

Pinealektomi Uygulanmış Erkek Sıçanlarda Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Evaluation of Spermatologic Parameters in Pinealectomized Male Rats

Tutku Can ACISU¹
Eda ÇOBAN ERCAN²
Gamze UÇAK³
Nida BADILLI¹
İlker ÇOBAN⁴



¹Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

²Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

³Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

⁴İstanbul Okan Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye



ÖZ

Pineal bez, beyin orta kısmında yer alan ve melatonin hormonunun salınımından sorumlu olan yapıdır. Melatonin, reproduktif sistemin düzenlenmesinde rol oynayan önemli hormonlardandır. Sunulan çalışmada, pinealektominin sıçanlarda sperma kalitesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada 36 adet erkek *Sprague-Dawley* cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol, sham, pinealektomi olarak her bir grupta 12 hayvan olmak üzere üç eşit gruba ayrıldı. Pinealektomi grubundan cerrahi yöntemle pineal bez uzaklaştırıldı. Sham grubunda ise pinealektomi işleminin yöntemleri uygulanıp yalnızca pineal bez uzaklaştırılmadı. Çalışma sonunda dekapitasyon sonrasında hayvanların sperma örnekleri alınarak incelendi. Sabah ve gece yapılan uygulamalar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Kontrol grubunda; vücut ağırlığı, pinealektomi ve sham gruplarından daha yüksek ölçüldü ($p < .001$). Testis ağırlığında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Total motilite ve sperma yoğunluğu değerleri; en yüksek kontrol grubundan elde edilirken en düşük değer, pinealektomi grubundan elde edildi ($p < .001$). En fazla anormal spermatozoon oranı pinealektomi grubunda, DNA fragmentasyonu oranı ise sham grubunda gözlemlendi ($p < .001$). Çalışma neticesinde; pinealektomi uygulamasının sıçan spermasında total motilite ve yoğunluğun azalmasına, DNA fragmentasyonu ve anormal spermatozoon oranının ise artmasına neden olarak sperma kalitesini olumsuz yönde etkilediği ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Melatonin, Pinealektomi, Sıçan, Sperm.

ABSTRACT

The pineal gland is the structure located in the central part of the brain that is responsible for the release of the hormone melatonin. Melatonin is one of the important hormones involved in the regulation of the reproductive system. In the present study, we aimed to investigate the effect of pinealectomy on semen quality in rats. In the study, 36 male *Sprague-Dawley* rats were used. The rats were divided into three equal groups as control, sham and pinealectomy with 12 animals in each group. The pineal gland was surgically removed from the pinealectomy group. In the sham group, the methods of pinealectomy procedure were applied and only the pineal gland was not removed. At the end of the study, semen samples of the animals were taken after decapitation and analyzed. No significant difference was observed between morning and night applications. Body weight was higher in the control group than in the pinealectomy and sham groups ($p < .001$). No significant difference was observed in testicular weight between the groups. Total motility and semen density values were highest in the control group and lowest in the pinealectomy group ($p < .001$). The highest abnormal spermatozoon rate was observed in the pinealectomy group and the highest DNA fragmentation rate was observed in the sham group ($p < .001$). As a result of the study, it was revealed that pinealectomy application negatively affected sperm quality by decreasing total motility and density and increasing DNA fragmentation and abnormal spermatozoon ratio in rat sperm.

Keywords: Melatonin, Pinealectomy, Rat, Sperm.

Geliş Tarihi/Received :28.10.2024
Kabul Tarihi/Accepted :21.04.2025
Yayın Tarihi/Publication Date :19.09.2025

Sorumlu Yazar/Corresponding author:
Gamze Uçak

E-mail: gamzeucak@atauni.edu.tr

Cite this article: Acisu, T.C., Çoban Ercan, E., Uçak, G., Badilli, N., & Çoban, İ. (2025). Evaluation of Spermatologic Parameters in Pinealectomized Male Rats. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*, 5(2), 73-80.
<https://doi.org/10.62425/jlasp.1569687>



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License.

Giriş

Pineal bez, epifiz bezi, tüm memelilerde beyin orta kısmında gömülü vaziyette bulunan küçük, beyaz, çam kozalağı görünümündeki yapıdır (Murala vd., 2022). Pineal bez, 16. yüzyılda ruhun merkezi olarak kabul edilmiştir ancak işlevi hakkında bilgiler yetersiz kalmıştır (Aleandri vd., 1996). İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda pineal bezin sirkadiyen ve mevsimsel değişikliklerde vücudun düzenlenmesinde rol oynadığı ortaya koyulmuştur (Masson-Pévet ve Gauer, 2004). Ayrıca; vücut ağırlığının (Lerchl ve Schlatt, 1993) ve vücut ısısının (Viola vd., 2023) düzenlenmesinde, immünoendokrin fonksiyonlar ile tümöral büyümenin engellenmesinde de (Maestroni, 1993) pineal bezin görev aldığı bilinmektedir.

Pineal bez, çevresel sinyalleri retina aracılığıyla alarak nöroendokrin mesajlara dönüştürme özelliği gösteren tek endokrin bezdir (Binkley, 1993). Retinadan alınan sinyaller beyin ilgili merkezlerine iletilip reseptörler uyarılır ve pineal bezden melatonin hormonu salgılanır (Horodincu ve Solcan, 2023). Pineal bezin vücuttaki işlevlerinin birçoğu melatonin hormonu aracılığıyla gerçekleşmektedir. Melatonin hormonunun üretimi, karanlık-aydınlık döngüsüne bağlı olarak ritimsel olarak gerçekleşir. Karanlıkta, özellikle gece saatlerinde, melatonin hormonunun plazma konsantrasyonu en yüksek düzeye ulaşır (Reiter, 1991). Işığa maruz kalma süresi arttıkça melatonin konsantrasyonu düşmeye başlar. Gece-gündüz farkının yanı sıra mevsimsel değişikliklere bağlı olarak da aynı değişim gözlenir (Goldman ve Nelson, 2020).

Melatonin, temel etkisini kısarak, koyun gibi mevsime bağlı poliöstrik hayvanlarda çiftleşme mevsiminin başlaması ve sona erdirilmesinde gösterir. Koyunlarda üreme mevsimi, gün uzunluğunun azaldığı sonbahar-kış aylarıdır. Melatonin, koyunlarda üreme üzerinde uyarıcı etki gösterir ve gün ışığı süresi azaldığında melatonin salınımı artmaya başlar (Malpoux vd., 2020). Kısırlıklarda ise üreme mevsimi, gün uzunluğunun arttığı ilkbahar-yaz aylarıdır. Melatonin, kısırlıklarda üreme üzerinde baskılayıcı etkiye sahiptir. İlkbahar-yaz aylarında gün ışığı artınca melatonin salınımı azalır. Melatoninin dolaşımdaki konsantrasyonunun azalmasıyla baskılayıcı etki ortadan kalkar ve seksüel aktivite başlar (Diekman vd., 2002).

Erkeklerde melatonin; testis dokusunun korunmasında, Leydig hücrelerinden testosteron salınımının uyarılmasında ve Sertoli hücrelerinde enerji metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Frungeri vd., 2017; Paiva vd., 2024; Sun vd., 2020). Önceki çalışmalarda, reaktif oksijen türleri üretiminin arttığı durumlarda melatonin etkisiyle oksidatif stresin önlendiği ortaya koyulmuştur (Espino vd., 2010; Semercioz vd., 2003).

Pinealektomi, pineal bezin çıkarılması işlemine verilen addir. Önceki çalışmalarda çeşitli amaçlarla pinealektomi işlemi gerçekleştirilerek melatoninin farklı organlarda işlevleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Pineal bez yüzeysel bir pozisyonda yer aldığı için genellikle çalışmalar sıçanlar üzerinde yürütülmüştür (Mohammadi ve Zahmatkesh, 2023). Yapılan bir çalışmada, pinealektomi uygulanan sıçanların karaciğerinde lipogenezin azaldığı ve obezitenin tetiklendiği ortaya koyulmuştur (Kim vd., 2020). Başka bir çalışmada, pinealektomize sıçanlara pilokarpin intraperitoneal enjeksiyon ile uygulanarak deneysel epilepsi oluşturulmuştur. Pinealektomize grupta, kontrol gurubuna göre daha hızlı ve daha çok sayıda nöbet oluşumu gözlenmiştir (de Lima vd., 2005). Pinealektomi uygulanan sıçanlarda oksidatif stresin indüklendiği ve glutatyon sisteminin değiştiği ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (De Butte ve Pappas, 2007). Reprodüktif sistem üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda; pinealektomi uygulanan sıçanlarda ovulasyon oranının azaldığı, ovaryumlarda morfolojik değişikliklerin meydana geldiği saptanmıştır (Dair vd., 2008). Hamile sıçanlarda ise kan östradiol ve progesteron konsantrasyonunun artmasına neden olduğu gözlenmiştir (Nir ve Hirschmann, 1980). Bir diğer çalışmada, pinealektomize sıçanlarda endometriyal hiperplazi meydana geldiği belirlenmiştir (Pekmez vd., 2005).

Pinealektominin erkek reprodüktif sistem ve sperma üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar yetersiz kalmaktadır. Sunulan çalışmada, pinealektomi uygulanan sıçanlarda spermatolojik parametrelerin etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler

Çalışma için Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul onayı alındı (14.08.2024 tarihli ve 2024/14-01 oturum numaralı karar). Çalışmada 250-300 gram ağırlığında 36 adet *Sprague-Dawley* cinsi erişkin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ortamda ve $21\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık koşullarında barındırıldı. Beslenmelerinde musluk suyu ve standart laboratuvar yemi kullanıldı ve ad libitum besleme uygulandı.

Sıçanlar, her grupta 12 hayvan olacak şekilde 3 eşit gruba ayrıldı. Grup I, kontrol grubu olarak kullanıldı. Grup II ve Grup III ise sırasıyla pinealektomi grubu ve sham grubu olarak tasarlandı. Her grup, altışar sıçan olmak üzere rastgele iki eşit gruba bölündü. Gruplardan biri sabah, diğeri ise gece sakrifiye edilmek üzere ayrı grupları temsil etmek üzere sınıflandırıldı.

Grup II'deki sıçanlara cerrahi yöntem ile pinealektomi uygulandı. Pinealektomi işleminde sıçanlar, Kuszack ve Rodin (Kuszack ve Rodin, 1977) tarafından önceden

tanımlanan yöntemle ketamin (60 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) kombinasyonu ile genel anesteziye alındı. Karınları üzerine yatırılan sıçanlar, kafa derisinden başlayıp iki göz arasından orta hat çizgisinde kafatası tabanına kadar bisturi ile kesilerek açıldı. Ekartör yardımıyla deri flepleri iki yana ayrılarak alt tabakadaki kaslar serbest hale getirildi. Tur cihazı yardımıyla dura materin derinliği boyunca delik oluşturuldu. Düz uçlu penset, oluşturulan delikten uçları açık şekilde içeri sokularak pineal bez tutuldu ve geri çekildi. Ekartör çıkarılıp deri flepleri yeniden bir araya getirilerek dikildi.



Şekil 1. Sıçanlarda cerrahi yöntem ile pineal bezin çıkarılması.

Figure 1. Surgical removal of the pineal gland in rats.

Grup III'teki sıçanlara, pineal bezin çıkarılması kısmı haricinde Grup II'ye uygulanan işlemlerin aynısı uygulandı.

Tüm hayvanlar pinealektomi işleminden 21 gün sonra canlı ağırlıkları tartılarak sakrifiye edildi. Sakrifikasyon işleminin ardından testis dokusu çıkarılarak sağ ve sol testisin ağırlıkları ayrı ayrı tartılıp kaydedildi. Testisler gibi epididimisler de sağ ve sol olarak ayrı şekilde tartıldı. Epididimisin total ağırlığının ardından, sağ kauda epididimis ayrıca tartılıp not edildi. Eklenti üreme bezlerinden vesikula seminalis ve prostatın ağırlıkları da tartılıp kaydedildi.

Sağ kauda epididimisler tartıldıktan sonra sperma eldesi için kullanıldı. Anatomik makas yardımıyla kauda epididimis parçalanarak sperma örneği steril bir petri kabındaki 5 µL tris sulandırıcısının üzerine alındı. Tris ile sulandırılmış haldeki sperma örneğinden 10 µL lam üzerine alınıp lamel ile üzeri kapatıldı ve motilite tayini için ısıtma tablası (37°C) yerleştirilen faz kontrast mikroskopunda (Celestron, Torrance, California, USA) değerlendirildi. Tüm örneklerde lam üzerindeki üç ayrı bölge incelenip ortalama bir motilite skoru belirlenerek kaydedildi.

Sperma yoğunluğunun tespitinde Varışlı ve ark. (Varisli vd., 2009) tarafından tarif edilen yöntemin modifikasyonu uygulandı. Petri kabına alınan sağ kauda epididimisler kesit atılarak ayrıştırıldı ve 37°C'de inkübasyona alındı. Inkübasyonun ardından, sperm süspansiyonu transfer pipetlerine çekilip santrifüj edildi. Bu yöntemle elde edilen saf spermadan 5 µL bir eppendorf tüpüne alınarak üzerine 995 µL distile su ilave edildi. Son karışım homojen hale

getirmek için vortekslendi. Homojen sperma karışımından 10 µL Thoma lamına alınıp spermatozoon sayısı sayılarak yoğunluk tespit edildi.

Anormal spermatozoon oranının tespiti için 20 µL sperma örneği ile 20 µL eosin-nigrosin boya (%1,67 eozin, %10 nigrosin ve 0,1 M sodyum sitrat) lam üzerine alındı (Swanson ve Bearden, 1951). Lamel yardımıyla sperma ve boya karıştırıldı, froti çekildi ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar ışık mikroskopun 400x büyütmesinde incelendi. Tüm örneklerde 200 adet spermatozoon incelenerek baş ve kuyruk bölümlerinde anomali olan hücreler kaydedildi.

DNA fragmentasyonu tespiti için Acridine Orange floresan boyası kullanıldı (Akarsu vd., 2024). Lam üzerine 20 µL sperma örneği alınıp froti çekildi ve kurumaya bırakıldı. Froti örnekleri, Carnoy solüsyonuna (metanol/asetik asit, 3:1) alınarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi tamamlandığında örnekler, önceden hazırlanan Acridine Orange solüsyonu ile 15 dakika muamele edildi. Boyamanın ardından örnekler floresan mikroskop (Zeiss Axioscope, Almanya) ile incelendi.

Melatonin hormonunun salınımı gece saatlerinde artış gösterdiğinden, sabah ile gece uygulaması arasındaki farkın ortaya koyulması amacıyla tüm gruplarda sabah ve gece olmak üzere iki ayrı kesim işlemi uygulanarak sonuçlar elde edilmiştir.

Pineal bezin yerleşim yeri ve spesifik görüntüsü dikkate alınarak yapılan pinealektomi operasyonu, hem işlem esnasında hem de deney sonlandırılırken beyin dokusunun diseksiyonu esnasında ilgili bezin yerleşmiş olduğu beyin bölgesinden çıkarılmış olduğu görüldü. Pineal bezin diseke edilmiş olması durumunda yapılan çok sayıda çalışma ile melatonin seviyesinin düştüğü belirtilmektedir (Kennaway, 2023; Kim vd., 2020; Lee vd., 2020). Dolayısıyla pineal bezin uzaklaştırılması sonucunda melatonin seviyesinin düşmesi kaçınılmaz bir durumdur.

İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS (IBM SPSS Corp., Armonk, NY, ABD, Version 26.0) veri programı ile yapıldı. Verilerin normallik kontrolünde Shapiro-Wilk testi kullanıldı ve dağılımın normallik gösterdiği saptandı. Verilerin homojenlik kontrolü Levene's test kullanılarak yapıldı. Levene's testi sonucunda grupların homojen olduğu belirlendi. Aynı zamanda yapılan uygulamalarda gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmede One-Way ANOVA post-hoc Duncan Testi uygulandı. Çalışma grubunda farklı zamanlarda yapılan ölçümler arasındaki karşılaştırmalar Independent- Samples T testi ile değerlendirildi.

Bulgular

Sabah gerçekleştirilen uygulamada, vücut ağırlığında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Ancak gece gerçekleştirilen uygulamada, kontrol grubunun diğer iki gruptan daha yüksek vücut ağırlığına sahip olduğu saptandı ($p < ,001$). Grup içinde iki uygulama karşılaştırıldığında, kontrol grubunda gece ölçülen ağırlık sabah ölçülenden daha yüksek tespit edildi ($p < ,001$).

Sağ testis ve sol testisin ağırlıklarında herhangi bir istatistiksel fark saptanmadı. Sağ epididimis ağırlıklarında sabah ve gece uygulamaları arasında herhangi bir fark gözlenmedi. Sabah yapılan tartımlarda, pinealektomi grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek sonuç elde edildi. Sol epididimis ağırlıkları da, testis ağırlıklarında olduğu gibi gruplar arasında fark göstermedi. Spermanın elde edildiği sağ kauda epididimis, sabah yapılan tartımda pinealektomi grubunda kontrol ve sham gruplarına kıyasla daha yüksek ölçüldü ($p < ,001$).

Eklenti üreme bezlerinden vesikula seminalisin ağırlığı, gece yapılan uygulamada sham grubunda kontrol grubundan daha yüksek sonuç verdi ($p < ,001$). Kontrol grubunda ise sabah ağırlığı geceden daha fazla ölçüldü. Prostat bezi ise pinealektomi grubunda sabah, geceye kıyasla daha fazla ağırlıkta tespit edildi ($p < ,001$).

Total motilite değeri, sabah ve gece yapılan uygulamalar arasında farklılık göstermedi. Gece yapılan uygulamada

gruplar arasında fark saptanmazken, sabah uygulamasında kontrol grubunun pinealektomi grubundan daha yüksek motiliteye sahip olduğu ortaya koyuldu ($p < ,001$).

Sperma yoğunluğunda motiliteye benzer şekilde sabah-gece uygulamaları arasında fark görülmedi. Sabah uygulamasında gruplar arasında anlamlı bir fark görülmezken gece uygulamasında kontrol grubunun yoğunluğu, sham ve pinealektomi gruplarına göre yüksek olarak saptandı ($p < ,001$).

Başa bağlı anormal spermatozoon oranı, sabah uygulamasında sham grubunda kontrol ve pinealektomi gruplarından yüksek tespit edildi ($p < ,001$). Gece uygulamasında ise en yüksek sonuç pinealektomi grubunda gözlemlendi. Ayrıca pinealektomi grubunda, gece elde edilen sonuçlar sabah uygulaması sonuçlarından daha yüksek belirlendi ($p < ,001$). Kuyruğa bağlı anormal spermatozoon oranı ise, gruplar arasında anlamlı bir fark göstermedi. Total anormal spermatozoon oranına bakıldığında, sabah uygulamasında gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu. Gece uygulamasında ise en düşük anormal spermatozoon oranı sham grubunda gözlemlendi.

DNA fragmentasyonu, sabah ve gece sonuçlarında en yüksek sham grubunda, en düşük ise kontrol grubunda gözlemlendi (Tablo 1 ve Tablo 2).

Tablo 1. Vücut ve bazı reproduktif organ ağırlıkları (g) ($\pm$ SEM)

Table 1. Body and some reproductive organ weights (g) ($\pm$ SEM)

	Vücut Ağırlığı (g)	Sağ Testis Ağırlık (g)	Sol Testis Ağırlık (g)	Sağ Epididimis Ağırlığı (g)	Sol Epididimis Ağırlığı (g)	Sağ Kauda Epididimis Ağırlığı (g)
Sham-Sabah	301,00 $\pm$ 6,31	1,39 $\pm$ 0,05	1,35 $\pm$ 0,05	0,52 $\pm$ 0,01 ^{ab}	0,50 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,00 ^a
Pinealektomi-Sabah	313,41 $\pm$ 12,69	1,34 $\pm$ 0,06	1,11 $\pm$ 0,13	0,54 $\pm$ 0,01 ^b	0,50 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,01 ^b
Kontrol-Sabah	300,50 $\pm$ 14,82 ⁻	1,38 $\pm$ 0,05	1,36 $\pm$ 0,05	0,48 $\pm$ 0,00 ^a	0,50 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,00 ^a
Sham-Gece	315,41 $\pm$ 14,61 ¹	1,51 $\pm$ 0,20	1,46 $\pm$ 0,15	0,50 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,01
Pinealektomi-Gece	316,41 $\pm$ 10,02 ¹	1,34 $\pm$ 0,05	1,32 $\pm$ 0,04	0,48 $\pm$ 0,05	0,48 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,02
Kontrol-Gece	363,33 $\pm$ 5,99 ⁺²	1,38 $\pm$ 0,05	1,39 $\pm$ 0,04	0,51 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,02

Aynı sütundaki farklı simgeler (a, b) sabah uygulamasında gruplar arasındaki farkı ifade eder ($p < ,001$). Aynı sütundaki farklı simgeler (1, 2, 3) gece uygulamasında gruplar arasındaki farkı ifade eder ($p < ,001$). Aynı sütundaki farklı simgeler (-, +) aynı grubun farklı zamanlarda (sabah, gece) yapılan uygulamasında gruplar arasındaki farkı ifade eder ($p < ,001$).

Tablo 2. Vesikula seminalis ve prostat ağırlıkları (g) ile Spermatolojik analiz sonuçları ($\pm$ SEM)**Table 2.** Vesicula seminalis and prostate weights (g) and Spermatological analysis results ($\pm$ SEM)

	Vesikula Seminalis Ağırlığı (g)	Prostat Ağırlığı (g)	Total Motilite (%)	Yoğunluk ($\times 10^6$)	Başa Bağlı Anomaliler (%)	Kuyruğa Bağlı Anomaliler (%)	Total Anormal Spermatozoon Oranı (%)	DNA Hasar Oranı (%)
Sham-Sabah	1,74 $\pm$ 0,10	0,57 $\pm$ 0,08	48,86 $\pm$ 12,18 ^{ab}	100,33 $\pm$ 16,41	6,16 $\pm$ 1,10 ^b	3,00 $\pm$ 0,73	9,16 $\pm$ 0,74	46,16 $\pm$ 3,30 ^b
Pinealektomi-Sabah	1,79 $\pm$ 0,09	0,59 $\pm$ 0,04 ⁻	29,41 $\pm$ 7,31 ^a	91,16 $\pm$ 16,99	3,00 $\pm$ 0,51 ^{-a}	5,00 $\pm$ 1,46	8,00 $\pm$ 1,73	39,33 $\pm$ 3,40 ^{ab}
Kontrol-Sabah	1,70 $\pm$ 0,11 ⁻	0,39 $\pm$ 0,07	62,75 $\pm$ 5,33 ^b	124,66 $\pm$ 8,28	3,16 $\pm$ 0,98 ^a	2,66 $\pm$ 0,49 ⁻	5,83 $\pm$ 0,90	31,83 $\pm$ 3,75 ^{-a}
Sham-Gece	1,70 $\pm$ 0,07 ²	0,41 $\pm$ 0,02	59,40 $\pm$ 4,96	91,00 $\pm$ 13,45 ¹	3,50 $\pm$ 0,76 ¹	3,33 $\pm$ 0,98	6,83 $\pm$ 1,24 ¹	54,83 $\pm$ 2,56 ³
Pinealektomi-Gece	1,58 $\pm$ 0,11 ¹²	0,45 $\pm$ 0,03 ⁺	31,08 $\pm$ 9,13	107,00 $\pm$ 8,66 ¹	7,00 $\pm$ 1,80 ⁺²	6,33 $\pm$ 1,33	13,33 $\pm$ 2,41 ²	34,16 $\pm$ 2,37 ²
Kontrol-Gece	1,43 $\pm$ 0,04 ⁺¹	0,49 $\pm$ 0,02	58,85 $\pm$ 12,06	146,33 $\pm$ 12,45 ²	2,66 $\pm$ 0,42 ¹	5,83 $\pm$ 1,13 ⁺	8,50 $\pm$ 1,17 ¹²	38,33 $\pm$ 3,53 ⁺¹

Aynı sütundaki farklı simgeler (a, b) sabah uygulamasında gruplar arasındaki farkı ifade eder ($p < ,001$). Aynı sütundaki farklı simgeler (1, 2, 3) gece uygulamasında gruplar arasındaki farkı ifade eder ($p < ,001$). Aynı sütundaki farklı simgeler (-, +,) aynı grubun farklı zamanlarda yapılan uygulamasında gruplar arasındaki farkı ifade eder ($p < ,001$)

Tartışma

Pineal bez; beyin orta kısmında yer alan ve önemli endokrin aktiviteye sahip olan bir organdır. Sirkadiyen ve mevsimsel değişikliklere bağlı olarak vücuttaki fonksiyonların düzenlenmesinden pineal bez sorumludur. Pineal bez asıl fonksiyonunu melatonin hormonu salgılayarak gösterir (Forsling vd., 1993). Karanlık hormonu olarak da bilinen melatoninin salınımı ışık miktarına bağlı olarak aydınlık-karanlık döngüsünde düzenlenir. Melatonin, özellikle mevsime bağlı poliöstrik hayvanlarda (kısarak, koyun vb.) üremenin düzenlenmesinde rol oynar. Önceki çalışmalarda; pineal bezin cerrahi yöntemle dışarı alınması işlemi olan pinealektomi uygulamasının, farklı organlarda çeşitli etkiler meydana getirdiği saptanmıştır (De Butte ve Pappas, 2007; de Lima vd., 2005; Kim vd., 2020). Bu çalışmada ise pinealektominin sıçanlarda spermatolojik parametreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Pinealektomi ve sham grubuna yapılan uygulama, vücut ağırlık artışının kontrol grubuna göre daha az olmasına neden olmuştur. Cerrahi işlem sırasında meydana gelen stres, hayvanların vücut ağırlık artışını yavaşlatmıştır. Vücut

ağırlıkları arasında fark oluşurken, testis ağırlıklarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Sağ epididimisin hem total

ağırlığında hem de kauda epididimis ağırlığında, sabah yapılan tartımlarda en yüksek sonuç pinealektomi grubundan elde edilmiştir. Ancak gece tartımlarında gruplar arasında böyle bir farka rastlanmamıştır. Aynı grubun sabah-gece tartımlarında da fark gözlenmemesi, ağırlık farkında melatonin etkisinin olmadığını göstermektedir. Önceki bir çalışma, melatonin uygulamasının epididimis ağırlığı üzerine etkisinin olmadığını gösterdiğinden, çalışma sonucunu doğrulamaktadır (Eleiwe vd., 2008). Eklenti üreme bezlerinin ağırlığı, pinealektomi uygulamasından sonra anlamlı bir fark oluşturmamıştır.

Motilite, spermatozoonların hareketliliğini ifade eder ve fertilizasyon kapasitesinin en önemli belirteçlerinden biridir (İnanç vd., 2022). Koçlar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, üreme mevsimi dışında melatonin implantı kullanıldığında sperma kinematik parametrelerinde artış gözlenmiştir (Casao vd., 2010). Melatoninin, spermatozoonlarda hem mitokondriyal homeostazi

etkileyerek ATP üretimini uyardığı hem de oksidatif strese karşı mitokondriyi koruduğu düşünülmektedir (Ortiz vd., 2011). Çalışma sonucunda en yüksek motilite değeri kontrol grubunda saptanırken en düşük motilite ise pinealektomi uygulanan grupta gözlenmiştir. Çalışmamız sonucunda pinealektomi uygulamasıyla melatonin salınımının engellenmesi, motilitenin düşmesiyle sonuçlanmıştır.

Sperma yoğunluğu, 1 ml hacimdeki spermatozoon sayısını ifade eder. Oksidatif stres oluşumu, testislerin toksik etkili maddeler ile uyarımı gibi çeşitli nedenlerle sperma yoğunluğunda azalma meydana gelmektedir (Akarsu vd., 2024; Tuncer vd., 2023). Sham ve pinealektomi gruplarına uygulanan cerrahi müdahalenin, oksidatif stres düzeylerindeki artışa bağlı olarak sperma yoğunluğunun düşmesine neden olabileceği düşünülmektedir. Kontrol grubuna kıyasla pinealektomi ve sham gruplarında belirgin bir azalma olmakla birlikte iki grubun arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Elde edilen sonuç, sperma yoğunluğunun melatonin varlığından önemli ölçüde etkilenmeyip yapılan müdahaleye bağlı olarak şekillendiği sonucuna varmaktadır.

Anormal spermatozoon oranı, sperma kalitesini etkileyerek spermatozoonların işlevlerinde bozukluklar ile sonuçlanmaktadır. Özellikle başa bağlı anormal spermatozoon oranındaki artış, spermatozoon DNA'sını etkileyerek genetik materyalin aktarımını engellemektedir. Yapılan bir çalışmada, boğa spermasının dondurulması sırasında sulandırıcıya değişen konsantrasyonlarda melatonin ilave edilmiştir. Melatonin ilave edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla anormal spermatozoon oranında düşüş tespit edilmiştir (Ashrafi vd., 2013). Pinealektomi grubunda, özellikle gece uygulamasında gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. Diğer gruplarda ise melatonin salınımına bağlı olarak daha düşük oranda anormal spermatozoon oluşmuştur.

DNA fragmentasyonu, DNA'da meydana gelen geri dönüşümsüz hasardır ve sperma kalitesini etkileyen başlıca etmenlerden biridir. Fareler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada organofosforlu pestisitlere maruziyet sonrası melatoninin koruyucu etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda melatoninin düşük dozlarda bile DNA fragmentasyonuna karşı koruyucu etkili olduğu bilinmektedir (Mir vd., 2022; Sarabia vd., 2009). Melatoninin güçlü antioksidan etkisi sayesinde DNA yapısının korunmasında görev aldığı düşünülmektedir. Hem sabah hem de gece uygulamasında, en düşük hasar kontrol grubunda gözlenirken en yüksek hasar ise sham grubunda

saptanmıştır. Pineal bezin uzaklaştırılmasının yanı sıra uygulanan cerrahi prosedürün de, sperma kalitesini etkileyerek DNA fragmentasyonu oranında ciddi bir artışa yol açtığı düşünülmektedir.

Sonuç

Sonuç olarak elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; pinealektomi uygulaması sıçanlarda total spermatozoon motilitenin ve sperma yoğunluğunun azalmasına neden olurken anormal spermatozoon oranının artmasına yol açmaktadır. Pineal bez çıkarılmasa dahi aynı cerrahi prosedür uygulandığından dolayı sham grubunda da kontrol grubuna kıyasla total motilitede ve yoğunlukta belirgin bir azalma, anormal spermatozoon oranı ve DNA fragmentasyonunda ise artış şekillenmiştir. Pineal bezin uzaklaştırılmasıyla sperma kalitesinde daha ciddi düşüş görülmekle birlikte pineal beze yapılan müdahalede dahi sperma kalitesinin olumsuz etkilenebildiği çalışma sonucunda ortaya koyulmuştur.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışmanın etik kurul onayı Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nda alınmıştır (Tarih: 14.08.2024, Karar numarası: 2024/14-01).

Yazar Katkıları: Konsept – T.C.A.; Tasarım – T.C.A., E.Ç.E.; Denetim – T.C.A.; Kaynaklar – G.U.; Malzemeler – T.C.A., N.B.; Veri Toplama ve/veya İşleme – İ.Ç., E.Ç.E., N.B.; Analiz ve/veya Yorum – T.C.A., İ.Ç.; Literatür Taraması – G.U.; Yazma – G.U.; Eleştirel İnceleme – T.C.A.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval for this study was obtained from the Local Ethics Committee for Animal Experiments of Fırat University (Date: 14.08.2024, Decision number: 2024/14-01).

Author Contributions: Concept – T.C.A.; Design – T.C.A., E.Ç.E.; Supervision – T.C.A.; Resources – G.U.; Materials – T.C.A., N.B.; Data Collection and/or Processing – İ.Ç., E.Ç.E., N.B.; Analysis and/or Interpretation – T.C.A., İ.Ç.; Literature Search – G.U.; Writing Manuscript – G.U.; Critical Review – T.C.A.

Peer-review: Externally peer-reviewed

Funding: The authors declared that they received no financial support for this study.

Declaration of Interests: The authors declare no conflict of interest.

Kaynaklar

- Akarsu, S. A., Gür, C., Küçükler, S., Akaras, N., İleritürk, M., & Kandemir, F. M. (2024). Protective effects of syringic acid against oxidative damage, apoptosis, autophagy, inflammation, testicular histopathologic disorders, and impaired sperm quality in the testicular tissue of rats induced by mercuric chloride. *Environmental Toxicology*, 39(10), 4803–4814. <https://doi.org/10.1002/tox.24395>
- Akarsu, S. A., İleritürk, M., Küçükler, S., Akaras, N., Gür, C., & Kandemir, F. M. (2024). Ameliorative effects of sinapic acid against vancomycin-induced testicular oxidative damage, apoptosis, inflammation, testicular histopathologic disorders and decreased epididymal sperm quality. *Reproductive Toxicology*, 129, 108666.

- <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2024.108666>
- Aleandri, V., Spina, V., & Morini, A. (1996). The pineal gland and reproduction. *Human Reproduction Update*, 2(3), 225-235. <https://doi.org/10.1093/humupd/2.3.225>
- Ashrafi, I., Kohram, H., & Ardabili, F. F. (2013). Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 139(1-4), 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.016>
- Binkley, S. (1993). Structures and molecules involved in generation and regulation of biological rhythms in vertebrates and invertebrates. *Experientia*, 49, 648-653. <https://doi.org/10.1007/bf01923946>
- Casao, A., Vega, S., Palacín, I., Pérez-Pe, R., Laviña, A., Quintín, F., Sevilla, E., Abecia, J., Cebrian-Perez, J., & Forcada, F. (2010). Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa Aragonesa rams. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(3), 425-432. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01215.x>
- Dair, E. L., Simoes, R. S., Simões, M. J., Romeu, L. R. G., Oliveira-Filho, R. M., Abi Haidar, M., Baracat, E. C., & Soares Jr, J. M. (2008). Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. *Fertility and Sterility*, 89(5), 1299-1305. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.03.050>
- De Butte, M., & Pappas, B. (2007). Pinealectomy causes hippocampal CA1 and CA3 cell loss: reversal by melatonin supplementation. *Neurobiology of Aging*, 28(2), 306-313. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.12.004>
- de Lima, E., Soares Jr, J. M., Garrido, Y. d. C. S., Valente, S. G., Priel, M. R., Baracat, E. C., Cavaleiro, E. A., da Graça Naffah-Mazzacoratti, M., & Amado, D. (2005). Effects of pinealectomy and the treatment with melatonin on the temporal lobe epilepsy in rats. *Brain Research*, 1043(1-2), 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.02.027>
- Diekmann, M., Braun, W., Peter, D., & Cook, D. (2002). Seasonal serum concentrations of melatonin in cycling and noncycling mares. *Journal of Animal Science*, 80(11), 2949-2952. <https://doi.org/10.2527/2002.80112949x>
- Eleiwe, S. A., Al-Taii, A. A., & Mobarak, H. J. (2008). Effect of melatonin on histology of the epididymidis of adult rat. *Iraqi Journal of Medical Sciences*, 6(2).
- Espino, J., Bejarano, I., Ortiz, Á., Lozano, G. M., García, J. F., Pariente, J. A., & Rodríguez, A. B. (2010). Melatonin as a potential tool against oxidative damage and apoptosis in ejaculated human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 94(5), 1915-1917. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.12.082>
- Forsling, M. L., Stoughton, R. P., Zhou, V., Kelestimur, H., & Demaine, C. (1993). The role of the pineal in the control of the daily patterns of neurohypophysial hormone secretion. *Journal of Pineal Research*, 14(1), 45-51. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1993.tb00484.x>
- Frungieri, M. B., Calandra, R. S., & Rossi, S. P. (2017). Local actions of melatonin in somatic cells of the testis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1170. <https://doi.org/10.3390/ijms18061170>
- Goldman, B. D., & Nelson, R. J. (2020). Melatonin and seasonality in mammals. *Melatonin*, 225-252. <https://doi.org/10.1201/9781003068570-9>
- Horodincu, L., & Solcan, C. (2023). Influence of different light spectra on melatonin synthesis by the pineal gland and influence on the immune system in chickens. *Animals*, 13(13), 2095. <https://doi.org/10.3390/ani13132095>
- İnanç, M. E., Güngör, Ş., Avdatek, F., Yeni, D., Gülhan, M. F., Olğaç, K. T., Denk, B., & Taşdemir, U. (2022). Thymoquinone improves motility, plasma membrane integrity and DNA integrity of frozen-thawed ram semen. *Andrologia*, 54(10), e14547. <https://doi.org/10.1111/and.14547>
- Kennaway, D. J. (2023). The mammalian gastro-intestinal tract is a NOT a major extra-pineal source of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 75(4), e12906. <https://doi.org/10.1111/jpi.12906>
- Kim, M., Lee, S. M., Jung, J., Kim, Y. J., Moon, K. C., Seo, J. H., Ha, T. K., & Ha, E. (2020). Pinealectomy increases thermogenesis and decreases lipogenesis. *Molecular Medicine Reports*, 22(5), 4289-4297. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11534>
- Kuszk, J., & Rodin, M. (1977). A new technique of pinealectomy for adult rats. *Experientia*, 33, 283-284. <https://doi.org/10.1007/bf02124114>
- Lee, B. H., Bussi, I. L., de la Iglesia, H. O., Hague, C., Koh, D. S., & Hille, B. (2020). Two indoleamines are secreted from rat pineal gland at night and act on melatonin receptors but are not night hormones. *Journal of Pineal Research*, 68(2), e12622. <https://doi.org/10.1111/jpi.12622>
- Lerchl, A., & Schlatt, S. (1993). Influence of photoperiod on pineal melatonin synthesis, fur color, body weight, and reproductive function in the female Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology*, 57(2), 359-364. <https://doi.org/10.1159/000126380>
- Maestroni, G. J. (1993). The immunoneuroendocrine role of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 14(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1993.tb00478.x>
- Malpoux, B., Chemineau, P., & Pelletier, J. (2020). *Melatonin and reproduction in sheep and goats*. In Melatonin, (pp. 253-287). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003068570-10>
- Masson-Pévet, M., & Gauer, F. (2004). Seasonality and melatonin receptors in the pars tuberalis in some long day breeders. *Neurosignals*, 3(2), 63-70. <https://doi.org/10.1159/000109527>
- Mir, S. M., Aliarab, A., Goodarzi, G., Shirzad, M., Jafari, S. M., Qujeq, D., Samavarchi Tehrani, S., & Asadi, J. (2022). Melatonin: A smart molecule in the DNA repair system. *Cell Biochemistry and Function*, 40(1), 4-16. <https://doi.org/10.1002/cbf.3672>

- Mohammadi, S., & Zahmatkesh, M. (2023). A surgical modification in the technique of rat pinealectomy. *Anatomical Science International*, 98(2), 164-175. <https://doi.org/10.1007/s12565-022-00683-6>
- Murala, S., Nagarajan, E., & Bollu, P. C. (2022). *Melatonin*. In *neurochemistry in clinical practice* (pp. 149-163). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-031-07897-2_8
- Nir, I., & Hirschmann, N. (1980). The effect of pinealectomy on serum progesterone and oestradiol levels during the last stage of pregnancy in rats. *Experientia*, 36(2), 259-260. <https://doi.org/10.1007/bf01953769>
- Ortiz, A., Espino, J., Bejarano, I., Lozano, G., Monllor, F., García, J., Pariente, J., & Rodríguez, A. (2011). High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. *Journal of Pineal Research*, 50(2), 132-139. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00822.x>
- Paiva, R. V. N., Mondes, P. H. d. L., Brandão, B. d. J., Sant'Anna, J. N., Freire dos Santos, M. E., Figuera, Y. M., Santos, L. C., Markus, R. P., Fernandes, P. A. C. M., & Silva, J. F. (2024). Effects of acute hypothyroidism on plasma melatonin and Aanat and Asmt expression in the pineal gland and gonads of rats. *Frontiers in Endocrinology*, 15, 1322867. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1322867>
- Pekmez, H., Kuş, İ., Çolakoğlu, N., Ögetürk, M., Kuloğlu, T., & Sarsılmaz, M. (2005). Pinealektomili Sıçanlarda Uterusun Işık Mikroskop Düzeyde İncelenmesi. *Fırat Tıp Dergisi*, 10(3), 92-95.
- Reiter, R. J. (1991). Neuroendocrine effects of light. *International Journal of Biometeorology*, 35, 169-175. <https://doi.org/10.1007/bf01049063>
- Sarabia, L., Maurer, I., & Bustos-Obregon, E. (2009). Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2), 663-668. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.04.023>
- Semercioz, A., Onur, R., Ogras, S., & Orhan, I. (2003). Effects of melatonin on testicular tissue nitric oxide level and antioxidant enzyme activities in experimentally induced left varicocele. *Neuroendocrinology Letters*, 24(1/2), 86-90.
- Sun, T.-C., Li, H.-Y., Li, X.-Y., Yu, K., Deng, S.-L., & Tian, L. (2020). Protective effects of melatonin on male fertility preservation and reproductive system. *Cryobiology*, 95, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.01.018>
- Swanson, E. W., & Bearden, H. (1951). An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *Journal of Animal Science*, 10(4), 981-987. <https://doi.org/10.2527/jas1951.104981x>
- Tuncer, S. Ç., Akarsu, S. A., Küçükler, S., Gür, C., & Kandemir, F. M. (2023). Effects of sinapic acid on lead acetate-induced oxidative stress, apoptosis and inflammation in testicular tissue. *Environmental Toxicology*, 38(11), 2656-2667. <https://doi.org/10.1002/tox.23900>
- Varisli, O., Uguz, C., Agca, C., & Agca, Y. (2009). Various physical stress factors on rat sperm motility, integrity of acrosome, and plasma membrane. *Journal of Andrology*, 30(1), 75-86. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.004333>
- Viola, I., Canto, F., & Abecia, J. A. (2023). Effects of melatonin implants on locomotor activity, body temperature, and growth of lambs fed a concentrate-based diet. *Journal of Veterinary Behavior*, 68, 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2023.08.004>