvanların spermatozoon, lizozom, yılan, sürüngen ve böceklerin zehirlerinde bulunmaktadır. Spermatozoon akrozomunda bulunan hyaluronidaz asit ve nötr ortamlarında etkili olabilen bir hyaluronidazdır (Martin-DeLeon, 2010).

6.4. Sperma Üzerinde Hyaluronidaz Enzimi Kullanım Miktarı

Hyaluronidaz, üreme alanında, en önemli enzimlerden bir tanesidir (Lourens et al., 1972; Kaymakçı, 2016). Ancak spermanın dondurulması ile ilgili çok az çalışma gerçekleştirilmiştir. Alpakaların seminal plazma vizkozitesini azaltmak için 20 µL hyaluronidaz ile sperma enkübasyon edilmiştir. Bu dozda sperma parametreleri (DNA bütünlüğü) hiçbir zarar görmemiştir (Kershaw-Young et al., 2013). Dolayısıyla teke spermasının dondurulmasında seminal plazmanın zarar gördüğü saptanmıştır. Seminal plazmanın ayrılması için spermanın yıkanması yararlı bulunurken (Cortel et al., 1980), kimi araştırmacılar sperma yıkamanın zararlı olduğunu belirtmiştir (Üstüner vd., 2010). Ritar and Salomon (1982)'a göre yıkamanın etkili olması için, spermayı 21 defa sulandırmak gerekmektedir. Spermanın yıkanması veya santrifüjü yerine 20 µL hyaluronidaz enzimi kullanılabildiğinden daha etkili, hem de zaman kaybı azaltılmaktadır.

7. ARJİNİN VE HYALURONİDAZ ENZİMİ KOMBİNASYONU

L-arjinin ve hyaluronidaz enzimi, teke spermasının dondurulmasında büyük önem taşımaktadır. L-arjinin, peroksidasyonu indirgenip enerji sağlarken hyaluronidaz seminal plazmanın vizkozitesini azaltır ve dolayısıyla dondurmanın olumsuz etkisini azaltmaktadır.



8. TARTIŞMA VE SONUÇ

L-arjinin ile metabolitleri (Nitrik Oksit (NO), spermin, spermidin) ve bazı antioksidanların spermanın dondurulmasında motilitenin korunması ve lipid peroksidasyonunun indirgenmesi özelliği çizelge 8.1 ve 8.2'de özetlemiştir.

Çizelge 8.1 Sperma dondurulmasında bazı antioksidanların etkileri

Maddeler	Tür	Yöntem	Kullanılan dozlar	Elde edilen sonuçlar			Kaynaklar
				İleri yönelik Motilite (%)	Toplam Motilite (%)	Peroksidasyon Düzeyi (nmol/ml)	
Metionin	Ankara keçisi	Alınmış spermaya ilave edilmiş	2.5*; 5; 10 mM	16.7 vs 16.2	45.1 vs 63.6	2.5 vs 3.1	Tuncer et al., 2010
Glütation	Horoz	Alınmış spermaya ilave edilmiş	0.5; 1; 2; 4*; 8 mM	23.3 vs 29.6	51.7 vs 58.8	3.3 vs 2.3	Masoudi et al., 2019
Selenium nano partikül	Sığır	Alınmış spermaya ilave edilmiş	0.5; 1*; 1.5 µg/ml	43.33 vs 65		69.53 vs 45.4	Khalil et al., 2019
Coenzym Q10	Horoz	Alınmış spermaya ilave edilmiş	1; 2*µM	25.4 vs 29.5	53.6 vs 56.9	2.57 vs 1.86	Masoudi et al., 2018
Taurin	Koyun	Alınmış spermaya ilave edilmiş	40mM		56,94 vs 66,66		Banday et al., 2017
kuersetin	Koyun	Alınmış spermaya ilave edilmiş	5µg/ml		56,94 vs 62,22		Banday et al., 2017
Glütation	Koyun	Alınmış spermaya ilave edilmiş	5 mM		56.96 vs 53.37		Banday et al., 2017
Coenzym Q10	Keçi	Alınmış spermaya ilave edilmiş	0.5;1*; 1.5 µM	27.8 vs 31.2	43.6 vs 53.4	2.4 vs 1.6	Yousefian et al., 2018
Lycopen	Keşmir keçisi	Alınmış spermaya ilave edilmiş	0.5; 1*; 2; 4 mg/ml		38.38 vs 52.04		Ren et al., 2018
Alfa lipoik asid	Keşmir keçisi	Alınmış spermaya ilave edilmiş	5; 10*; 15; 20 µg/ml		37.8 vs 50.71		Ren et al., 2018

*: en yüksek sonuç veren doz; sperma motilitesi ve peroksidasyon düzeyi: kontrol grubunun değeri vs muamele grubunun değeri.

Çizelge 8.1'in değerlendirilmesinde, bazı antioksidanların etkilerini çıkartabilmek için muamele grubunun değerinden (M) kontrol grubunun değeri (K), (M-K) çıkarılmıştır. Spermanın dondurulmasında, sulandırıcılara antioksidan eklenmesi sperma ileriye yönelik motilite ve sperma toplam motilitesinde % -0.5 ila 21.67 ve % -3.59 ila 18,5 sırasıyla artış sağlanmıştır. Lipid peroksidasyonu ile ilgili ise metionin dışında diğer antioksidanlarda -0.6 ila 24.13 nmol/ ml bir düşüş gözlenmiştir. Ancak genel bir bakış ile Çizelge 10. 1'e bakıldığında Angora teke spermasında metionin eklenmesi kontrol grubuna göre % 18.5 ekstra sperma toplam motilite sağlarken sperma ileriye yönelik motilitesinde % 0.5 düşüş gözükmüş ve lipid peroksidasyonunda 0.6 nmol/ml bir artış izlenmiştir.

Çizelge 8.2 Sperma dondurulmasında L-arjinin ve metabolitlerin etkileri

Maddeler	Tür	Yöntem	Kullanılan dozlar	Elde edilen sonuçlar			Kaynaklar
				İleriye yönelik Motilite (%)	Toplam Motilite (%)	Peroksidasyon Düzeyi (nmol/ml)	
Arjinin	Manda	Alınmış spermaya ilave edilmiş	1 mM		32.33 vs 38.33	4.41 vs 3.5	Siddique and Atreja, 2013
Arjinin	Koyun	Alınmış spermaya ilave edilmiş	0.1; 0.5*; 1; 5; 10 mM		40 vs 55		Özer Kaya vd., 2018
Arjinin	Nellore sığırı	Alınmış spermaya ilave edilmiş	1 mM		55 vs 67.5		Maciel Jr. et al, 2018
Spermin	Manda	Alınmış spermaya ilave edilmiş	10 µM		32.33 vs 43.33	4.41 vs 3.11	Siddique and Atreja, 2013

*: en yüksek sonuç veren doz; sperma motilitesi ve peroksidasyon düzeyi: kontrol grubunun değeri vs muamele grubunun değeri.

Çizelge 8.2'nin değerlendirilmesinde, L-arjinin ve metabolitlerin etkileri çıkartabilmek için muamele grubunun değerinden kontrol grubunun değeri (M-K) çıkarılmıştır. Sperma dondurulmasında, L-arjinin ve metabolitleri sperma toplam motilitesinde % 6- 15 artış sağlamıştır. Lipid peroksidasyonu ile ilgili L-arjinin ve metabolitleri kullanarak 0.91- 1.3 nmol/ 10⁸ hücre bir azalma gözlemlenmiştir.

Çizelge 8.1 ve 8.2 karşılaştırıldığında, L-arjinin ve metabolitlerinin etkileri sperma motilitesini % 6 ila 15 düzeyinde artırırken antioksidanların etkileri ile % -

3.59 ila 18.5 düzeyde sperma toplam motilitesi ve % -0.5- 21.67 düzeyde sperma progresif motilitesi sağlanmıştır. Lipid peroksidasyon ile ilgili ise L-arjinin ve metabolitleri 0.91 ila 1.3 nmol/ 10^8 hücre azattırken antioksidanlar -0.6 ila 24.13 nmol/ ml azaltmıştır. Genellikle L-arjinin ve metabolitleri gerek sperma motilitesi gerekse lipid peroksidasyonu olumlu şekilde etkilerken bazı antioksidanlar hem sperma motilitesini hem de lipid peroksidasyonunu iyileştirmekten çok olumsuz yönde etkilemiştir. Öte yandan, antioksidanlarda en iyi sonuç verenler küçük ağırlık moleküllerden oluşanlardır. Dolayısıyla Nitrit Oksit (NO) ve spermin biyolojik yolu ile üretilen L-arjinin, kendisi büyük molekül olsa da küçük ağırlıklı moleküller üretebilmektedir.

Dondurulmuş spermada iki türlü peroksidasyon; (seminal plazmada ve spermatozoon içinde), ortaya çıkmaktadır (Setyawan et al., 2016). Dondurmada kullanılan en güçlü antioksidanlar, taurin, likopen ve glutathion (Benedetti et al., 2012) seminal plazmadaki peroksidasyonu (ki membran bütünlüğü bozuklarından sorumlu), azaltmaktadır (Ren et al., 2018; Bandy et al., 2017; Masoudi et al., 2019). L-arjinin seminal plazmadaki peroksidasyonu azaltabilmek veya yok edebilmek için üretilen spermin ve seminal sıvısında bulunan PDC 109 proteini ile bağlanır (Singh et al., 2017). Spermatozoon içindeki peroksidasyon DNA bozukları, sperma motilitesi kaybı ve hiperaktivasyondan sorumludur. Ancak sperma toplam motilitesi veya CASA (Computer Assistance Semen Analysis) ile saptana motilite spermadaki spermatozoonların baş sallama, titreme, dairesel hareket, ilerleme ve gerileme hareketleri sayılmaktadır (Setyawan et al., 2016). İstenen düzeyde dölleme elde edebilmek için sadece ileriye yönelik hareket eden spermatozoonlar gerkmektedir (Kaymakçı, 2016). Bazı antioksidanlar az da olsa ileriye yönelik sperma motilitesi sağlamaktadır. Keçilerde coenzyme Q10 (% 31.2 vs 27.8) (Yousefian et al., 2018), boğalarda selenium nanoparticles (% 65 vs 43.33) (Khalil et al., 2019) ve horozlarda glutathion (% 29.6 vs 23.3) ve Coenzyme Q10 (% 30.2 vs 25.4) (Masoudi et al., 2018; 2019) iyileştirirken tekelerdeki methionin gibi bazı antioksidanların motiliteyi azalttığı (% 16.2 vs 16.7) bildirilmektedir (Tuncer et al., 2010) azaltmıştır. Funashi (2002) sulandırıcılara L-arjinin eklenmesinin Nitrit oksit (NOs) enzimini uyararak Nitrik Oksit (NO) üretimine neden olduğu saptanmıştır. L-arjininin üretildiği Nitrik Oksit bir yanda peroksitler veya reaktif oksijen türleri ile bağlanarak lipid

peroksidasyonunu engellemektedir. Bu reaksiyon sonunda elde edilen peroksinitrit (ONOO), güçlü antioksidan olup sperm kapasitasyonunda ve akrozom reaksiyonunda önemli görev yapmaktadır (Ignarro, 2000). Diğer yandan Nitrit Oksit sperma motilitesini sağlamak için enerji kaynağı sunmaktadır.

Öncelikle teke sperması başta olmak üzere tüm küçükbaş hayvanların spermasının dondurulmasını olumsuz etkileyen unsurlardan en önemlisi ek üreme bezleri tarafından üretilen seminal plazmadır. Seminal plazmada bulunan enzimler özellikle fosfolipaz A ile yumurta sarısı reaksiyonu, lizolesitini üretmektedir. Lizolesitin spermatozoonlar için ölümcüldür (Roy, 1957; Ritar and Salomon, 1982). Dolayısıyla seminal sıvının spermatozoonlardan ayrılması gerekir (Tabarez et al., 2017). Seminal sıvının etkisini yok edebilmek için, 11 çift veya 21 kez sperma yıkaması gerektiği belirtilmiştir (Ritar and Salomon, 1982). Seminal plazmanın temel görevi; spermatozoonları beslemek ve korumaktadır (Kaymakçı, 2016). Seminal plazmanın gerek besleyici ve koruyucu etkilerinden faydalanabilmek için gerekse dondurulma esnasındaki olumsuz etkisini yok edebilmek için, Kershaw-Young et al. (2013) sulandırıcılara 20 µL hyaluronidaz enzimi ekleyerek çözüm bulmuşlardır.

Sonuç olarak teke başta olmak üzere küçükbaş hayvanların spermasının dondurulmasında sulandırıcılara 0.5 mM L-arjinin ile 20 µL hyaluronidaz ilavesi, çözdürülmüş sperma parametrelerini iyileştirilebilmektedir.

Bu çalışma başlangıçta kontrol ve muamele gruplarının olduğu bir deneme şekilde planlanmıştır. Ancak gerek dünyada Covid-19 (Korona) nedeni ile planlanan araştırma derleme haline dönüştürmüştür. Konuyla ilgili yerli ve yabancı bilimsel makaleler taranarak çalışma kaleme alınmıştır.

9. ÖNERİLER

Çiftlik hayvanlarında üreme üzerinde bilinen ya da bilinmeyen çok sayıda kalıtsal ve çevresel etmen vardır. Yapay tohumlama çalışmalarında amaç; bilinen çevresel etmenleri aza indirerek en yüksek gebelik oranı ve bunun sonucunda yavru elde etmektir. Ancak, küçükbaş hayvanlarda dondurulmuş- çözündürülmüş sperma ile tohumlanmış dişilerden elde edilen gebelik oranı oldukça düşüktür. Bu sorunun çözümü, büyük ölçüde, sperma kalite ve kullanılan sulandırıcı ile dondurna yöntemiyle yakından ilişkilidir. Bu nedenle yukarıda belirtilen konularda çok sayıda araştırma yapılmasında yarar vardır.

L-arjinin ile hyaluronidaz birlikte, seminal plazmadaki peroksidasyon, dondurulma- çözündürülme stresini azalttığı ve çözündürülmüş sperma kalitesini yükselttiği saptanmıştır. Dolayısıyla, spermasının dondurulmasında sulandırıcılara 0.5 ml L-arjinin ile 20 µL hyaluronidaz ilavesi, çözündürülmüş sperma kalitesi iyileştirilebilir.

Farklı dozlarda L-arjinin ve hyaluronidaz kullanımının dondurulmuş sperma kalite özelliklerin üzerindeki etkileri mutlaka incelenmelidir.

Son olarak da likopen ile papainin sulandırıcıya eklenmesi konusu da göz ardı edilmemelidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahangar, M., Asadzadeh, S., Rezaeipour, V. and Zareh Shahneh, A.,** 2017, Effects of L-Arginine supplementation on semen quality, testosterone concentration and testes histological parameters of Ross 308 breeder roosters, *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 6(3): 133-135 pp.
- Akyol, Ö., Işçi, N., Temel, I., Özgöçmen, S., Uz, E., Murat, M. and Büyükberber, S.,** 2001, Relations entre les enzymes anti-oxydantes plasmatiques et érythrocytaires et la peroxydation des lipides chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, *Revue du Rhumatisme*, 68 : 601-608 pp.
- Alcak, S., Toker, B.M., Gokce, E., Ustuner, B., Onder, T.N., Sagirkaya, H., Nur, Z. and Soylu, K.M.,** 2016, Successful ram semen cryopreservation lyophilised egg yolk based extender, *Cryobiology*, 71: 329- 333 pp.
- Anonim,** https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn%3AANd9GcRF3crSH-IJjAEuYsnXjw3AjNemhhdKd6gWM3L9d_3A6Z1kUM9p, Erişim tarihi: 11/02/2020.
- Banday, M.N., Lone, F.A., Rasool, F., Rashid, M. and Shikari, A.,** 2017, Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation, *Cryobiology* 74: 25-30 pp.
- Benedetti, S., Tagliamonte, M.C., Catalani, S., Primiterra, M., Canestrari, F., De Stefani, S., Palini, S. and Bulletti, C.,** 2012, Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality, *Reproductive BioMedicine Online*, 25: 300– 306 pp.
- Benson, J.D., Woods, E.J., Walters, E.M. and Critser, J.K.,** 2012, The cryobiology of spermatozoa, *Theriogenology*; 78: 1682–99 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bittencourt, R.F., Oba, E., Biscarde, C.E., de Almeida Biscarde, C.E., Azevedo, H.C., Bittencourt, M.V., de Menezes, G.F., da Silva Lima, A., da Mata Fuchsa K. and de Lisboa Ribeiro Filho A.,** 2018, Dimethylacetamide and trehalose for ram semen cryopreservation, *Cryobiology*, 85: 1- 6 pp.
- Bozkurt, E. ve Tekin, N.,** 2002, Boğa Spermalarının Farklı Sulandırıcılar İle Dondurulması ve in Vitro Değerlendirilmesi. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, 42 (2) 1-17.
- Brosnan J.T.,** 2003; Interorgan amino acid transport and its regulation, *Journal of Nutrition*, 133(6 Suppl 1): 2068- 2072 pp.
- Bucak, M.N. and Tekin, N.,** 2007, Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen, *Small Ruminant Reseach* (73): 103–108 pp.
- Cavallini, M., Gazzola, R., Metalla, M. and Vaienti, L.,** 2013, The Role of Hyaluronidase in the Treatment of Complications From Hyaluronic Acid Dermal Fillers, *Aesthetic Surgery Journal*, 33(8): 1167– 1174 pp.
- Chelucci, S., Pasciu, V., Succu, S., Addis, D., Leoni, G., Manca, M., Naitana, S. and Berlinguer F.,** 2015, Soybean lecithin– based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation, *Theriogenology*, 83: 1064–1074 pp.
- de Moura, B.R.L., Gurgel, M.C.A., Machado, S.P.P., Marques, P.A., Rolim1, J.R., de Lima, M.C. and Salgueiro, L.L.,** 2017, Low concentration of hyaluronidase for oocyte denudation can improve fertilization rates and embryo quality, *JBRA Assisted Reproduction*, 21(1): 27-30 pp.
- Decuadro-Hansen G.,** 2004, La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l’animal, *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 32, 887–893 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Faigl, V., Vass, N., Jávör, A., Kulcsár, M., Solt, L., Amíridis, G. and Cseh, S.,** 2012, Artificial insemination of small ruminants – a review, *Acta Veterinaria Hungarica* 60 (1), 115–129 pp.
- Foote, R. H.,** 2001, The history of artificial insemination: Selection notes and notables, *Journal of Animal Science*, 80: 1- 10 pp.
- Funahashi, H.,** 2002, Induction of capacitation and the acrosome reaction of boar spermatozoa by L-arginine and nitric oxide synthesis associated with the anion transport system, *Reproduction*, (124): 857– 864 pp.
- Gbadamonsi, A.A., Koşum, N., Kandemir, Ç., Assani, S.A., Alkoiret, I.T., Taşkın, T.,** 2020, Küçükbaş Hayvanlarda Yapay Tohumlamanın Gebelik ve Doğum Oranları Üzerine Etkileri, *5.Uluslararası sempozyum Bildiri kitabı*, cilt: 7, 2870 s., Edirne/ Türkiye.
- Gökçen, H.,** 1998, Dünya’da ve Türkiye’de sun’i tohumlamanın tarihçesi, *Performans Dergisi*, Sayı:5. [http://www.hazimgokcen.net/Veteriner/dunyada-ve-turkiye-suni-tohumlamanin-tarihcesi/\(22.06.2015\).](http://www.hazimgokcen.net/Veteriner/dunyada-ve-turkiye-suni-tohumlamanin-tarihcesi/(22.06.2015).)
- Hafez, E.S.E.,** 2008, Preservation and Cryopreservation of Gamete and Embryos, *In Reproduction in Farm Animals*. Hafez E.S.E. and B. Hafez (eds.). 7th ed. Lippincott & Williams. Baltimore, Maryland, USA.
- Ignarro L.J.,** 2000, Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, *acid-free paper.*, Erişim tarihi: 23/02/2020.
- Jansen, C. et Van den Burg, K.,** 2004, L’élevage de chèvres dans les zones tropicales, *Agrodok No. 7*, 3^e éd., ISBN Agromisa:90-77073-65-5, 104 pp.
- Johny, J., Bhagvandas, S.C., Mohan, S.P., Punathil, S., Moyin, S. and Bhaskaran, M.K.,** 2019, Comparison of Efficacy of Lycopene and Lycopene–Hyaluronidase Combination in the Treatment of Oral Submucous Fibrosis, *Journal of Pharmacy & BioAllied Science*, 11(Suppl 2), 260–264 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kershaw-Young, C. M., Stuart, C., and Maxwell, W. M. C.**, 2013, The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function, *Animal Reproduction Science*, 138 (3–4), 261-267 pp.
- Lafarge A.**, 2018, Utilisation de la hyaluronidase dans les complications des fillers, these online, Erişim tarihi: 24/01/2020.
- Lourens, J. D. Zaneveld, Kenneth L. Polakoski and Andgebhard F. B. Schunacher**, 1972, Properties of Acrosomal Hyaluronidase from Bull Spermatozoa, *the Journal of Biological Chemistry*, 248 (2- Issue 25): 504-570 pp., 1973 Printed in U.S.A.
- Maciel, Jr. V. L., Caldas-Bussiere, M. C., Silveira, V., Reis, R. S., Rios, A. F. L., Paes de Carvalho, C.S.**, 2018, L-arginine alters the proteome of frozen-thawed bovine sperm during in vitro capacitation, *Theriogenology*, 119: 1- 9 pp.
- Marei, W.F.A., Raheem, K.A., Salavati, M., Tremaine, T., Khalid, M. and Fouladi-Nashta A. A.**, 2016, Hyaluronan and hyaluronidase, which is better for embryo development?, *Theriogenology* 86, 940– 948 p.
- Martin-DeLeon, P. A.**, 2010, Germ-cell hyaluronidases: their roles in sperm function, *International Journal of Andrology*, 34, 306– 318 pp.
- Melendrez, C.S., Rutfle, J.L., Hallford, D.M., Chaudhry, P.S. and Casillas, E.R.**, 1992, Polyamines in Ejaculated Ram Spermatozoa and Their Relationship with Sperm Motility, *Journal of Andrology*, 13(4):293- 296 pp.
- Meyers, S.A.**, 2001, Equine sperm–oocyte interaction: the role of sperm surface hyaluronidase, *Animal Reproduction Science*, 68: 291–303 pp.
- Naresh, S. and Atreja, S.K.**, 2015, The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa, *Cryobiology*, 70: 211- 216 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P. and Kolar, J.**, 2008, Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Veterinarni Medicina*, 53(8): 397–411 pp.
- Ozer Kaya, S., Gur, S. and Kaya, E.**, 2019, The effect of l- arginine on erection time, sperm quality and the seminal plasma arginase activity in rams, *Revue De Medecine Veterinaire*, 170(4–6): 73–79 pp.
- Ozer Kaya, S., Kandemir, F.M., Gur, S., Erisir, M., Benzer, F., Kaya, E., Turk, G. and Sonmez, M.**, 2020, Evaluation of the role of L- arginine on spermatological parameters, seminal plasma nitric oxide levels and arginase enzyme activities in rams, *Andrologia*, 52(1): 13439 p.
- Ömür, A. D.**, 2015, Koç spermasının dondurulmasında antioksidanların etkisi, *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 10(1):61-69 s.
- Özer Kaya, Ş., Gür, S. and Kaya, E.**, 2018, Effect of l-arginine addition on long-term storability of ram semen, *Andrologia*, 50: 12945 p.
- Peker Akalın P., Bucak, M.N., Güngör, Ş., Başpınar, N., Çoyan, K., Dursun, Ş., İli, P., Aksoy, A., Karaşör, Ö.F., Bilgili, A., Sarıözkan, S. and Yeni, D.**, 2016, Influence of lycopene and cysteamine on sperm and oxidative stress parameters during liquid storage of ram semen at 5 °C, *Small Ruminant Research*, 137, 117–123 pp.
- Radany, E.W. and Atherton, R.W.**, 1981, Arginine Induced Stimulation of
- Rather, H.A., Islam, R., Malik, A.A. and Lone, F.A.**, 2016, Addition of antioxidants improves quality of ram spermatozoa during preservation at 4°C, *Small Ruminant Research*, 141, 24–28 pp.
- Rita, A. J. and Salamon S.**, 1982, Effects of Seminal Plasma and of Its Removal and of Egg Yolk in the Diluent on the Survival of Fresh and Frozen-Thawed Spermatozoa of the Angora Goat, *Australian Journal of Biological Sciences*, 35, 305 - 312 pp. Avustralya.
- Roy, A.**, 1957, Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat, *Nature*, 179, 318 - 319 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Salamon, S., and Maxwell, W.M.C.**, 2000, Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 77–111 pp.
- Salamon, S., and Maxwell, W.M.C.**, 1995, Frozen storage of ram semen: II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, 38: 1–36 pp.
- Setyawan, E.M.N., Kim, M.J., Oh, H.J., Kim, G.A., Jo, Y.K., Lee, S.H., Choi, Y.B., and Lee, B.C.**, 2016, Spermine reduces reactive oxygen species levels and decreases cryocapacitation in canine sperm cryopreservation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 479, 927- 932 pp.
- Siddique, R.A. and Atreja, S.K.**, 2013, Effect of L-Arginine and spermine-NONOate on motility, viability, membrane integrity and lipid peroxidation of Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa, *Livestock Science*, 153 (1-3): 147- 153 pp.
- Singh, B.P., Saha, I., Nandi, I., and Swamy, M.J.**, 2017, Spermine and spermidine act as chemical chaperones and enhance chaperone-like and membranolytic activities of major bovine seminal plasma protein, PDC-109, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493, 1418- 1424 pp.
- Smith, J.T. and Mayer, D.T.**, 1955. Evaluation of sperm concentration by the hemocytometer method, *Fertility and Sterility*, 6: 271–275 pp.
- Srivastava, S., Desai, P., Coutinho, E. and Govil, G.**, 2006, Mechanism of Action of L-arginine on the Vitality of Spermatozoa is Primarily Through Increased Biosynthesis of Nitric Oxide, *Biology of Reproduction*, 74(5): 954–958 pp.
- Srivastava, S., Desai, P., Coutinho, E. and Govil, G.**, 2006, Protective effect of L-arginine against lipid peroxidation in goat epididymal spermatozoa, *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*, 32(2): 127–135 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tabarez, A., García, W., Palomoa, M.J.,** 2017, Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donorage on buck sperm cryopreservation, *Small Ruminant Research*, 149: 91–98 pp.
- Toker, M., Alcay, S., Gokce, E. and Ustuner, B.,** 2016, Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soyabean lecithin based extenders and impacts on incubation resilience, *Cryobiology*, 72: 205- 209 pp.
- Tuncer, P.B., Bucak, M. N., Sarıözkan, S., Sakin, F., Yeni, D., Çiğerci, I. H., Ateşşahin, A., Avdatek, F., Gündoğan, M. and Büyükleblebici, O.,** 2010, The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (*Capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities, *Cryobiology*, 61: 89–93 pp.
- Tuncer, P.B., Çevik, M., Demiral, ÖO., Kinet, H.,** 2005, Boğa Spermalarının İki Farklı Sulandırıcı ile Dondurulması ve İn Vitro Değerlendirilmesi, *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* , 2(2) 65-71.
- Üçgül, İ., Aras, S. ve Elibüyük, U.,** 2018, Ekstraselüler matris yapısı ve görevleri, *Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, 23(1), doi: 10.17482/uumfd.327376.
- Ünay, E., Yaman, S., Kinet, H., Tuncer, PB., Büyükleblebici, S., Karakaş, V. ,** 2014, Rasyon çinko miktarının boğalarda sperma miktar ve kalitesine etkisi, *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg*, 54 (1) 1-7.
- Washaya, S., Tavirimirwa, B., Dube, S., Sisito, G., Tambo, G., Ncube, S., and Zhakata. X.,** 2019, Reproductive efficiency in naturally serviced and artificially inseminated beef cows, *Tropical Animal Health and Production*, **volume 51**, pages1963–1968(2019).
- Watson, P.F.,** 1995, Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function, *Reproduction Fertility and Development*, 7: 871- 91 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Watson, P.F.**, 2000, The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, *Animal Reproduction Science*, 60– 61, 481– 492 pp.
- Weber, G. C., Buhren, B. A., Schrumpf, H., Wohlrab, J. and Gerber, P. A.**, 2019, Clinical application of hyaluronidase, *Therapeutic enzymes: Functions and Clinical Implications*, 255- 277 pp.
- Yang, J.Y., Zhang, Y.F., Nie, N., Feng, W.P., Bao, J.F., Meng, X.P. and Qiao, X.L.**, 2019, Protective effects of L-arginine against testosterone synthesis decreased by T-2 toxin in mouse Leydig cells, *Theriogenology*, 134: 98-103pp.
- Yuan, F., Zhang, L., Caob, Y., Gaob, W., Zhao, C., Fang, Y., Zahedi, K., Soleimani, M., Lud, X., Fang, Z. and Yang, Q.**, 2018, Spermidine/spermine N1-acetyltransferase-mediated polyamine catabolism regulates beige adipocyte biogenesis, *Metabolism Clinical and Experimental*, 85: 298–304 pp.
- Zhang, Y.F., Yang, J.Y., Meng, X.P. and Qiao, X.L.**, 2019, L-arginine protects against T-2 toxin induced male reproductive impairments in mice, *Theriogenology*, 126: 249–253 pp.

TEŞEKKÜR

Tüm varlıkların sahip olan **Allah**, sağlık ve huzur verene;

Bu tezin planlanmasında ve yürütülmesinde, musait olmamasına rağmen bizimle bilgi paylaşan ve hatalarımızı düzelten danışmanım Sayın **Prof. Dr. Nedim KOŞUM**'a;

Tezimin yazma sırasında tavsiye ve desteğini esirgemeyen sayın hocam **Prof. Dr.Turgay TAŞKIN** ve **Çağrı KANDEMİR**'e;

Ege Üniversitesi'ndeki tüm hocalar ve personel özellikle, zootekni bölümündekilere, yardım ve destekleri için;

Birçok fedakârlık göstererek maddi, manevi destekleri ve duaları için sevgili aileme;

Moibi GBADAMONSI,

Sidonie ADJI,

Moucharaf- dine GBADAMONSI,

Yousseuf GBADAMONSI,

Rouchdane GBADAMONSI na;

Sabır gösteren sevgilim **Naguibath KPARAKPE**'ne, gösterdiğiniz fedakârlıkların boşa düşmediğine emin olun, kanıt bu tez çalışmasıdır. Fedakârlıklarınız için teşekkür kelimeleri bulamıyorum. Allah razı olsun.

Başta eğitim ve barınma olmak üzere birçok olanak sağlayan tüm Türkiye vatandaşlarına, özellikle Türkiye Cumhuriyeti devletine sonsuz teşekkür ederim.

08/09/2020

Awo Abdoulaye GBADAMONSI

ÖZGEÇMİŞ

Awo Abdoulaye GBADAMONSI, 27.01.1992 tarihinde Akpero (Benin)'de doğdu. İlkokulu Sakabansi İlköğretim okulunda 2004 yılında tamamladı. Ortaokul ve lise eğitimleri 2008 ve 2012 yıllarında Nikki devlet öğretimleri 2 ve 1 sırasıyla Nikki'de tamamladı. 2012- 2015 yıllarında Parakou Üniversitesine giderek Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümünde eğitime başlamıştır. 2015 yılın sonunda Mouvement Wanrou Kossa çiftliğinde 3 aylık staj yaptı. 2016 yılında Pic sarl çiftliği Sirarou'da ve Okunlola çiftliği Komiguea'da çalıştı. 2016- 2017 eğitim- öğretim yılında Sirarou'da biyoloji öğretmeni olarak kamuda çalıştı. 2017- 2018 eğitim- öğretim yılında Türkçe Öğretim Merkezinde Türkçe dili öğrendi. 2018 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne giderek Zootečni Bölümü Hayvan Yetiştirme ve Islahı Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğretimine başladı ve eğitimini tamamladı. Fransızca ve İngilizce bilen Awo, bekârdır.

Bilimsel alanda, "Gençlerin Kırmızı Et Tüketim Tercihlerinin Analizi: Ege Üniversitesi Öğrencileri Örneği" başlıklı araştırma makalesi ve "küçükbaş Hayvanlarda Yapay Tohumlamanın Gebelik ve Döl Verimi Üzerine Etkileri" başlıklı bildirilerde yazarlardan biri olarak yer almıştır.