KUERSETİNİN MERİNOS IRKI KOÇ SPERMASININ AKROZOM REAKSİYONU ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Oğuzhan ULUYOL

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Yrd.Doç.Dr. Ali Doğan ÖMÜR

Yüksek Lisans Tezi-2018

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KUERSETİNİN MERİNOS IRKI KOÇ SPERMASININ AKROZOM REAKSİYONU ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Oğuzhan ULUYOL

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Ali Doğan ÖMÜR

Erzurum
2018

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

KUERSETİNİN MERİNOS IRKI KOÇ SPERMASININ AKROZOM REAKSİYONU ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Oğuzhan ULUYOL

Tez Savunma Tarihi : 23.02.2018

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Ali Doğan ÖMÜR (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Özgür KAYNAR (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Saadet BELHAN (Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2018

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **III**

ÖZET ..... **IV**

ABSTRACT ..... **V**

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ ..... **VI**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **VII**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **VIII**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **4**

2.1. Koçlarda Sperma Almanın Yöntemleri 5

2.2. Koç Spermasının Genel Özellikleri 6

2.3. Koç Sperminin Yapısı 7

2.3.1. Baş Kısmı 7

2.3.1.1. Nükleus 8

2.3.1.2. Akrozom Yapısı 8

2.3.2. Sperm Kuyruğu ve Flagellum Yapısı 9

2.3.2.1. Boyun Bölgesi, Orta Kısım ve Kuyruk 10

2.4. Antioksidanlar 11

2.4.1. Polifenoller 12

2.4.2. Flavonoidler 13

2.4.2.1. Flavonoidlerin Yapısal Özellikleri 13

2.4.3. Kuersetin 15

2.4.3.1. Kuersetinin Antioksidan Etkisi 16

2.4.3.2. Kuersetinin Sperma Üzerine Etkisiyle İlgili Bulgular 18

3. MATERYAL VE METOT 20

3.1. Hayvan Materyali 20

3.2. Yöntem 20

3.3. İstatiksel Analiz 21

4. BULGULAR 22

4.1. Kuersetin Maddesinin Akrozom Üzerine Etkisi 22

4.2. Kuersetinin Akrozom Üzerine Etkisinin Sonucu 25

5. TARTIŞMA 26

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 30

KAYNAKLAR 31

EKLER 40

EK-1. ÖZGEÇMİŞ 40

EK-2. ETİK KURUL KARARI 41

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezi olaraksunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali Doğan ÖMÜR'e en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez kapsamında akademik anlamda desteklerini gördüğüm Doç. Dr. Emrah Hicazi AKSU (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), Yrd. Doç. Dr. Saadet BELHAN (Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van) ile Dr. Vet. Yzb. Serhan DURMAZ'a yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim. Ayrıca çalışmamızı yapmamız için laboratuvarlarını bize açan Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim elemanlarına çok teşekkür eder, eğitim döneminde her an yanımda olan sevgili eşim ve aileme desteklerinden dolayı şükranlarımı sunarım.

Oğuzhan ULUYOL

ÖZET

Kuersetinin Merinos Irkı Koç Spermasının Akrozom Reaksiyonu Üzerindeki Etkinliğinin Araştırılması

Amaç: Koyunculukta yüksek verim alabilmek için koç spermasının dölleme yeteneği yüksek olmalıdır. Güçlü bir antioksidan olan kuersetinin farklı türlerde sperma üzerine olumlu etkisi olduğu görülmüştür. Bu tezin amacı kuersetin maddesini kullanarak Merinos ırkı koç spermasının döl verimini yükselterek dölleme yeteneğinin arttırılmasıdır.

Materyal ve Metod: Merinos koçlardanalınan ejakülatlardan uygun özellik (sperm yoğunluğu $\geq 3\times10^9$ spermatozoa/ml; motilite ≥% 80) gösterenler spermanın sulandırılması işleminde kullanıldı.Spermaların sulandırılmasında Tris sulandırıcı kullanıldı. Ejakülatlar 32ºC'de 4 eşit hacme bölündü.Farklı dozlarda kuersetin(15, 30, 45 µg/mL) katılarak 3 grup oluşturuldu. 4'üncü grup olan kontrol grubuna antioksidan(kuersetin) katılmadı. Spermalar Tris sulandırıcısıyla ml'de yaklaşık 4×10^8 spermatozoa olacak şekilde sulandırıldı ve dondurulduu. Çözdürüldükten sonra 60µl sperma, 10µl FITC-PNA ve 2.5µl PI ile ana karışım hazırlanarak 20 dakikada 37^0C'de inkübasyona bırakıldı. Ardından 10µl Hancock solüsyonuyla muamele edildikten sonrareaksiyon sonlandırıldı. Örnekten 2.5µl'lik miktar alınarak floresan mikroskopta 400'lük büyütmede 200 adet sperm sayıldı.Yeşil renk veren spermler hasar görmüş akrozom, yeşil renk vermeyen spermler ise hasar görmemiş akrozom olarak değerlendirildi. Çalışma 6 replikasyondan oluşturuldu.

Bulgular: 15, 30, 45µg/mL dozlarında kuersetin katılan üç grup ile kuersetin katılmayan kontrol grubunda hasar görmeyen akrozom bütünlüğünün yüzdelerine bakıldı. 15µg/mL grubunda %39,16±2,65^b, 30µg/mL grubunda %40,83±0,30^b, 45µg/mL grubunda %20,83±2,95^c, kontrol grubunda %54,83±3,38^a bulunmuştur.

Sonuç: Farklı dozlarda (15, 30, 45µg/mL) katılan kuersetin maddesi ile oluşturulan üç grubunda yüzdesi kontrol grubuna göre daha düşük çıktı. Kuersetinin bu dozlarda akrozom bütünlüğü üzerine toksik etki ettiği görüldü.

Anahtar Kelimeler: Akrozom,Koç, Kuersetin,Sperma.

ABSTRACT

Investigation of Quercetin Activation on the Acrosomal Reaction of the Merinos Ram Sperm

Aim: In the sense of achieving high efficiency in sheep, ram sperm must have high fertilization ability. Quercetin, a potent antioxidant, has been shown to have a positive effect on semen in different species. This thesis aims to improve the efficiency of the Merinos racial ram sperm using quercetin.

Material and Method: The ejaculates collected from Merinosrams were used for the dilution of the sperm (sperm density $\geq 3\times10^9$ spermatozoa/ml, motility≥80%). Tris diluent was used to dilute the semen. The ejaculates were divided into 4 equal volumes at 32°C. Three groups were formed by adding quercetin (15, 30, 45 µg/mL) at different doses. Antioxidant (quercetin) did not participate in the 4th group(the control group). Spermatozoa were diluted and frozen to approximately $4x10^8$ spermatozoa per ml with Tris diluent. After thawing, the master mix was prepared with 60µl semen, 10µl FITC-PNA and 2.5µl PI and allowed to incubate at 37^0C for 20 minutes. The reaction was then terminated after treatment with 10µL Hancock solution. An amount of 2.5µl of the sample was taken and 200 sperm were counted at 400 magnification on a fluorescent microscope. Sperm that gave a green color were evaluated as damaged acrosome, and sperm that did not give green color were regarded as undamaged acrosome. The study consisted of 6 replicates.

Results: In terms of the undamaged percentage of acrosomal integrity was assessed in the control group and quercetin groups (15, 30, and 45µg/mL). Findings: 39.16 ± 2.65^b in the 15µg/mL group, 40.83 ± 0.30^b in the 30µ/mL group, 20.83 ± 2.95^c in the 45µg/mL group and 54.83 ± 3.38^a in the control group .

Conclusion: The percentage of the three groups formed with the quercetin substance added at different doses (15, 30, 45µg/mL) was lower than the control group. Quercetin has been shown to toxicize acrosome integrity at these doses.

Key Words: Acrosome, Quercetin,Ram, Semen.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

% **:** Yüzde

< **:** Küçük

> **:** Büyük

≥ **:** Büyük eşit

ATP **:** Adenozin trifosfat

CPE **:** Corona Penetreting Enzyme

FSH **:** Follicle Stimulating hormon

Gr **:** Gram

HO **:** Hidroksil

Kg **:** Kilogram

LP **:** Lipit peroksidasyonu

LH **:** Luteinizan hormon

Ml **:** Mililitre

mM **:** Milimolar

µM **:** Mikromolar

MDA **:** Malondialdehit

µg **:** Mikrogram

NO **:** Nitrik oksit

RO· **:** lipid alkoksil

ROO· **:** lipid peroksil

ROS **:** Reaktif oksijen türleri

RNS **:** Reaktif nitrojen türleri

ZP **:** Zona pellusida

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 1.1. Flavonoid iskeleti 14
Şekil 2.2. Kuersetinin yapısal formu 15
Şekil 4.1. Kontrol grubunda hasar görmeyen akrozom bütünlüğünün mikroskobik görüntüsü. 23
Şekil 4.2. 15 µg/mL kuersetin grubunda hasar görmeyen akrozom bütünlüğünün mikroskobik görüntüsü. 24
Şekil 4.3. 30 µg/mL kuersetin grubunda hasar görmeyen akrozom bütünlüğünün mikroskobik görüntüsü. 24
Şekil 4.4. 45 µg/mL kuersetin grubunda hasar görmeyen akrozom bütünlüğünün mikroskobik görüntüsü 24

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No **Sayfa No**

Tablo 4.1. Kuersetinin akrozom bütünlüğü üzerine etkisi (x±SEM) 22

1. GİRİŞ

Koyunculuğun hayvansal üretim, dolayısıyla tarımsal üretim ve ülkelerin ekonomilerinde önemli bir yeri bulunmaktadır. Koyunlardan elde edilen et, süt ve süt ürünleri, yapağı ve deri gibi ürünler insanların önemli ihtiyaçlarını karşılamaktadır. Bu hayvanlar birçok çiftlik hayvan türünün faydalanamadığı yem kaynaklarını değerlendirebilmektedir. Bu nedenlerle dünyanın her yerinde koyun yetiştiriciliği yapılmaktadır.[1]

Koyunculuk, otlakları geniş ve kurak iklim şartlarına sahip çayır bölgelerde daha sık olarak yapılmaktadır. Koyunlar uygun ağız yapılarıyla düşük kaliteli meralardan daha fazla yararlanabilmektedir. Koyunculuk gerek verim özellikleri gerekse de beslenme avantajları bakımından ülke hayvancılığı içerisinde önemli bir yer tutmaktadır.[1]

Koyunculuk Türkiye'de en önemli hayvan yetiştiriciliği dallarından birisidir. Kırsal alanda yaşayan halkımız içiniş alanı ve ekonomik kazançları nedenleriyle geçim kaynağı haline gelmiştir. Bu nedenlerletarih boyunca en eski hayvansal üretim alanlarından birisi olmuştur. Koyun yetiştiriciliği işsizlik, ekonomik kazanç, üretim veet ihtiyacının karşılanması açısından da önemlidir. Halkımızın önemli bir geçim kaynaklarından birisini oluşturan koyunculuğun daha da gelişmesi nedeniyle üzerinde önemle çalışılmalıdır.[1]

Koyunculuk bu kadar önemliyken koyunculukta verimi artırmak hedeflenmektedir. Koyun yetiştiriciliğinde üretimin artırılması için birim hayvandan daha fazla verim almak zorunludur. Bu amaçla koyunculukta üreme özelliklerinin iyileştirilmesi gerekmektedir. Döl verimi iyi olmayan bir dişiden yüksek verimli yavru alınamayacağı gibi spermasının verimi ve kalitesi uygun olmayan bir erkek hayvandan da iyi bir döl verimi alınamayacağı ortadadır. Bu nedenlerle koyunculuğun etkin bir şekilde sürdürülebilmesinde koç

sperminindöllemeyeteneğinin yüksek olması önem arz etmektedir. Koç spermasının dölleme yeteneğini arttırmak için özellikle dondurma-çözündürme sonrası zarar gören sperm hücrelerini azaltılmasında antioksidan maddeler kullanılmaktadır.[1]

Dondurma-çözündürme sonrası spermada antioksidan kapasite azalmakta ve reaktif oksijen radikal oluşumu artarak spermatolojik özellikler ve fertilitede olumsuzluklar meydana getirmektedir. Dondurulup çözdürülen sperma**,** taze spermaya nazaran peroksidasyona daha hassas olmaktadır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar**,** spermanın muhafazası sırasında infertiliteye neden olan en önemli faktör olarak spermatozoa membran lipidlerinin peroksidasyonunu işaret etmektedir. Bu nedenle spermaların dondurma-çözündürme sonrasında spermatolojik özellikler üzerine pozitif etkileri olabileceği düşüncesinden dolayı sperma sulandırıcılarına antioksidan maddeler ilave edilmektedir.[2]

Memeli hayvanlarda vücut sıvıları ve üreme dokularında yüksek miktarda bulunan antioksidan maddeler, sperma sulandırıcılarına ilave edildiğinde spermadaki serbest radikallerin sebep olduğu hücre membranlarındaki yağ asitleri ve fosfolipitlerin peroksidasyonunu asgari seviyeye düşürmektedir. Böylelikle lipit peroksidasyonunun spermatozoa akrozomunda sebep olduğu zarar azaltılarak sağlanan döl verimi büyük ölçüde arttırılabilmektedir.[3]

Çözdürme sonrası spermlerin antioksidan kapasitesi donma eritme işlemi sırasında oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu zarara karşı yetersiz kaldığı bildirilmişbunun sonucu olarak çözdürme sonrası sperm kalitesinin düşük olduğu görülmüştür. Kuersetin maddesi güçlü bir antioksidan olması nedeniyle reaktif oksijen türlerinin neden olduğu zararı azaltarak sperm kalitesini arttırabilir.[4]

Yapılan bu çalışmada koç sperminin dondurma öncesi belirli dozlarda antioksidan(kuersetin) katılarak, çözdürme sonrası spermde hasar gören akrozom bütünlüğü

yüzdesinin azaltılması sayesindekoç sperminindölleme yeteneğinin yükseltilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Koyunlar tür olarak (Ovis aries) Bovidae grubunun içinde yer almaktadır. Koyunlar yünü ve eti için ilk evcilleştirilen hayvanlar içinde bulunmaktadır. Seksüel siklusu koyunların mevsime bağlı poliöstrik hayvanlardan olması nedeniyle gün uzunluğuna, beslemeye ve ırka bağlı olarak farklılık gösterir. İklim olarak ılıman bölgelerde yaşayan koyun ırkları genellikle ilkbahar ve yaz mevsimi süresince anöstrusta olup, sonbahar mevsimi döneminde gün ışığının azalmasına bağlı olarak östrus gösterir. Tropikal bölgelerde gün ışığındaki değişimin az olması nedeniyle yerli ırk koyunlar seksüel yönden aktifliğini yıl boyunca korur. Yerli ırklar tropikal bölgelere götürülürse, zamanla reprodüktif aktivitelerindeki mevsimsel farklılık kaybolarak yeni ortama uyum sağladığı görülür. Beslenmenin yetersiz olması ve yüksek çevre sıcaklığı tropikal bölgelerde yılın bazı aylarında seksüel aktiviteyi kısıtlayabilmekte iken, yağmurların başladığı mevsimlerde mera şartlarının iyileşmesi ve uygun çevre sıcaklığının oluşması seksüel faaliyetlerde artış gösterebilmektedir.[5]

Koçların seksüel aktivitelerinin sınırları kesin bir şekilde betimlenebilecek mevsimsel özellik göstermezler. Koçlar sonbaharda yüksek bir seksüel aktivite gösterseler de kışın son dönemleri, bahar ve yaz aylarında da birçok etkene bağlı olarak aktif olabilirler. Gün uzunluğunun azalması koçlarda FSH, LH ve testosteronun salgılanmasını uyarırken**,** günlerin uzaması da bu hormonları inhibe edilmesini sağlar. Yetişkin koçlarda gün uzunluğu süresine bağlı olarak serum gonadotropin ve testosteron sekresyonlarının salınım miktarı birey ve ırklar arasında farklılık oluşturabilir. Bu farklılıklar hipotalamus-hipofiz-testis aksisinin en aktif olduğu kısa günlerde daha belirgin saptandığı belirtilmiştir.[5]

2.1. Koçlarda Sperma Almanın Yöntemleri

Koçlarda seksüel aktivite; testosteron sekresyonu, spermatogenesis ve çiftleşme davranışlarındaki belirgin bir artışla karakterizedir. Koçların testis ölçüleri 8-10 haftalık yaşa ve yaklaşık 16-20 kg ağırlığa ulaştıkları zaman artmaya başlar. Bu durum, primer spermatositlerin görülmesi ve seminifer tubullerin genişlemesi ile aynı zamana denk gelmektedir. Çiftleşme ile oluşan ejakülasyondaki canlı spermler, 4-6 aylık yaş ve olgun beden ağırlığının %40-60'ına ulaştığı zaman şekillenir.[5] Diğer çiftlik hayvanlarında olduğu gibi koçlardan suni vajina, elektroejakülatör, doğal aşım sonrası vajinaya bırakılan spermanın alınması vb farklı yöntemler kullanılarak sperma alınabilmektedir.[5] Sperma koçlardan en uygun şekilde suni vajina ya da elektroejakülatör kullanılarak alınabilmektedir. Bu yöntemlerin birbirine göre üstünlüğü veya olumsuz yönleri olsa da suni vajina yöntemi ile alınan sperma kalite bakımından diğer yöntemlere göre daha üstündür. Suni vajina yöntemi ile sperma alınacağı zaman, koçun seksüel olarak dışarıdan uyarılmasına gerek duyulması nedeniyle ortamda 4 kızgın koyun veya fantom bulunmasına ihtiyaç vardır. Suni vajina yönteminin olumsuz yönleri koçlardan suni vajina yöntemi ile sperma vermeye alıştırılması için sürece gereksinim olması, bazı durumlarda suni vajinayı reddetmesi ve deneyimsizlikten ileri gelen nedenlerden dolayı spermanın alınamaması gibi nedenler bulunmaktadır. Ayrıca suni vajina koşulları, çevre ve uygulayıcıdan kaynaklanan farklılıklar da sperma kalitesini doğrudan etkileyebilmektedir. Diğer yandan sperma alınırken kızgın dişinin kullanılması nedeniyle istenmeyen çiftleşmelere neden olarak sperma kayıplarına yol açmakta ve sperma alan kişi veya dişi hayvanın güvenliğini de tehlikeye sokarak risk oluşturabilmektedir. Sperma vermeye alışan koçlardan östrustaki dişinin varlığında günde bir veya iki kez sperma alınabileceği bildirilmiştir.[6]

Elektroejakülasyon yöntemi ile alınan spermanın kalitesi suni vajina ile elde edilen spermanın kalitesine yakın özellikte olduğu bildirilmiştir. Bu yöntem, kızgın dişi veya fantoma gereksinim duyulmaması nedeniyle suni vajina yönteminden üstün olan tarafları vardır. Ancak sperma alırken daha fazla personele gereksinim duyulması, uzmanlık gerektirmesi, hayvanın yatırılması gibi bazı olumsuz tarafları bulunmaktadır.[7] Elektroejakülatörle sperma alma yönteminde, elektroejakülatörün üç elektrotlu rektal probu (19x3,5cm; uzunlukxçap) kayganlaştırılarak rektuma yerleştirildikten sonra 2-3 saniye aralıklarıyla verilen elektriksel uyarımlarla sperma alınır. Alınan spermanın direkt güneş ışığından veya soğuk şokundan korunması ve en fazla 10 dakika içerisinde motilite değerlendirilmesinin yapılması gerekir.[7] Elektroejakülasyon yöntemi ile sperma alırken rektal prob; koçun rektumuna zarar vermeden yerleştirilmeli, ilk uyarımdan sonra 30 saniye masaj yapılmalı ardından voltaj aşamalı olarak artırılarak işlem tekrarlanmalıdır. Her uyarımın ardından voltaj düşürülerek ve masaj uygulanmasına devam edilmelidir. Bu işlem sperma alımına kadar (3-5 kez) sürdürülmesi gerekmektedir. Elektroejakülatör ile sperma vermeye alışmış koçlar genelde bir iki uyarım sonrası sperma verirler. Deneyimi olmayan koçlar için biraz daha fazla uyarım gerekli olabilir.[8] Suni vajina ve elektroejakülatörle sperma alma tekniklerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda,[8,9] elektroejakülatörle alınan spermanın hacminin**,** suni vajina yöntemi ile alınanlara göre daha fazla olduğu, sperma yoğunluğunun ise daha düşük bulunduğu belirtilmektedir. Bunun nedeni**;** elektriksel uyarımla eklenti bezlerinin salgıları normalden daha fazla salınması olduğu belirtilmektedir.[10,11]

2.2. Koç Spermasının Genel Özellikleri

Koç sperması diğer çiftlik hayvanları ile kıyaslandığında ırk, yaş, beslenme, sperma alma yöntemi, sperma alma sıklığı, sperma alma zamanı ve mevsim gibi faktörlere bağlı olarak ejakulat hacminin düşük olduğu belirtilmiştir. Ejakulat hacmi koçlarda ortalama 1 ml

dir. Sağlıklı bir koç ejakulatının rengi gri-beyazdan krem rengine kadar değişiklik gösterebilmektedir. Koç sperması normalde koyu kıvamlı ve düşük vizkoziteye sahiptir. Spermanın kıvamı ile yoğunluğu arasında doğrusal bir ilişki olduğu bildirilmektedir. Koç spermasının motilitesi ortalama %70, pH'sı 6,2-6,9 arasında değişmekte olup**,** $3x10^9$/ml yoğunluğunda ve ortalama %20 anormal sperm oranına sahip olduğu belirtilmiştir.[12]

2.3. Koç Sperminin Yapısı

Spermler baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluşur. Nükleus ve oosite penetrasyonu sağlayan akrozom baş kısmını oluşturur. Bağlantı, orta ve son kısmı (asıl kuyruk) kuyruk kısımını oluşturur. Bağlantı kısmı, erkek ve dişi gamet nükleuslarını zigotta bir araya getirmede önemli bir rolü olan sentrozomu içerir. Orta kısımda sperm motilitesinde gerekli olan enerji kaynağını sağlayan mitokondria bulunur. Kuyruk kısmıda, spermin uterus ve ovidukta ilerleyerek oositle karşılaşıp penetre olmasını sağlar.[13] Spermatogenezisin son aşamasında bölünme yeteneğini yitiren sperm, hareket özelliği kazanarak özel bir yapıya bürünür. Memeli sperm yapısı genellikle akrozomun ve başın şekli ile toplam uzunluğu bakımından türler arasında farklılık gösterir. Memeli sperm uzunluğu farklılıkları 28,3µm ile 356,3µm arasında değişir. Rodent sperminin uzunluğu 150-250µm iken insan ve evcil hayvan spermi ortalama 50µm uzunluğundadır. Koç sperminin baş, orta kısım ve toplam uzunluğu sırasıyla 8,2µm, 14 µm ve 65µm olarak belirtilmiştir.[14] Memeliler arasında en uzun spermatozoaya sahip hayvan ise 350µm ile Avustralya keselisi olduğu görülmüştür.[13]

2.3.1. Baş Kısmı

Baş kısmının içinde nükleus, hücre membranı, apikal vakuol, akrozomal kap, post-nükleer kap, bazal yumru ve implantasyon çukurluğu bulunmaktadır.[7] Asıl görevi; oosite penetre olmak, haploid genomu vermek ve fertilizasyon sonrası embriyonik gelişimi başlatmaktır.[13]

2.3.1.1. Nükleus

Nükleus baş kısmının merkezinde bulunur ve haploid kromozomlar içerir. Nüklesun şekli kaba olarak başın şekli ile aynıdır.[7] Spermin kromatin yapısı, metafaz aşamasındaki somatik hücrelerin kromozomlarından 6-10 kat daha kompakt görünümde ve transkripsiyonel olarak inaktif durumdadır. Histokimyasal boyamada primatların dışında memeli spermatozoasının kromatin yapısı genellikle homojen bir şekilde boyanır.[13] Primatlara ait spermatozoa nükleusu ise vakuollü görülür. Bazı nükleer vakuoller, spermatidlere ait sitoplazma kalıntıları içerir. Nükleusta vakuollerin bulunması birçok memeli türünde bozukluk olarak nitelendirilir. İnfertil ruminantların bazılarında nükleus yıkımına yol açan, perinükleer sitoplazma ve mikrotübüllerin invaginasyonu görülmektedir.[13] Genetik kusurlar, nükleusta bulunan kromozomlar**,** DNA tarafından yavruya aktarıldığı için, sperm DNA hasarlarının belirlenmesi spermatolojik muayene sistematiğinde ayrı bir önem kazanmaya başlamıştır. İnfertil bireylerin sperma DNA kırıkları oranının fertil bireylere göre daha yüksek olduğu ve bu nedenle, bireyin fertilite yeteneğini ortaya koymak için spermin DNA bütünlüğünün önemli olduğu vurgulanmaktadır. Yapılan son çalışmalarda genetik hastalıkların önüne geçmek ve yardımcı üreme tekniklerinde başarı şansını artırmak için gametlerin kromatin yapısının bütünlüğünün ortaya koyulmasına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır.[15]

2.3.1.2. Akrozom Yapısı

Akrozom nükleusun frontal ve lateralinde, plazma membranı ve perinükleer teka arasında bulunan veziküler yapıya verilen isimdir. Bu yapı spermiyogenezisin golgi aşamasında meydana gelir. Yapısal ve işlevsel olarak ön ve arka olmak üzere iki bölüme ayrılabilir.[7] Spermin kumulus hücrelerini geçmesi veya zona pellusidaya (ZP) bağlanmasında ön kısım önemli rolü üstlenir. Ön kısım kumulus hücreleri geçilirken akrozomal ekzositozun

oluştuğu bölgedir. Arka bölüm diye adlandırılan ekvatoryal veya posterior akrozomal kısım ise akrozomal ekzositoz ve fertilizasyon sonrası oositle birleştiği bölümdür.[13] Akrozom spermatozoanın ön kısmını oluşturan bölgedir. Bu yapı fertilizasyon sırasında spermatozoanın oosit katmanlarını geçerken gerekli olan çok sayıda farklı hidrolitik enzimleri içerisinde ihtiva eder.[5] Bu parçalayıcı enzimler akrozom reaksiyonu sonucu ortaya çıkarak penetrasyon öncesi spermden ayrılırlar. Morfolojik incelemelerde ve fertilizasyonda önemli rol oynaması nedeniyle akrozomun ayrı bir önemi vardır. Spermin yaşlanması veya zararlı etkilere bağlı olarak apikal bölgede bulunan akrozomal enzimleri içeren yapıların bozulması nedeniyle fertilite kaybı oluşmaktadır.[7] İstenilen oranda gebelik elde etmek için fertilizasyonda etkin rol oynayan enzimleri içeren akrozomal yapının bütünlüğünün bozulmamış olması gerekmektedir. Akrozom**;** Hyaluronidaz, Corona Penetreting Enzyme (CPE), Neuraminidaz ve Tripsin gibi fertilizasyonun oluşmasında etkin rol oynayan enzimleri içerir.[5] Hyaluronidaz ve CPE, oosit çevresindeki kumulus hücrelerine bağlı olan hyaluronik asidi hidrolize eder.[7] Spermatozoa, hyaluronidaz enzimini salıp hyaluronik asit bağlarını yıkımlayarak kumulus hücrelerini dağıtır ve kumulus ooforusa penetre olur.[13] Akrozomal matriks ve proteolitik enzimlerin ZP yüzeyinde serbest bırakılarak fertilizasyon yırtığı (deliği) açılmasında görev aldığı ileri sürülmektedir. Fertilizasyon deliğinin şekillenmesinde spermin mekanik gücünün yani motilitesinin de etkili olduğu belirtilmiştir.[5,7,13]

2.3.2. Sperm Kuyruğu ve Flagellum Yapısı

Sperm kuyruğu, başın arka kısmından uzanan ince uzun bir organel yapıdadır. Kuyruğun görevi kamçı tarzı hareket ile spermi ileri hareket ettirmek ve hareket için gerekli enerji üretmektir. Kuyruk, eksternal morfolojide temel olarak boyun bölgesi (bağlayıcı parça), orta parça, ana parça ve son parça olmak üzere dört bölümde incelenebilir.

2.3.2.1. Boyun Bölgesi, Orta Kısım ve Kuyruk

Sperminin "boyun" kısmı baş ve kuyruğu bağlayan karmaşık ve özelleşmiş bir yapıya sahiptir. Başın konkav yüzeyi bazal yumru, kuyruğun konveks yüzeyi ise kapitulum olarak tanımlanır. Her ikisi birbirleri ile ince flamentlerle bağlanmış elektron yoğunluğu yapısına sahiptir.[13] Orta kısım içerisnde mitokondrialar, sentriol halkaları ve fibriller bulundurması nedeniyle asıl kuyruktan daha kalındır. Boyun bölgesi arkasınca uzanan tüm yapı bölgesi sperm kuyruğu veya flagellum olarak adlandırılır. Orta kısım, ana kısım ve son kısım olaraküç kısma ayrılabilir. Kuyruğun ana yapısı olan aksonema, yoğun dış lifler ve fibröz bir kılıf ile sarılıdır. Aksonema bir çift sentral küçük mikrotubül ve onu çevreleyen büyük dokuz mikrotubül çiftinden oluşmuştur. Bu fibriller**;** aksiyal fibril yığını olarak adlandırılır.[7,13] Aksiyal fibril yığınını çevreleyen periferal halka olan fibroz zarın, sperm maturasyonu, progresif motilite, kapasitasyon ve ovidukta spermin taşınması sırasındaki hiperaktivasyon sağlayan reaksiyon zinciri sinyalinin verilmesinde rol oynayan enzim ve komponentleri içerdiği düşünülmektedir. Spermin metabolit merkezi olan mitokondrialar orta kısmın çevresini sarar. Bu yapı mitokondrial heliks olarak tanımlanır. Mitokondrial heliks, 70-80 kez 10-15°'lik bir açı ile orta kısım etrafında döner.[7] Sperm mitokondriası fizyolojik olarak aktiftir ve farklı substratlarla ATP sentezleyebilir.[5] Spermatozoa, tubulus seminiferus lümenine geçtiğinde rüzidüal parçacık olarak adlandırılan sitoplazmanın kullanılmayan kısımlarını saçar. Bu parçacıklar sertoli hücrelerince fagosite edilir. Mature olmuş serbest spermatozoanın boyun kısmında kalan sitoplazma parçası ise "sitoplazmik damlacık" (SD) olarak tanımlanır. Sitoplazmik damlacık boyutları türler arasında farklılık gösterir. Bu yapıda yapılan ileri yapısal analizlerde farklı yapılarda membranlar, lipit damlacıkları, golgi yapılı kesecik ve kese, çeşitli sitoplazmik yapılar gözlendiği bildirilmiştir. Biyokimyasal olarak SD, lipit, lipoprotein, RNA ve birçok hidrolitik enzim içerir. Sitoplazmik damlacığın

spermatogenezis ya da fertilizasyon sırasında belirli bir etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir. Sitoplazmik damlacık spermatozoanın orta kısmında, distal uçtan proksimal uca doğru göç eder ve epididimisteki taşınma sırasında dökülür. Spermatozoanın bu yapıyı atamaması sonucu motilitenin engellendiği ve fertilizasyonda kullanılamadığı görülmüştür. Çok sayıda sitoplazmik damlacıklı sperm en fazla domuz ejekütlatlarında gözlenmiştir.[13] Ayrıca sık sık ejakülasyon yapan hayvanlarda spermin epididimal olgunlaşmasını tamamlamaması sonucu spermada yüksek oranda sitoplazmik damlacığa rastlandığı görülmüştür.[16] Canlı spermatozoa sağlam ve tamamen lipoproteinden oluşan plazma membranı ile kaplıdır. Plazma membranı, özellikle kapasitasyonda, akrozom reaksiyonunda ve oositin plazma membranını eritmede önemli role sahiptir. Sperm plazma membranı epididimise geçişte çeşitli sekretorik proteinleri absorbe eder. Bu sayede epididimal spermatozoa fertilizasyon yeteneği kazanır.[13]

2.4.Antioksidanlar

Vücutta oluşan veya dışarıdan alınan serbest radikallerin oluşturduğu hasara karşı koymak için vücudun oluşturduğu antioksidan savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bu antioksidan mekanizmaların görevleri serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonu durdurarak, oksijeni veya metalleri bağlayarak, oksidasyonun sebep olduğu zararları engeller.[17,18] Antioksidanların insan sağlındaki temel etkisi, serbest radikalleri nötralize eden ve zincir kıran mekanizmalarda aktif rol almasıyla ortaya çıkmaktadır.[19] Antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak sınıflandırılabilirler.[20] Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GPx) , sitokrom oksidaz ve katalazdır (KAT). Enzimatik olmayan antioksidan bileşiklerden mineral (SE,Zn), vitamin (A,C,K,E), antioksidan kofaktörler ve polifenoller şeklinde incelenmektedir.[21] Antioksidanların serbest radikalleri

ve reaktif türevleri süpürme, dolayısıyla oksidatif stres ve oksidatif stresle bağlantılı olan hasarı azaltmaları nedeniyle, besinlerle antioksidan takviyesi hakkında sayısız çalışma ve öneriler yapılmıştır.[20] Bazı gıda antioksidanlarının oksidasyonu engelleyerek arteroskleroz, malarya, romatoid artrit ve diyabette faydalı olabileceği, antitümöral, antitrombotik, antiülser, antikarsinojenik, antihipertansif, antinakteriyel, antifungal, antiviral etkileri olduğu yapılan in-vivo çalışmalarda gösterilmiştir.[21] Reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidanlar arasındaki dengenin korunması, oksidatif stresten kaynaklanan hasarın önlenmesinde önemli bir mekanizma görevi vardır. Organizmanın antioksidan kapasitesinin yetersizliği durumunda, metabolik reaksiyonlar hücreler için zararlı olur. Bu reaksiyonlar koroner damar hastalıkları, diyabet, Alzheimer, Parkinson ve değişen kanser türlerinin oluşmasına neden olmaktadır.[21] Bu nedenle, vitaminler ve flavonoidler gibi antioksidanlar ile beslenme takviyesi, birçok kronik hastalığın önlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Antioksidanlar serbest radikallerin neden olduğu zararlı etkileri, düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) ve lipoprotein oksidasyonunu önleyerek hastalıkların oluşumunu engeller.[18]

2.4.1. Polifenoller

Polifenoller olarak adlandırılan antioksidanlar, zengin biyoaktif bileşiklerdir. Bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, gövde, dal ve yapraklarında bulunup pek çok gıdanın tat ve aromasına katkıda bulunurlar.[18,22] Beslenme fizyolojisi açısından olumlu etkileri nedeniyle ‘biyoflavonoid’ olarak da adlandırılırlar. Polifenollerin diyetteki günlük 1g tüketimi, vitamin C tüketimine göre 10 kat daha değerli olması nedeniyle güçlü antioksidanlar olarak kabul edilmiştir.[18,22,23] Fenolik bileşikler, gıda maddelerinin görünüş, tat ve lezzet gibi tüketim açısından önemli olan özellikleriyle doğal antioksidan olarak insan sağlığı üzerinde gösterdikleri olumlu etkileri nedeniyle oldukça önemli bileşenlerdir.[18] Fenolik bileşiklerin antialerjik, antienflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik,

antiviral ve antitrombotik etkiye sahip olduğu yapılan araştırmalarla bildirilmiştir. Antioksidan olarak fenolik bileşiklerin kanser, kalp hastalıkları, katarakt, göz hastalıkları ve Alzheimer gibi hastalıklara karşı koruyucu özellik gösterdikleri bilinmektedir. Polifenollerin antioksidan aktivitelerinin ise, serbest radikalleri bağlama kapasitesi veya demiri indirgeme gücüne dayandığı bildirilmiştir.[18,22] Polifenoller, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Flavonoidler, önemli düzeyde antioksidan ve şelatlama özelliklerine sahip difenilpropanoidler olup insan vücudunda sentezlenemeyen bitkisel polifenollerin en yaygın grubunu oluştururlar.[18] Fenolik asitler ise, aromatik karboksilik asitlerin hidroksi türevleridir. Doğal olarak meydana gelen bu bileşikler; birçok kronik hastalığa sebep olan serbest radikallere ve diğer reaktif oksijen türlerine karşı güçlü antioksidan özellik gösterdiği bilinmektedir.[18,22]

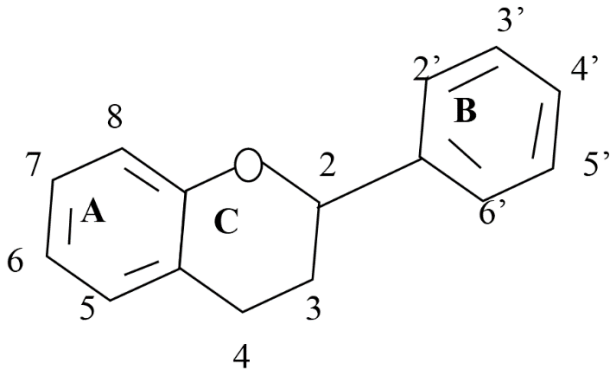
2.4.2. Flavonoidler

Polifenollerin doğada en yaygın bulunan formu flavonoidlerdir. Meyve ve sebzelerin, bitkisel çayların doğal yapılarında bulunan ve insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan, polifenolik antioksidanlardır.[18,19,20,24] Meyveler, yapraklar, çiçekler, kök ve tohumlar gibi bitkilerin farklı kısımlarında bulunurlar.[24] Biyolojik aktiviteleriyle ilgili ilk çalışma 1936 yılında Rusznyak ve Szent-Gyorgyi tarafından yayınlanmıştır.[25] Yapılan çalışmalarda flavonoidlerin**;** anti-inflamatuar, antioksidan, antialerjik, antitrombotik, antiviral ve antikarsinojenik gibi aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir.[17]

2.4.2.1. Flavonoidlerin Yapısal Özellikleri

Flavonoidlerin karbon iskeleti, iki fenil halkasının propan zinciriyle birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C6-C3-C6) yapısındadır. Flavonoid iskeleti

(Şekil 2.1) heterosiklik (C) bir halde bulunan 3 karbonlu bir zincirle bağlanmış iki fenolik (A,B) halkadan oluşur ve flavonoidlerin karakteristik özelliklerini bu heterosiklik halkanın belirlediği bilinmektedir.[20,24,26] Aynı zamanda, B halkasındaki hidroksilasyon da antioksidan aktivitelerine katkı sağladığı görülmüştür.[27]



Şekil 1.1. Flavonoid iskeleti

Doğada, 5000'den fazla flavonoid olduğu belirlenmiştir ve bunlar moleküler yapılarına göre 6 sınıfta toplanmaktadırlar.[18,19,26] Bunlar;

1.Flavonlar : Apigenin, Chrysin, Luteolin

2.Flavonoller : Kaemferol, Miricetin, Kuersetin

3.Flavanonlar : Hesperidin, Naringenin

4.Flavanoller : Epikateşin, Gallocatecin

5.Antosiyanidinler : Cyanidin, Malvidin, Pelargonidin

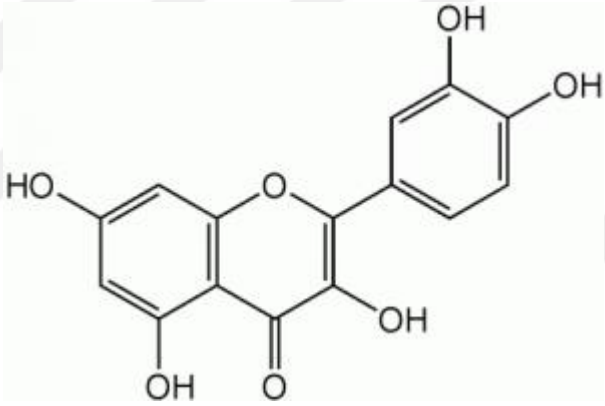
6.İzoflavonlar : Genistein, Daidzein

Flavonodiler**;** serbest radikal süpürücü bazı enzim aktivitelerini düzenlemeleri, hücre çoğalmasını inhibe etmeleri ve antibiyotik, antialerjen özellik göstermelerinden dolayı önem taşımaktadır.[22] Flavonoidlerin süperoksit (O·), lipid alkoksil (RO·), lipid peroksil (ROO·), nitrik oksit (NO) radikal temizleme, demir ve bakır şelasyon, fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatatör, immünstimülan, antiallerjik, östrojenik, antiviral (HSV,HIV, influenza)

etkileri vardır. Fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonuyla da antiinflamatuar özellik gösterdikleri bilinmektedir.[27] Ortalama yiyeceklerle günlük flavonoid alımının 26 mg/gün olduğu ve predominant flavonoidin kuersetin olduğu belirlenmiştir.[27]

2.4.3. Kuersetin

Kuersetin antioksidanlar içinde polifenoller, polifenollerin alt grubu flavanoid, flavanoidlerin alt grubu olan Flavonoller grubunun içinde yer alır. Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon), meyve, sebze ve tahıl gibi farklı bitki materyallerinde yaygın olarak bulunan güçlü bir antioksidandır. 3 halka ve 5 hidroksil grubundan oluşur (Şekil 2.2).[24,28,29]



Şekil 2.2. Kuersetinin yapısal formu

Kuersetin, antikanserojenik, antiastmatik, antiviral, antialerjenik, antihipertansif, hepatoprotektif, antidiyabetik, anti-inflamatuar, kardiyoprotektif ve antibakteriyel etkinlikler gibi geniş biyolojik etkilere sahip güçlü bir antioksidandır. Elma, soğan ve kırmızı şarap başta olmak üzere, greyfurt, siyah çay, ahududu, yaban mersini, kiraz, brokoli gibi sebze ve meyvelerde bulunan, günlük 25-30 mg tüketiminin insanlar için yeterli olduğu bir flavonoidin türüdür .[24,26,30,31]

2.4.3.1. Kuersetinin Antioksidan Etkisi

Kuersetinin antioksidan potansiyeli üzerine birçok in vivo ve in vitro çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar, kuersetinin antioksidan etkisinin beyin, kalp, testis ve diğer dokuları iskemi-reperfüzyon hasarına, toksik bileşiklere ve oksidatif stresin neden olduğu diğer faktörlere karşı koruyucu olduğunu göstermiştir.[31] Kuersetin, Reaktif oksijen türleri (ROS) ve Reaktif nitrojen türleri (RNS) tutma özelliklerinde dolayı güçlü bir antioksidan olarak kabul edilmektedir. Ayrıca doğrudan lipid peroksitleri yok ettiği[32] ve dolaylı olarak enzimatik antioksidanların etkinliğini arttırıp, nonenzimatik antioksidanların üretimini arttırdığı belirtilmiştir.[33]

Kuersetinin antioksidan ve serbest radikal süpürücü potansiyelinden sorumlu olan B halkasında ve serbest hidroksil gruplarındaki katekol kısmının varlığı olduğu bilinmektedir.[19,24] Kuersetinin in vitro antienflamatuar, anti-proliferatif ve gen ekspresyonu kapasitelerine sahip bir antioksidan olduğu kanıtlanmıştır. Fakat şimdiye kadar in vivo şartlarda sadece antioksidatif ve antienflamatuar etkileri gösterilmiştir. Kuersetinin bu iki etkisi oksidatif stres ve inflamasyonun bazal düzeyleri yüksek olduğunda daha da belirgin görünmektedir. Bu etki, kuersetin takviyesinin hipertansiyon ve sarkoidoz gibi her iki süreçle ilişkili bir hastalığı olan insanlarda özellikle verimli olduğunu ortaya koymaktadır.[19] Kuersetin tedavisi diyabete bağlı testiküler disfonksiyon ve histopatolojik hasarları azalttığı bildirilmiştir. Kuersetin, antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırırken, ROS seviyelerini düşürdüğü, diyabetik sıçan testisindeki PCNA aktivitesini ve TUNEL pozitif hücrelerin sayısını azaltarak diyabetin neden olduğu oksidatif DNA hasarını ve sıçan testisindeki apoptozu iyileştirici etkilerinin olduğu çalışmalarda belirtilmiştir.[34] Kuersetinin; plazma glukozunu düşürdüğü,[35,36,37] glukoz tolerans testlerini normalleştirdiği, pankreatik β-hücre bütünlüğünü ve fonksiyonunu koruduğu ve deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlarda,

diyabetin neden olduğu biliş, ruh hali ve böbrek fonksiyonlarında düşüşe karşı koruma sağladığı bilinmektedir.[35]

Kuersetin, birçok önemli enzimin aktivitesini de etkilemektedir. Diyabetik katarakt oluşumunda aldoz redüktaz inhibitörünün önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.[31] Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibe ettiği de bilinmektedir. Kuersetinin bu etkisi kısmen hipertansiyonun azaltılmasında sorumlu olabilmektedir.[38]

Kuersetin, süperoksit ve hidroksil radikallerini temizlemekte, lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir ve lipid peroksil radikallerini azaltmaktadır. Birçok araştırmacı, kuersetinin antioksidan aktivitesi sayesinde, erkeklerde üreme işlev bozukluğu üzerinde iyileştirme etkisi olduğunu bildirmiştir. Buna ek olarak, kuersetin lipid peroksidasyonu antioksidan enzim aktivitesinin artırılması ve azaltılması ile CCl_4'ün neden olduğu karaciğer fibrozu üzerine yararlı bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.[36,39,40-43]

Kuersetin, vücuttaki serbest radikallerin neden olduğu hasar olaylarını, serbest radikal toplayıcı etkisi sayesinde koruyucu, tedavi edici özellik göstermektedir. UV ışınlarının hasarına karşı kuersetinin koruyucu rolü üzerine çalışma yapılmıştır. UV ışını verilen ratlarda MDA seviyelerinde anlamlı bir yükselme ve antioksidan aktivitelerinde azalma görülmüştür. Koruyucu olarak kuersetin verilen grup sadece UV verilen grupla karşılaştırıldığında antioksidan enzim seviyelerinde artış, MDA seviyesinde düşüş olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak UV ışınına karşı kuersetinin koruyucu rolü olduğu belirlenmiştir.[44] Serbest radikal toplayıcı aktivitesi olduğu bilenen kuersetin, diabetüs mellitus ile oluşan oksidatif hasarı koruyucu etkisine bakmak için yapılan çalışmada, bulgular neticesinde kuersetinin, oksidatif stresi azaltarak pankreatik β- hücre bütünlüğünde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.[44] Kuersetinin prostat kanserinde potansiyel koruyucu ajan olabileceği gösterilmiştir. Kuersetin, prostat tümör hücre modelinde doza bağlı olarak apoptozu uyarmaktadır ve hücre

büyümesini inhibe etmektedir. Kanser başlangıcının, ilerlemesinin ve yayılmasının engellenmesine yönelik yaklaşımlardan biri reaktif oksijen türlerinin temizlenmesidir. Besinsel 22 antioksidan olarak bilinen kuersetinin insan hepatoma hücrelerindeki reaktif oksijen türlerinin konsantrasyonunu azalttığı bulunmuştur.[40]

2.4.3.2. Kuersetinin Sperma Üzerine Etkisiyle İlgili Bulgular

Johinkee ve ark.,[45] tavşan spermasının kısa süreli saklanmasıyla ilgili çalışmasında sulandırıcıya ilave ettikleri 25, 50, 100 ve 200µm dozlarındaki kuersetinin DNA bütünlüğü üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını belirtmişlerdir.[45] Bununla birlikte Şükrü ve ark.,[46] yaptıkları kangal köpeği spermasının dondurulmasında farklı antioksidanlar ve kriyoprotektanların etkisi konulu çalışmasında TGK50 (Temel sulandırıcı + %5 Gliserol + Kuersetin 50µM), TEK50 (Temel sulandırıcı + %5 Etilen Glikol + Kuersetin 50µm) ve TEK200 (Temel sulandırıcı + %5 Etilen Glikol + Kuersetin 200µm) gruplarının DNA bütünlüğü üzerindeki etkilerini incelemişler ve TGK200 (Temel sulandırıcı + %5 Gliserol+Kuersetin 200µm) grubunun istatistiksel olarak diğer gruplardan daha üstün olduğunu bildirmişlerdir.[46] Benzer sonuç Zribi ve ark.[47] insan spermasının dondurulmasında yaptıkları bir başka çalışmada da elde edildiği ortaya konulmuştur.[47]

Silva ve ark.[48] koç spermasının çözüm sonu mitokondriyal aktivitesini araştırdıkları çalışmada**,** %5 gliserollü temel sulandırıcıya 5, 10, 15 ve 20µg/ml oranlarda kuersetin ekledikleri gruplarda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oranda mitokondriyal aktivite tespit etmişlerdir.[48]

Gibb ve ark.[49] aygır spermasının dondurulmasında sulandırıcıya ilave ettikleri 0,15mM dozundaki kuersetinin, sistin (0,2mg/ml) ve katalaza (200U/ml) göre çözüm sonu daha yüksek oranda akrozom bütünlüğü oranı sağladığını ortaya koymuşlardır.[49]

Gibb ve ark.[49] aygır spermasının dondurulmasında sulandırıcıya 0,15mM dozunda eklenen kuersetinin etkisini araştırdıkları çalışmalarında, kuersetin içeren sulandırıcı grubunun kontrol grubuna göre üstünlük sağlamadığını belirtmişlerdir.[49]

Khanduja ve ark.[50] insan sperma sulandırıcısına eklenen 5, 10, 50, 100 ve 200µM dozlarındaki kuersetinin spermanın kısa süreli saklanmasında canlılık üzerine etkilerini araştırmışlar ve kuersetinin herhangi bir etkinliğinin olmadığı sonucuna varmışlardır.[50]

Moretti ve ark.[51] insan sperma yıkama medyumuna 20, 30, 50, 100 ve 200µM dozlarında ekledikleri kuersetinin canlılık oranları bakımından kontrol grubuna göre etkinliğinin olmadığı sonucuna varmışlardır.[51]

Johinkee ve ark.[45] tavşan spermasını kısa süreli saklama çalışmasında sulandırıcıya ilave edilen 25, 50, 100 ve 200µM dozlarındaki kuersetin gruplarında progresif motilite değerlendirmesinde, kuersetinin artan dozlarının kontrol grubuna göre üstünlük sağladığını bildirmişlerdir.[45]

Farklı türlerde kuersetin ile yapılan çalışmalarda farklı sonuçların bulunması kullanılan antioksidanın dozuna, farklı hayvan türlerine, saklama şartlarının farklılığına, sulandırıcılara ve sulandırıcılar arasındaki pH değişikliğine bağlı şekillendiği rapor edilmiştir.[45-51]

3.MATERYAL VE METOT

3.1. Hayvan Materyali

Yaptığımız çalışmada**,**Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesinin imkanlarıyla yaşları 2 ile 5 olan 6 baş ergin koç çalışma öncesinde temin edilerek kullanıldı. Bu koçların sağlık durumları rutin muayenler yapılarak çalışmadan once kontrol edildi. Hayvanların yem ve su ihtiyaçları ad libitum olarak giderildi. Çalışmada antioksidanın koç spermasının akrozom bütünlüğü üzerine etkisini belirlemek amacıyla kuersetinin farklı (15, 30, 45µg/mL) dozları kullanıldı.

3.2. Yöntem

Çalışmamızda 2 ile 5 yaş arası 6 baş ergin Merinos ırkı koçlardan alınan spermalar kullanıldı. Koçların genel bakım ve beslemesi standart yetiştirme koşullarında yapıldı. Koçlardan alınan ejakülatlar, suni vajen yardımıyla haftada iki kez alınarak, üç hafta süresince toplamda altı kez alınması sağlandı. Alınan ejakülatlardan uygun özellik (spermatozoa/ml; motilite≥%80, sperma yoğunluğu≥3×10^9) gösteren spermalar çalışmada kullanıldı.

Uygun özellik gösteren spermaların sulandırılmasında Tris sulandırıcısı (82.66mM fruktoz, %15 yumurta sarısı, gliserol %5, 297.58mM tris, 96.32mM sitrik asit, gentamisin 0.1ml/100ml: pH 6,8-7,0) kullanıldı. Spermalar 32ºC'lik uygun sıcaklıkta dört eşit hacme bölünerek farklı dozlarda kuersetin (15, 30, 45µg/mL) içeren üç grup ve kuersetin içermeyen dördüncü grup (kontrol grubu) Tris sulandırıcısıyla ml'de yaklaşık 4×10^8 spermatozoa olacak şekilde sulandırılarak seyreltildi. Sulandırma işlemini takiben sperma numuneleri on dakika oda ısısında tutula**r**ak ardından 0.25ml'lik payetlere çekilerek yaklaşık üç saat +5ºC'ta ekilibrasyona bırakıldı ve ekilibrasyonu izleyen süreçte sıvı azot buharında (~-100ºC) on

dakika dondurularak -196^{o}C'taki sıvı azota konuldu. Çalışma altı replikasyondan oluşturuldu.

Çalışmada antioksidan içeren ve içermeyen sperma numuneleri dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik muayenelerde floresan boyama teknikleri kullanılarak akrozom bütünlüğü yönünden değerlendirildi. Akrozom bütünlüğünü belirlemek için FITC-PNA (L7381 FITC-PNA, Invitrogen) ve Nagy *ve ark.* (2003) tarafından modifiye edilen PI (propidium iodide) boyası kullanıldı. 1 ml phosphate buffered saline (PBS) eklenen 120µg FITC-PNA 100µl'lik eşit miktarlara bölünüp 1:3 oranında Tris temel solusyonuyla dilüe edildikten sonra 60µl sperma, 10µl FITC-PNA ve 2.5µl PI ile ana karışım hazırlanarak 20 dakikada 37^{0}C'de inkübasyona bırakıldı. Ardından 10µl Hancock solüsyonu katılarak reaksiyon işlemi sonlandırıldı. Hazırlanan örnekten 2.5µl'lik miktar alınarak floresan mikroskopta (Leica DM 3000 Microsystems GmbH, Ernst-Leitz-Strase, Wetzlar, Germany; excitation at 450–490nm, emission at 520nm) 400'lük büyütmede 200 adet hücre sayılarak parlak yeşil ve parçalı yeşil renk veren sperm hücreler hasar görmüş akrozomu gösterirken, yeşil renk vermeyen sperm hücreler ise sağlam yapıda hasara uğramamış akrozom olarak değerlendirildi.

3.3. İstatiksel Analiz

Yapılan çalışmada farklı dört grubun istatiksel analiz ile kıyaslanmasında varyans analizi ve Post Hoc Tukey HSD testi ile aralarında önemli farklılık bulunan ikiden fazla grubu karşılaştırılması yapıldı. SPSS 15,0 for Windows Evaluation Version istatiksel analiz programı kullanıldı. Sonuç olarak $P < 0,001$ düzeyde çıkan farklılık çok yüksek anlamlı olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. Kuersetin Maddesinin Akrozom Üzerine Etkisi

Kuersetinin**,** koç spermasının akrozom bütünlüğü üzerindeki farklı dozlardaki etkisi aşağıda Tablo 4.1'de belirtildiği gibi sonuçlandı.

Tablo 4.1. Kuersetinin akrozom bütünlüğü üzerine etkisi (x±SEM)

Gruplar	**Hasar görmeyen akrozom oranı (%)**
Kontrol	54,83±3,38[a]
Kuersetin 15 µg/mL	39,16±2,65[b]
Kuersetin 30 µg/mL	40,83±0,30[b]
Kuersetin 45 µg/mL	20,83±2,95[c]
P	*

a,b,c : Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir (*: p < 0,001)

Tablo 4.1'e göre kuersetin katılmayan kontrol grubunda**,** hasar görmeyen akrozom bütünlüğü yüzdesi 54,83±3,38[a] olarak bulundu. Farklı dozlardaki kuersetin maddelerinin akrozom bütünlüğü üzerine etkilerine bakıldığında;

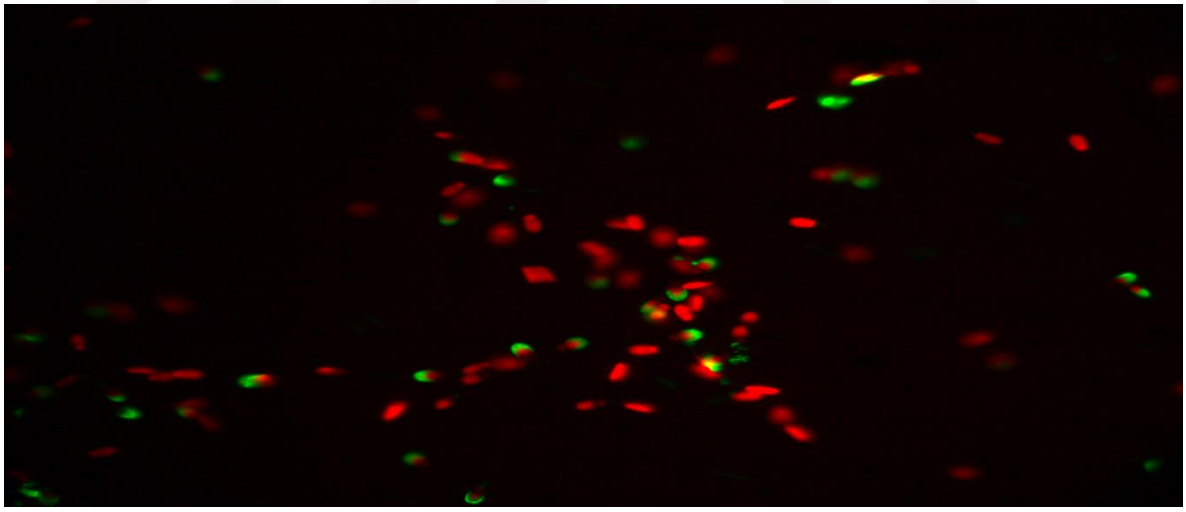
15µg/mL kuersetin maddesi katılan sperma grubunda**,** hasar görmeyen akrozom yüzdesi 39,16±2,65[b] bulundu. Bu sonuç kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; hasar görmeyen akrozom oranının kontrol grubuna göre düşük olduğu ve bu farkın istatiksel açıdan önemli olduğu tespit edildi. 15µg/mL kuersetin maddesi katılmasının akrozom bütünlüğüne olumsuz etki ettiği değerlendirildi.

30µg/mL kuersetin maddesi katılan sperma grubunda hasar görmeyen akrozom yüzdesi 40,83±0,30[b] bulundu. Bu sonuç kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; hasar görmeyen akrozom oranının kontrol grubuna göre düşük olduğu ve bu farkın istatikselaçıdan

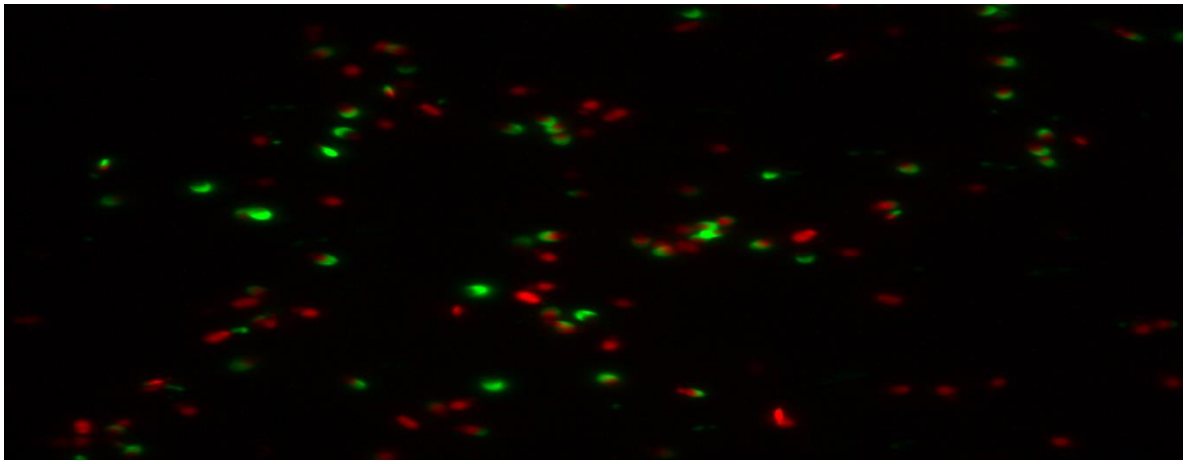
önemli olduğu tespit edildi. 30µg/mL kuersetin maddesi katılan grupla 15µg/mL kuersetin katılan grup arasındaki farkın ise anlamlı olmadığı, benzer olduğu görüldü.

45µg/mL kuersetin maddesi katılan sperma grubunda hasar görmeyen akrozom yüzdesi 20,83±2,95^{c} bulundu. Bu sonuç kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; hasar görmeyen akrozom oranının kontrol grubuna göre çok daha düşük olduğu tespit edildi. Kontrol grubu ve diğer iki (15µg/mL kuersetin, 30µg/mL kuersetin) grupla arasındaki fark istatiksel açıdan önemli bulundu. 45µg/mL kuersetin maddesi katılmasının akrozom bütünlüğü üzerine toksik etki etti oluşturduğu belirlendi.

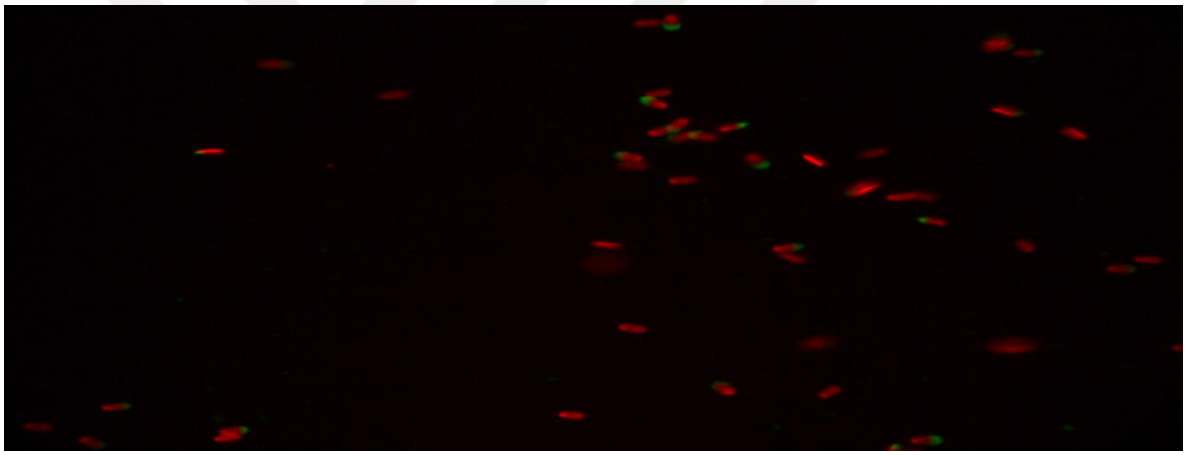
Aşağıda kontrol grubunun ve farklı dozlarda kuersetin katılan sperma gruplarının hasar görmeyen akrozom (Kırmızı Renkli Sperm Hücresi) bütünlüğünün mikroskobik görüntüleri verilmiştir.



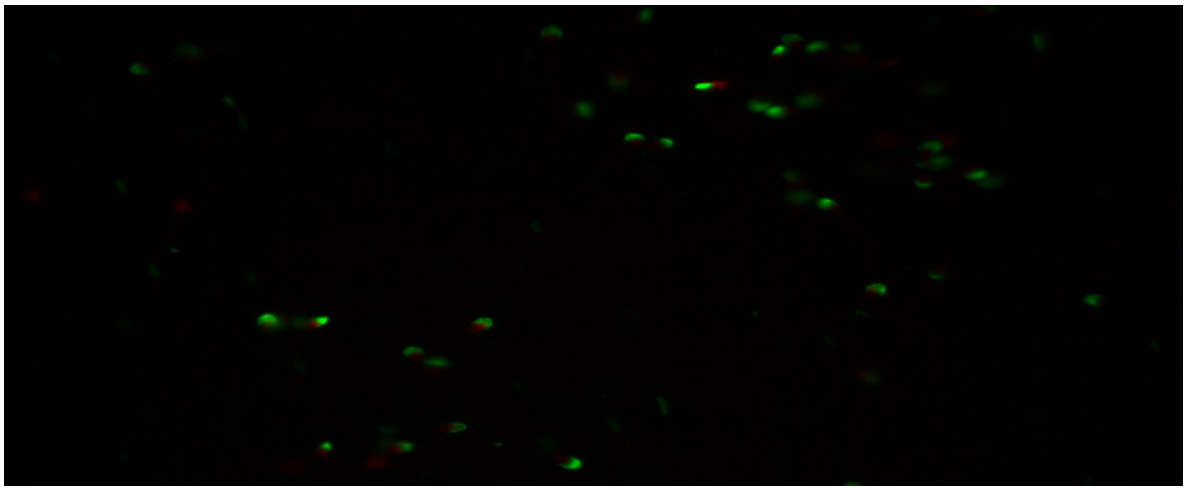
Şekil 4.1. Kontrol grubunda hasar görmeyen akrozom bütünlüğünün mikroskobik görüntüsü.



Şekil 4.2. 15 µg/mL kuersetin grubunda hasar görmeyen akrozom bütünlüğünün mikroskobik görüntüsü.



Şekil 4.3. 30 µg/mL kuersetin grubunda hasar görmeyen akrozom bütünlüğünün mikroskobik görüntüsü.



Şekil 4.4. 45 µg/mL kuersetin grubunda hasar görmeyen akrozom bütünlüğünün mikroskobik görüntüsü

4.2. Kuersetinin Akrozom Üzerine Etkisinin Sonucu

Çalışmada farklı dozlarda (15, 30, 45µg/mL) katılan kuersetin miktarlarının akrozom bütünlüğüne olumsuz etkileri olduğu belirlendi. 15µg/mL ile 30µg/mL kuersetin katılan gruplarda akrozom bütünlüğünün benzer oranlarda olumsuz etkilendiği tespit edildi. En yüksek doz olan 45µg/mL kuersetin içeren grupta ise akrozom bütünlüğü üzerine toksik etkiler gerçekleştiği görüldü. Kuersetinin akrozom bütünlüğüne etkisinin araştırıldığı bu çalışmada kuersetin doz oranlarındaki yükselmelere bağlı olarak akrozom bütünlüğü üzerinde toksik etkinin arttığı sonucuna varıldı.

5.TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada kuersetin maddesinin koç sperma sulandırıcısına katılıp akrozom bütünlüğüne baktığımızda toksik etki oluşturduğu görüldü. Daha önce yapılan çalışmalarda kuersetin maddesinin farklı tür spermalarında spermanın kalitesinin arttığına dair bir çok çalışma vardır. Spermatolojik parametreler bağlamında kuersetin kullanılarak yapılan çalışmaların bir kısmı aşağıda belirtilmiştir.

Bir flavonoid polifenol olan kuersetin, reaktif oksijen türlerinin en güçlü toplayıcısıdır. Yapılan çalışmalarda koç ve aygırda çözdürme sonrası sperm kalitesini iyileştirdiği gözlemlenmiştir.[52,53,54,55]

Başka bir çalışmada 10µM'de kuersetinin damar endotel hücrelerinde ve horoz spermatogonial hücrelerinde çeşitli kimyasallar ile uyarılmış oksidatif stresi inhibe ettiği gösterilmiştir. Kuersetinin erkek üreme işlevlerine etkileri incelenmiş ve bu bileşiğin sıçanlarda sperm kalitesini artırdığı görülmüştür.[40]

Khaki & Arash[36] yaptıkları diyabet çalışmasında kuersetin tedavisi uygulanan grupta apoptotik indeksin azaldığını, seminifer tübül yapısının ve epitelinin iyileştiğini göstermişlerdir. Kanter ve ark.[34] yaptığı çalışmada kuersetinin testis dokusu üzerindeki benzer iyileştici etkisini gözlemiştir.[34,36] Khaki & Arash[28] yaptıkları çalışmalarında kuersetinin diyabetik sıçan testislerinde koruyucu etkisini incelemişler ve kuersetinin epididimal sperm kalitesini arttırdığını bildirmişlerdir.

Kuersetin, enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler, özellikle NADPH oksidaz[56] ve NADH'ye bağımlı oksido redüktaz[57] tarafından ROS oluşumunu inhibe etme kabiliyetinden dolayı güçlü antioksidan görevi yapar. Kuersetinin taze koç spermasına eklenmesinin, geçici

olarak glikolizatı inhibe ettiği ve böylece asitlenmeyi önlediği ve spermin ömrünü uzattığı bulunmuştur.[58]

Kaliteli sperma için çözdürme sonrası motilite ve canlı sperm sayısıyla ilgili kuersetin, taurin ve indirgenmiş glutatyon ile yapılan çalışmalarda kuersetin kontrol grubuna göre iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Alvarez ve Storey[59] tavşan spermasında, Bucak ve ark.[60] koç spermasında, Atessahin ve ark.[61] geyik spermasında, Reddy ve ark.[62] manda spermasında, Perumal ve ark.[63] mithun ve Rather ve ark.[64] koç spermasında, Sarıözkan ve ark.[65] boğa spermasında, Bucak ve Uysal[66] Sannen keçi sperminde benzer sonuçlar bulmuşlardır.

Kuersetin, koç sperması,[67] boğa sperması,[68] aygır sperması[69] ve insan sperması[70] çalışmalarında azaltılmış glutatyon ve kontrol grubuna göre daha iyi sonuç vermiştir.

2011 yılında E.C.B. Silva ve ark.[71] donmuş koç spermasına resveratrol ve kuersetin antioksidanların etkisi konulu çalışmalarında farklı dozlarda kuersetin koç spermasına katıp akrozom bütünlüğüne bakmışlardır. Bu çalışmada akrozom bütünlüğü kontrol grubunda %62.3±7.0, kuersetin 5µg/mL grubunda %66.4±3.9, kuersetin 10µg/mL grubunda %64.5±5.4, kuersetin 15µg/mL grubunda %68.9±7.1, kuersetin 20µg/mL grubunda %64.3±6.2 bulunmuştur.(P>0.80) Yapılan bu çalışmada farklı dozlarda kuersetin gruplarının akrozom bütünlüğüne etkisi kontrol grubuna göre olumlu sonuç vermiştir. Çalışmadakuersetinin doz oranlarında en iyi sonucu 15µg/mL kuersetin grubu daha sonra 5µg/mL kuersetin grubu vermiştir. Doz oranı 20µg/mL yükseldikçe akrozom bütünlüğüne toksik etki ettiği bildirilmiştir.[71] Bu çalışmanın 15µg/mL grubundan çıkan sonuç ile bizim yaptığımız çalışmanın 15µg/mL grubundan çıkan sonuç farklı bulunmuştur. Sonuçların farklı olması ekilibrasyon süreleri ve sulandırıcıların farklı olmasından kaynaklanabilir.

Koç spermasının diğer türlerden daha hassas olmasıyla ilgili Avustralya'da yürütülen çalışmalarda**,** koç spermasını dondurma çalışmalarının çoğunluğunda boğa spermasında

uygulanan yöntemin koyunlara uygulanma şeklinde olmasına rağmen beklenen başarı sağlanamamıştır. Koyunlarda dondurulmuş spermayla yapılan tohumlama sonrasındaki fertilite oranlarının sığırlara göre düşük kalması, erkek ve dişiye ait çeşitli faktörlerden kaynaklanmaktadır.Erkeğe ait faktörlerin başında spermanın donma sırasında gördüğü hasar gelir.[72] Bizim yaptığımız çalışmada**,** hasar görmeyen akrozom yüzdesinin kontrol grubundan daha kötü çıkmasında**,** kuersetinin çok güçlü bir antioksidan olması nedeniyle dozunun yüksek olması ve koç spermasının diğer türlerden daha hassas spermaya sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

2017 yılında Banday ve ark.[73] dondurma öncesi koç spermasının kalitesini arttırmak için antioksidanların kullanılmasıyla ilgili çalışmasında**;** altı adet melez koçtan toplam 24 adet ejakülat toplanmış ve taurin (40mM), kuersetin (5µg /ml) ve indirgenmiş glutatyon (5 mM) antioksidanları katılmış ve antioksidan katılmayan kontrol grubu oluşturulmuştur. Bu çalışmanın sonucunda 5µg/ml kuersetin katılan koç spermasının çözdürme sonrasında sperm motilitesi ve canlı sperm yüzdelerinin kontrol grubuna göre arttığı gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada 5µg/ml kuersetin katılan koç spermasının çözdürme sonrası akrozom bütünlüğü kontrol grubuna göre yüzde olarak bir üstünlük sağlamadığı**,** benzerlik taşıdığı görülmüştür.[73] Bu çalışmayla bizim yaptığımız çalışmayı baz aldığımızda kuersetinin 15µg/mL, 30µg/mL, 45µg/mL dozlarda kontrol grubuna göre olumsuz sonuç verdiği, 5µg/ml doz da kontrol grubuyla benzerlik taşıdığı görülmüştür. Buradan kuersetinin daha düşük dozlarda uygulandığında olumlu sonuçlar vereceği tahmin edilmektedir.

Kuersetin maddesinin sperma üzerine etkisi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bizim yaptığımız çalışmada da sulandırıcıya farklı dozlarda katılan (kuersetin; 15µg/mL, 30µg/mL, 45µg/mL) kuersetin maddesinin koç spermatozoasının akrozomu üzerindeki etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır. Kuersetin maddesinin bizim bulduğumuz bulgularda spermin

akrozom bütünlüğüne toksik etki ettiği, hasar görmeyen akrozom yüzdesini kontrol grubuna göre düşürdüğü görüldü. Hasar görmeyen akrozom yüzdesinin azalmasında; kuersetin maddesinin doz oranı, koç spermasının diğer türlerden daha hassas olması, farklı sulandırıcı ve farklı saklama koşulları etki etmiş olabilir.[58,61,67,71,72,73]

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kuersetin maddesinin güçlü antioksidan özelliğinden dolayı akrozom bütünlüğünün korunmasında faydalı olacağını düşünerek yürüttüğümüz bu çalışmada, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında değişik dozlarda belirlenen kuersetinin (15µg/mL, 30µg/mL, 45µg/mL) koç spermasına katılmasının akrozom bütünlüğü üzerine olumsuz etkileri olduğu sonucuna varıldı.

Deney gruplarındaki kuersetin dozlarının koç spermasının çözüm sonu akrozom bütünlüğü üzerine etkisi incelendiğinde ise; 15µg/mL ve 30µg/mL kuersetin içeren gruplardaki hasar görmeyen akrozom yüzdesinin, doz oranı daha yüksek olan 45µg/mL kuersetin içeren grubuna göre daha yüksek oranda olduğu görüldü. Çalışmada kuersetinin dozu arttıkça sperma üzerindeki toksik etkisinin de arttığı kanısına varıldı.

Koç spermasının diğer türlerden daha hassas olması ve kuersetinin de güçlü bir antioksidan olması sebebiyle kuersetinin 15µg/mL, 30µg/mL ve 45µg/mL dozlarda kullanılmasının akrozom bütünlüğü oranlarını olumsuz etkilediği değerlendirildi.

Sonuç olarak antioksidan özelliği sebebi ile döl verimi parametreleri üzerinde olumlu etkiler elde edilebilmesi için kuersetin dozlarının 15µg/mL seviyesinden daha düşük oranlarda kullanılması gerektiği kanısına varıldı. İleride bu konuda yapılacak çalışmalar ile döl verimi üzerine optimum etki oluşturacak kuersetin dozlarının ortaya konulmasının başta koyun yetiştiriciliği olmak üzere ülke hayvancılığına olumlu katkılar sağlayacağı düşünüldü.

KAYNAKLAR

1. Akçapınar H. Koyun Yetiştiriciliği. *Medisan Yayın Evi*, 1994, No:8.
2. Kulaksız R, ve Daşkın A. Farklı antioksidanlarla dondurulan Saanen teke spermasının in vitro ve in vivo değerlendirilmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*, 2009, 56: 201-205.
3. Ömür AD. Sezon İçi ve Sezon Dışında Koç Spermasının Dondurulmasında Antioksidanların Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Konya: Selçuk Üniversitesi, 2011.
4. Bucak MN, Sariozkan S, Tuncer PB, Sakin F, Atessahin A, Kulaksiz R, Cevik M. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircus ancryrensis) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Rumin. Res.* 2010,89: 24-30
5. Ese H. Reproduction in Farm Animals. *Philadelphia,* 1993, 6th ed., page 330-343.
6. Gordon I. Controlled Reproduction in Sheep and Goats. *CABI Publishing,* 1999, 19:351-359.
7. İleri İK, Ak K, Pabuçoğlu S, Birler S. Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını*, 2000, 59:75-90.
8. Youngquıst RS. Current therapy in large animal theriogenology. *Philadelphia,* 1997, 1st edition, page 481-499.
9. Dogan I, Nur Z, Gunay U, Soylu MK. Semen charasteristics during the transition period in Saanen bucks. *Indian Veterinary Journal*, 2005, 82: 1080-1082.
10. Platz C, Follıs T, Demorest N, Seager S. Semen Collection, Freezing and Insemination in The Domestic Cat. *VII. International Congress Animal Reproduction*, 1976, 4:1053-1056.

11. Dooley MP, Pındeda MH. Effect of Method of Collection on Seminal Characteristics of The Domestic Cat. *American Journal of Veterinary Research*, 1986, 47:286-292.

12. Evans G, Maxwell WMC. *Salamon's Artificial İnsemination of Sheep and Goats*. Sydney, Butterworths, 1987:22-30.

13. Schatten H, Constantınescu GM. *Comparative Reproductive Biology*. USA, Blackwell Publishing, 2007:5-111.

14. Bedfoed JM, Hoskıns DD. The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. *Lamming GE, Marshall's Physiology of Reproduction, Churchill Livingstone, Edinburg London Melbourne and New York*, 1990, page 379-568.

15. Sharma RK, Saıd T, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assesing reproductive outcome. *Asian Journal of Andrology*, 2004, 6:139-148.

16. Kaya A, Aksoy M, Tekelı T. Influence ofejeculation frequancy on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Ruminant Research*, 2002, 44: 153-158.

17. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2009, 681(1):51-67.

18. Nizamlıoğlu NM, Sebahattin N. Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. *Electronic Journal of Food Technologies*, 2010, 5(1):20-35.

19. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*, 2008, 585(2):325-337.

20. So FV, Guthrie N, Chambers AF, Carroll KK. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer letters*, 1997, 112(2):127-133.

21. Kasprzak KS. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis 1, 3. *Free Radical Biology and Medicine,* 2002, 32(10):958-967.

22. Kasnak C, Palamutoğlu R. Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması ve İnsan Sağlığına Etkileri. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology,* 2015 3(5).

23. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of clinical nutrition,* 2005, 81(1): 215-217.

24. Nabavi SF, Russo GL, Daglia M, Nabavi SM. Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: you are what you eat. *Food chemistry,* 2015, 179:305-310.

25. Güven EÇ, Otkun GT, Boyacıoğlu D. Flavonoidlerin biyoyararlılığını etkileyen faktörler. *Gıda Dergisi*, 2010, 35(5).

26. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna J, De Biasi S, Roat E, Cossarizza A. Quercetin and cancer chemoprevention. https://www.hindawi.com/journals/ecam/2011/591356 9 Nisan 2010

27. ÇİMEN MBY. Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. Turkiye Klinikleri *Journal of Medical Sciences,* 1999, 19(5):296-304.

28. Khaki A, Nouri M, Fathiazad F, Ahmadi-Ashtiani H, Rastgar H, Rezazadeh S. Protective effects of quercetin on spermatogenesis in streptozotocin-induced diabetic rat. *Journal of Medicinal Plants*, 2009, 1(29):57-64.

29. Kocabaş N. Homosisteinin İndüklediği Oksidatif Stres Üzerinde Quercetinin Koruyucu Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Afyon: Kocatepe Üniversitesi, 2008.

30. Yılmaz İ. Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 2010, 17(2).

31. Kelly GS. Quercetin. Altern. *Med. Rev*, 2011, 16(2):172-194.

32. Baghel SS, Shrivastava N, Baghel RS, Agrawal P, Rajput S. A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. *World J Pharm Pharmaceutical Sci*, 2012, 1(1):146-160.

33. Nabavi SF, Nabavi SM, Mirzaei M, Moghaddam AH. Protective effect of quercetin against sodium fluoride induced oxidative stress in rat's heart. *Food & function,* 2012, 3(4): 437-441.

34. Kanter M, Aktas C, Erboga M. (2012). Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food and chemical toxicology,* 2012, 50(3):719-725.

35. Adewole SO, Caxton-Martins EA, Ojewole JA. Protective effect of quercetin on the morphology of pancreatic β-cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines,* 2007, 4(1):64-74.

36. Khaki A, Fathiazad F, Nouri M, Khaki A, Maleki NA, Khamnei HJ, Ahmadi P. Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Phytotherapy Research,* 2010, 24(9):1285-1291.

37. Vessal M, Hemmati M, Vasei M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocininduced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology,* 2003, 135(3):357-364.

38. Miles S L, McFarland M, Niles RM. Molecular and physiological actions of quercetin: need for clinical trials to assess its benefits in human disease. *Nutrition reviews*, 2014, 72(11):720-734.

39. Türk G, Çeribaşı S, Sönmez M, Çiftçi M, Yüce A, Güvenç M, Aksakal M. Ameliorating effect of pomegranate juice consumption on carbon tetrachloride-induced sperm

damages, lipid peroxidation, and testicular apoptosis. *Toxicology and industrial health*, 2016, 32(1):126-137

40. Abarikwu SO, Pant AB, Farombi EO. The protective effects of quercetin on the cytotoxicity of atrazine on rat Sertoli-germ cell co- culture. *International journal of andrology*, 2012, 35(4):590-600.
41. Ben Abdallah F, Fetoui H, Zribi N, Fakhfakh F, Keskes L. Quercetin attenuates lambda cyhalothrin-induced reproductive toxicity in male rats. *Environmental toxicology*, 2013, 28(12):673-680.
42. Kanter M, Meral I, Dede S, Cemek M, Ozbek H, Uygan I, Gunduz H. Effects of Nigella sativa L. and Urtica dioica L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl4-treated rats. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 2003, 50(5):264-268.
43. Zhang D, Yasuda T, Yu Y, Zheng P, Kawabata T, Ma Y, Okada S. Ginseng extract scavenges hydroxyl radical and protects unsaturated fatty acids from decomposition caused by iron-mediated lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, 20(1):145-150.
44. Emek H. Erişkin Erkek Sıçanlarda Karbon Tetraklorür ile Oluturulan Testis Hasarı Üzerine Kuersetinin Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi, 2014.
45. Johinkee D, de Graaf SP, Bathgate R. Quercetin reduces the in vitro production of H2O2 during chilled storage of rabbit spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 2014, 151:208–19.
46. Güngör Ş. Kangal Köpeği Spermasının Dondurulmasında Farklı Antioksidanlar ve Kriyoprotektanların Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Konya:Selçuk Üniversitesi, 2015.

47. Zribi N, Chakroun FN, Abdallah BF, Elleuch H, Sellami A, Gargouri J, Rebai T, Fakhfakh F, Keskes AL. Effect of freze-thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. *Criobiology*, 2012, 65:326-31.

48. Silva ECB, Cajueiro JFP, Silva SV, Soares PC, Guerra MMP. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 2012, 77, 17:22–26.

49. Gibb Z, Butler TJ, Morris LHA, Maxwell WMC, Grupen CG. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. *Theriogenology*, 2013,1–9.

50. Khanduja KL, Verma A, Bhardwaj A. Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. *Andrologia*, 2001, 33:277–81.

51.Moretti E, Mazzi L, Terzuoli G, Bonechi C, Iacoponi F, Martini S, Rossi C, Collodel G. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. *Reprod Toxicol*, 2012, 34:651– 57.

52. T.T. Cushnie, A.J. Lamb, Antimicrobial activity of flavonoids, International Journal of *Antimicrobial Agents*, 2005, 26:343-356.

53. Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R, Ruiz RS. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, 2004, 62:690-701

54. Seifi-Jamadi A, Kohram A, Shahneh AZ, Ansari M, Macias-Garcia B. Quercetin Ameliorate Motility in Frozen-Thawed Turkmen Stallions Sperm. *J. Equine Vet. Sci.* 2016, 45:73-77.

55. Silva ECB, Cajueiro JFP, Silva SV, Soares PC, Guerra MMP. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 2012,77:1722-1726

56. Li Y. Antioxidants in biology and medicine: essentials, advances and clinical applications, *Nova Science Publishers*, 2011, pp. 21-30

57. Delmas D, Jannin B, Latruffe NPN. Resveratrol: natural properties against atherosclerosis, associated pro-inflammatory effects and aging. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2005, 4: 377-395.

58. Nass-Arden L, Breitbart H. Modulation of mammalian sperm motility by quercetin. *Mol. Reprod. Dev*.,1990, 25:369-373

59. Alvarez JG, Storey BT. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Bio. Reprod*.,1983, 29:548-555.

60. Bucak MN, Atessahin A, Varish O, Yuce A, Tekin N, Akcay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*, 2007,67:1060-1067

61. Atessahin A, Bucak MN, Tuncer PB, Kizil M. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze–thawing process. *Small Rumin. Res*., 2008, 77:38-44

62. Reddy NSS, Mohanarao GJ, Atreja SK. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (Bubalus bubalis) sperm quality following cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci*., 2010 119:183-190.

63. Perumal P, Vupru K, Rajkhowa C. Effect of addition of taurine on the liquid storage (5o C) of Mithun (Bos frontalis) semen. http://dx.doi.org/10.1155/2013/165348. 30 Mayıs 2013

64. Rather HA, Islam R, Malik AA, Lone FA. Addition of antioxidants improves quality of ram spermatozoa during preservation at 4° C. *Small Rumin. Res*., 2016, 141: 24

65.Sariozkan S, Tuncer PB, Bucak MN, Ulutas PA. Influence of various antioxidants 456 on microscopic-oxidative stress indicators and fertilizing ability of frozen-thawed bull semen. *457 Acta. Vet. Brno*, 2009, 78:463-469.

66. Bucak MN, Uysal. The role of antioxidants in freezing of Saanen goat semen. *Indian Vet. J., 2008,* 85:148-150

67. Silva ECB, Cajueiro JFP, Silva SV, Soares PC, Guerra MMP. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology,* 2012, 77: 1722-1726

68. Klinc P, Rath D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reprod. Domest. Anim*, 2007, 42:63-67

69. McNiven MA, Richardson GF. Effect of quercetin on capacitation status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. *Cell Preservation Technology*, 2006, 4:169-177.

70. Anderson D, Dobrynska MM, Basaran N, Basaran A, Yu TW. Flavonoids modulate comet assay responses to food mutagens in human lymphocytes and sperm. *Mutat. Res. Fund. Mol. M*., 1998, 269

71. Silva ECB, Cajueiro JFP, Silva SV, Soares PC, Guerra. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology,* 2011, 77: 1722–1726

72. Agas ĠH, Varışlı Ö, Yurdaydın N. DeğiĢik Ozmotik Basınç Düzeyleri ve Kryoprotektif Maddelerin İvesi Koç Sperması Üzerine Etkisi. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 2014, 3:84-88

73. Banday MN, Lone FA, Rasool F, Rashid M, Shikari A. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28040489. 28 Aralık 2016

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Oğuzhan ULUYOL
Doğum Tarihi:	18/10/1986
Doğum Yeri:	Delice
Medeni Hali:	Evli
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkezi Komutanlığı Gemlik/BURSA
Tel:	5535968920
Faks:	
E-mail:	suleymanasaf71@gmail.com
Eğitim	
Lise:	Mehmet Akif Ersoy Lisesi
Lisans:	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Yüksek Lisans:	Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Devam)
Doktora:	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Başlangıç
Almanca:	
Rusça:	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
İlgi Alanları ve Hobiler	

EK-2. ETİK KURUL KARARI

T.C.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

REKTÖRLÜĞÜ

Hayvan Deneyleri Yerel Etik

Kurulu Başkanlığı

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1600267067

10.11.2016

Konu: HADYEKKararı.

VETERİNER FAKÜLTESİ

DEKANLIĞINA

İlgi : 10.10.2016 tarihli ve 36643897-000-E.1600232288 sayılıbelge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 04.11.2016 tarih ve 7 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 145 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz ederim.

Toplantı Tarihi: 04.11.2016 **Toplantı Sayısı**: 7

KARAR N0 145: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Ali Doğan ÖMÜR'ün yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığının Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuarlarında yürütülecek olan **"Kuersetinin Merinos Irkı Koç Spermasının Akrozom Reaksiyonu Üzerindeki Etkinliğinin Araştırılması"** başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Veteriner Fakültesi Dekanlığının 10.10.2016 tarih ve 36643897-000-E.1600232288 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ Kurul Başkanı

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: http://www.atauni.edu.tr/#!birim=veteriner-fakultesi
Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr
Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr

