



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2024; 38 (2): 125 - 135
http://www.fusabil.org

Ginkgo Bilobanın Sperma Sulandırıcılarına İlavesinin Koç Spermasının Dondurulmasına Etkisi *

İbrahim Halil GÜNGÖR^{1, a}
Serap DAYAN ÇİNKARA^{1, b}
Aslıhan ÇAKIR ÇİHANGİROĞLU^{2, c}
Şeyma ÖZER KAYA^{1, d}
Emre KAYA^{3, e}
Tutku Can ACISU^{1, f}
Figen ERDEM ERİŞİR^{4, g}
Ökkeş YILMAZ^{4, h}
Seyfettin GÜR^{1, i}
Mustafa SÖNMEZ^{1, j}
Gaffari TÜRK^{1, k}

¹ Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Dölerme ve Suni Tohumlama
Ana Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

² Siirt Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Dölerme ve Suni Tohumlama
Ana Bilim Dalı,
Siirt, TÜRKİYE

³ Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Ana Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

⁴ Fırat Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-5250-1478

^b ORCID: 0000-0003-2992-8729

^c ORCID: 0000-0003-3365-8960

^d ORCID: 0000-0002-9970-9364

^e ORCID: 0000-0002-7445-3091

^f ORCID: 0000-0002-0882-937X

^g ORCID: 0000-0002-0499-9339

^h ORCID: 0000-0002-8276-4498

ⁱ ORCID: 0000-0003-0096-2501

^j ORCID: 0000-0003-0281-7228

^k ORCID: 0000-0001-7417-1038

Geliş Tarihi : 13.03.2024

Kabul Tarihi : 17.04.2024

Yazışma Adresi Correspondence

İbrahim Halil GÜNGÖR
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Dölerme ve Suni Tohumlama
Ana Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

ihgungor@firat.edu.tr

Yüksek düzeyde antioksidan özelliği bilinen Ginkgo Biloba'nın koç spermasının dondurulması sırasında oluşan oksidatif stresi baskılayarak dondurma kalitesini artırmasını hedeflenerek bu çalışma yapılmıştır. Bu amaçla 6 adet Akkaraman ırkı koçlardan toplanan spermalar pooling yapıldı ve kontrol ile deney gruplarına eşit paylaştırıldı. Deney grupları [Grup 1: %4 GB, Grup 2: %2 GB, Grup 3: %1 GB, Grup 4: %0.5 GB, Grup 5: %0.25 GB ve Grup 6: Kontrol (%0 GB)] oluşturulduktan sonra sulandırılmış-soğutulmuş spermalar gliserolizasyon-ekilibrasyon işlemine tâbi tutulup 0.25 ml'lik mini payetlere çekildi ve otomatik dondurma cihazında donduruldu. Dondurulup-çözdürülen spermalarda CASA ile spermatolojik ve kinematik analizler, akış sitometri ile canlılık, akrozomal hasar ve mitokondriyal membran potansiyeli analizleri yapıldı. Ayrıca HOS test ile membran bütünlüğü belirlenirken, oksidatif stres analizleri ile vitamin, yağ asitleri ve kolesterol düzeyleri ölçüldü. Yapılan analizler sonucunda %0.25 ve %0.50 GB içeren grupların kontrol grubuna göre total, progresif, rapid motilite, canlılık ve yüksek mitokondriyal membran potansiyeli düzeyinde artış sağladığı görülmüştür. Deney gruplarından %4 GB içeren grubun ise yapılan analizlerde spermatozoonlar üzerinde zararlı etki oluşturduğu belirlenmiştir. Oksidatif stres analizleri sonucunda %4 GB hariç diğer deney grupları kontrole göre GSH düzeyini artırmıştır. Ayrıca %1 GB GSH-Px, %0.25 ve %1 GB CAT ve %4 GB ise MDA düzeyinde kontrole göre artış sağlamıştır. Kontrol grubuna göre %2 GB içeren grup MDA, %4 GB içeren grup ise SOD düzeyinde önemli azalma sağlamıştır. Deney ve kontrol grupları arasında vitamin, yağ asitleri ve kolesterol düzeyleri arasında herhangi bir farklılık tespit edilememiştir. Sonuç olarak; koçlarda sperma sulandırıcılarına %0.25-%0.50 GB ekstresinin ilave edilmesinin spermanın dondurma kalitesini artırdığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Koç, dondurarak saklama, ginkgo biloba, oksidatif stres, akış sitometre

Effect of the Addition of Ginkgo Biloba to Semen Diluents on Freezing Ram Semen

This study was conducted for increasing the freezing quality by suppressing the oxidative stress that occurs during the freezing of ram semen by suppressing the oxidative stress by Ginkgo Biloba, which is known for its high level of antioxidant property. For this purpose, semen collected from 6 Akkaraman breed rams was pooled and distributed equally to the control and experimental groups. After the experimental groups [Group 1: %4 GB, Group 2: %2 GB, Group 3: %1 GB, Group 4: %0.5 GB, Group 5: %0.25 GB ve Group 6: Control (%0 GB)] were formed, the diluted-cooled semen were subjected to the glycerolization-equilibration process, drawn into 0.25 ml mini straws and frozen in an automatic freezing device. Spermatological and kinematic analyzes were performed on frozen-thawed semen using CASA, and viability, acrosomal damage and mitochondrial membrane potential analyzes were performed on flow-cytometry. In addition, membrane integrity was determined with the HOS test, while vitamin, fatty acid and cholesterol levels were measured with oxidative stress analysis. As a result of the analyses, it was seen that the groups containing 0.25% and 0.50% GB provided an increase in total, progressive, rapid motility, vitality and high mitochondrial membrane potential compared to the control group. In conclusion; it has been determined that adding 0.25%-0.50% GB extract to semen extenders in rams increases the freezing quality of semen. Among the experimental groups, it was determined that the group containing 4% GB had a harmful effect on spermatozoa. As a result of oxidative stress analyses, except for 4% GB, all experimental groups increased GSH levels compared to the control. In addition, 1% GB GSH-Px, 0.25% and 1% GB CAT and 4% GB increased MDA levels compared to the control. Compared to the control group, the group containing 2% GB provided a significant decrease in MDA levels, and the group containing 4% GB provided a significant decrease in SOD levels. No difference were detected in vitamin, fatty acid and cholesterol levels between the experimental and control groups.

Key Words: Ram, cryopreservation, ginkgo biloba, oxidative stress, flow-cytometer

Giriş

Spermanın dondurularak uzun süreli saklanması, spermaların taşınmasını ve kontrol altına alınmasını sağlamaktadır. Ayrıca bu işlem değerli bir damızlık hayvanın yaşamını yitirmesinden sonraki zamanlarda bile üstün nitelikli genetik materyalinin uzun süreli kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Ancak koçlarda spermanın dondurulma işlemi yapılan birçok çalışmaya rağmen henüz başarılı bir seviyeye ulaşamamıştır. Bu türün spermasının diğer türlere göre farklı lipid yapısına sahip olması bu sorunun temel

* Bu çalışma altyapı projesi olarak Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (VF.21.13).

nedeni olarak düşünölmektedir. Ayrıca dondurma işleminin koç spermasında çeşitli fiziksel ve kimyasal stresleri oluşturması bu işlemin başarısını olumsuz yönde etkilemektedir (1). Bu stres çeşitlerinin spermanın dondurulması sırasında spermatozoonlar üzerindeki oluşturduğu hasarları azaltmak ve dondurma kalitesini arttırmak amacıyla sperma sulandırıcılarına pek çok antioksidan madde ilave edilmiş fakat hala istenilen başarıya ulaşılamamıştır (2-4).

Ginkgo Biloba (Egb 761 - GB) en çok Çin'de bulunan yaklaşık 30 m boyunda bir ağaçtır. Bu ağaç; Mabet ağacı, Kızsaçı ağacı ve Japon eriği olarak da bilinmektedir. Ginkgoiae sınıfının dünyada yetişen tek üyesi ginkgo bilobadır (5). Ginkgo biloba, bu ağacın yapraklarından 27 basamaklı bir ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen bir bitki ekstresidir. Bu ekstraksiyon işleminin son ürünü olarak %24 flavonoid glikozitleri (kuersetin, kaemferol, izoramnetin vb), %6 terpenoidleri (%3.1 ginkgolid A, B, C ve J ile %2.9 bilobalid), %5-10 organik asitleri ve diğer birçok bileşeni ihtiva ettiği bildirilmektedir (6). Spermatozoon plazma membranını dondurma işleminin neden olduğu hasarların primer organeldir (1).

Dondurma-çözdürme işlemleri esnasında meydana gelen sıcaklık değişimi, memeli spermatozoonlarında fiziksel ve kimyasal strese yol açarak plazma membranındaki lipid kompozisyonunda değişikliğe neden olmaktadır (7, 8). Koç spermasının dondurulması esnasında meydana gelen hasarların, buz kristal oluşumundan dolayı oksidatif stres düzeyindeki artışın indüklediği membran lipidlerinin peroksidasyonuna bağlı olduğu ileri sürölmektedir (9). Dondurma çözdürme işlemi sonucunda koç spermasında motilite kayıpları, ölü ve anormal spermatozoon oranları ile hasarlı plazma ve akrozom membranlı spermatozoon oranlarında artış (10, 11), oksidan-antioksidan dengede bozulmaların göstergesi olan LPO'da artış ve antioksidan aktivitede azalma (10), membran lipid kompozisyonunda değişiklik (12, 13) gibi pek çok hasarlara neden olduğu bildirilmektedir.

GB ekstraktının testis hasarına karşı koruyucu etkinliğini destekleyen pek çok çalışma mevcuttur (14, 15). Ayrıca GB'nin ana bileşenlerinden biri olan kuersetin ratlarda spermatozoon motilitesi, canlılığı ve konstrasyonunu artırmıştır (16). Ginkgo Biloba ekstresinin erektil disfonksiyonun tedavisinde kullanıldığı birçok çalışma ile tespit edilmiştir (17-19). Bu olumlu etkilerinin yanı sıra GB ekstraktın İsviçre farelerinde düşük gebelik indeksine neden olması ve erkeklerinde kauda epididimis ile prostat ağırlıklarında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (20). Ek olarak bu ekstraktın yüksek dozlarının hamsterların oositlerinin zona pellucidasına spermatozoon penetrasyonunu azaltması (21) ve insanlarda 24 saatlik bir saklama sonrası spermatozoon motilitesini inhibe etmesi belirlenen diğer özellikleridir (22). Bu çalışmada Tris+yumurta sarısı sulandırıcısına farklı oranlarda Ginkgo Biloba ekstresi ilavesinin koç spermasında antioksidan özellikler ve dondurma kalitesine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırma ve Yayın Etiği: Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (FÜHADYEK) 14.04.2021 tarihli ve 2021/07 oturum sayılı onayı alındı.

Hayvan Materyali: Klinik olarak sağlıklı olan, genital organ muayenesi sırasında herhangi bir patolojik bulguya rastlanmayan, ortalama 60-65 kg canlı ağırlığında 6 adet Akkaraman ırkı koç kullanıldı. Deneysel çalışmalar başlamadan önce ve tüm çalışma boyunca koçlar kaliteli kaba yem ve konsantre yemlerle beslendi. İçme suyu ad libitum olarak sağlandı.

Ginkgo Biloba Ekstresinin Sulandırılması ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması: Bu amaçla 2.4 g GB toz ekstresi (Nurbal Şifa Merkezi, İstanbul, Türkiye) üzerine 7.6 mL distile su ilave edilerek vortekslenildi ve çözümlenip %16 GB stok solüsyonu (SS) elde edildi. Stok solüsyonlar Tris+yumurta sarısı sulandırıcısı (TYSS) ile tekrar seyreltildi [GB %8: 2 mL GB SS + 2 mL TYSS, GB %4: 1 mL GB SS + 1 mL distile su + 2 mL TYSS, GB %2: 0.5 mL GB SS + 1.5 mL distile su + 2 mL TYSS, GB %1: 0.25 mL GB SS + 1.75 mL distile su + 2 mL TYSS, GB %0.5: 0.125 mL GB SS + 1.875 mL distile su + 2 mL TYSS, Kontrol: 2 mL distile su + 2 mL TYSS].

Deneysel Dizayn ve Spermanın İşlenme Süreci: Koçlardan suni vajen yardımıyla spermalar toplandı. Laboratuvara getirilen spermaların motilite ve yoğunluk tayinleri bilgisayar destekli sperm analiz (CASA-ISASv1, Proiser, Spain) cihazı kullanılarak yapıldı. Alınan spermaların araştırmada kullanılabilmesi için total motilitesi %70'in ve yoğunluğu 2 milyarın üzerinde olma şartı arandı. Bu şartı sağlayan spermalar daha önceden hazırlanmış TYSS ile 1:1 oranında sulandırıldı. Sulandırılan spermalar pooling yapıldı. Pooling çalışma gruplarının her birine 2'şer ml olacak şekilde bölündü ve çalışma grupları ile birleştirildi. Bu sayede deney grupları [Grup 1: %4 GB, Grup 2: %2 GB, Grup 3: %1 GB, Grup 4: %0.5 GB, Grup 5: %0.25 GB ve Grup 6: Kontrol (%0 GB)] oluşturuldu. Daha sonra sulandırılmış spermaların sıcaklığı soğutma kabinde 5°C'ye düşürüldü ve aynı oranlarda GB içeren %10 gliserollü TYSS ile deney grupları kademeli bir şekilde birleştirildi. Bu işlemin akabinde spermalar soğutma kabinde 4 saatlik bir bekleme işlemine tâbi tutuldu ve spermalar 0,25 ml'lik mini payetlere çekildi. Otomatik dondurma cihazında (Microdigitcool, IMV, Fransa) donduruldu. Dondurulmuş spermalar -196°C'deki sıvı azot içeren konteynerlerde saklandı. Dondurma işleminden 24 saat sonra payetler 38°C sıcaklıktaki su içerisinde 25 saniyede çözdürüldü. Çözdürülen spermalarda spermatolojik ve akış sitometrik analizler ile vitamin ve yağ asitleri düzeyleri ölçüldü.

Spermatolojik Analizler

Motilite ve Kinematik Parametrelerin Analizi:

Bu aşamada CASA sistemi kullanılarak spermalarda motilite ve kinematik parametre tayinleri yapıldı. Çözdürülen spermalar 1:4 oranında Tris buffer ile sulandırıldı ve özel lam (Spermtrack 20 µm) üzerine 3 µL koyuldu. Motilite modülü üzerinden total, progresif

motilite (hızlı, orta ve yavaş hızda hareket eden spermatozoon oranları ile birlikte) oranları (%), kinematik parametre değerleri [(VCL- Eğrisel hız ($\mu\text{m/s}$); VSL-Doğrusal hız ($\mu\text{m/s}$); VAP- Ortalama yol hızı ($\mu\text{m/s}$); LIN- Doğrusallık (Eğrisel yolakların doğrusallığı, %); STR- Doğrusallık (Ortalama yolun doğrusallığı, %), WOB: Kararsızlık (Gerçek yolakta ilerlerken izlenen dalgalanmanın ölçüsü, %), ALH- Spermatozoon başının ortalama yolda ilerlerken laterale doğru saptığı uzaklık (μm); BCF- Çapraz geçiş frekans ritmi (Eğrisel yolağın ortalama yoldan geçme frekansı, Hertz)] kaydedildi.

Membran Bütünlüğünün Belirlenmesi (HOS Test): Çözdürülen ve 1:5 oranında sulandırılan spermadan 50 μL alınıp üzerine 500 μL hipotonik solüsyon (0.49 g sitrik asit, 0.9 g fruktoz, 100 mL distile su) ilave edildi. Etüv içerisinde 38°C'de 60 dakika inkübasyona bırakılan spermalardan 15 μL alınıp lam üzerine damlatıldı ve lamelle kapatıldı. Faz-kontrast mikroskopun 400x büyütmesi kullanılarak 200 adet spermatozoon sayıldı. Şişmiş baş ve kıvrılmış kuyruklu sağlam spermatozoonların oranı % olarak ifade edildi.

Akış Sitometrik Analizler: Bu analiz için her grupta çözdürülen spermalar 3 eşit parçaya ayrıldı. Ayrılan kısımlar PBS ile 99 kat sulandırıldı. Çözdürülen spermaların canlılık oranlarının belirlenmesi amacıyla LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (L7011, ThermoFisher Scientific, USA) kullanıldı. Sulandırılan spermaların üzerine 5 μL SYBR-14, 5 μL PI eklendi. Bu işlemin ardından spermalar 38°C'deki etüv içerisinde karanlık ortamda 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası akış sitometri cihazıyla (Cytoflex, Beckman-Coulter, USA) canlılık oranı % olarak ölçüldü. Akrozomal hasar düzeyinin belirlenmesi amacıyla ise Lectin PNA from Arachis hypogaea (peanut agglutinin), Alexa Fluor™ 488 Conjugate (L21409, ThermoFisher Scientific, USA) kullanıldı. Bu işlem sırasında sulandırılan spermaya 5 μL Lectin PNA ve 3 μL PI boyası eklendi. Aynı inkübasyon süresinin ardından akış sitometri cihazıyla total akrozomal hasar düzeyi % olarak ölçüldü. Mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi amacıyla 1,1',3,3'-Tetraethyl-5,5',6,6'-tetrachloroimidacarbocyanine iodide (JC-1 Dye, Mitochondrial Membrane Potential Probe, (T3168, ThermoFisher Scientific, USA) kullanıldı. Sulandırılan sperma üzerine 2.5 μL JC-1 eklendi. Aynı inkübasyon süresinin ardından akış sitometri cihazıyla yüksek ve düşük membran potansiyeline sahip spermatozoonlar ayrı ayrı görüntüldü ve % olarak ifade edildi (23).

Total lipid, Yağ Asidi, Vitaminler ile Kolesterol Analizleri

Lipidlerin Ekstraksiyonu: Sperma örneklerinden lipidlerin ekstraksiyonu, Hara ve Radin (24)'in bildirdiği yöntemle yapıldı.

Total Lipid: Sperma örneklerindeki total lipid miktarları Frings ve ark. (25)'nin bildirdiği metoda göre fosfovanilin reaktifi ile spektrofotometrik olarak belirlendi.

Yağ Asitleri: Doku ve vücut sıvılarındaki yağ asitleri analizleri yapılırken yağ asitleri % 2'lik sülfürik

asit içeren metanolde metil esterlere dönüştürülerek analiz edilmektedir. Bunun için önce lipid ekstraktlardaki yağ asitleri, yağ asidi metil esterlerine dönüştürülmekte ve daha sonra da yağ asidi metil esterlerinin analizi yapılmaktadır (26).

Vitaminler ve Kolesterol: Sperma lipid ekstraktlarındaki vitaminler ve kolesterol analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı kullanıldı (27-30).

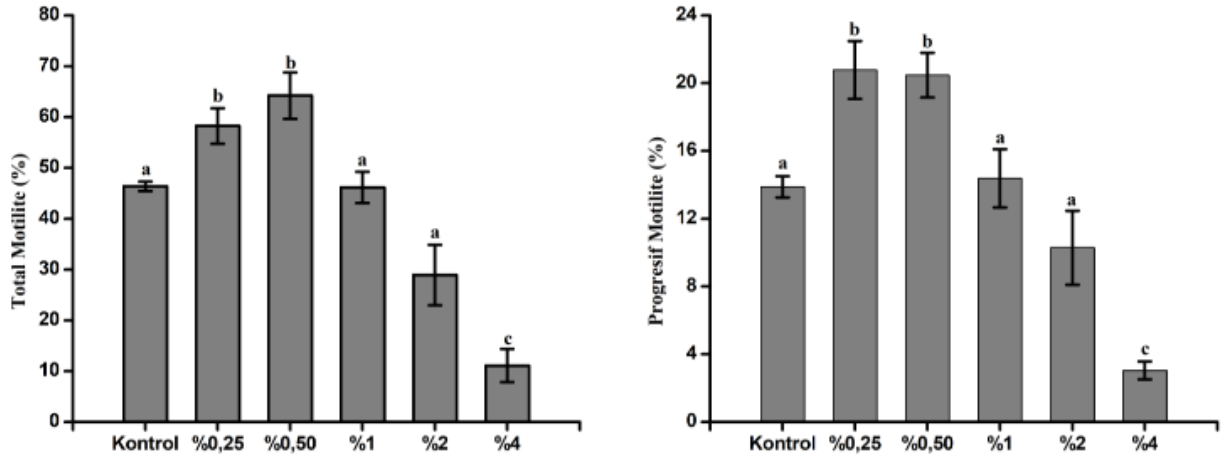
Oksidatif Stres Analizleri: Dondurulan koç sperması örnekleri oda sıcaklığında çözülmeye bırakıldı. Daha sonra sperma 600 g x 10 dakika x 4°C santrifüj edildi. Hüresel pelet üç kez damıtılmış suyla yıkandı ve her seferinde santrifüj uygulandı ve pelet korundu. Daha sonra hüresel pelet ayrıldı, tartıldı ve 1:10 (ağırlık/hacim) oranında damıtılmış su ile seyreltildi. Daha sonra tüm numuneler Bullet Blender Doku Homojenizatörü (Next Advance Bullet Blender, BBY24M-CE Model, Next Advance, Inc. Averill Park, New York, ABD) ile hız 10 ve süre 4'te homojenleştirildi. Homojenat, MDA, GSH, CAT, GST, SOD'un miktarını belirlemek için 4°C'de 3.000 g'de 15 dakika boyunca ve GSH-Px miktarını test etmek için 55 dakika boyunca 10.000 g'de santrifüjlendi (Hettich Mikro 200R, Tuttleen, Almanya). MDA, GSH, CAT, GST, SOD, GSH-Px analizlerinde süpernatantlar kullanıldı.

MDA düzeyi Placer ve ark. (31), tarafından açıklanan yöntemle göre test edildi. GSH düzeyi Ellman ve ark. (32)'nin yöntemiyle belirlendi. CAT aktivitesi Aebi (33) yöntemi kullanılarak ortaya çıkarıldı. GSH-Px aktivitesinin ölçümü Beutler (34) yöntemiyle yapıldı. GST aktivitesini test etmek Habig ve ark. (35) metodu kullanıldı. SOD aktivitesi için Sun ve ark. (36) metodu kullanıldı. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi, Lowry ve ark. (37) tarafından açıklanan yöntem kullanılarak gerçekleştirildi.

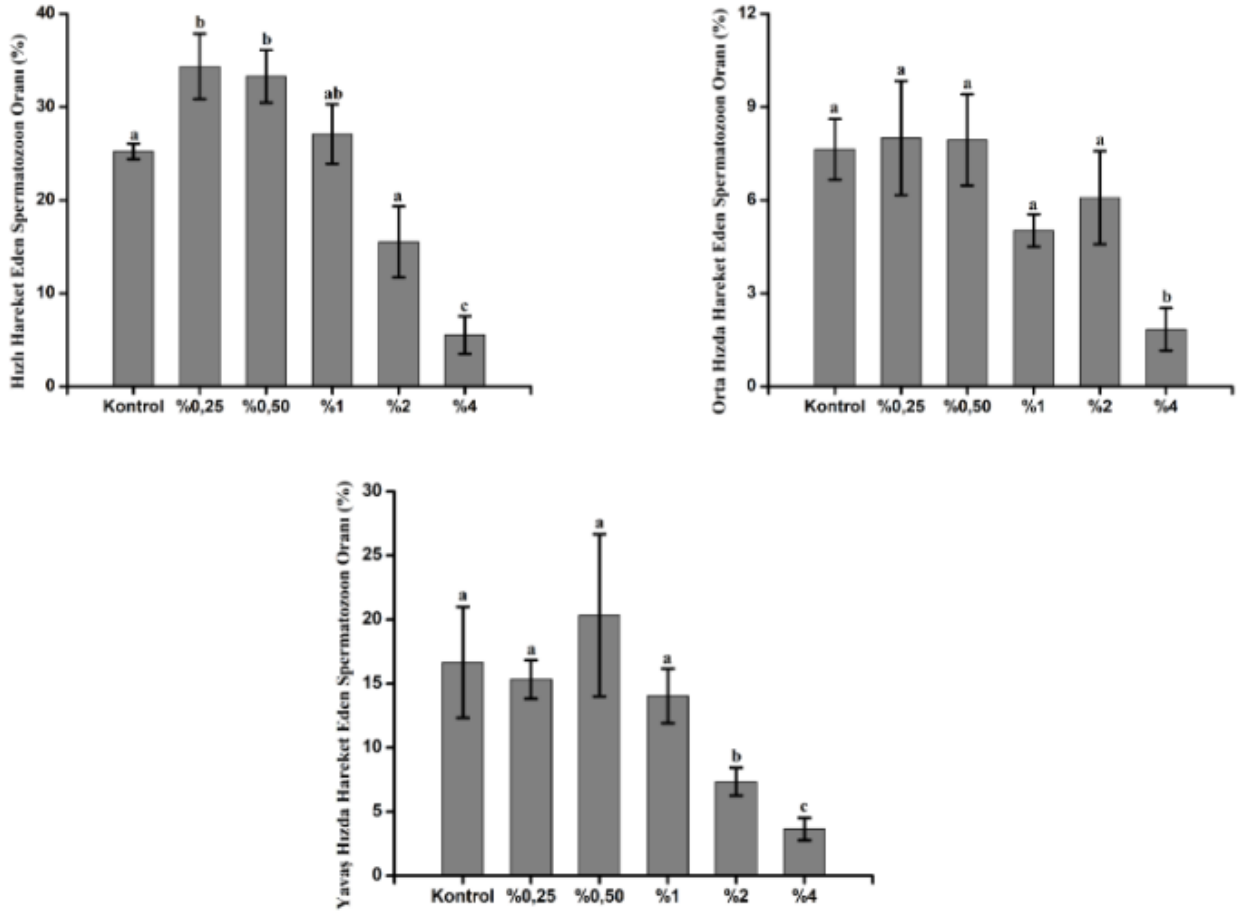
İstatistiksel Analizler: Bütün istatistiksel analizler için SPSS (versiyon 22) istatistik programı kullanıldı. P<0.05 istatikselsel olarak anlamlı kabul edildi. Yapılan normallik analizi sonrası grupların normal dağılım göstermediği belirlendi. Kontrol ve GB ilaveli deney grupları arasındaki farklılıkları belirlemek için non-parametrik Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı ve ikili karşılaştırmalar için de non-parametrik Mann-Whitney-U testi tercih edildi.

Bulgular

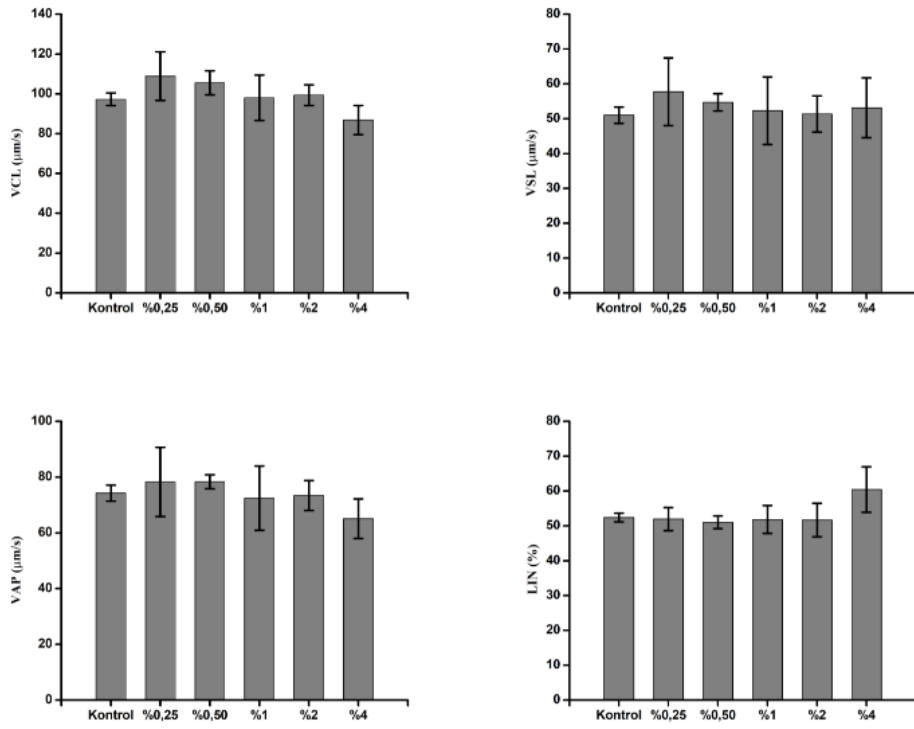
Motilite ve Kinematik Parametreler: Çözdürülen spermalardan %0.25 ve %0.50 GB kontrol grubuna göre önemli oranda (P<0.05) total, progresif motilite değerlerinde ve hızlı hareket eden spermatozoon oranlarında artış sağladı. Kontrol grubuna göre %4 GB total, progresif motilite, hızlı, orta ve yavaş hareket eden spermatozoon oranlarında önemli oranda (P<0.05) azalmaya neden oldu (Şekil 1 ve 2). Dondurma-çözdürme sonrası kinematik parametreler açısından yapılan istatikselsel analizler sonucunda kontrol ve deney grupları arasında istatikselsel açıdan herhangi bir farklılık tespit edilemedi (Şekil 3 ve 4).



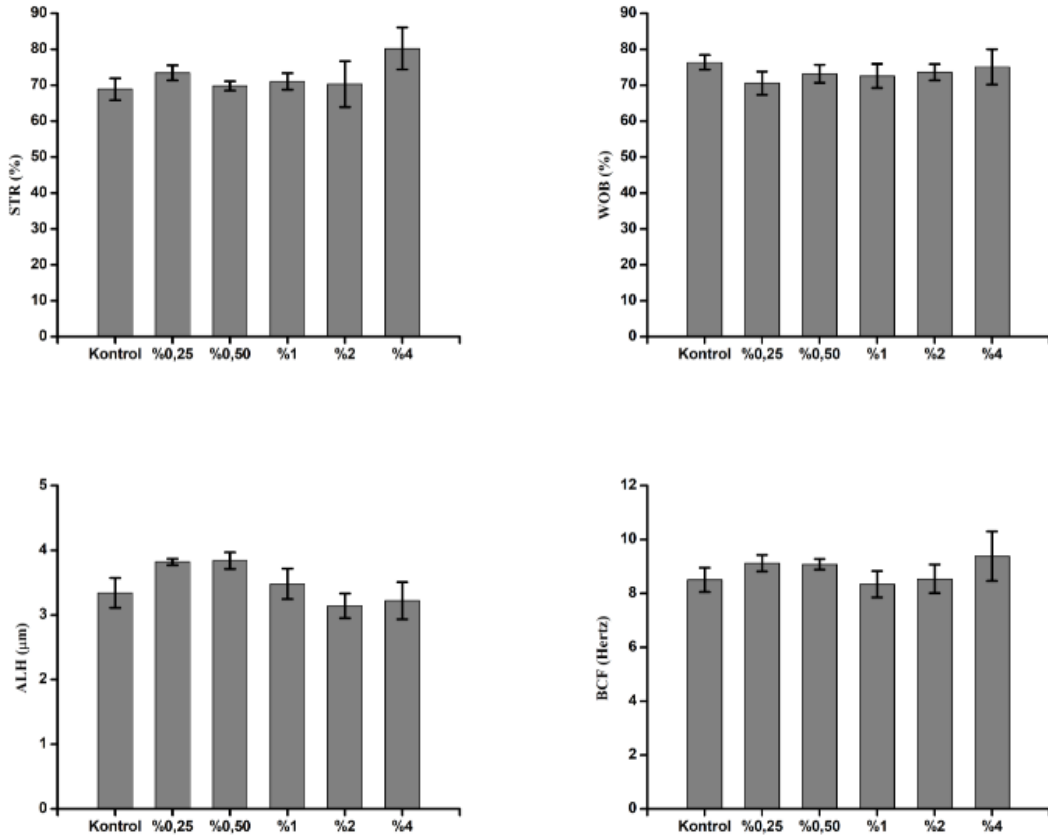
Şekil 1. Kontrol ve Deney Gruplarına ait dondurma-çözdürme sonucu belirlenen total ve progresif motilite değerleri



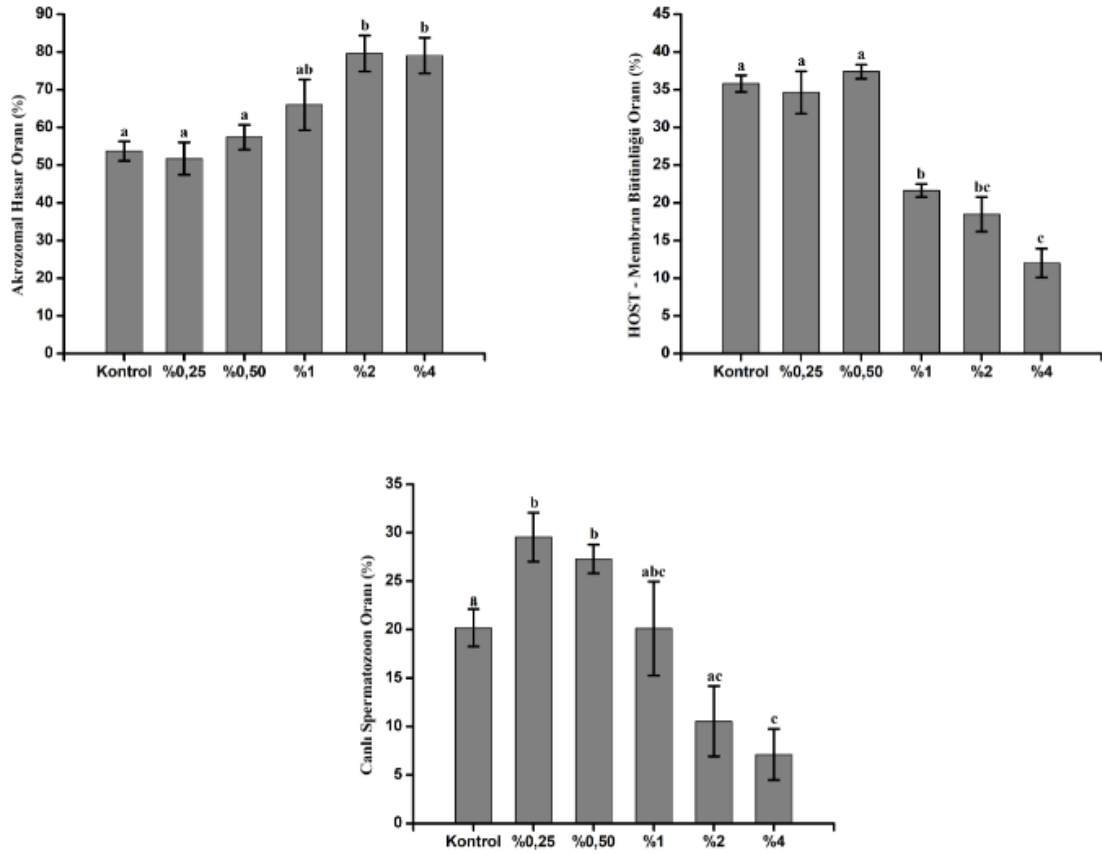
Şekil 2. Kontrol ve Deney Gruplarına ait dondurma-çözdürme sonucu belirlenen hızlı, orta ve yavaş hareket eden spermatozoon oranları



Şekil 3. Kontrol ve Deney Gruplarına ait dondurma-çözdürme sonucu belirlenen bazı kinematik parametre (VCL, VSL, VAP, LIN) değerleri



Şekil 4. Kontrol ve Deney Gruplarına ait dondurma-çözdürme sonucu belirlenen bazı kinematik parametre (STR, WOB, ALH, BCF) değerleri



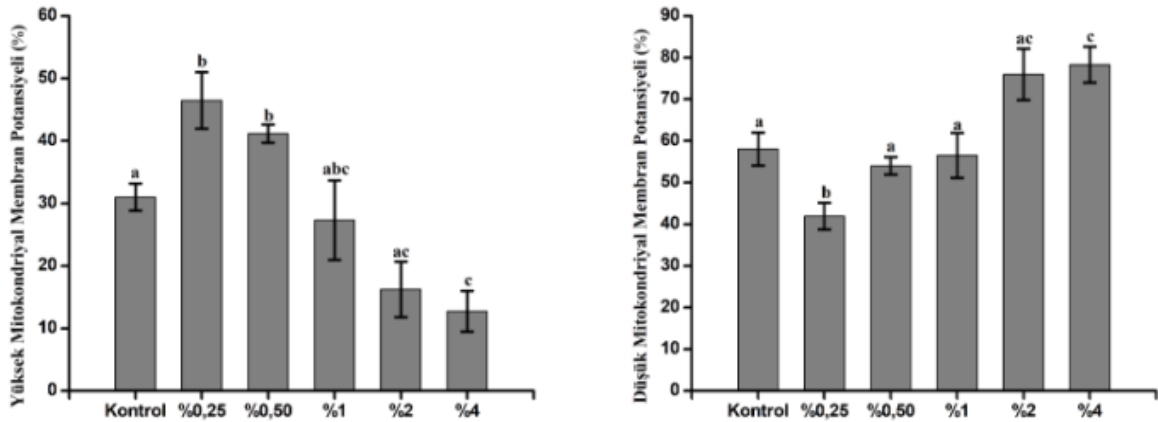
Şekil 5. Kontrol ve Deneş Grularına ait dondurma-çözdürme sonucu belirlenen akrozomal hasar, membran bütünlüğü ve canlı spermatozoon oranları

Membran Bütünlüğüne (HOS Test) ait Değerler:

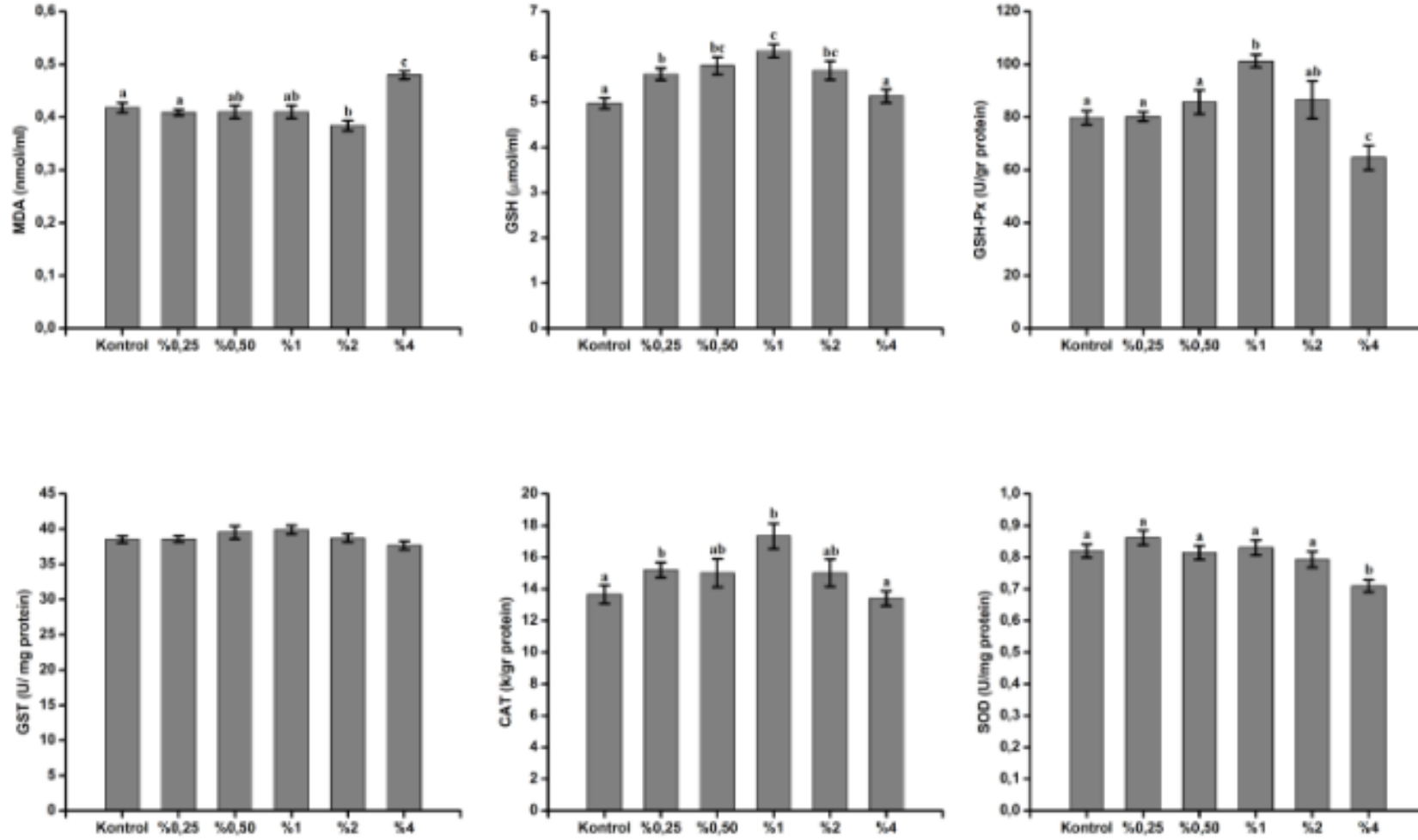
Çözdürme sonrası membran bütünlüğünün %1, 2 ve 4 GB gruplarında, kontrol grubuna göre önemli oranda ($P<0.05$) azaldığı tespit edildi (Şekil 5).

Akış sitometrik Analizleri: Çalışmada sperma sulandırıcısına %2 ve %4 GB ilavelerinin, kontrol, %0.25 ve %0.50 GB ilavelerine göre akrozomal hasar oranını arttırdığı görüldü ($P<0.05$). Ayrıca %0.25 ve %0.50 GB kontrol grubuna göre canlı spermatozoon oranını önemli düzeyde artırırken, %4 GB kontrol

grubuna göre bu parametreyi ($P<0.05$) azalttı (Şekil 5). Dondurma-çözdürme sonrası %0.25 ve %0.50 GB kontrol grubuna göre yüksek mitokondriyal membran potansiyelini önemli oranda ($P<0.05$) artırırken, %4 GB bu potansiyeli önemli seviyede ($P<0.05$) azalttı. Dondurma-çözdürme sonrası %0.25 GB ise düşük mitokondriyal membran potansiyelini kontrol grubuna göre önemli düzeyde ($P<0.05$) azaltırken, %4 GB bu potansiyeli ($P<0.05$) artırdı (Şekil 6).



Şekil 6. Kontrol ve Deneş Grularına ait dondurma-çözdürme sonucu belirlenen yüksek/düşük mitokondriyal membran potansiyeli oranları



Şekil 7. Kontrol ve Deneş Grularına ait dondurma-çözdürme sonucu belirlenen oksidatif stres parametre değeri

Tablo 1. Ginkgo Biloba ekstresinin koç spermasına farklı oranlarda ilave edilmesiyle yapılan dondurma-çözdürme işlemi sonrasında belirlenen vitamin ve kolesterol düzeyleri

Deney Grupları	Vitamin K1 (µg/mL)	Vitamin K2 (µg/mL)	α-tokoferol (µg/mL)	Ergosterol (µg/mL)	δ-tokoferol (µg/mL)	Retinol (µg/mL)	Kolesterol (µg/mL)	Vitamin D2 (µg/mL)	Vitamin D3 (µg/mL)
Kontrol	0.23 ± 0.08	0.87 ± 0.57	20.47 ± 1.71	1.37 ± 0.64	0.23 ± 0.15	0.34 ± 0.11	671.87 ± 92.36	1.12 ± 0.72	0.40 ± 0.12
% 0.25	0.95 ± 0.51	1.88 ± 0.71	27.15 ± 3.14	3.37 ± 0.47	0.74 ± 0.42	0.28 ± 0.11	693.13 ± 86.62	0.92 ± 0.54	0.72 ± 0.22
% 0.50	0.44 ± 0.21	0.98 ± 0.54	23.19 ± 4.69	3.04 ± 1.10	1.16 ± 0.24	0.17 ± 0.09	565.85 ± 72.06	0.07 ± 0.07	0.60 ± 0.25
% 1	1.20 ± 0.52	2.66 ± 0.75	26.91 ± 2.80	4.46 ± 0.44	1.25 ± 0.48	0.43 ± 0.12	784.57 ± 53.60	0.85 ± 0.52	0.68 ± 0.24
% 2	0.51 ± 0.10	1.60 ± 1.20	24.55 ± 3.26	4.65 ± 0.63	1.00 ± 0.28	0.30 ± 0.17	800.98 ± 11.51	0.42 ± 0.42	0.74 ± 0.13
% 4	0.54 ± 0.23	3.20 ± 1.20	30.51 ± 5.66	4.41 ± 1.68	1.20 ± 0.64	0.42 ± 0.14	650.09 ± 60.46	0.74 ± 0.34	0.56 ± 0.29

Yukarıda verilen parametreler açısından kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel anlamda bir fark tespit edilememiştir (P>0.05).

Tablo 2. Ginkgo Biloba ekstresinin koç spermasına farklı oranlarda ilave edilmesiyle yapılan dondurma-çözdürme işlemi sonrasında belirlenen doymuş yağ asidi (SFA) düzeyleri

Deney Grupları	Miristik asit (C14:0)	Palmitik asit (C16:0)	Stearik asit (C18:0)	ΣSFA
Kontrol	0.51 ± 0.01	24.40 ± 0.63	13.97 ± 0.93	38.89 ± 1.33
% 0.25	0.58 ± 0.04	25.24 ± 0.53	13.41 ± 0.78	39.24 ± 0.97
% 0.50	0.57 ± 0.02	25.33 ± 0.35	13.92 ± 0.56	39.84 ± 0.47
% 1	0.47 ± 0.01	25.07 ± 0.40	14.35 ± 0.71	39.90 ± 0.40
% 2	0.50 ± 0.04	25.18 ± 0.25	13.56 ± 0.32	33.82 ± 3.10
% 4	0.54 ± 0.03	25.33 ± 0.24	12.73 ± 0.77	36.06 ± 2.76

Yukarıda verilen parametreler açısından kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel anlamda bir fark tespit edilememiştir (P>0.05).

Tablo 3. Ginkgo Biloba ekstresinin koç spermasına farklı oranlarda ilave edilmesiyle yapılan dondurma-çözdürme işlemi sonrasında belirlenen tekli doymamış yağ asidi (MUFA) düzeyleri

Deney Grupları	Palmitoleik asit (C16:1 n7)	Oleik asit (C18:1 n9)	ΣMUFA
Kontrol	4.04 ± 0.21	25.60 ± 0.56	30.74 ± 0.66
% 0.25	4.33 ± 0.26	27.57 ± 1.03	33.02 ± 1.49
% 0.50	4.25 ± 0.27	27.01 ± 1.10	32.05 ± 1.63
% 1	3.65 ± 0.11	25.67 ± 0.72	30.92 ± 0.87
% 2	4.06 ± 0.28	27.59 ± 0.66	35.98 ± 2.11
% 4	4.41 ± 0.22	28.39 ± 1.10	36.81 ± 2.73

Yukarıda verilen parametreler açısından kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel anlamda bir fark tespit edilememiştir (P>0.05).

Tablo 4. Ginkgo Biloba ekstresinin koç spermasına farklı oranlarda ilave edilmesiyle yapılan dondurma-çözdürme işlemi sonrasında belirlenen çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) düzeyleri

Deney Grubu	Linoleik asit (C18:2 n6)	α-linolenik asit (C18:3 n3)	Araşidonik asit (C20:4 n6)	Dokozapentaenik asit (C22:5 n6)	Dokozahexaenik asit (C22:6 n3)	ΣPUFA
Control	14.04 ± 0.64	0.69 ± 0.03	6.70 ± 0.42	1.49 ± 0.20	2.68 ± 0.15	25.54 ± 0.97
% 0.25	14.80 ± 0.90	0.64 ± 0.01	6.74 ± 0.66	1.24 ± 0.09	2.53 ± 0.24	25.77 ± 1.52
% 0.50	14.63 ± 0.60	0.68 ± 0.01	6.86 ± 0.52	1.33 ± 0.09	2.53 ± 0.25	25.71 ± 1.27
% 1	14.23 ± 0.61	0.71 ± 0.03	7.00 ± 0.30	1.70 ± 0.27	2.71 ± 0.12	26.58 ± 0.50
% 2	13.99 ± 0.51	0.73 ± 0.03	6.35 ± 0.24	1.57 ± 0.20	2.32 ± 0.18	25.20 ± 0.65
% 4	14.26 ± 0.56	0.72 ± 0.04	6.09 ± 0.41	1.47 ± 0.19	2.27 ± 0.25	24.81 ± 0.95

Yukarıda verilen parametreler açısından kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel anlamda bir fark tespit edilememiştir (P>0.05).

Total lipid, Yağ Asidi, Vitaminler ile Kolesterol Değerleri: Dondurma-çözdürme sonrası yapılan analizler sonucunda yağ asitleri, vitaminler ve kolesterol düzeyleri açısından kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel anlamda herhangi bir farklılık tespit edilemedi (Tablo 1, 2, 3 ve 4).

Oksidatif Stres Değerleri: Dondurma-çözdürme sonrası yapılan oksidatif stres analizleri sonucunda %4 GB kontrol grubuna göre MDA düzeyini önemli düzeyde (P<0.001) artırırken, %2 GB bu oranı (P<0.05) azalttı. Ayrıca %0.25, %0.50, %1 ve %2 GB kontrol grubuna göre GSH seviyesini önemli oranda (P<0.05) artırdı. Kontrol grubuna göre %1 GB GSH-Px düzeyini önemli oranda artırırken (P<0.001), %4 GB önemli azalma (P<0.01) sağladı. Kontrol ve deney grupları arasında GST düzeylerine bakıldığında istatistiksel anlamda herhangi bir farklılık belirlenemezken %0.25 ve %1 GB'nin kontrol grubuna göre CAT seviyesini önemli oranda artırdığı (P<0.05) belirlendi. Ayrıca %4 GB kontrole göre SOD'u önemli oranda (P<0.001) azalttı (Şekil 7).

Tartışma

Yapılan literatür taraması sonrası koçlarda GB ekstraktının sperma sulandırıcısına ilavesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu sebeple bu çalışma sonrası elde edilen verilerin oldukça değerli olduğu düşünülmektedir. Yaptığımız çalışmada koç spermasının dondurulması amacıyla %4 GB ilavesinin motilite ve akış sitometrik parametreleri olumsuz yönde

etkilediği belirlenmiştir. Ayrıca bu oran spermatozoonlarda LPO'nun bir göstergesi olan MDA düzeyini artırırken, antioksidan parametreler olan GSH-Px ve SOD düzeylerini ve membran bütünlüğünü azaltmıştır. Spermatozoon metabolizması üzerine tespit edilen bu olumsuz etkiler GB ekstresinin yüksek oranlarda sperma sulandırıcılarına ilavesinin toksik etki oluşturabileceğini göstermiştir. Belirlenen bu bulgular ile Ondrizek ve ark. (22), insan spermasına yüksek oranda GB ilavesi sonucu elde ettikleri bulgular benzerlik göstermektedir. Bu olumsuz etkinin altında yatan sebep tam olarak açıklanamamakla beraber GB'nin içeriğinde bulunan kuersetinin yüksek oranlarda pro-oksidan özellik göstererek (38) spermatozoonlarda oksidatif stresi tetiklediği düşünülmektedir.

Yüksek oranda GB ilavesinin dondurulmuş-çözdürülmüş spermatozoonlarda oluşturduğu hasarın aksine, düşük oranlarda (%0.25-%0.50) ilavesinin spermanın motilitesi, canlılığı, mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkilerinin oldukça olumlu olduğu bu çalışmada ortaya konmuştur. Ayrıca yine düşük oranlarda GB ilavesi GSH ve CAT gibi antioksidan enzim düzeyinde de önemli artışlar sağlamıştır. GB ekstresinin antioksidan özelliği (6, 39) bilinmektedir. GB hücrelerde apoptozis ile ilişkili genlerin etkilerini ve serbest radikal üretimini azalttığı, doku ve hücrelerde antioksidan enzim aktivitesini artırdığı, eksojen toksik uyarımların neticesine karşı hücre bütünlüğünü koruyucu bir ajan olarak etki gösterdiği bildirilmiştir (40). GB'nin süperoksit ve hidroksil radikallerine süpürücü etki gösterdiği (6, 39), reaktif oksijen türlerinin üretimini

engellediği (41) ve nitrik oksit ile etkileşime girdiği bildirilmiştir (42). Ayrıca bu ekstraktın oksidatif stres sonucu oluşan hidrojen peroksit'e karşı potansiyel bir ajan olduğu bildirilmiştir (43). Bunların yanı sıra hem hayvan modellerinde hemde insan deneklerde serbest radikalleri temizlediği ve redoks homeostazisini koruduğu ortaya konulmuştur (44, 45). Literatür bilgi GB ekstsresinin antioksidan etkisini ortaya koymuştur. Bizim çalışmamızda literatür bilgisi ile desteklenmektedir. Spermatolojik açıdan belirlenen olumlu etkiler ise GB'nin temel antioksidan özelliklerinden (6, 39), serbest radikal üretimini azaltmasından (40) süperoksit ve hidroksil radikallerine süpürücü etki göstermesinden ve reaktif oksijen türlerinin üretimini baskılamasından kaynaklandığı düşünölmektedir (41). GB ekstsresinin koç sperma sulandırıcısına ilavesi ile ilgili bir çalışma yapılmamış olmasına rağmen GB'yi oluşturan en önemli antioksidanlardan biri olan kuersetin ile ilgili yeterli bilgi bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada 5 ve 10 µg/mL kuersetinin koç spermasına ilavesinin dondurma-çözdürme sonrası spermatozoon canlılığını artırdığı belirlenmiştir (46). Koçlarda yapılan bir başka çalışmada 10-20 µM kuersetin ilavesinin dondurma-çözdürme sonrası sperma kalitesini artırdığı tespit edilmiştir (38). Kuersetin'in koç spermasına ilavesi ile ilgili yapılan

çalışmalar ile bizim yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz bulgular paralellik göstermektedir. Bu durum hem kuersetinin hemde yüksek oranda kuersetin içeren GB ekstsresinin temel antioksidan özellikleri sayesinde spermatozoon membranını dondurma-çözdürme süreci sırasında oluşan hasarlardan önemli oranda koruduğunu ortaya koymuştur. Dondurma-çözdürme işleminin sonrası deney ve kontrol grupları arasında vitamin, yağ asitleri ve kolesterol düzeyleri açısından herhangi bir farklılık belirlenememiştir. Bu durumun sebebi tam olarak açıklanamamakla beraber dondurma-çözdürme işleminin tüm gruplarda hücre membranlarında benzer derecede hasara sebep olmasından dolayı yağ asitleri, vitaminler ve kolesterol düzeyleri arasında bir farklılığının oluşmadığı düşünölmektedir.

Sonuç olarak; koçlarda sperma sulandırıcılarına %0.25-%0.50 GB ekstsresinin ilave edilmesinin spermanın dondurulup-çözdürölme işlemleri sırasında oluşan hasarlara karşı spermatozoonları koruduğu ve antioksidan özellikleri sayesinde dondurma kalitesini artırdığı belirlenmiştir. Belirtilen oranlarda GB ekstsresinin koç sperma sulandırıcılarına ilavesi önerilmektedir.

Kaynaklar

1. Bailey JL, Bilodeau J, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 2000; 21(1): 1-7.
2. Omur A, Çoyan K. Protective effects of the antioxidants curcumin, ellagic acid and methionine on motility, mitochondrial transmembrane potential, plasma membrane and acrosome integrity in freeze-thawed Merino ram sperm. *Vet Med* 2016; 1: 10-16.
3. Özer Kaya Ş, Gür S, Kaya E. Effect of L-arginine addition on long-term storability of ram semen. *Andrologia* 2018; 50(4): e12945.
4. Türk G, Koca RH, Güngör İH, et al. Effect of hydrated C60 fullerene on lipid, vitamin and amino acid composition in frozen-thawed ram semen. *Anim Reprod Sci* 2022; 238: 106939.
5. Roychoudhury N, Mishra RK. Ginkgo biloba Linn.: A promising species of potential importance. *Van Sangyan* 2016; 3(7): 35-37.
6. Pincemail J, Dupuis M, Nasr C, et al. Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of Ginkgo biloba extract. *Experientia* 1989; 45: 708-712.
7. Schiller J, Arnhold J, Glander HJ, Arnold K. Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy-effects of freezing and thawing. *Chem Phys Lipids* 2000; 106: 145-156.
8. Perez-Pe R, Grasa P, Fernandez-Juan M, Peleato ML, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 226-233.
9. Türk G. Reaktif oksijen türlerinin spermatozoon fonksiyonları üzerindeki fizyolojik ve patolojik etkileri. *Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics* 2015; 1: 26-34.
10. Çoyan K, Başpınar N, Bucak MN, Akalın PP. Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. *Cryobiology* 2011; 63: 1-6.
11. Demir K, Bakırer Öztürk G, Cirit Ü, et al. Effects of cooling rate on membrane integrity and motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2015; 21: 61-67.
12. Muller K, Pomorski T, Muller P, Herrmann A. Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *J Cell Sci* 1999; 112: 11-20.
13. Towhidi A, Zeinoaldini S, Ardebili R, Dadashpour Davachi N, Nasiri AH. Combined n-3 fatty acids and Î±-tocopherol supplementation improved the ovine sperm cryosurvival. *Iran J Biotechnol* 2013; 114: 238-243.
14. Yeh YC, Liu TJ, Wang LC, et al. A standardized extract of Ginkgo biloba suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes. *Br J Pharmacol* 2009; 156: 48-61.
15. Amin A, Abraham C, Hamza AA, et al. A standardized extract of Ginkgo biloba neutralizes cisplatin-mediated reproductive toxicity in rats. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012; 362049.
16. Taepongsorat L, Tangpraputgul P, Kitana N, Malaivijitnond S. Stimulating effects of quercetin on sperm quality and reproductive organs in male rats. *Asian J Androl* 2008; 10: 249-258.
17. Kang BJ, Lee SJ, Kim MD, Cho MJ. A placebo-controlled, double-blind trial of Ginkgo biloba for antidepressant-induced sexual dysfunction. *Hum Psychopharmacol* 2002; 17: 279-284.

18. Mackay D. Nutrients and botanicals for erectile dysfunction: Examining the evidence. *Altern Med Rev* 2004; 9: 4-16.
19. Moyad MA, Barada JH, Lue TF, et al. Prevention and treatment of erectile dysfunction using lifestyle changes and dietary supplements: What works and what is worthless, part II. *Urol Clin North Am* 2004; 31: 259-273.
20. Al-Yahya AA, Al-Majed AA, Al-Bekairi AM, Al-Shabanah OA, Qureshi S. Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of Ginkgo biloba in Swiss albino mice. *J Ethnopharmacol* 2006; 107: 222-228.
21. Ondrizek RR, Chan PJ, Patton WC, King A. An alternative medicine study of herbal effects on the penetration of zona-free hamster oocytes and the integrity of sperm deoxyribonucleic acid. *Fertil Steril* 1999; 71: 517-522.
22. Ondrizek RR, Chan PJ, Patton WC, King A. Inhibition of human sperm motility by specific herbs used in alternative medicine. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 87-91.
23. Güngör İH. Koç Spermalarının Kısa ve Uzun Süreli Saklanması L-karnosin Kullanımının Spermatojik ve Flow-sitometrik Analizlerle Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2023.
24. Hara A, Radin NS. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem* 1978; 90: 420-426.
25. Frings CS, Fendley TW, Dunn RT, Queen CA. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phosphovanillin reaction. *Clin Chem* 1972; 18(7): 673-674.
26. Christie WW. *Gas Chromatography and Lipids*. Glaskow: The Oil Pres, 1990.
27. Katsanidis E, Addis PB. Novel HPLC analysis of tocopherols and cholesterol in tissue. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1137-1140.
28. Sanchez-Machado DI, Lopez-Hernandez J, Paseiro-Losada P, Lopez-Cervantes J. An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *BMC* 2004; 18: 183-190.
29. Karpinska J, Mikoluc B, Motkowski R, Piotrowska-Jastrzebska J. HPLC method for simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and coenzyme Q10 in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 18: 232-236.
30. Lopez-Cervantes J, Sanchez-Machado DI, Rios-Vazquez NJ. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol, alpha-tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate. *J Chromatogr A* 2006; 1105: 135-139.
31. Placer ZA, Cushman L, Johnson BC. Estimation of products of lipid peroxidation in biological fluids. *Anal Biochem* 1966; 16: 359-364.
32. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95.
33. Aebi H. Catalase in vitro. In: *Methods in Enzymology*. Academic press, 1984.
34. Beutler E. *Red cell metabolism: A manual of biochemical methods*, Grune and Starton, New York, 1984.
35. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 130-139.
36. Sun Y, Oberly LW, Ying LA. Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
37. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
38. Khan MT, Khan MIUR, Ahmad E, Yousaf MR, Oneeb M. Synergistic effect of extracellular adenosine triphosphate and quercetin on post-thaw quality and fertilization potential of Lohi ram sperm. *Cryobiology* 2023; 113: 104593.
39. Gardes-Albert M, Ferradini C, Sekaki A, Droy-Lefaix MT. Oxygen-centered free radicals and their interactions with EGb 761 or CP 202. In: Ferradini C, Droy-Lefaix MT, Christen Y (Eds). *Advances in Ginkgo biloba Extract Research*. Paris: Elsevier, 1993: 1-11.
40. Akgül T, Ayyıldız A, Nuhoğlu B, et al. Ginkgo biloba (Egb 761) usage attenuates testicular injury induced by testicular ischemia/reperfusion in rats. *Int Urol Nephrol* 2008; 40: 685-690.
41. Pincemail J, Thirion A, Dupuis M, et al. Ginkgo biloba extract inhibits oxygen species production generated by phorbol myristate acetate stimulated human leukocytes. *Experientia* 1987; 43: 181-184.
42. Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT, Packer L. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 201: 748-755.
43. Oyama Y, Chikahisa L, Ueha T, Kanemaru K, Noda K. Ginkgo biloba extract protects brain neurons against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Brain Research* 1996; 712(2): 349-352.
44. Pietri S, Séguin JR, d'Arbigny P, Drieu K, Culcasi M. Ginkgo biloba extract (EGb 761) pretreatment limits free radical oxidative stress in patients undergoing coronary bypass surgery. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997; 11: 121-131.
45. Seif-El-Nasr M, Abd El-Fattah AA. Lipid peroxide, phospholipids, glutathione levels and superoxide dismutase activity in rat brain after ischaemia: Effect of ginkgo biloba extract. *Pharmacol Res* 1995; 32(5): 273-278.
46. Ardeshirmia R, Zandi M, Sanjabi MR. The effect of quercetin on fertility of frozen-thawed ram epididymal spermatozoa. *S Afr J Anim Sci* 2017; 47(2): 237-244.