

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
REPRODÜKSİYON VE SUNİ TOHURLAMA (VETERİNER)
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

SERİSİNİN FARKLI DERECELERDE SAKLANILAN TAVŞAN
SPERMATOZONLARI ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

TANAY ÖZCAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

AYDIN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama (Veteriner) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Tanay ÖZCAN tarafından hazırlanan “Serisinin farklı derecelerde saklanılan tavşan spermatozoonları üzerine koruyucu etkisinin araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 09/09/2019

Üye (T.D.) :	Prof.Dr.Ahmet Ceylan	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye :	Prof. Dr. Melih Aksoy	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye :	Doç. Dr. Deniz Yeni	Afyon Kocatepe Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cavit KUM

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Ahmet Ceylan'a çok teşekkür ederim.

Araştırma öncesi ve sonrası değerli fikirleriyle beni yönlendiren ve çalışmama değer katan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Melih Aksoy ve Prof. Dr. İlker Serin'e teşekkür ederim. Ayrıca birikimleriyle bana destek olan Araş. Gör. Dr. Niyazi Küçük ve Araş. Gör. Uğur Uçan'a, çalışma sürecinde desteğini esirgemeyen ve yoluma ışık tutan Uzm. Vet. Hekim Sanan Raza'ya, araştırma sürecinde bana destek olan değerli meslektaşlarım Vet. Hekim Elif Öykü Kılıç ve Vet. Hekim Güney Tuzlalıoğlu'na teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince hoşgörölü davranıp, her türlü kolaylığı sağlayan Vet.Hekim Mustafa Kentan'a teşekkürü borç bilirim.

Yüksek Lisans dönemim boyunca bütün sıkıntılarımı paylaşan ve huzurlu çalışma ortamı sunan aileme minnettarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Spermanın Saklanması	5
2.1.1. Spermanın Kısa Süreli Saklanması.....	5
2.1.2 Spermanın Dondurularak Saklanması	7
2.2. Tavşanlarda Üreme.....	8
2.2.1. Tavşanlarda Pubertas	8
2.2.2. Erkek Tavşan Reprodüktif Organ Özellikleri.....	9
2.2.3.Tavşan Spermasının Karakteristik Özellikleri.....	10
2.3. Serisin Hakkında Genel Bilgiler.....	12
2.3.1. Serisin'in Moleküler Yapısı	12
2.3.2. Serisin Çalışmaları.....	13
2.3.3. Serisin Elde Edilme Yöntemleri	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. Gereç.....	15
3.1.1 Deney Kurgusu	15
3.2. Yöntem	17
3.2.1. Serisin Solüsyonun Hazırlanışı.....	17
3.2.2 Spermatolojik Değerlendirmeler	17

3.2.3. Progresif Motilite.....	17
3.2.4. Canlı Spermatozoon Oranı	17
3.2.5. Akrozom Reaksiyonu	17
3.2.6. Spermatozoon Membran Bütünlüğünün Belirlenmesi	18
3.2.7 Analiz Yöntemleri	18
4. BULGULAR	19
4.1. Progresif Motilite Değerlendirmesi	19
4.2. Canlı Spermatozoon Değerlendirmesi.....	20
4.3. Akrozom Reaksiyonu Değerlendirmesi.....	22
4.4. Membranı Sağlam Spermatozoon Oranı	24
5. TARTIŞMA.....	26
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	29
KAYNAKLAR.....	30
ÖZGEÇMİŞ.....	35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Da	: Dalton
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
kDa	: Kilodalton
mM	: Milimolar
Na₂HPO₄	: Disodyum Fosfat
TCG	: Tris – Sitrik Asit - Glikoz
µL	: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kontrol ve deney gruplarının oluşturulması.	16
Şekil 2. 24. saatteki progresif motilite değerlendirmesi.....	19
Şekil 3. 48. saatteki progresif motilite değerlendirmesi.....	20
Şekil 4. Canlı spermatozoon oranı 24. Saat	21
Şekil 5. Canlı spermatozoon oranı 48. Saat	21
Şekil 6. 24. saatteki akrozom reaksiyonu gösteren spermatozoon oranı.....	23
Şekil 7. 48. saatteki akrozom reaksiyonu gösteren spermatozoon oranı.....	23
Şekil 8. 48. saatteki akrozom reaksiyonu değerlerinin karşılaştırılması.	24
Şekil 9. 24. saatteki membranı sağlam spermatozoon oranı.	25
Şekil 10. 48. saatteki membranı sağlam spermatozoon oranı.	25

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Deneyde kullanılan TCG sulandırıcısı formülü.....	15
Tablo 2. 15 °C’de ki spermatolojik Değerlendirme Sonuçları.	25
Tablo 3. 5 °C’de ki spermatolojik Değerlendirme Sonuçları.	25

ÖZET

SERİSİNİN FARKLI DERECELERDE SAKLANILAN TAVŞAN SPERMATOZOONLARI ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Özcan T. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama (Veteriner) Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2019.

İpek serisini, ipek böceği türü olan *bombyx mori*'den elde edilen doğal bir makro moleküler proteindir. Serisin ham ipek üretimi aşamasında, farklı amaçlarda kullanmak amacıyla elde edilebilir. Oksidasyona karşı dirençli, antibakteriyel, UV dirençli ve nemi kolayca absorbe edici gibi özelliklere sahip olan serisin, bu özellikleri gereği farklı alanlarda kullanılabilir bir proteindir. Serisin ve serisin kompozitleri, biyomateryal ve biyomedikal materyal olarak kullanılabilir. Tavşan spermasının uygun şartlarda saklanılmasına yönelik yeni yöntemlerinin geliştirilmesi için birçok çalışma yapılmaktadır. Bu araştırma, tavşan spermalarının kısa süreli saklanmasıyla sperma sulandırıcılarına serisin ilavesinin spermatolojik parametreler üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla toplanan sperma 1:4 oranında TCG ile sulandırıldı. Sulandırılan sperma, 1,5 ml hacminde 2 ayrı Eppendorf tüpüne kontrol ve deney grubu olmak üzere ikiye ayrıldı. Deney grubuna, sulandırılmış spermaya ilave olarak 170µL serisin ilave edilerek %0.5 oranı sağlandı. Her iki 1,5 ml hacmindeki tüp 2 ayrı 0.5 ml'lik Eppendorf tüplerine dağıtılarak 24. 48. saatlerde değerlendirmek üzere inkubasyona bırakıldı. Aynı işlem her iki sıcaklık (5 °C ve 15 °C) için uygulandı. Sıcaklıklar ayrı ayrı değerlendirildiğinde 24. ve 48. saatlerdeki spermatolojik değerlendirmelerde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark açığa çıkmadığı gözlemlendi ($P>0.05$). Derece faktörü eşdeğişken olarak alındığında grup faktör düzeyleri olan kontrol ve deney gruplarının 48.saatteki akrozom reaksiyonu ortalamaları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlendi ($P< 0.05$).

Anahtar Kelimeler: serisin, spermatozoon, sulandırıcı, tavşan,

ABSTRACT

EVALUATION OF THE PRESERVATIVE EFFECT OF SERICIN ON RABBIT SPERMATOZOONS CHILLED TO DIFFERENT DEGREES

Ozcan T. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute Reproduction and Artificial Insemination (Veterinary) Program, Master's Thesis, Aydın, 2019.

Silk is a natural macro-molecular protein derived from the silkworm species *bombyx mori*. Sericin can be obtained in raw silk production stage for different purposes. Sericin, which has properties such as oxidation resistant, antibacterial, UV resistant and easily absorbing moisture, is a protein that can be used in different fields due to these properties. Sericin and sericin composites can be used as biomaterial and biomedical material. Many studies have been carried out to develop new methods for storing rabbit sperm under appropriate conditions. The aim of this study was to determine the effects of sericin addition to semen diluents on spermatological parameters in short term storage of rabbit sperm. Semen collected for this purpose was diluted with TCG at a ratio of 1: 4. The diluted semen was divided into two separate Eppendorf tubes with a volume of 1.5 ml as control and experimental groups. For the experimental group, 170 μ L sericin was added to the diluted sperm in order to obtain 0.5% ratio. Both 1.5 ml volumes were dispensed into 2 separate 0.5 ml Eppendorf tubes and allowed to incubate at 24th and 48th hours for evaluation. The same procedure was applied for both temperatures (5 ° C and 15 ° C). When the temperatures were evaluated separately, it was observed that there was no statistically significant difference between the groups at the 24th and 48th hours ($P > 0.05$). When the degree factor was taken as co-variant, it was observed that there was a statistically significant difference between the two groups in terms of the mean acrosome reaction in the 48th hour of the control and experimental groups which were group factor levels ($P < 0.05$).

Keywords: extender, rabbit, sericin, spermatozoon,

1. GİRİŞ

Suni tohumlamanın ilk uygulanmaya başladığı yıllarda hayvanlardan toplanan sperma örnekleri hiçbir işleme tabi tutulmadan taze olarak kullanılmaktaydı. Bu durum yeterli sayıda tohumlanacak dişinin bulunmaması durumunda da alınan spermaların kullanılmadan atılmasına sebep oluyordu. Bununla birlikte erkek damızlıklardan gereği kadar ve uzun süre yararlanmayı önlediği de bilinmektedir.

Verim özellikleri iyi olan hayvan türlerinin genetik gelişimi, sürdürülebilir bir hayvancılık endüstrisinin başarısı için temel yapı taşlarından biridir. Bu bağlamda suni tohumlama, modern hayvan üretiminin ilerlemesine katkıda bulunan tartışmasız en önemli araçlar arasında sayılır. Suni tohumlama aracılığıyla, genetik açıdan üstün bir erkekten alınan bir ejakülat sperma ile modern hayvancılık açısından kaliteli genlerin yurt içi ve yurt dışındaki dağılımını en üst düzeye çıkarmak adına birden çok dişiye gebe bırakmak mümkündür. Bununla birlikte suni tohumlama, hayvanlar arasındaki fiziksel teması ortadan kaldırarak çiftleşme yoluyla bulaşabilen hastalıkların yayılmasını da önlemektedir. Ancak suni tohumlamanın bu avantajları, damızlık hayvandan alınacak spermanın dış ortamda birkaç saatten fazla yaşayamamasına istinaden spermanın soğuk ortamda saklanma zorunluluğunu da beraberinde getirmektedir (Bailey vd., 2000).

20. yüzyılın başlarından itibaren özellikle koyun, keçi ve sığır gibi çiftlik hayvanlarının spermalarının uygun koşullarda saklanarak suni tohumlama uygulamalarında kullanılması ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır (Salamon ve Maxwell, 1995). Spermanın saklanması, spermatazoonların uygun sulandırıcılar içerisinde hareketlerinin sınırlandırılması ile gerçekleştirilmektedir. Bu da ancak sperma ısısının uygun biçimde düşürülmesi ile olmaktadır. Günümüzde erkek gamet hücrelerinin muhafazasında iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar 5 C derece sıcaklıkta saklama ve dondurma yöntemleridir. Her iki yöntemde de spermanın yaşamsal işlevlerini saklama sıcaklığı, soğutma hızı, sulandırıcının kimyasal bileşenleri ve kullanılan kriyoprotektif maddeler gibi faktörler belirlemektedir.

Dondurma yöntemi; spermanın daha düşük ısılarda saklanması esasına dayanır. Bu tekniğin dayandığı temel ilke, uygun teknikler ile spermanın ısısının 0 C derecenin altına kadar düşürülerek, sıvı azot içinde -196 C derecede muhafaza edilmesidir. Sperma alındıktan sonra gerekli makroskobik ve mikroskobik kontrolleri ve değerlendirmeleri yapılır. Daha

sonra Sperma Hücreyi soğuk şokunun etkilerinden koruyan kriyoprotektif maddelerle içeren uygun bir sulandırıcı ile sulandırılarak payetlere çekilir. Payetler daha sonra -110 C derecede sıvı azot buharında dondurularak -196 C derecede sıvı azot içerisinde saklanır. Spermayı dondurarak uzun süreli saklama, spermaların taşınmasını kolaylaştırmakta, spermanın kontrol altına alınmasına izin vermekte ve damızlık hayvanın ölümünden sonra bile üstün özellikli genetik materyalin uzun süre kullanılmasını sağlamaktadır. Sperma dondurma işlemi, verim özellikleri açısından önemli hayvan türleri özellikle boğa için dünya çapında bir endüstri kolu haline gelmiştir. Soyu tükenmekte olan türlerin veya değerli soyların biyolojik çeşitliliğini korumak için genom kaynak bankacılığı da spermanın dondurulması işleminden çok büyük fayda sağlamaktadır (Bailey, 2000).

Dondurma işlemi; hücre ve dokulardan oluşan biyolojik materyalin uzun süre saklanmasına olanak sağlayan bir yöntemdir. Spermatozoonların dondurma işleminden zarar görmelerinin en önemli nedenleri arasında kullanılan sulandırıcıların oluşturduğu buz kristalleri sayılabilir. (Aisen ve ark, 2005; Bailey ve ark, 2000). Gliserol, DMSO, etilen glikol ve propilen glikol hücre ve dokuların dondurulması amacıyla kriyoprotektan olarak çok yaygın biçimde kullanılmaktadır (Bhattacharya ve Prajapati, 2016). Bu ajanlar hücre stoplazmasına geçmek suretiyle buz kristali oluşumunu engelleyerek koruyucu etki yaparlar. Ancak, bu ajanların tamamı hemen tüm hücre tipleri için yüksek düzeyde toksiktir (Bhattacharya ve Prajapati, 2016). Bu olumsuz etkiler çözüm sonu yaşama oranlarını ve spermatozoonların fertilitite yeteneklerini azaltır.

Spermanın kısa süreli saklanma yöntemi ise erkek damızlıktan alınan spermanın birkaç gün içerisinde kullanılmasını sağlamaktadır. Sperma alındıktan sonra gerekli makroskobik ve mikroskobik kontrolleri ve değerlendirmeleri yapıldıktan sonra uygun bir sulandırıcı ile sulandırılarak suni tohumlamada kullanmak amacıyla 4-5 C derecede muhafaza edilir. Kısa süreli saklamalarda sulandırıcının kompozisyonu, sulandırma oranı, saklama ısısı ve şartlarıyla ilişkili olmaksızın, sadece saklama süresinin uzamasına bağlı olarak da spermatozoonlar zarar görebilmektedir. Saklama sırasında ortaya çıkan başlıca değişiklikler, spermatozoon motilitesinin azalması ve morfolojik bütünlüğünün bozulması olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu değişikliklere spermatozoonun plazma membranında lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan reaktif oksijen türleri (serbest oksijen radikalleri) olarak bilinen toksik metabolizma ürünlerinin birikimi de olumsuz yönde etkilemektedir (Atiken,1989).

Spermatozoonlarda meydana gelen bu tarz değişiklikler, spermatozoon membran fosfolipitlerinde gelişen lipit peroksidasyonu ve bunun sonucu olarak ortaya çıkan serbest

oksijen radikallerin oluşturduğu yıkımlara bağlı olabilmektedir. Spermatozoonların serbest oksijen radikallerine ve onların neden olduğu peroksidasyona oldukça duyarlı olmasının nedeni, spermatozoonların plazma membran yapısının doymamış yağ asitleri bakımından zengin olmasıdır (Salamon ve Maxwell, 2000). Serbest oksijen radikalleri spermatozoonların membranında yaptığı olumsuz etki sonucu membran akışkanlığını etkiler. Spermatozoonlarda plazma membranının bütünlüğü erkek fertilitesi açısından büyük önem taşır. Spermatozoonların kendilerini çevreleyen ortamla madde alışverişlerinin yanı sıra kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon başlangıcında spermatozoonların oosit yüzeyine tutunabilmesi için de yine aktif bir plazma membranına gereksinim vardır (Atiken,1989; Töpfer-Petersen ve ark., 1990). Bu olaylar sonucunda da, spermatozoanın dışı genital kanalında yaşam süresinin kısalması ve transportunun gerçekleşmemesi ve fertilitede düşüşler ortaya çıkmaktadır.

Sperma saklama yöntemlerinin geliştirilmesi, yeterli fertilitite oranlarının yakalanmasına katkıda bulunacaktır. Ne yazık ki sperm hücreleri soğukta bekletmeye ve dondurmaya karşı sınırlı kapasiteye sahiptir. Bu durum kısmen, serbest oksijen radikallerinin sebep olduğu lipid peroksidasyonun, spermatozoon içinde bulunan lipidlere, proteinlere, nükleik asit ve şekerlere zarar vermesinden kaynaklanmaktadır.

İpek serisini, ipek böceği türü olan *bombyx mori*'den elde edilen doğal bir makromoleküler proteindir. Serisin ham ipek üretimi aşamasında, farklı amaçlarda kullanmak amacıyla elde edilebilir. Serisin özellikleri gereği kullanışlı bir proteindir ve oksidasyona karşı dirençli, antibakteriyel özellikte, UV dirençli ve nemi kolayca absorbe edebilir özelliktedir. Serisin ve serisin kompozitleri, biyomateryal, biyomedikal materyal, fonksiyonel membranlar ve fiber olarak kullanılabilir (Zhang, 2014).

Çeşitli hayvan türlerinden elde edilen spermanın toplandıktan sonra gerek soğukta bekletilerek gerekse dondurularak muhafazası bazı zorluklar içermektedir. Spermanın kısa ve uzun süreli muhafazası amacıyla yapılan alımlar ve geliştirilen teknikler, döl veriminin geliştirilmesi açısından olumlu sonuçların alınmasına yardımcı olmaktadır. Bu amaçla yürütülen çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Tavşan sperması soğuk şartlarda saklamaya veya dondurulmaya karşı oldukça kısıtlı bir kapasitesi sahiptir. (Aziza ve ark, 2017). Bu sebepten dolayı ülkemizde her ne kadar tavşan yetiştiriciliği gelişmemiş olsa da bu çalışmada tavşan sperması model olarak kullanılmıştır. Tavşan spermasının uygun şartlarda uygun şartlarda saklanılmasına yönelik yeni yöntemlerinin geliştirilmesi için birçok çalışma yapılmaktadır.

Bu araştırma, tavşan spermalarının kısa süreli saklanmasında sperma sulandırıcılarına katılan serisinin spermatolojik özelliklere üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spermmanın Saklanması

Tavşanlarda laboratuvar ortamında yapılan araştırmalarda taze, kısa sürede bekletilmiş veya dondurulmuş-çözdürülmüş spermalar ile başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Kısa süreli bekletilen sperma ile elde edilen gebelik oranlarının düşük olduğu bildirilmesine rağmen, yapılan araştırmalar kısa süreli bekletilen veya dondurulmuş-çözdürülmüş sperma ile elde edilen gebeliklerin normal çiftleşme sonucu elde edilen gebelik oranı kadar olabileceğini göstermiştir (Koefoed, 1970).

2.1.1. Spermmanın Kısa Süreli Saklanması

Kısa süreli saklama metodunun esasını sıvı durumda olan spermmanın ısısının 0 C derece ile -15 C derece arasında bir noktaya kadar düşürülmesi ve bu derecelerde spermatozoonların reversible olarak inaktive edilmesi oluşturmaktadır. Spermmanın kısa süreli muhafazası için daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda en uygun olan ısı dereceleri üzerine çeşitli görüşler ortaya konulmuştur. Bazı araştırmacılar kısa süreli saklama için en uygun sıcaklıkların 10 - 15 C derece olduğunu (Salamon ve Maxwell 2000), bazıları da koç ve boğa spermalarının fertilitelerini devam ettirebilmeleri için 0 - 5 C derecelerin daha iyi olduğunu ifade etmişlerdir (Johnson ve ark, 2000; Huo ve ark, 2002).

Erkek hayvanlardan alınan spermmanın sağlıklı bir şekilde muhafaza edilebilmesi için uygun ortamın oluşturulması ve kaliteli bir sperma sulandırıcısına gereksinim vardır. Kaliteli bir sperma sulandırıcısı spermatozoonlar için gerekli olan enerji gereksinimini karşılamalı, bakteriyel üremeyi kontrol etmeli, spermayı soğuk şokuna karşı korumalı ve ortamın pH değerini dengeleyebilmelidir

Spermatozoonlarda geri dönüşü olmayan bozukluklar meydana getirebilen ani ısı değişikliklerine soğuk şoku adı verilir. Spermayı düşük ısılarda saklarken soğuk şokuna uğrayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle spermatolojik özellikleri belirlenmiş ve sulandırılmış spermanın 5 C dereceye soğutulması sırasında çok dikkatli olunmalıdır. Çünkü 17 C derecenin altındaki ani ısı değişikliklerinde özellikle spermanın akrozomunda olmak üzere irreversible bozukluklar meydana gelebilecektir. Sonuçta oluşabilecek değişiklikler spermanın potansiyel fertilitasını düşürebilir niteliktedir (Maxwell ve Salamon 1993; Salamon ve Maxwell 2000).

Spermatozoonların plazma membranı, akrozom ve mitokondri bölümleri soğuk şokuna karşı oldukça duyarlı yapılardır. Soğuk şoku, spermatozoanın motilite ve fertilitate gücünün azalmasına sebep olan önemli etkenler arasındadır. spermatozoonların plazma membranlarında yer alan lipidler fiziksel bir değişikliğe uğrayarak yumuşak ve akışkan durumlarını yitirir (Alberts ve ark, 2002). Erkek damızlıklardan alınan sperma örneklerini 5 C derecede kısa süreli saklama tekniğiyle 2-3 gün süreyle saklamak mümkün görünmektedir. Fakat zamana bağlı olarak 4-8 saatten sonra spermatozoonların motilitesinde sürekli bir azalma ve morfolojik bozukluklarda artma meydana gelmektedir. Daha önce gerçekleştirilen bir araştırmada, kısa süreli saklanan koç spermasının mitokondriyal aktivitesinin ve akrozomal bütünlüğünün azaldığı tespit edilmiştir (Güngör ve ark. 2017). Süre uzadıkça spermanın kalitesinde meydana gelen bu azalma, dikkate alınması gereken bir durumdur. Bu olaylar sonucunda da, spermatozoon motilitesinde ve membran bütünlüğünde bozulmalar, bunların sonucu olarak fertilitate oranlarında düşmeler yaşanmaktadır (Bilodeau ve ark, 2000; De Lamirande ve ark, 1997).

Spermatozoonların dışı genital kanalında yaşam süresinin kısılması ve transportunun gerçekleşmemesi ve fertilitate düşüşler ortaya çıkmaktadır (Maxwell ve Saloman 1993; Maxwell ve Stojanov 1996). Bununla beraber kısa süreli saklama sürecinde DNA hasarında artışlar meydana gelerek bu da infertilite, kusurlu embriyonel gelişim, implantasyon kusuru ve tekrarlayan abortlara neden olmaktadır (Avdatek ve ark, 2018). Saklama süresince her gün spermanın motilite ve morfolojik muayenelerinin yapılması ve tohumlama dozunun bulgulara göre yeniden hesaplanmasının yararlı olacağı bildirilmektedir (Maxwell ve Saloman 1993).

Spermatozoon membran yapısı, dış etkenlere karşı hassas oluşu ve spermanın kısa süreli bekletilmesi ve dondurulmasının gerekliliği sonucu farklı türlerin spermalarında farklı sulandırıcılar ve antioksidan maddeler denenmiştir. Roof ve ark (2011) yaptıkları çalışmada teke spermasının dondurulmasında soya bazlı ve yumurta sarısı bazlı iki farklı ticari ürünü

karşılaştırmasını yapmış ve soya bazlı sulandırıcı ile sulandırılan keçi spermasının dondurma işlemi öncesi ve sonrasında daha yüksek motiliteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. (Roof ve ark 2012). Sandra ve ark. (2012) köpek spermasını Tris – yumurta sarısı, CaniPRO™ , Uppsala Equex-2 sulandırıcıları ile sulandırıp 10 gün boyunca sperma kalitesini değerlendirmiş ve Tris-yumurta sarısı ve CaniPRO™ sulandırıcıları ile sulandırılan köpek spermasının Uppsala Equex-2 sulandırıcısı ile sulandırılan köpek spermasına göre 10. günde; motilite, ölü-canlı, membran bütünlüğü açısından değerlendirildiğinde daha iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. (Goericke-pesch ve ark, 2012).

Bazı memeli türlerinde, seminal plazmada bulunan parçacıklı fraksiyonun üreme fizyolojisinde önemli rol oynadığına dair kanıtlar vardır. Partiküllerin kapasitasyona engel olması, partiküllerin lipid yapısı ve ektoenzimlerin salınmasına atfedilir. Seminal partiküller, yüksek oranda kolesterol ve şifingomyelin içerir. Birçok biyolojik membranın aksine spermatozoaların fosfolipid kolesterol oranı yaklaşık olarak 1:2 oranındadır. Fosfolipid ve kolesterolün membran akışkanlığının belirlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Spermatozoalarda kolesterol, akrozom reaksiyonu baskılar özelliğindedir. Hücre membranındaki sinyal aktarımının başlatılması için kolesterol salınımı gereklidir (Castellini, 2007).

2.1.2 Spermmanın Dondurularak Saklanması

Spermmanın dondurulması veya soğuk şartlarda saklanması işlemlerinde, spermatozoonları soğuk şokuna karşı korumak ve bu işlemler sırasında geri dönüşümsüz hasarın veya fonksiyonel zayıflıkların önlenmesi açısından önemlidir. Çeşitli türlerin spermalarında kullanılan sulandırıcıların, içerisinde bulunan koruyucu maddelerin bileşimi benzerlik gösterse de türe özgü sperma özellikleri, araştırmacıları bu sperma sulandırıcılarını ve protokolleri optimize etmeye zorlamıştır (Mocé & Vicente, 2009).

Dondurma yöntemi spermmanın daha düşük ısılarında saklanması esasına dayanır. Bu tekniğin dayandığı temel ilke, uygun teknikler ile spermmanın ısısının eksi C dereceye kadar düşürülerek, sıvı azot içinde -196 C derecede muhafaza edilmesidir. Uzun süreli saklama yönteminde, uygun saklama koşullarında sperma potansiyel fertilitasını yıllarca koruyabilir.

Dondurma işleminde, spermatozoon hücrelerini soğuk şokunun etkilerinden koruyan kriyoprotektif maddelerle içeren uygun bir sulandırıcı ile sulandırılarak payetlere çekilir. Payetler daha sonra -110 C derecede sıvı azot buharında dondurularak -196 C derecede sıvı

azot içerisinde saklanır. Spermanın fizyokimyasal yapısı hem donma hem de çözme işlemleri sırasında şekillenen buz kristalleri nedeniyle zarar görür.

Spermayı dondurarak uzun süreli saklama, spermaların taşınmasını kolaylaştırmakta, spermanın kontrol altına alınmasına izin vermekte ve damızlık hayvanın ölümünden sonra bile üstün özellikli genetik materyalin uzun süre kullanılmasını sağlamaktadır. Sperma dondurma işlemi, verim özellikleri açısından önemli hayvan türleri özellikle boğa için dünya çapında bir endüstri kolu haline gelmiştir. Soyu tükenmekte olan türlerin veya değerli transgenik soyların biyolojik çeşitliliğini korumak için genom kaynak bankacılığı da spermanın dondurulması işleminden çok büyük fayda sağlamaktadır (Bailey, 2000).

Spermasının saklanması spermanın dondurulması veya soğuk şartlarda bekletilmesi işlemlerinde, spermatozoonları soğuk şokuna karşı korumak ve bu işlemler sırasında geri dönüşümsüz hasarın veya fonksiyonel zayıflıkların önlenmesi açısından önemlidir. Çeşitli türlerin spermalarında kullanılan sulandırıcıların, içerisinde bulunan koruyucu maddelerin bileşimi benzerlik gösterse de türe özgü sperma özellikleri, araştırmacıları bu sperma sulandırıcılarını ve protokolleri optimize etmeye zorlamıştır (Mocé ve Vicente, 2009).

Dondurma işlemi; hücre ve dokulardan oluşan biyolojik materyalin uzun süre saklanmasına olanak sağlayan bir yöntemdir. Spermatozoonların dondurma işleminden zarar görmelerinin en önemli nedenleri arasında kullanılan sulandırıcıların oluşturduğu buz kristalleri sayılabilir. (Aisen ve ark, 2005; Bailey ve ark, 2000). Gliserol, DMSO, etilen glikol ve propilen glikol hücre ve dokuların dondurulması amacıyla kriyoprotektan olarak çok yaygın biçimde kullanılmaktadır (Bhattacharya ve Prajapati 2016). Bu ajanlar hücre stoplazmasına geçmek suretiyle buz kristali oluşumunu engelleyerek koruyucu etki yaparlar. Ancak, bu ajanların tamamı hemen hemen tüm hücre tipleri için yüksek düzeyde toksiktir (Bhattacharya ve Prajapati, 2016). Bu olumsuz etkiler çözüm sonu yaşama oranlarını ve spermatozoonların fertilite yeteneklerini azaltır.

2.2. Tavşanlarda Üreme

2.2.1. Tavşanlarda Pubertas

Yeni Zellanda ırkları vücut ağırlıkları 1,8-7,3 kg arasında değişmektedir. Bu ırklar pubertasa (seksüel olgunluğa) 20 haftada ulaşmaktadır (Castellini, 2007). Pubertasa ulaştıkları 20. Haftada (4-5 aylık) ortalama ağırlıklarının 2-2,5 kg arasında değişmektedir .

2.2.2. Erkek Tavşan Reprodüktif Organ Özellikleri

Evcil tavşanlar son derece fertil, çabuk üreyen ve kısa reprodüktif siklusa sahip hayvanlardır. Erkek tavşanlar, sperma üretimi stabilize olduğunda -yaklaşık 32 haftalık- yaşta üremeye hazır durumdadır. Erkek üreme organlarını, testis, epididimis, ampula, vas deferens, uretra, penis, preputial bezler, ve aksesör bezler oluşturur. Penisin cranialinde, ürogenital açıklıkta bulunan iyi gelişmiş, external genital organlardan scrotum, tavşanlara özgü bir özellik kazandırır. Scrotumun ana görevi testisleri abdominal kaviteden uzakta tutup, normal vücut sıcaklığından 0.5 – 4 C derece daha düşük ortamda tutmaktır. Bu durum spermatogenezis için gereklidir. Kriptorşidi tavşanlar cinsel birleşmeye devam edebilir ancak fertilite oranı çok düşüktür. Scrotum gelişmiş ancak testis palpe edilebilir durumda değilse, testisler muhtemelen inguinal kanala veya abdominal kaviteye geri çekilmiştir (Campos ve ark, 2014).

2.2.3.Tavşan Spermasının Karakteristik Özellikleri

Diğer türlerin sperma özelliklerinden farklı olarak, tavşan sperması düşük hacimde ve düşük yoğunluktadır (0.4-0.5 ml ve $150-500 \times 10^6$ spermatozoon/ml). Bu karakteristik özellik ırka veya genetik hatta bağlıdır. Buna ek olarak, tavşan seminal plazması, epididimal kaynaklı bir glikoprotein içerir ve sperma kapasitasyon sürecini inhibe eder. Bununla birlikte damlacıklar ve veziküller içerir. Damlacık ve veziküllerin görevi net olarak açıklanmasada buna Castellini ve ark, (2006) yılında bu damlacık ve veziküllerin motilite, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunda farklı görevleri olduğunu belirtmiştir. Damlacıklar, kolesterol yönünden son derece zengindir ve muhtemelen spermatozooları soğuk şokuna karşı koruyarak ve erken akrozom reaksiyonun önüne geçerek sterol donoru gibi davranırlar. Öte yandan veziküller, insan prostazomlarına çok benzer şekilde kolesterol/fosfolipid oranına sahiptir ve bu durum veziküllerin, tavşan spermatozoonlarının fertilitesi üzerinde aktif rol oynadığını gösterir (Mocé ve Vicente, 2009).

Kolesterol, spermatozoon membranın akışkanlığını, fosfolipidlerin yağ açıl zincirlerini etkileyek modüle eder. Kolesterol:fosfolipid oranı, membran akışkanlığını tanımlamada son derece önemlidir. Castellini ve arkadaşları (2006), diğer türlerden farklı, olarak tavşan spermatozoonlarının plasma membran kolesterol:fosfolipid oranının yüksek (0.88-1.56) olduğunu bildirmişlerdir. Bununla beraber, insan sperm hücrelerine benzer şekilde, yapısal olmayan yağ asidi/yapısal yağ asidi (0.8) oranı düşüktür (Mocé ve Vicente, 2009).

Tavşan sperması bu karakteristik özellikleri ile, membranına orta seviyede bir akışkanlık sağlar ve çevresel strese karşı dirençli hale getirir. Böylece soğuk şokuna karşı karakteristik bir özelliği vardır (Mocé ve Vicente, 2009).

Tavşan spermasında bulunan jelimsi katman vesiküler bez originli olup androjen bağımlıdır. Bu jelimsi oluşum yüksek oranda östojenik substans, sitrik asit ve düşük oranda früktoz içerir. Günde iki kere sperma alındığı takdirde, ilk ejagulat jelatin katman % 75.4 oranında bulunabilirken 2. ejagulatta % 4.8 oranında bulunabilir. Bu jelatimsi tabakaya birçok sperm hücresi takılmış olabilir ancak dilue edilip inkubatör'de 37 C derecede bekletildiği zaman jelatinöz tabakanın çözüldüğü ve sperm hücrelerinin tekrar serbest kalıp ve aktifleştiği gözlemlenmiştir (Campos ve ark, 2014).

Tavşanlarda ejakulasyonun, 2 sperma fraksiyonu şeklinde gerçekleştiğine inanılmaktaydı. Daha sonra yapılan çalışmalar, vezikül bezinde bulunan sıvının içeriğinin, akışkandan jelli yapıya doğru değiştiğini göstermiştir (Holtz ve Foote, 1978).

Sperma alınma işlemi öncesi, erkek tavşanları stimule etmenin, sperma konsantrasyonunu artırdığı bildirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda kafesin en üstüne dişi tavşan konulabilir. Suni vagina tipleri tavşanlardan sperma alınması amacıyla kullanılabilir. Geniş sperma toplama deliğine geniş suni vaginalar, sperması alıncak tavşan sayısında artışa sebep olur. Sperma alınması amacıyla kullanılan suni vagina steril olmalıdır. Hijyenik koşulların sağlanması ve bakteriyel kontaminasyonun engellenmesi son derece önemlidir. Genel bir kural olarak, toplama sırasında spermaların yaşayacağı herhangi şok durumu (sıcaklık, kimyasal) fertilité düşüklüğüne sebep olabilir. Sperma toplanmasından 5 dakika içinde, soğuk-sıcak şokundan kaçınmak için toplanan sperma 1/2 - 1/5 oranında sulandırılmalıdır. Genel olarak spermaya uygulanan her işlemin sperma kalitesi üzerinde olumsuz etkisi vardır (Castellini, 2007).

Sperma alınma işleminin haftada iki defa yapılması en yüksek kalite ve sayıda hücre içeren sperma toplanmasına olanak sağlar. Bunun tam aksine, sperma toplama işlemi için uzun süreli beklemler (2 haftada bir defa muhtemelen seksüel uyarılmanın azlığı sebebi ile sperma kalitesinde düşüklüğe sebep olur. Sperma toplama sıklığı sadece sperm konsantrasyonunu etkilemez ayrıca seminal granüllerin konsantrasyonunu da etkiler (Castellini, 2007).

Johinke ve ark (2014) yaptıkları çalışmada farklı derecelerde ve sulandırıcılarda tavşan sperması bekletilmesinin sperma kalitesinin üzerinde etkilerini incelemişlerdir. Total sperm motilitesi, ölü-canlı oranı, akrozom reaksiyonu, mitokondriyal fonksiyon, DNA hasarı parametreleri incelendiğinde en iyi kalitede spermayı 15 C derecede kullandıkları sulandırıcı ile elde ettiklerini belirtmişlerdir. Ancak reaktif oksijen radikal üretiminin 5 C derecede daha az olduğunu bildirmişlerdir. Buna benzer olarak spermaların fertilité özelliği incelendiğinde, 5 C derecede inkube edilen tavşan spermatozoalarının 15 C derecede inkube edilen tavşan spermatozoalarına göre daha fertil olduğunu belirtmişlerdir (Johinke ve Bathgate, 2014).

Rosato ve Iaffaldano, 5 C derecede bekletilen spermanın 15 C derecede bekletilen spermaya göre daha kaliteli sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir (Rosato ve Iaffaldano, 2011).

2.3. Serisin Hakkında Genel Bilgiler

2.3.1. Serisin'in Moleküler Yapısı

İpek böceği (*bombyx mori*) kozası ana yapısında 2 farklı protein tanımlanmıştır. Posterior ipek bezinden salgılanan Fibroin ve alt üniteleri ipek ipliğini şekillendirir. İpek bezinin ortasından salgılanan Serisin, ikiz ipliklerin birbirine iyice yapışmasını sağlar. Serisin ailesindeki proteinler yüksek oranda (%30) serin içerir ve kozadaki diğer proteinleri ve ipek böceği pupalarını çeşitli stres durumlarına ve hidrofilik ortama karşı korur (Tsujimoto ve ark, 2001). Serisin ipek liflerini kaplayan yapışkan bir proteindir. Bu durumun kozanın ışığa karşı stabiletisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Rajkhowa ve ark, 2013).

Serisin, moleküler ağırlığı 200kDa'dan büyük suda çözünebilir bir bileşimdir. 18 farklı aminoasit içerir ve bunların birçoğu hidroksil, karboksil ve amino gruplar gibi güçlü polar gruplara sahiptir. Özellikle yüksek oranda hidroksil grup içeren aspartik asit ($\geq 19\%$) ve serin ($\geq 32\%$) oranı fazladır (Garel, 1997).

İpek serisini, ipek böceği türü olan *bombyx mori*'den elde edilen doğal bir makro moleküler proteindir. Ham ipek üretimi aşamasında, serisin farklı amaçlarda kullanmak amacıyla elde edilebilir. Ayrıca, serisin elde edilmesi, ipek üretiminin çevresel etkiside azaltır. Serisin özellikleri gereği kullanışlı bir proteindir. Serisin, oksidasyona karşı dirençli, antibakteriyel özellikte, UV dirençli ve nemi kolayca absorbe edebilir özelliktedir. Serisin ve serisin kompozitleri, biyomateryal, biyomedikal materyal, fonksiyonel membranlar ve fiber amaçlı kullanılabilir (Zhang, 2014)

Serisin, polar çözücüler ile çözülüp, asit veya alkali solüsyonlarda hidrolize edildiğinde ve proteazlar ile indirgenildiğinde, elde edilen serisin molekülünün büyüklüğü sıcaklık, pH ve uygulama süreci gibi faktörlere bağlı olarak değişir. Düşük moleküler ağırlıklı serisin peptitleri (≤ 20 kDa) veya serisin hidrolizatları deri bakım kremleri, saç kremleri gibi kozmetik ürünler için kullanılır. Yüksek moleküler ağırlıklı serisin peptitleri ise (≥ 20 kDa) genellikle biyomateryal, indirgenmiş biyomateryal, bileşik polimerler, fonksiyonel membran, hidrojel ve fonksiyonel fiber olarak kullanılır (Zhang, 2014).

2.3.2. Serisin Çalışmaları

Serisinin farklı hücrelerde koruyucu etkisinin kanıtlandığı çalışmalar mevcuttur. LI You-gui ve ark. (2008) fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada deneysel olarak oluşturdukları alkol kökenli mide mukozası hasarı tedavisinde serisin peptidini kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuca göre serisin peptidinin mide mukozası üzerinde koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir. Serisin peptidinin bu koruyucu etkisini etanolün ürine eliminasyon hızını artırması ile ilişkili olduğunu düşünmüşlerdir. Serisin peptidinin ayrıca mide mukozası yapısı ve gastrik mitokondriyal fonksiyonları üzerinde koruyucu etkisi vardır (Dash ve ark. 2011).

Kumar ve ark (2015) bufalo spermasında yaptığı çalışmada, sperma sulandırıcılarına 0.25-0.5 % serisin ilavesinin dondurma-çözdürme sırasında meydana gelen oksidatif strese karşı spermatozoonları koruduğunu bildirmişlerdir

Dash ve ark (2011) yayınladıkları raporda, ipek böceğinden elde edilen serisinin antioksidan özelliğinin olduğunu bildirmişlerdir.

Ghasemi ve ark (2018) yaptıkları çalışmada kryoprotektan olarak 0.5 % oranında serisin ilavesinin dondurulup çözündürülen fare epididimal sperm hücrelerinin kalitesini artırdığını ve embriyo gelişimini olumlu etkilediğini bildirmişlerdir.

Kato ve ark (1998) serisinin, in vitro ortamda lipid peroksidasyonunu baskılayarak antioksidan etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Üstelik, tirozinaz aktivitesini ihbide ettiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlarla beraber, serisinin gıda ve kosmetik endüstride doğal bir katkı maddesi olabileceğini önermişlerdir.

Miyamoto ve ark (2012) yaptıkları çalışmada, insan adipoz doku kök hücrelerinin dondurulması sırasında kryoprotektif ajan olarak serisinin pozitif etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Yasmin ve ark (2015) gerçekleştirdikleri çalışmada koyun oositleri üzerinde yaptıkları çalışmada, olgunlaşma kültürüne % 0,1 serisin ilavesinin, hücrel olgunlaşmaya ve fertiliteye olumlu katkıda bulunabileceğini belirtmişlerdir. Buna ek olarak, BSA yerine kimyasal tercih olarak hastalık taşıma riski bulunmayan sericin kullanılabileceğini bildirmişlerdir .

Khampieng ve ark (2015) yaptıkları çalışmada serisinin topikal antiinflamatuvar etkilerini araştırmışlardır. Bu araştırmada rat patisi üzerinde deneysel amaçla karragen yosunu ile oluşturdukları ödemde, ipek serisini yüklü alginat nano-parçacıkları içeren topikal hidrojel

uygulanmasının etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmalarında ipek serisini yüklü alginat nano-parçacıkları jelinin uygulanmasının karragen yosunu ile oluşturulan yangıyı öneleyebileceği hipotezlerini doğrulamışlardır.

2.3.3. Serisin Elde Edilme Yöntemleri

Serisinin ham ipekten ayrılması sudaki çözünürlüğü ile ilişkilidir. Protein tipik olarak B.mori kozasından elde edilir. İpeğin zamklı maddelerden uzaklaştırılmasında geleneksel yöntem olarak kullanılan sabun ve deterjanlar serisinin hidrolizine sebep olabilir. Bu doğal ağırlık ve fonksiyonel kayba yol açabilir. Serisinin çıkartılması ve kullanılabilir hale getirilmesinde 4 farklı yöntem sıralanabilir; yüksek basınç ile veya yüksek basınç uygulanmadan otoklav ile sıcaklık uygulaması, asidik veya alkali uygulamalar ve üre. Bütün bu uygulamalar sıcaklık, zaman, kimyasal uygulamalar solüsyon konsantrasyonu ile ilişkilidir (Kunz ve ark, 2016).

İpek üretimi, üretim sırasında çok fazla su ihtiyacı olan ve üretim sonucunda atık su miktarının yüksek olduğu endüstriyel sektörlerden biridir. Bu atık suyun bir kısmı, serisin elde etmek amacıyla zamksı maddelerin giderilmesi esnasında salınır. Bu işlem için 95 C derecede 1 saat süresince sentetik sabun solüsyonu kullanılır. 100 kg ipekten 22 kg serisin elde edilmesi beklenir.

Serisin, moleküler ağırlığı 10.000 ile 30.000 Da aralığında değişir ve ipek fibroinin dışında globüler bir yapıdadır. Zamksı maddelerin uzaklaştırılması işlemi sırasında, serisin, serisin peptidi veya moleküler ağırlığı 20.000 Da'dan az olan hidroliz serisine indirgenir. Bu peptid ve serisin hidrolizatının, mükemmel nem tutucu özelliği ve antioksidan, tirozinaz aktivitesi inhibasyonu, anti-kanser gibi birçok biyolojik aktivitesi vardır. Bu özellikleriyle birlikte serisin, kozmetik, biyomedikal, tekstil gibi birçok sektörde kullanılabilir (Vaithanomsat ve Kitpreechavanich, 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1 Deney Kurgusu

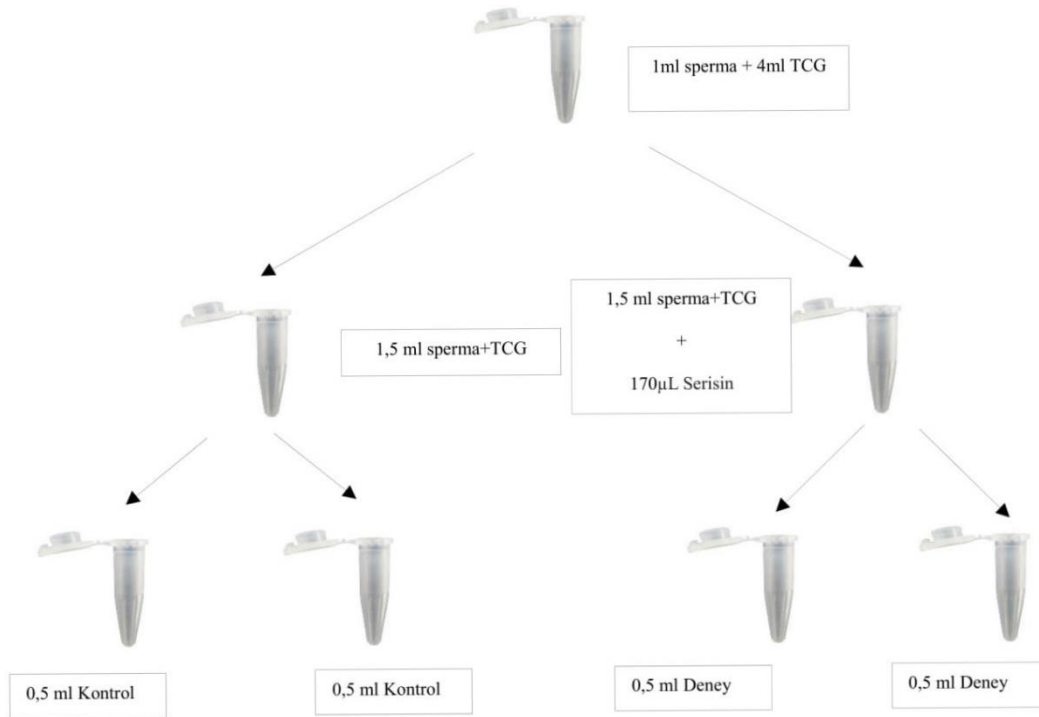
Araştırmada aynı kafes koşullarında (16-28 C derece aralığında) bulunan, 4-5 kg canlı ağırlığına sahip, ad libitum su ve yem verilen 6 erkek tavşandan kullanılmıştır. Toplanan spermalar ayrı ayrı tüplerde fiziksel ve laboratuvar özellikleri açısından değerlendirildi. Toplanan spermaların motilite yönünden muayenesi sonucu, motilite oranı %70 ve üzerinde, anormal spermatozoon oranları ise %20'nin altında olan ejakülatlar araştırmada kullanıldı. Bu kriterlerin üzerindeki spermalar toplama kadehlerinden otomatik pipet ile eşit miktarlarda alınarak önceden 37C derecelik su banyosunda bekletilerek ısıtılmış kuru bir deney tüpünde birleştirildi.

Toplanan sperma aynı sulandırıcı (TCG) ile sulandırıldı ve 2 ayrı grup oluşturuldu. Her iki grupta sulandırıcı olarak formülü belirtilen tris - sitrik asit – glikoz (TCG) sulandırıcısı kullanıldı. Gruplardan biri kontrol diğeri ise serisin ilave edilmiş grup olarak belirlendi.

Tablo 1. Deneyde kullanılan TCG sulandırıcısı formülü (Parrilla et al., 2002)

Tris	313.79 mM
Sitrik Asit	103.07 mM
Glikoz	33.3 mM
Kanamisin	80mg/l
pH	6.9
Osmotik Basınç	336 mOsm/L

TCG sulandırıcısı, sperma alımından 1 gün öncesinde hazırlanıp, +4 derecede buzdolabında ağzı parafilm ile sıkıca kapatılarak muhafaza edildi. Toplanan sperma 1:4 oranında TCG ile sulandırıldı. Sulandırılan sperma, 1,5 ml hacminde 2 ayrı Eppendorf tüpüne kontrol ve deney grubu olmak üzere ikiye ayrıldı. Deney grubuna, sulandırılmış spermaya ilave olarak 170µL % 0.5 serisin eklendi. Her iki 1,5 ml hacmindeki tüp 2 ayrı 0.5 ml'lik Eppendorf tüplerine dağıtılarak 24. 48. saatlerde değerlendirmek üzere inkubasyona bırakıldı.



Şekil 1. Kontrol ve deney gruplarının oluşturulması.

3.2. Yöntem

3.2.1. Serisin Solüsyonun Hazırlanışı

Sigma-Aldrich firmasından temin edilen Sericin (S5201) %0.5 oranında TCG sulandırıcısında sulandırılmıştır.

1.Grup 5 C derecede bekletilerek 24. ve 48. saatlerde muayene edildi. 2. Grup ise 15 C derecede bekletilmek üzere 24. ve 48. saatlerde muayene edildi. Spermatolojik değerlendirmelerde progresif motilite, canlı spermatozoon oranı, akrozom reaksiyonuna uğramış spermatozoon oranı ve membranı bütün spermatozoon oranı parametreleri değerlendirildi.

3.2.2 Spermatolojik Değerlendirmeler

3.2.3. Progresif Motilite

Isıtma tablalı bir mikroskopta (Olympos CX41) 10x lik objektifte CASA yöntemi ile belirlendi. Her bir değerlendirme için en az 1000 spermatozoon sayıldı. Progresif motilite incelemeleri inkubatörden çıkarılan tüpler ısıtma banyosunda 20 dakika bekletildikten sonra yapıldı.

3.2.4. Canlı Spermatozoon Oranı

Supravital boyama tekniğiyle belirlendi. Eosin-Nigrosin boyası kullanılarak hazırlanan frotilerde mikroskop yardımıyla en az 200 hücre sayıldı. Tam ve yarı boya alanlar ölü, boya almayanlar canlı olarak kabul edildi. Bu rakamlar üzerinden canlı spermatozoon oranları tespit edildi.

3.2.5. Akrozom Reaksiyonu

Spermatozoonların akrozom reaksiyon yüzdelerini saptamak amacıyla Commasie Blue boyama tekniği uygulanmıştır (Larson ve Miller, 1999). Bu amaç doğrultusunda sperma %4 paraformaldehit solüsyonu (110 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM NaH₂PO₄) ile 10 dakika süreyle fikse edildi. Sperma 2 kere santrifuj edildi ve 100mM amonyum asetat ile yıkandı. Son santrifuj

sonrasında sperma tekrar 100mM amonyum asetat ile muamele edilerek 50µl sperma-amonyum asetat suspansiyonu cam slayt üzerine froti çekildi ve kurumaya bırakıldı. Froti üzerinde bulunan sperma hücreleri Commasie boyası ile (0.22% Coomassie Blue G-250 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ), 50% methanol, 10%) 2 dakika süre ile muamele edildi. Boyama sonrası frotiler distile su ile yıkandı. Preparatlar 40x objektif ile ışık mikroskop altında incelendi. Toplamda 200 hücre sayıldı.

3.2.6. Spermatozoon Membran Bütünlüğünün Belirlenmesi

Bu amaçla HOS testi uygulanmıştır. Bu amaçla Jeyendran ve ark (1984) tarafından belirtilen yöntemden yararlanılmıştır. Sperma örneklerinin 100 mOsm/l'te ayarlanmış (Aisen ve ark., 2005) fruktoz solüsyonu içerisinde inkube edilmesinden sonra preparatlar hazırlandı ve boyandı. Hazırlanan preparatlardan toplam 200 hücre sayıldı, kıvrık kuyruklu spermatozoonlar pozitif olarak kabul edildi ve membran bütünlüğüne sahip spermatozoonların oranları belirlenmiştir.

3.2.7 Analiz Yöntemleri

Araştırmada elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart hataları saptandı. Sonuçlar SPSS (version 22, SPSS Inc.,Chicago IL USA) programı kullanılarak Windows 10 işletim sistemine sahip bilgisayarda analiz edildi. Her iki derecedeki, 24. ve 48. saatlerdeki spermatolojik değerlendirmeler sonucu elde edilen bulgular Independent T Test ve Two-Way ANOVA analizi ile karşılaştırıldı. 0.05 değerinin altındaki p değerleri istatistiksel açıdan önemli olarak yorumlandı. Elde edilen sonuçlar standart hataları ile birlikte verilmiştir.

4. BULGULAR

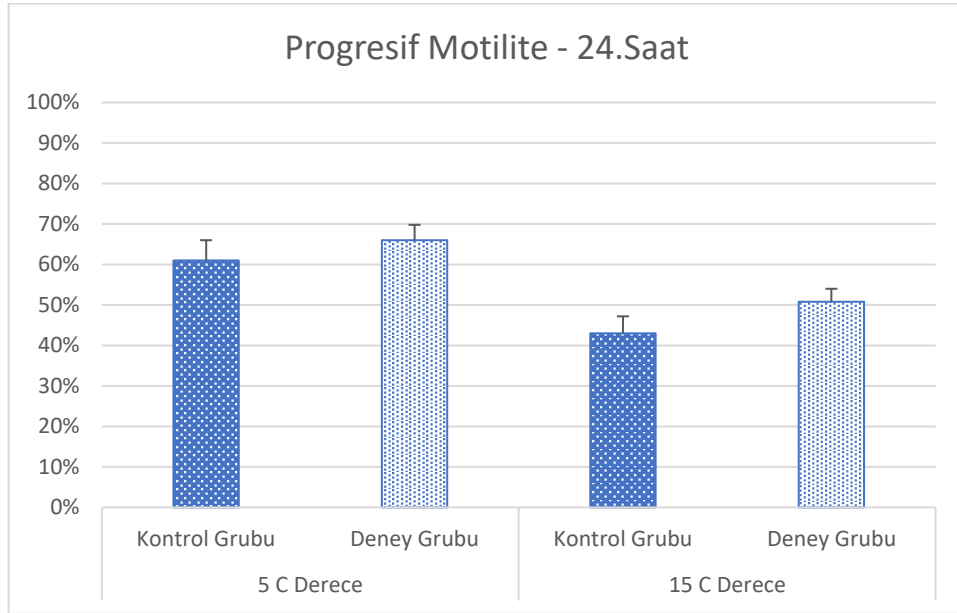
4.1. Progresif Motilite Değerlendirmesi

Yapılan çalışmada 24. saatteki progresif motilite sonuçları 5 C derecede kontrol ve deney grupları için sırasıyla %61±5.1 ve %66±3.8 iken, 15 C derecede kontrol ve deney grupları için sırasıyla %43±4.2 ve %50±3.2 olarak bulunmuştur.

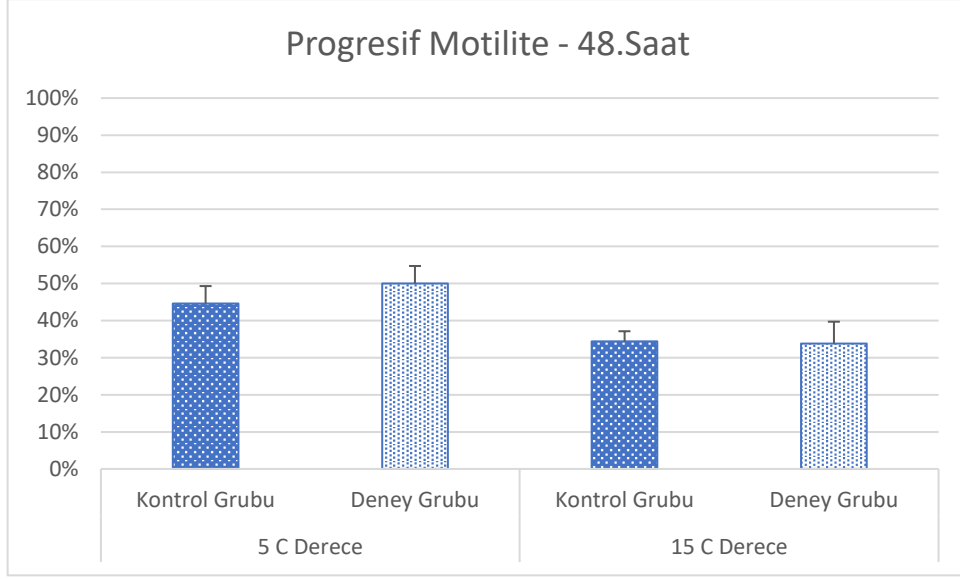
24. saatteki spermatolojik değerlendirmede her iki sıcaklıkta (5 °C ve 15 °C), gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmadı ($p>0.05$).

48. saatteki progresif motilite sonuçları, 5 C derecede kontrol grubu ortalaması %44±4.7 deney grubu progresif motilite ortalaması %50±4.7 olarak bulunmuştur. Yine 48.saatteki progresif motilite sonuçları 15 C derecede kontrol grubu ortalaması %34±2.7 deney grubu ortalaması ise %33±5.9 olarak bulunmuştur.

48. Saatteki progresif motilite değerlendirmesinde, her iki sıcaklıkta (5 °C ve 15 °C), gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmadı ($p>0.05$).



Şekil 2. 24. Saatteki Progresif Motilite değerlendirilmesi ($p>0.05$).



Şekil 3. 48. Saatteki Progresif Motilite değerlendirmesi ($p>0.05$).

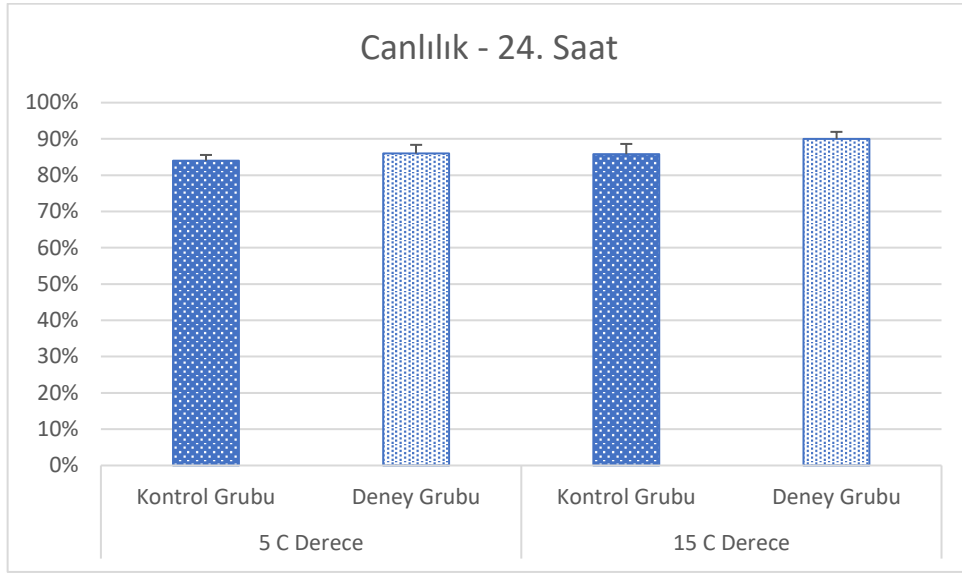
4.2. Canlı Spermatozoon Değerlendirmesi

24. Saatteki canlılık oranı 5 C derecede kontrol ve deney grupları için sırasıyla, %84.0±1.5 ve %86.0±2.3 olarak değerlendirilmiştir. 15 C derecedeki canlılık oranı ise kontrol ve deney grupları için sırasıyla %85.0±2.8 ve %90.0±1.9 olarak kaydedilmiştir.

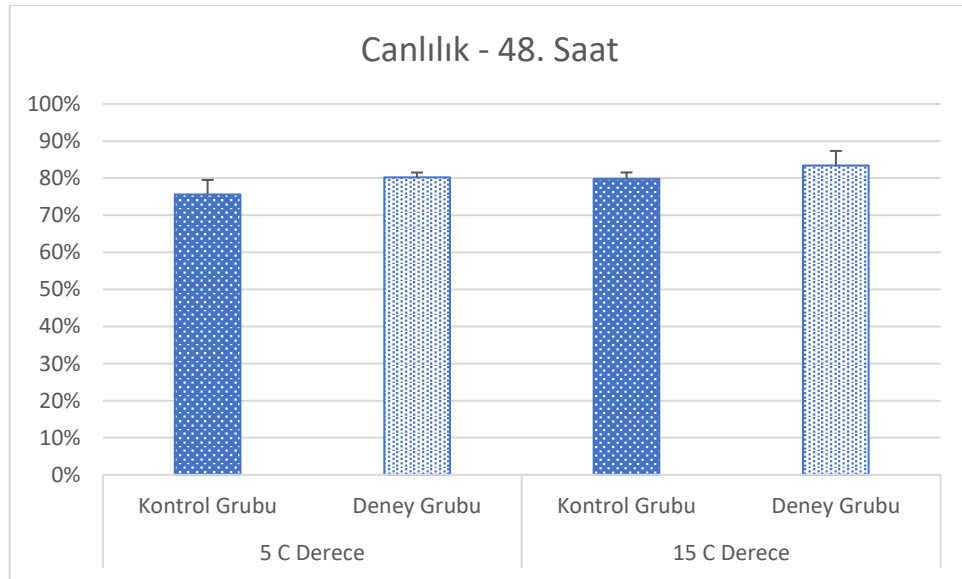
24. saatteki spermatolojik değerlendirmede her iki sıcaklıkta (5 °C ve 15 °C), gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmadı ($p>0.05$).

48. saatte yapılan spermatolojik değerlendirmede 5 C derecede inkubasyon ısısında canlılık oranı kontrol ve deney grupları için sırasıyla %75.6±3.9 ve %80.2±1.3 bulunmuştur. Bu oran 15 C derecede inkubasyon ısısında kontrol ve deney grupları için sırasıyla %79.8±1.7 ve %83.4±3.9 olarak kaydedilmiştir.

48. saatteki spermatolojik değerlendirmede her iki sıcaklıkta (5 °C ve 15 °C), gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmadı ($p>0.05$).



Şekil 4. Canlı Spermatozoon Oranı 24. saat ($p>0.05$).



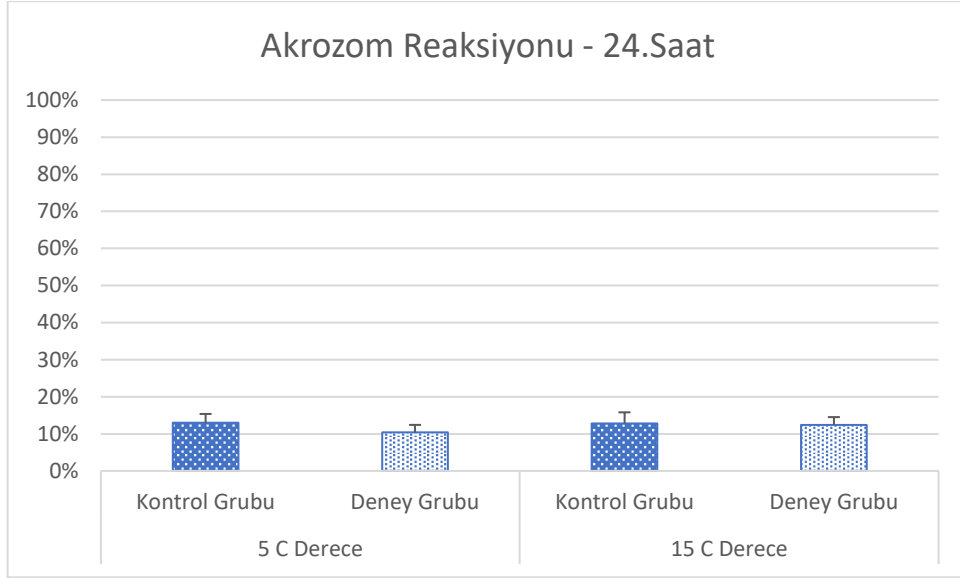
Şekil 5. Canlı Spermatozoon Oranı 48. saat ($p>0.05$).

4.3. Akrozom Reaksiyonu Değerlendirmesi

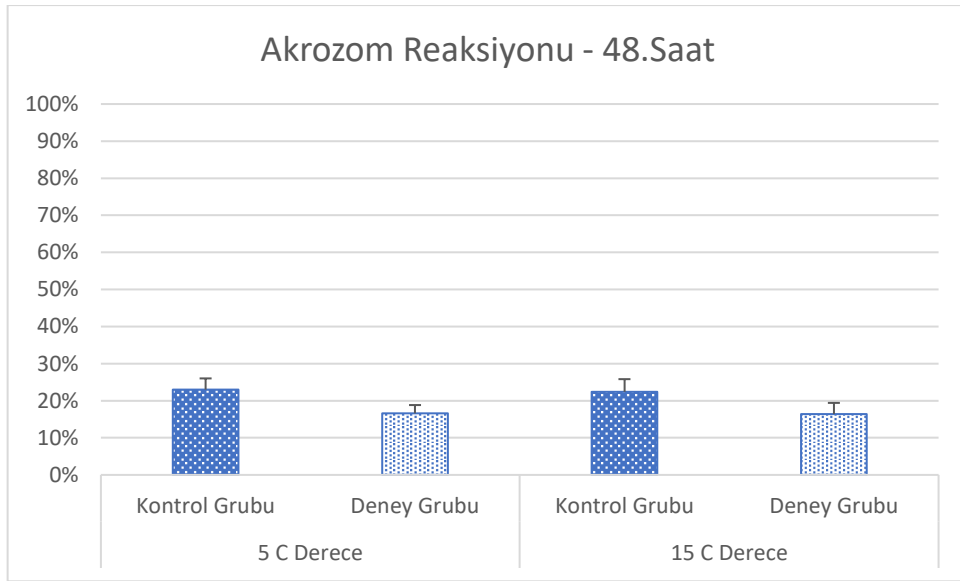
24. saatteki akrozom reaksiyonuna girmiş spermatozoon oranı 5 C derecede kontrol ve deney grupları için sırasıyla %13.0±2.3 ve %10.4±2.01 olarak bulunmuştur. 15 C derecede ise bu oranlar kontrol ve deney grubu için sırasıyla %12.8±3.0 ve %12.4±2.1 olarak değerlendirilmiştir.

48. saatteki değerlendirmelerde akrozom reaksiyonuna girmiş spermatozoon oranı 5 C derecede kontrol ve deney grupları için sırasıyla %23.0±3.0 ve %16.6±2.2 olarak kaydedilmiştir. 15 C derecede ise bu oranlar kontrol ve deney grubu için sırasıyla %22.4±3.4 ve %16.4±3.0 olarak değerlendirilmiştir.

24. ve 48. saatlerdeki spermatolojik değerlendirmeler de her iki sıcaklıkta (5 °C ve 15°C), gruplar arasındaki akrozom reaksiyonuna girmiş spermatozoon oranındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmadı ($p>0.05$).

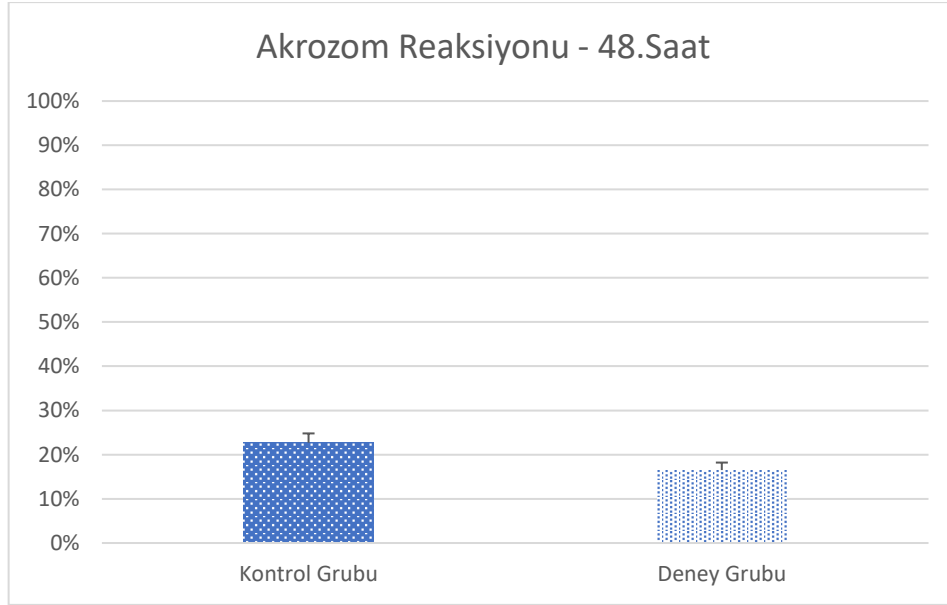


Şekil 6. 24. Saatteki akrozom reaksiyonu gösteren spermatozoon oranı.



Şekil 7. 48. Saatteki akrozom reaksiyonu gösteren spermatozoon oranı.

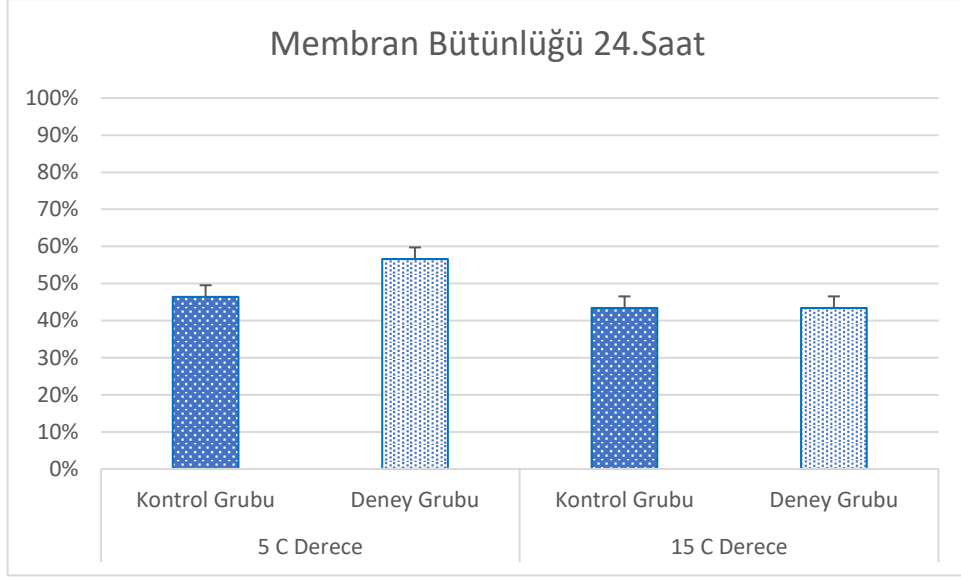
Derece faktörü eş değişken olarak alındığında, %95 güven aralığı ile grup faktörünün düzeylerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır. Grup faktör düzeyleri olan kontrol ve deney gruplarının 48.saatteki akrozom reaksiyonu ortalamaları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilmiştir ($p<0.05$).



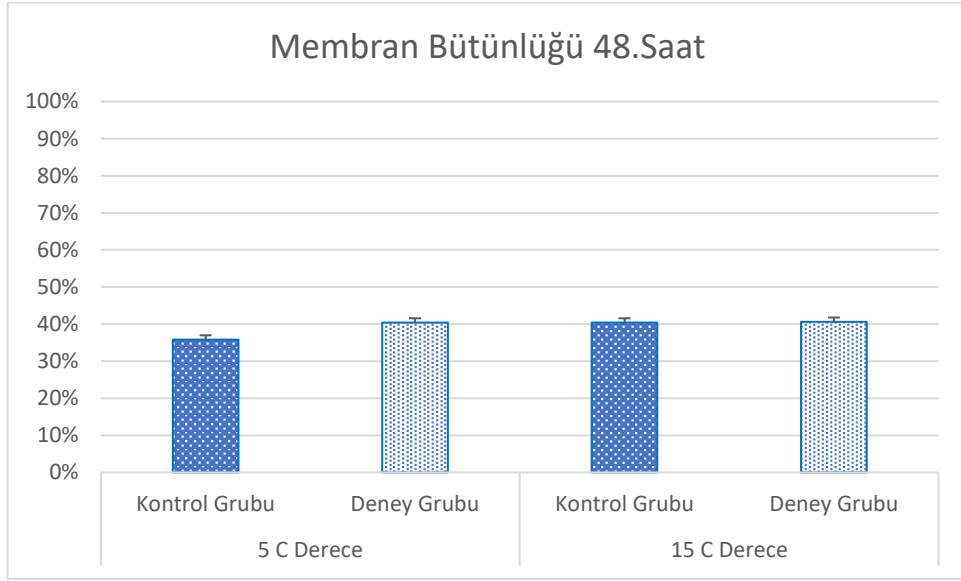
Şekil 8. 48.saatteki Akrozom reaksiyonu değerlerinin karşılaştırılması. Kontrol grubu 23 ± 3.0 ve Deney grubu $17\pm2.2^*$ ($p<0.05$)

4.4. Membranı Sağlam Spermatozoon Oranı

24. saatteki değerlendirmede kontrol ve deney grupları için sırasıyla sağlam plazma membranına sahip spermatozoon oranı 5 C derecede 46.4 ± 6.4 ve 56.6 ± 6.7 iken 15 C derecede ise 43.4 ± 3.5 ve 43.4 ± 5.9 şeklinde kaydedilmiştir. Bu oranlar 48. Saatteki değerlendirmede kontrol ve deney grupları için sırasıyla 5 C derecede 35.8 ± 2.9 ve 40.4 ± 6.8 15 C derecede ise 40.4 ± 4.9 ve 40.6 ± 5.4 olarak kaydedilmiştir. 24. ve 48. saatlerdeki spermatolojik değerlendirmeler de her iki sıcaklıkta (5 °C ve 15 °C), gruplar arasındaki sağlam plazma membranına sahip spermatozoon oranındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmadı ($P>0.05$).



Şekil 9. 24.saatte membranı sağlam spermatozoon oranı ($p>0.05$).



Şekil 10. 48.saatte membranı sağlam spermatozoon oranı ($p>0.05$).

Tablo 2. 15 °C’de ki spermatolojik Değerlendirme Sonuçları.

Gruplar	Progresif	Progresif	Canlılık		Akrozom	Akrozom	Membran	Membran
	Motilite	Motilite	Canlılık	Canlılık	Reaksiyonu	Reaksiyonu	Bütünlüğü	Bütünlüğü
	24.Saat	48.Saat	24.Saat	48.Saat	24.Saat	48.Saat	24.Saat	48.Saat
Kontrol	%43.0±4.2	%34.4±2.7	%85.0±2.8	%79.8±1.7	%12.8±3.0	%22.4±3.4	%43.4±3.5	%40.4±4.9
Deney	%50.8±3.2	%33.8±5.9	%90.0±1.9	%83.4±3.9	%12.4±2.1	%16.4±3.0	%43.4±5.9	%40.6±5.4

Tablo 3. 5 °C’de ki spermatolojik Değerlendirme Sonuçları.

Gruplar	Progresif	Progresif	Canlılık		Akrozom	Akrozom	Membran	Membran
	Motilite	Motilite	Canlılık	Canlılık	Reaksiyonu	Reaksiyonu	Bütünlüğü	Bütünlüğü
	24.Saat	48.Saat	24.Saat	48.Saat	24.Saat	48.Saat	24.Saat	48.Saat
Kontrol	%61.0±5.1	%44.6±4.7	%84.0±1.5	%75.6±3.9	%13.0±2.3	%23.0±3.0	%46.4±6.4	%35.8±2.9
Deney	%66.0±3.8	%50.0±4.7	%86.0±2.3	%80.2±1.3	%10.4±2.01	%16.6±2.2	%56.6±6.7	%40.4±6.8

5. TARTIŞMA

Serisin, nem tutucu (Patel ve Modasiya 2011), UV ye karşı direnci artırıcı (Tamada ve ark 2004), antikoagulant (Sarovart ve ark. 2003), antioksidan ve antibakteriyel (Aramwit ve ark. 2010), tirozinazı inhibe etme aktivitesi (Zhang, 2014), yara iyileştirici (Wu ve ark. 1996) gibi bazı önemli özellikleri ile ön plana çıkmaktadır. Son yapılan çalışmalara göre serisin, biyomateryal (Padamwar ve ark 2005) ve kozmetik materyal (Yamada ve ark 2001), olarak kullanılabilir.

Serisin suda çözünebilir bir proteindir. Küçük serisin peptidleri soğuk suda çözünebilirken, büyük serisin peptidleri sıcak suda çözünebilir niteliktedir. Serisinin bu çözünebilirlik profili serisinin kullanım sahasını belirlemekte rol oynayan unsurlardandır (Zhang, 2014). Yine de serisin, serin ve aspartik asit içeriği ile hidrofilik karakterdedir (Garel, 1997).

Spermanın hangi hayvan türü olursa olsun toplandıktan sonra gerek soğukta bekletilerek gerekse dondurularak muhafazası bazı zorluklar içermektedir. Spermanın korunması amacıyla geliştirilen teknikler, döl verimi açısından sperma fertilitelerini etkiler. Bu amaçla yürütülen bir çok çalışma mevcuttur. Yürütülen çalışmalara rağmen tavşan spermasının soğukta bekletilmeye ve ya dondurulmaya karşı oldukça kısıtlı bir kapasitesi vardır. (Aziza ve ark, 2017). Bu sebepten dolayı ülkemizde her ne kadar tavşan yetiştiriciliği gelişmemiş ve tavşan suni tohumlama teknolojisi gelişmemiş olsa da bu çalışmada tavşan sperması model olarak kullanılmıştır.

Spermanın saklanacağı sürenin uzatılması sperma toplanmasından tohumlama zamanına kadar spermanın kalitesinin korunması tohumlama sonucundaki başarıyı artırır. Tavşan spermasının 24 – 48 saatten fazla bekletilmesi sperma kalitesinde düşüğe ve bunun sonucunda tohumlama başarısında azalmaya yol açacaktır. Bundan dolayı, bekletme süresinin uzatılması sperma kalitesinin ve tohumlama başarısının artmasını sağlayacaktır. Spermanın dondurularak saklanması birçok avantajı olsa da, bu işlem soğukta bekletmeye göre daha pahalıdır ve dondurma işleminin sperma kalitesi üzerine olumsuz etkileri fazladır. Bu sebep dolayısıyla, spermanın soğukta bekletilmesi sırasındaki sürenin uzatılması son derece önemlidir (Di Iorio ve ark, 2014).

Sperm hücreleri, oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonuna karşı enzimatik ve enzimatik olmayan yol ile iki farklı strateji ile korunur. Glutasyon peroksidaz, superoksit dismutaz ve katalaz en kritik antioksidan enzimlerdir. Tokoferol, taurin, askorbik asit, karateoinler, ubikiononlar enzimatik olmayan antioksidanlardır. Sperma sulandırma ve/ve ya sperma dondurma çözündürme işlemleri sırasında veya antioksidanlar ile oksijen radikalleri arasındaki herhangi bir orantısızlık, serbest radikallere karşı defans sisteminin zayıflamasına ve lipid peroksidasyonun yıkıcı etkisine neden olur. Bu problemi aşabilmek adına çeşitli türlerde farklı antioksidanlar kullanılmıştır (Nasirabadi ve ark, 2019).

Sperma sulandırma sürecinde, at spermasında glutasyon ve askorbik asit (Aurich ve ark, 1997), koç spermasında dismutaz ve katalaz (Maxwell ve Stojanov, 1996), teke spermasında melatonin hormonu (El-Battawy, 2003) gibi antioksidanlar denenmiş ve bu antioksidanların sperma hücrelerini reaktif oksijen radikallerinin zararlı etkilerine karşı korudukları bildirilmiştir.

Tavşan spermasının soğukta bekletilmesi esnasında fertilite potansiyelini korumak amacıyla bir çok çalışma yapılmıştır (Aksoy ve ark, 2008; Lopez ve ark, 2005; Roca ve ark, 2000). Alternatif olarak motilite oranını ve canlı spermatozoon oranını artırabilmek ve daha yüksek fertilite oranı elde edebilmek için, sperma koruma protokolleri, sulandırıcılar ve antioksidanlar üzerine çalışmalar yürütülmektedir (Moce ve Vicente, 2002; Roca ve ark, 2000).

Johinke ve ark. 2014 yılında yaptığı çalışmada tavşan sperması sulandırıcısına ilave edilmiş quarsacetinin hücre içi H₂O₂ üretimini azalttığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada metiyoninin H₂O₂ üretimine herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir (Johinke ve ark, 2014). El Gaffary (1994) sulandırılmış tavşan spermasına ilave edilen kafein, teofilin gibi cAMP stimüle edicilerinin sperma motilitesi üzerine olumlu etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir.

İpek böceği kozasından elde edilen ve suda çözünebilir bir protein olan serisin, oksidatif stresi azaltmak amacıyla kullanılabilir. Serisin, diğer ticari enzimatik olmayan askorbik asit, tokoferol, urik asit ve beta-karotenler gibi antioksidanlar ile aynı amaç doğrultusunda kullanılabilir (Dash ve ark, 2011).

Manda spermasında yapılan çalışmada, serisinin, sperma sulandırıcılarına 0.25-0.5% ilavesinin dondurma-çözündürme sırasında meydana gelen oksidatif strese karşı spermatozoonları koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir (Kumar ve ark 2015).

Aygır spermasında yapılan çalışmada, sulandırıcıya serisin ilavesinin, çözüm sonu DNA hasarına engel olduğu, ayrıca reaktif oksijen radikallerine ve lipid peroksidasyonuna karşı direnç gösterdiği bildirilmiştir (Nasirabadi ve ark, 2019)

Yapılan bu çalışmada spermatolojik değerlendirmelerin 5 C derecede bekletilen tavşan spermasının 15 C derecede bekletilen tavşan spermasına göre daha iyi olduğu gözlenmiştir. Rosato ve Iaffaldano'da 2011 yılında gerçekleştirdiği, farklı inkubasyon ısılarının spermatolojik değerler üzerindeki etkilerini incelediği araştırmada, 5 C derecede saklanan tavşan spermasının spermatolojik değerlerinin, 15 C derecede saklanan tavşan spermasına göre daha iyi olduğunu bildirmişlerdir (Rosato ve Iaffaldano, 2011).

Araştırmayı karşılaştırmak amacıyla yapılan literatür taramalarında tavşan spermasının kısa süreli veya dondurularak saklanması, sperma sulandırıcılarına serisin ilave edildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Serisinin, farklı derecelerde saklanan tavşan spermasının, 24. ve 48. saatlerde yapılan spermatolojik değerlendirmelerine etkilerinin incelendiği bu çalışmada, istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmasa da, serisinin spermatolojik değerlendirmelerde olumlu etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. Derece faktörünün eş değişken olarak kabul edilerek yapılan istatistiksel çalışmada akrozom reaksiyonuna uğramış olan spermatozoon sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen çalışmada, farklı sıcaklıklarda (5 °C ve 15 °C) bekletilen tavşan spermasına ilave edilen serisinin, 24. ve 48. saatlerdeki spermatozojik parametreler üzerine etkisi incelenmiş ve progresif motilite, canlı spermatozoon oranı, reakte akrozom oranı ve membranı sağlam spermatozoon oranlarına etkisi istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($P>0.05$). Ancak, spermatozojik değerlendirmelere göre serisinin tüm parametreler üzerinde en azından numerik olarak olumlu etkilerinin olduğu düşünülmektedir.

Derece faktörü eş değişken olarak alındığında, grup faktörünün düzeylerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilmiştir. Grup faktör düzeyleri olan kontrol ve deney gruplarının 48.saatteki akrozom reaksiyonuna girmiş spermatozoon ortalamaları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilmiştir ($P < 0.05$).

Yapılan bu çalışmada, farklı derecelerde yapılan spermatozojik değerlendirmelerde istatistiksel olarak önemli fark bulunmamasına rağmen, serisinin, spermatozojik parametreler üzerinde olumlu etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçların elde edilmesi için, replikasyon sayılarının artırılması gerektiği düşünülmektedir. Bunun yanında daha kesin sonuçlar elde edebilmek için in vitro çalışmalar yanında döl verimi çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Aisen, E., Quintana, M., Medina, V., Morello, H., Venturino, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology* 2005, 50,239–249.

Aramwit, P., Damrongsakkul, S., Kanokpanont, S., & Srichana, T. Properties and antityrosinase activity of sericin from various extraction methods. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2010, 55(2), 91-98.

Atiken RJ, The role of free oxygen radicals and sperm function. *International Journal of Andrology* 1989, 12, 95-97.

Aurich, J.E., U. Schonherr, H. Hoppe and C. Aurich, Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology* 1997, 48,185-192.

Avdatek F, Yeni D, Gündoğan M, Merinos koçlarda spermaya katılan antioksidanların kısa süreli saklama sırasında spermatolojik parametreler ve DNA hasarı üzerine etkileri. *Kocatepe Vet Journal* 2018, 11, 126-133.

Aziza, S. A. H., El-Nattat, W. S., Hussein, A. S., El-Senosy, Y. A., El-Tohamy, M. M., & El-Seadawy, I. E.-S. Preservability of rabbit semen after chilled storage in tris based extender enriched with different concentrations of Propolis ethanolic extract (PEE). 2017, 6(2), 68–76.

Bailey, JL., Bilodeau, JF., Cormier N., Semen cryopreservation in domestic animals a damaging and capacitating phenomenon. 2000, 21(1):1-7.

Bailey, L., Morrier, A., Cormier, N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species 2003, 83(3):393-401

Bhattacharya SA, Prajapati BG. On Cryoprotectant and its Modern Implication in Cryonics. 2016, 10(3 1):1-6.

Bilodeau, JF, Chatterjee S, Sirard, MA, Gagnon.C. Levels of antioxidant defenses are decreased after a cycle of freezing and thawing. 2000, 55 pp. 282-288

Campos ACN, Gadelha CRF, Guerreiro MEF, Pereira ES, Lima ICS, Linard MAB, Meneses HM, Castelo-Branco KF and Estevam FNL Male Rabbit Reproductive (2014) Vol 2(8): 120-12

Castellini, C., Cardinali, R., Dal Bosco, A., Minelli, A., Camici, O. Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. 2006, 1;65(4):703-12.

Castellini, C. Semen production and management of rabbit bucks. *9th World Rabbit Congress* 2008, 265–278.

Dash, R., Acharya, C., Bindu, P. C., & Kundu, S. C. Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts. *BMB Reports* 2011, 41(3), 236–241.

De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama, H, Gagnon C. Reactive Oxygen Species and Sperm Physiology. 1997, 2: 48-54.

Di Iorio, M., Manchisi, A., Rocco, M., Chrenek, P., & Iaffaldano, N. Comparison of different extenders on the preservability of rabbit semen stored at 5°C for 72 hours. *Italian Journal of Animal Science* 2014, 13(4), 710–714.

El-Gaafary, M.N. Quality and fertility of cooled rabbit semen supplemented with cyclic-AMP stimulators. *Animal Reproductive Science* 1994, 34, 307–313.

E. Moce, J.S. Vicente, Effect of cooling and freezing, the two steps of a freezing protocol on the fertilizing ability of the rabbit sperm, *Reproductive Nutrition Develeopment* 42 2002 189–196.

F. Lopez-Gatius, G. Sances, J. Yaniz, P. Santolaria, R. Gutierrez, M. Nunez, J. Nunez, C. Soler, Effect of solid storage at 15 degrees C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen, *Theriogenology* 64 2005, 252–260.

El-Battawy, K.A., W.S. El-Nattat and A.A. Mohamed Storage of goat semen using various extenders with emphasis of melatonin on its phosphatase activity, preservation and freezability. 2003 63(5): 119-130.

Garel, A. Structure and Organization of the Bombyx mori Sericin 1 Gene and of the Sericins 1 Deduced from the Sequence of the Ser 1B cDNA. 1997, 27(5), 469–477.

- Ghasemi, M., Farshad, A., Hajarian, H., Asadollahi, V., Fathi, F., & Banafshi, O.** The effects of sericin on cryopreserved sperm cells and subsequent embryo development in mice. *International Journal of Reproductive BioMedicine* 2018,16(6), 405–
- Goericke-pesch, S., Klaus, D., Failing, K., & Wehrend, A.** Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. *Animal Reproduction Science* 2012, 135(1–4), .
- H. Koefoed-Johnsen, A. Pavlok and Fulka** The Influence of the Ageing of Rabbit Spermatozoa in vitro on Fertilizing Capacity and Embryonic Mortality 1971, 26,351-356
- Holtz, W., & Foote, R. H.** The Anatomy of the Reproductive System in Male Dutch Emphasis on the Accessory Sex Glands. 1978, 158(1):1-20.
- Johinke, D., de Graaf, S. P., & Bathgate, R.** Investigation of in vitro parameters and in vivo fertility of rabbit spermatozoa after chilled storage. *Animal Reproduction Science* 2014, 147(3–4), 135–143.
- Khampieng, T., Aramwit, P., & Supaphol, P.** Silk sericin loaded alginate nanoparticles: Preparation and anti-inflammatory efficacy. *International Journal of Biological Macromolecules* 2015, 80, 636–643
- Kumar, P., Kumar, D., Sikka, P., & Singh, P.** Sericin supplementation improves semen freezability of buffalo bulls by minimizing oxidative stress during cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 2015, 152, 26–31.
- Kunz, R. I., Brancalhão, R. M. C., Ribeiro, L. de F. C., & Natali, M. R. M.** Silkworm Sericin: Properties and Biomedical Applications. *BioMed Research International* 2016, 1–19.
- Ladha, S.** Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon, *Journal of Membrane Biology* 1998, 165, 1-10.
- Larson, J. L., & Miller, D. J.** Simple Histochemical Stain for Acrosomes. 1998, 445–449
- Mandal, R., Badyakar, D., Chakrabarty, J.** Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation, *Advances in Andrology* 2014, ID 190542,.
- Maxwell, W.M.C. and T. Stojanov.** Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. 1996, 8: 1013-1020.

- M. Aksoy, N. Cankat Lehimcioglu, O. Akman,** Effect of seminal plasma on functional integrity of rabbit sperm membranes during storage at 4 °C or freezing, *World Rabbit Science* 2008 16 1–6.
- Miyamoto, Y., Oishi, K., Yukawa, H., Noguchi, H., Sasaki, M., Iwata, H., & Hayashi, S.** Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. 2012, 21(2–3), 617–622.
- Mocé, E., & Vicente, J. S. Rabbit sperm cryopreservation:** A review. *Animal Reproduction Science*, 2009, 110(1–2), 1–24.
- Nasirabadi, M. H., Shirazi, A., Kadivar, A., Shams-esfandabadi, N., Mohebbi, A., & Ahmadi, E.** Sericin Ameliorates the Capacitation State and Chromatin Integrity of Frozen-Thawed Stallion Spermatozoa by Reducing Oxidative Stress. 2019, 11(3), 245–252.
- Padamwar, M. N., Pawar, A. P., Daithankar, A. V., & Mahadik, K. R.** Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2005, 4(4), 250-257.
- Patel R. J., Modasiya M. K.** Sericin: pharmaceutical applications. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2011, 2(3):913–917.
- Rajkhowa, R., Zhang, J., Wang, X., Kaur, J., Millington, K., & Tsuzuki, T.** Photoprotection by Silk Cocoons. *Biomacromolecules*, 2013, 14(10), 3660–3667.
- Rosato, M. P., & Iaffaldano, N.** Effect of Chilling Temperature on the Long-Term Survival of Rabbit Spermatozoa held Either in a Tris-Based or a Jellified Extender. *Reproduction in Domestic Animals*, 2011, 46(2), 301–308.
- Roof, D. J., Bowley, S., Price, L. L., & Matsas, D. J.** Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. 2012, 77(2), 412-420.
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C.,** Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science* 1995, 37:185-249.
- Sarovart, S., Sudatis, B., Meesilpa, P., Grady, B. P., & Magaraphan, R.** The use of sericin as an antioxidant and antimicrobial for polluted air treatment. 2003, 5(3), 193-198.

Tamada, Y., Sano, M., Niwa, K., Imai, T., & Yoshino, G. Sulfation of silk sericin and anticoagulant activity of sulfated sericin. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2004, 15(8), 971-980.

Tsujimoto, K., Takagi, H., Takahashi, M., Yamada, H., & Nakamori, S. Cryoprotective effect of the serine-rich repetitive sequence in silk protein sericin. *Journal of Biochemistry* 2001, 129(6), 979–986.

Vaithanomsat, P., & Kitpreechavanich, V. Sericin separation from silk degumming wastewater. *Separation and Purification Technology* 2008, 59(2):129-133

Wassall, S.R., Stillwell, W., Polyunsaturated fatty acid cholesterol interactions: domain formation in membranes. *Biochimica Biophys Acta-Biomembranes* 2009, Jan;1788(1):24-32.

Wu, C., Tian, B., Zhu, D., Yan, X., Cheng, W., Xu, G., Guo, Y., Wu, Y., Jia, S. Wound protection film and its preparation method. Suzhou Silk Engineering Collage, China. 1996, 130:100662.

Yamada, H., Yamasaki, K., Zozaki, K. Nail cosmetics containing sericin. 2001, 134(14), p 15.

Yasmin C, Otoi T, Setiadi MA, Karja NW. Maturation and fertilisation of sheep oocytes cultured in serum- free medium containing silk protein sericin. 2015, 63: 110-117.

Zhang, Y. Application of natural silk sericin protein in biomaterials. 2002, 20(2):91-100

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : ÖZCAN Tanay
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Van / 26.03.1992
E-mail : tanayzcn@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Y. Lisans	Veteriner Fakültesi Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı	2019
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2016

