

Riosiguat'ın Soğukta Saklanan Koç Spermasında Motilite, Membran Fonksiyonu ve DNA Bütünlüğü Üzerindeki Etkileri

Recep Hakkı KOCA^{1,a,*}, Serkan Ali AKARSU^{2,b}¹Bingöl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Bingöl, TÜRKİYE²Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYEORCID: ^a0000-0002-1740-8016, ^b0000-0003-4450-6540

Sorumlu Yazar

Recep Hakkı KOCA

Bingöl Üniversitesi, Veteriner
Fakültesi, Dölerme ve Suni
Tohumlama Anabilim Dalı, Bingöl,
TÜRKİYE

recep.hakkikoca@gmail.com

Received

26.12.2025

Accepted

04.03.2026

Published

30.06.2026

DOI

10.47027/duvetfd.1849764

How to cite: Koca RH, Akarsu SA

(2026). Riosiguat'ın soğukta saklanan koç spermasında motilite, membran fonksiyonu ve DNA bütünlüğü üzerindeki etkileri. *Dicle Univ Vet Fak Derg.*, 19(1):17-21This journal is licensed under a
Creative Commons Attribution-Non
Commercial 4.0 International
License (CC BY-NC 4.0).

Öz

Bu çalışmada, koç spermasının 5°C'de kısa süreli saklanması sırasında sulandırıcıya eklenen riosiguatın sperm fonksiyonları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada üreme mevsiminde sekiz sağlıklı Tuj koçundan elde edilen ejakülatlar pooling yapıp, 400×10⁶ sperm/mL yoğunluğa ayarlanarak beş eşit gruba ayrılmıştır. Deney grupları; kontrol (0 µM), 0.5 µM, 5 µM, 50 µM ve 250 µM riosiguat içerecek şekilde hazırlanmış ve örnekler 5 °C'de 72 saat süreyle saklanmıştır. Spermatolojik değerlendirmeler 0. ve 72. saatlerde total motilite, canlılık, plazma membran bütünlüğü, anormal spermatozoon oranı ve DNA bütünlüğü açısından gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular, riosiguatın sperm fonksiyonları üzerinde doza bağlı bifazik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle 0.5 ve 5 µM riosiguat içeren gruplarda 72. saatte total motilite ve canlılık oranlarının daha iyi korunduğu, plazma membran bütünlüğünün ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir (P<0.05). Ayrıca, 72. saatte DNA bütünlüğü, kontrol grubuna kıyasla riosiguat ile tedavi edilen tüm gruplarda önemli ölçüde daha yüksekti (P<0.05). Buna karşın, yüksek doz riosiguat (250 µM) uygulamasında spermatozoon a ait baş ve kuyruk anomalilerinin arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, riosiguatın düşük dozlarda (özellikle 0.5 ve 5 µM) koç spermasının kısa süreli soğukta saklanması sırasında motilite, membran fonksiyonu ve DNA bütünlüğünü koruyucu etki gösterdiği; ancak yüksek dozlarda morfolojik bozukluk riskini artırabileceği belirlenmiştir. Bu bulgular, riosiguatın uygun dozlarda kullanıldığında sperm sulandırıcılarına potansiyel bir katkı maddesi olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: DNA, koç, riosiguat, sperma

Effects of Riociguat on Sperm Motility, Membrane Function and DNA Integrity in Chilled Stored Ram Sperm

Abstract

This study aimed to investigate the effects of riociguat supplementation in semen extender on sperm functional parameters during short-term storage of ram semen at 5°C. Semen samples were collected from eight healthy, sexually mature Tuj rams during the breeding season, pooled, and diluted to a final concentration of 400×10⁶ sperm/mL. The samples were divided into five equal groups: control (0 µM), 0.5 µM, 5 µM, 50 µM and 250 µM riociguat. All groups were stored at 5 °C for 72 hours, and sperm evaluations were performed at 0 and 72 hours. Spermatological assessments included total motility, viability, plasma membrane integrity, abnormal spermatozoa rates, and DNA integrity. The results demonstrated that riociguat exerted a dose-dependent biphasic effect on sperm quality. At 72 hours, sperm samples supplemented with 0.5 and 5 µM riociguat showed significantly higher total motility and viability compared to the control group (P<0.05). Plasma membrane integrity was also better preserved in these low-dose groups, with the highest values observed in the 5 µM riociguat group. Moreover, DNA integrity at 72 hours was significantly higher in all riociguat-treated groups compared to the control (P<0.05). Conversely, high-dose riociguat supplementation (250 µM) resulted in an increased incidence of sperm head and tail abnormalities, indicating potential detrimental effects at excessive concentrations. These findings suggest that while physiological activation of the NO-sGC-cGMP pathway by low-dose riociguat supports mitochondrial function and cellular homeostasis, excessive stimulation may disrupt sperm morphology and function. In conclusion, low-dose riociguat supplementation, particularly at 0.5 and 5 µM, effectively preserves motility, membrane integrity, and DNA integrity of ram sperm during short-term chilled storage. However, higher doses may negatively affect sperm morphology. Riociguat may represent a novel additive for semen extenders, provided that optimal dose ranges are carefully determined.

Key Words: DNA, ram, riociguat, semen

GİRİŞ

Suni tohumlama, genetik ilerlemeyi ve üreme verimliliğini artırmak için koyun yetiştirme programlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Koç spermasının 4–5 °C'de kısa süreli saklanması, özellikle kriyoprezervasyonun mümkün olmadığı veya spermanın hemen kullanılması amaçlandığında pratik ve ekonomik bir yaklaşım olmaya devam etmektedir. Sperma metabolizması önemli ölçüde yavaşlar ve 24-72 saat boyunca kabul edilebilir fertilitite seviyeleri korunabilir. Ancak, bu sıcaklığa düşerken soğuk şoku riskine karşı kademeli bir soğutma yapılmalıdır. Bununla birlikte, kısa süreli saklama hareketliliğin azalması, membran bütünlüğünün bozulması, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve oksidatif stresin artması ile karakterize edilen sperm kalitesinde bir düşüşe sebep olabilir ve sonuçta döl verimini azaltabilir (1-3). Bu kısa süreli saklama sırasında en önemli sınırlayıcı faktörlerden biri, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ile antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizliktir. Fizyolojik düzeylerdeki ROS, spermelerin kapasitasyonu ve sinyal iletimi için gerekli olsa da, muhafaza sırasında aşırı ROS üretimi, spermatozoonlarda lipid peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna ve DNA hasarına yol açar (4). Spermatozoonlar, yüksek çoklu doymamış yağ asidi içeriği ve sınırlı sitoplazmik antioksidan kapasitesi nedeniyle bu etkilere karşı özellikle savunmasızdır. Koç spermasında, yüksek malondialdehit (MDA) seviyeleri ve glutatyon (GSH) gibi antioksidan rezervlerinin azalması, kısa süreli saklama sırasında hareketliliğin ve membran bütünlüğünün azalmasıyla kendini gösterir (5-8).

Spermanın ömrünü uzatmak için kullanılan sulandırıcılara, enerji kaynağı, tamponlama maddeleri, soğuk şokundan korumak için madde ve antibiyotikler eklenir. İlâveten fertilitenin korunması için son yıllarda yapılan çalışmalar; sulandırıcılara eklenen C vitamini, E vitamini veya sistein gibi antioksidanların saklama süresini uzattığını göstermektedir (1,7,9).

Riosiguat, klinik olarak onaylanmış, öncelikle pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde kullanılan bir çözünür guanilat siklaz (sGC) uyarıcısıdır. Bu bileşik, nitrik oksit (NO)-sGC-siklik guanosin monofosfat (cGMP) sinyal yolunu güçlendirerek vazodilatasyonu, hücre korumasını ve doku perfüzyonunu iyileştirir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, riosiguatın ROS üretimini azaltarak ve mitokondriyal fonksiyonu destekleyerek üreme ve sinir dokularında antioksidan ve antiapoptotik etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur (10-12).

Bu çalışmanın amacı, koç spermasına riosiguat ilave edilip 4–5 °C'de depolandıktan sonra sperma motilitesine, membran potansiyeline, canlılık oranlarına, sperm morfolojisine ve DNA bütünlüğüne olan etkisini ortaya koymaktır.

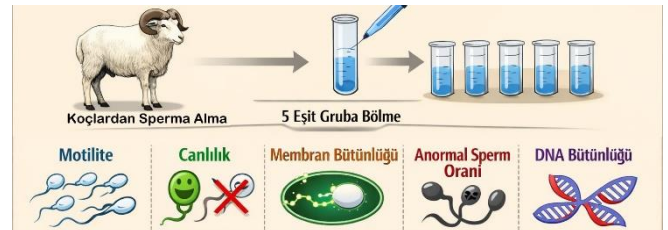
MATERYAL VE METOT

Penisilin (penisilin G potasyum, 1.000.000 IU) ve streptomisin (kristalize streptomisin sülfat, 1 g) I.E. Ulagay Co. (İstanbul, TR) firmasından temin edildi. Diff-Quick hızlı boyama seti Gündüz-Kimya Co. (İstanbul, TR) firmasından satın alındı. Riosiguat (CAS: 625115-55-1), Tris (hidroksimetil) aminometan, fruktoz, glikoz, sitrik asit, eozin, nigrosin ve sodyum sitrat Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD) tarafından tedarik edildi.

Hayvanlar ve Sulandırıcı Hazırlama

Çalışmamızda üreme mevsiminde (Ağustos-Eylül 2025) daha önceden fertilitesi bilinen, tabi aşım için kullanılan ve genel durumu iyi olan sekiz adet sağlıklı, cinsel olgunluğa erişmiş Tuj koçu (~2 yaşında) kullanıldı. Hayvanlar, tek tip yönetim ve beslenme koşulları altında Atatürk Üniversitesi Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezinde barındırıldı. Sperma suni vajina kullanılarak üç hafta boyunca haftada iki kez sperm toplandı ve toplam 48 ejakülât elde edildi. Daha sonra alınan spermalar 1:1 oranında sulandırılıp %70 ve üzeri total motiliteye sahip ve yoğunluğu 2×10^9 /mL ve üzeri olan spermalar kullanıldı. Spermalar pooling yapıp son yoğunluğu 400×10^6 /mL olacak şekilde sulandırılıp 5 eşit hacme bölünerek deney grupları oluşturuldu.

Riosiguat üretici firmanın tarifine uygun şekilde çözdü-rüldükten sonra deney grupları son hacimde 0 μ M (Kontrol), 0.5 μ M, 5 μ M, 50 μ M ve 250 μ M olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra 5 °C'lik bir soğutma dolabına yerleştirildi. Sulandırılmış sperma gruplarının 5 °C'ye soğutulduktan sonra, örnekler bu sıcaklıkta saklandı ve spermatolojik incelemeler 0. ve 72. saatlerde gerçekleştirildi (Şekil 1).

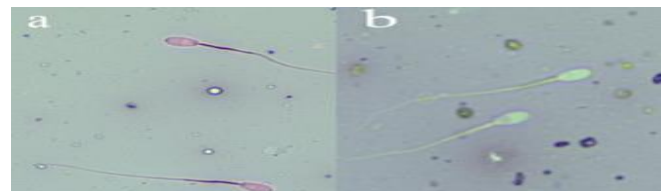


Şekil 1. Koçlardan sperma alma, işleme ve spermada yapılan analizler [Deney tasarımının şematik gösterimi, yapay zeka (ChatGPT, OpenAI) kullanılarak oluşturulmuştur (18).].

Sperm Analizi

Motilite (TM) oranı için, sperma örnekleri seyreltilip 5 mikroskop sahasında 40x objektif kullanılarak ışık mikroskobu (Zeiss, Almanya) ile incelendi. Sonuçlar yüzde olarak belirtildi (13).

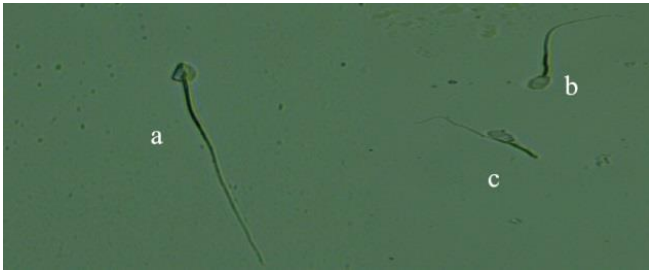
Canlılık oranı için soğutulmuş spermadan 50 μ L sperma alınıp 1:1 oranında tris tampon çözeltisi (Tris hidroksil aminometan; 3.63 gr + fruktoz; 0.50 gr + sitrik asit; 1.99 gr, 100 mL distile su içerisinde çözündürüldü) ile yeniden sulandırıldı. Spermadan bir damla lam üzerine damlatılıp ardından, 3 damla eozin-nigrosin boyası (%1.67 eozin + %10 nigrosin + 0.1 M sodyum sitrat + 100 mL distile su) karışımının üzerine damlatıldı ve karıştırıldı. Tris tamponlu soğutulmuş sperma boyama çözeltisinden smearlar hazırlandı ve 5-10 saniye kurutuldu. Smearlar, ışık mikroskobu (Nikon, E100, JPN) ile 40x objektifi kullanılarak incelendi. Her smearda toplam 400 spermatozoon incelendi ve baş kısmı pembe renkli olan spermatozoonlar ölü, boyanmayanlar ya da yarı boya alanlar ise canlı olarak kabul edildi (Şekil 2). Oranlar yüzde olarak ifade edildi (14).



Şekil 2. Koç spermasında canlılık analizi görüntüsü (a: ölü spermatozoon ve b: canlı spermatozoon).

Plazma membran bütünlüğünün belirlenmesinde hi-poosmotik swelling test (HOST) yapıldı. Kısaca: soğutulmuş spermadan 100 µL, 37 °C'de 400 µL tris tampon çözeltisi ile yeniden sulandırıldı. Daha sonra, bu spermadan 50 µL alındı ve 500 µL hipotonik çözelti (0.49 g sitrik asit + 0.9 g fruktoz + 100 mL distile su) ile karıştırıldı (14). Ardından 37 °C'de 60 dakika süreyle inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, karışımdan 30 µL alındı ve 400 adet spermatozoon, ışık mikroskopunda 40x objektif ile incelendi. Şişmiş ve kıvrılmış kuyruğu olan sağlam spermatozoon oranı yüzde olarak ifade edildi (15).

Anormal spermatozoon oranı HOS test amacıyla Tris buffer ile seyreltilen sperma örneklerinden 75 µL alınıp sürme frotiler hazırlandı ve 5-10 dakikada havada kurutuldu. Boyama amacıyla Diff-Quik boyama setinin A, B ve C solüsyonlarına sırasıyla 30 saniye, 20 saniye ve 30 saniye daldırılıp çıkartılarak boyandı. Boyanan frotiler distile su ile yaklaşık bir dakika yıkandı ve havada kurutuldu. Hazırlanan frotiler ışık mikroskopunun 40x objektifi ile incelendi. Her bir froti için toplam 200 spermatozoon incelenerek anormal şekilli (Şekil 3) spermatozoonların oranları hesaplandı (14). Veriler yüzde olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3. Koç spermasında anormali analizi görüntüsü (a: baş anomali, b: normal morfoloji ve c: kuyruk anomali).

DNA bütünlüğü oranı için spermatozoon DNA bütünlüğünün yüzdesini belirlemek için akridin turuncu floresan boyama kullanıldı. Kısaca, 10 µL sperma numunesi bir lama froti çekildi ve havada kurumaya bırakıldı. Frotiyi iki saat boyunca sabitlemek için Carnoy çözeltisi (1:3 asetik asit ve metanol) kullanıldı. Distile su ile yıkandıktan sonra, lamalar oda sıcaklığında taze hazırlanmış akridin turuncu çözeltisi (10 mL %0.1 akridin turuncu, 40 mL 0.1 mol/L sitrik asit ve 2.5 mL 0.3 mol/L Na₂HPO₄ distile su içinde) kullanılarak karanlık ortamda on dakika boyandı (16). Boyanan lameller distile su ile yıkandı. Her numuneden rastgele 200 spermatozoon seçildi ve Zeiss Axioscope A1 floresan mikroskopunda 40x objektif kullanılarak incelendi. Sonuçlar yüzde olarak ifade edildi ve kırmızı floresan spermatozoon DNA hasarlı olarak kabul edilirken yeşil floresan veren spermatozoon sağlam olarak ifade edildi (16, 17) (Şekil 4).

Şekil 4. Koç spermasında DNA bütünlüğü görüntüsü (Zeiss Axioscope A1, skala 20 µm. yeşil spermatozoon: DNA bütünlüğü korunmuş, kırmızı spermatozoon: DNA hasarına sahip).



İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS (Sürüm 27.0, Inc, Chicago, IL, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak sunulmuştur. Spermatolojik incelemeler açısından zaman dilimleri (2 zaman dilimi) ve gruplar (5 grup) arasında bir etkileşim olup olmadığını belirlemek için, tekrarlanan ölçümler için Bonferroni düzeltmesi ile iki yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Etkileşimin belirlenmesi sonrasında, her gruptaki zaman noktalarını karşılaştırmak için Bonferroni düzeltmesi ile nonparametrik Wilcoxon testi ve aynı zaman noktasındaki grupları karşılaştırmak için Bonferroni düzeltmesi ile nonparametrik Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak P<0.05'e sahip olan tüm parametreler anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Aynı zaman dilimindeki gruplar arasında ve aynı grup içindeki farklı zamandaki total motilite ve canlılık bulguları Tablo 1'de verilmiştir. Çalışmamızda aynı zaman dilimi içerisinde total motilite değerlerinde gruplar arası farklılıkların 72. saatlerde ortaya çıktığı görüldü, 0.5 ve 5 µM riosiguat içeren grubun oranları diğer gruplara göre daha yüksekti (P<0.05). Grup içerisinde zamana bağlı motilite kayıpları yine 0.5 ve 5 µM riosiguat içeren grupta olmuştur (P<0.05). Canlılık oranlarında grup içerisinde zamana bağlı canlılık oranları 5 µM riosiguat içeren grupta korunurken diğer gruplarda zamana bağlı daha düşüktü (P<0.05).

Tablo 1. Koç sperması sulandırıcısına Riosiguat içeren/içermeyen gruplardaki 5 °C'de ki 0. ve 72. saatlerde total motilite ve spermatozoon canlılık oranları (ortalama ± standart hata)

Grup	TM (%)		Canlılık (%)	
	0. Saat	72. Saat	0. Saat	72. Saat
K	74.67±1.65 ^{Aab}	64.67±2.04 ^{Ba}	94.67±1.02 ^{Aa}	89.50±1.82 ^{Ba}
0.5	77.93±1.38 ^{Ab}	75.17±1.83 ^{Ab}	95.50±1.41 ^{Aa}	91.67±0.88 ^{Ba}
5	75.33±1.74 ^{Aab}	74.67±1.69 ^{Ab}	94.00±1.15 ^{Aa}	92.17±0.48 ^{Aa}
50	77.79±0.71 ^{Aab}	73.00±0.86 ^{Bb}	96.33±0.49 ^{Aa}	93.00±0.58 ^{Ba}
250	70.00±1.07 ^{Aa}	66.67±1.31 ^{Ba}	95.83±0.87 ^{Aa}	92.83±0.48 ^{Ba}

* A, B: Aynı grup içindeki zamana bağlı değerlerin istatistiksel olarak farklılığını gösterir (P<0.05). * a, b: Aynı zaman içindeki gruplar arası değerlerin istatistiksel olarak farklılığını gösterir (P<0.05).

Aynı zaman diliminde gruplar arası ve aynı grup içinde farklı zamandaki anormal baş ve kuyruğa sahip spermatozoon oranları Tablo 2'de verilmiştir. Baş anomalilerine ait bozuklukların aynı zaman dilimindeki gruplar arası 72. saatlerde ortaya çıktığı görülmüş, kontrol grubu ve 250 µM riosiguat içeren grubun oranları diğer gruplara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (P<0.05). Kuyruk anomalileri incelendiğinde zamana bağlı değişim 0.5, 5 ve 250 µM riosiguat içeren gruplarda görülmüş (P<0.05), aynı zaman diliminde ki gruplar arası farklılıklar sadece 72. saatlerde olup diğer gruplara nazaran 250 µM riosiguat içeren grup daha yüksekti (P<0.05).

Aynı zaman diliminde gruplar arası ve aynı grup içinde farklı zamandaki plazma membran bütünlüğü oranları ve DNA bütünlüğü oranları Tablo 3'de verilmiştir. Aynı grup içinde farklı zaman dilimine göre değişim tüm gruplarda daha (P<0.05). Aynı zaman dilimleri incelendiğinde 0. saatlerde kontrol grubuna göre bu oranlar tüm riosiguat grupları daha yüksekti (P<0.05). Öte yandan 72. saatlerde ise plazma membran bütünlüğünde en yüksek oran istatistiksel olarak 5

μM riosiguat içeren gruba aitti ($P<0.05$). DNA bütünlüğünde $0.5 \mu\text{M}$ riosiguat içeren grup hariç tüm gruplarda plazma membran bütünlüğü oranlarında zamana bağlı düşüş istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$). Çalışmamızda aynı zaman dilimi içerisinde DNA bütünlüğü oranlarında gruplar arası farklılıkların 72. saatlerde ortaya çıktığı görülmüş kontrol grubuna göre tüm riosiguat gruplarında ki oranlar daha yüksekti ($P<0.05$).

Tablo 2. Koç sperması sulandırıcısına Riosiguat içeren/ içermeyen gruplardaki 5°C 'de ki 0. ve 72. saatlerde anormal başa sahip ve anormal kuyruğa sahip spermatozoon oranları (ortalama $\pm$ standart hata)

Grup	Baş (%)		Kuyruk (%)	
	0. Saat	72. Saat	0. Saat	72. Saat
K	3.50 $\pm$ 0.67 ^{Aa}	4.83 $\pm$ 0.40 ^{Aa}	7.83 $\pm$ 0.48 ^{Aa}	9.33 $\pm$ 0.49 ^{Aab}
0.5	2.17 $\pm$ 0.54 ^{Aa}	3.17 $\pm$ 0.31 ^{Ab}	6.33 $\pm$ 0.33 ^{Aa}	8.50 $\pm$ 0.50 ^{Ba}
5	3.17 $\pm$ 0.54 ^{Aa}	3.33 $\pm$ 0.21 ^{Ab}	6.67 $\pm$ 0.76 ^{Aa}	8.17 $\pm$ 0.31 ^{Aa}
50	3.00 $\pm$ 0.26 ^{Aa}	3.33 $\pm$ 0.21 ^{Ab}	6.67 $\pm$ 0.80 ^{Aa}	9.17 $\pm$ 0.31 ^{Bab}
250	2.50 $\pm$ 0.22 ^{Aa}	4.67 $\pm$ 0.33 ^{Ba}	6.33 $\pm$ 0.33 ^{Aa}	10.83 $\pm$ 0.60 ^{Bb}

* A, B: Aynı grup içindeki zamana bağlı değerlerin istatistiksel olarak farklılığını gösterir ($P<0.05$). * a, b: Aynı zaman içindeki gruplar arası değerlerin istatistiksel olarak farklılığını gösterir ($P<0.05$).

Tablo 3. Koç sperması sulandırıcısına Riosiguat içeren/ içermeyen gruplardaki 5°C 'de ki 0. ve 72. saatlerde plazma membran bütünlüğü ve DNA bütünlüğü oranları (ortalama $\pm$ standart hata)

Grup	Plazma Membran Bütünlüğü (%)		DNA Bütünlüğü (%)	
	0. Saat	72. Saat	0. Saat	72. Saat
K	49.67 $\pm$ 2.88 ^{Aa}	42.00 $\pm$ 3.09 ^{Ba}	96.67 $\pm$ 1.48 ^{Aa}	87.17 $\pm$ 0.48 ^{Ba}
0.5	68.83 $\pm$ 1.01 ^{Ab}	40.67 $\pm$ 3.18 ^{Ba}	95.00 $\pm$ 1.75 ^{Aa}	93.67 $\pm$ 0.33 ^{Ab}
5	69.00 $\pm$ 2.25 ^{Ab}	52.00 $\pm$ 4.51 ^{Bb}	97.33 $\pm$ 1.48 ^{Aa}	94.17 $\pm$ 0.95 ^{Bb}
50	67.17 $\pm$ 3.74 ^{Ab}	44.50 $\pm$ 2.90 ^{Bab}	97.50 $\pm$ 1.31 ^{Aa}	94.00 $\pm$ 1.32 ^{Bb}
250	68.67 $\pm$ 3.19 ^{Ab}	45.17 $\pm$ 3.19 ^{Bab}	97.17 $\pm$ 1.01 ^{Aa}	95.00 $\pm$ 0.58 ^{Bb}

* A, B: Aynı grup içindeki zamana bağlı değerlerin istatistiksel olarak farklılığını gösterir ($P<0.05$). * a, b: Aynı zaman içindeki gruplar arası değerlerin istatistiksel olarak farklılığını gösterir ($P<0.05$).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, koç spermasının 5°C 'de kısa süreli saklanması sırasında sulandırıcıya eklenen riosiguatın sperm fonksiyonları üzerindeki etkileri ilk kez kapsamlı biçimde değerlendirilmiştir. Bulgularımız, riosiguatın doza bağlı çift yönlü (bifazik) bir etki sergilediğini ve özellikle $0.5\text{--}5 \mu\text{M}$ aralığında sperm motilitesi, canlılık, plazma membran bütünlüğü ve DNA bütünlüğünün korunmasında belirgin avantaj sağladığını ortaya koymuştur. Buna karşılık, yüksek doz ($250 \mu\text{M}$) uygulamalarında morfolojik anomalilerin artması ve bazı fonksiyonel parametrelerde bozulma eğilimi gözlenmiştir.

Kısa süreli soğukta saklama sırasında spermatozoonlarda görülen fonksiyon kaybının temel nedenleri; mitokondriyal disfonksiyon, membran lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı ile ilişkili oksidatif stres artışıdır (1,2,4). Çalışmamızda kontrol grubunda 72. saatte motilite, plazma membran bütünlüğü ve DNA bütünlüğünde belirgin düşüşler görülmesi,

literatürle uyumlu olarak soğuk depolamanın sperm hücreleri üzerinde kümülatif stres oluşturduğunu doğrulamaktadır (1,6,9).

Riosiguatın düşük dozlarda gözlenen koruyucu etkileri, büyük olasılıkla çözünür guanilat siklaz (sGC) aktivasyonu yoluyla cGMP düzeylerinin artırılması ve buna bağlı olarak mitokondriyal fonksiyonun desteklenmesi ile ilişkilidir. NO-sGC-cGMP yolunun sperm motilitesi, enerji metabolizması ve hücre homeostaz üzerinde düzenleyici rol oynadığı daha önce bildirilmiştir (8,10,11). Düşük doz riosiguat uygulamalarında total motilitenin korunması ve membran bütünlüğünün daha yüksek seyretmesi, bu sinyal yolunun fizyolojik düzeyde aktive edilmesinin sperm hücrelerinde enerji üretimini ve membran stabilitesini desteklediğini düşündürmektedir.

DNA bütünlüğü açısından elde edilen sonuçlar da bu mekanizmayı destekler niteliktedir. Özellikle 72. saatte tüm riosiguat gruplarında DNA bütünlüğünün kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunması, riosiguatın oksidatif DNA hasarını sınırlayıcı bir etki gösterdiğini düşündürmektedir. sGC aktivasyonu ile ilişkili antiapoptotik ve hücre koruyucu etkiler, testiküler iskemi-reperfüzyon ve nörolojik hasar modellerinde daha önce rapor edilmiştir (10,12). Mevcut çalışma, bu hücre koruyucu etkinin spermatozoonlar için de geçerli olabileceğini ortaya koymaktadır.

Bununla birlikte, yüksek doz ($250 \mu\text{M}$) riosiguat grubunda baş ve kuyruk anomalilerinin artması dikkat çekicidir. Bu durum, aşırı cGMP üretiminin sperm fizyolojisinde redüktif stres veya metabolik dengesizlik oluşturabileceğini düşündürmektedir. Spermatozoonlar, fizyolojik düzeylerde reaktif oksijen türlerine (ROS) bağımlı hücrelerdir ve aşırı antioksidan veya sinyal baskılanması durumunda kapasitasyon, membran akışkanlığı ve flagellar hareket olumsuz etkilenebilmektedir (4,5). Benzer şekilde, literatürde yüksek doz antioksidan uygulamalarının sperm motilitesini ve morfolojisini olumsuz etkileyebileceği bildirilmiştir (6,7). Bu bulgu, riosiguatın sperm sulandırıcılarında dar bir terapötik pencereye sahip olabileceğini göstermektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, çalışmamız riosiguatın koç spermasının kısa süreli saklanması doza bağımlı olarak faydalı veya zararlı etkiler gösterebileceğini açıkça ortaya koymaktadır. Özellikle $0.5\text{--}5 \mu\text{M}$ aralığının, fonksiyonel ve yapısal parametreler açısından en dengeli sonuçları verdiği görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışma, riosiguatın koç spermasının 5°C 'de kısa süreli saklanması sırasında sperm kalitesini doza bağlı olarak etkilediğini ortaya koymaktadır. Düşük doz riosiguat (özellikle $5 \mu\text{M}$), motilite, canlılık, plazma membran bütünlüğü ve DNA bütünlüğünün korunmasında belirgin üstünlük sağlamış; buna karşın yüksek doz uygulamalar morfolojik bozukluk riskini artırmıştır. Bu bulgular, riosiguatın uygun dozlarda kullanıldığında sperm sulandırıcılarına yenilikçi ve hedefe yönelik bir katkı maddesi olabileceğini, ancak klinik ve saha uygulamaları öncesinde doz optimizasyonu ve fertilitate sonuçlarının mutlaka değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Riosiguat'ın *in vivo* fertilitate ve moleküler mekanizmaları üzerindeki etkilerini ayrıntılı olarak incelemek için gelecekteki çalışmalar önerilmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

YAZAR KATKILARI

RHK ve SAA, Araştırma yapmada, incelemede, analiz yapmada, veri toplamada görev almıştır. RHK, makale yazma ve düzenlemede görev almıştır.

ETİK BEYAN

Çalışmamızda etik kurallara uyulmuş olup Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığından 2025/04 sayılı etik kurulu raporu mevcuttur.

KAYNAKLAR

1. Salamon S, Maxwell WMC (2000). Storage of ram semen. *Anim Rep Sci.*, 62(1-3):77-111.
2. Gillan L, Evans G, Maxwell W (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2):445-57.
3. Evans G, Maxwell WC (1987). Salamons' artificial insemination of sheep and goats: *Butterworths*, Australia.
4. Aitken RJ, Baker MA (2006). Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 250(1-2):66-69.
5. Tremellen K (2008). Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Hum Reprod Update.*, 14(3):243-258.
6. Bucak MN, Çoyan K, Öztürk C ve ark. (2012). Methionine supplementation improves ram sperm parameters during liquid storage at 5°C. *Cryobiology*, 65(3):335-7.
7. Uysal O, Bucak M (2007). Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Vet Brno.*, 76(3):383-90.
8. Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B ve ark. (2004). Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Hum Reprod Open.*, 19(10):2267-76.
9. Paulenz H, Söderquist L, Pérez-Pé R ve ark. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, 57(2):823-36.
10. Seker U, Kavak DE, Guzel BC ve ark. (2022). Targeting soluble guanylate cyclase with Riociguat has potency to alleviate testicular ischaemia reperfusion injury via regulating various cellular pathways. *Andrologia*, 54(11):e14616.
11. Makowski CT, Rissmiller RW, Bullington WM (2015). Riociguat: a novel new drug for treatment of pulmonary hypertension. *Pharmacotherapy*, 35(5):502-519.
12. Aslanoglu B, Kaya S, Gunara SO, ve ark. (2024). Neuroprotective potential of a novel soluble guanylate cyclase stimulator the riociguat alone or in a combination manner with resveratrol in experimental stroke model in rats. *Int J Morphol.*, 42(4):984-920.
13. Özmen MF, Cirit Ü, Arıcı R ve ark. (2020). Evaluation of synergic effects of iodixanol and trehalose on cryosurvival of electroejaculated ram semen. *Andrologia*. 52(9):e13656.
14. Özer Kaya Ş, Güngör İH, Dayan Cinkara S ve ark. (2021). Effect of different doses of hydrated C60 fullerene nanoparticles on ram semen during cool - storage. *Turk J Vet Anim Sci.* 45(1), 139-147.
15. Söderquist L, Madrid-Bury N, Rodriguez-Martinez H (1997). Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology*, 48(7):1115-1125.
16. Akarsu SA, Gür C, Küçükler S, ve ark. (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. *Environ Toxicol.*, 39(10):4803-4814.
17. Nur Z, Zık B, Ustuner B, ve ark. (2010). Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*, 73(9), 1267-1275.
18. Open AI, (2025). Koçlardan sperma alma, işleme ve spermada yapılan analizler. AI-generated image. ChatGPT. Erişim Tarihi: 15.12.2025. Erişim Linki: <https://chat.openai.com/>.