

Kısa Süreli Saklanan Epididimal Anadolu Mandası Spermalarına İlave Edilen Karnosik Asitin Etkisi

Deniz YENİ *, Fatih AVDATEK

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, AFYONKARAHISAR

*Corresponding author e-mail: dyeni@aku.edu.tr

ÖZ

Bu çalışma biberiyeden (*rosmarinus officinalis*) elde edilen karnosik asitin epididimal manda spermalarının kısa süreli saklanmasında motilite, anormal spermatozoon oranları ve HOST/HE test oranları üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Sulandırılan spermalar kesim sonrası alınan 36 baş (4-5 yaşlı) Anadolu Mandası testisinden elde edildi. Her 6 testisten toplanan spermalar 5 eşit parçaya bölünerek gruplar oluşturuldu ve çalışma 6 kez tekrar edildi. Gruplar 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml karnosik asit ve antioksidan içermeyen Tris sulandırıcısından oluşturuldu. Sperma + 4 °C'ye düşürüldü ve 0., 24. ve 48. saatlerde spermatolojik veriler değerlendirildi. Motilite yönünden 0. saatte gruplar arasında herhangi bir fark tespit edilmemiş 24. saat bulgularında ise kontrole göre tüm gruplardaki motilite değerleri yüksekti. Bunun yanında 48. saat motilite değerleri ise 12.5, 25 ve 50 µg/ml lik gruplarda kontrol grubuna göre yüksekti. Bu değerlerin istatistiki açıdan önemliydi ($p < 0.05$). Toplam anormal spermatozoon yönünden karnosik asidin koruyucu etkisi sırasıyla 0. saatte 12.5 µg/ml'lik grupta, 24. saatte 12.5 ve 25 µg/ml grupta ve 48. saatte tüm gruplarda önemli bulundu ($p < 0.05$). H+/E- yönünden değerlendirildiğinde karnosik asitin 0. saatte 25 µg/ml'lik grupta 24 ve 48. saatlerde ise tüm gruplarda koruyucu etkisinin önemli olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Sonuç olarak Manda epididimal spermalarının + 4 °C saklanmasında sulandırıcıya eklenen karnosik asitin motilite, spermatozoon morfolojisi, membran bütünlüğü ve canlılığı açısından özellikle 12,5 ve 25 µg/ml lik dozlarının kontrol grubuna göre koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelime: Epididimal Sperma, Karnosik Asit, Kısa Süreli Saklama, Manda.

Effect of Carnosic Acid On The Short Term Storage Anatolian Buffalo Epididymal Sperm

ABSTRACT

This study was conducted to determine the effect of carnosic acid, extracted from rosemary (*rosmarinus officinalis*), to epididymal buffalo sperm to short-term motility, abnormal spermatozoon rates and HOS test ratio. Semen samples were obtained from 36 (4-5 year old) Anatolian buffalos after the slaughtering. Semen were collected from each 6 testes they were divided into 5 equal parts and groups were formed and the study was repeated 6 times. The groups were composed with the Tris extender containing carnosic acid 12.5, 25, 50 and 100 µg / ml and no-additive (control). Semen were cooled to +4 °C and spermatological data was evaluated at 0, 24 and 48. hours. Although there was no difference between the groups at the 0.h when evaluated in terms of motility, in 24. h motility values were higher in all groups than control. Besides, 48.h motility values were higher in groups of 12.5, 25 and 50 µg / ml than control. these values were statistically significant ($p < 0.05$). In terms of total abnormal spermatozoon the protective effect of carnosic acid was found significantly in 12.5 µg / ml group at 0 h, 12.5 and 25 µg / ml group at 24 h and all groups at 48 h. respectively. With regard H+/E-, protective effect of carnosic acid was determined in 25 µg/ml group and in all groups at 24 and 48 h. In conclusion, it was determined that the doses of 12.5 and 25 µg / ml of carnosic acid added to extender in +4 °C storage of buffalo epididymal sperm showed a protective effect compared to the control group in terms of motility, spermatozoon morphology, membrane integrity and viability.

Key Words: Epididymal Sperm, Carnosic Acid, Short Term Storage, Buffalo.

To cite this article: Yeni D. Avdatek F. Kısa Süreli Saklanan Epididimal Anadolu Mandası Spermalarına İlave Edilen Karnosik Asitin Etkisi *Kocatepe Vet J. (2017) 10(3): 187-195.*

GİRİŞ

Manda (*Bubalus bubalis*) dünyada yaygın olarak bulunan ve bulunduğu yöreye özgü olarak ekonomik değer taşıyan bir türdür. Özgün ve nitelikli süt, peynir, kaymak ve et verimi, pek çok hastalığa karşı dayanıklı olması, gücünden faydalanılması, inekler kadar özen istememeleri, kalitesiz kaba yemleri değerlendirebilmesi, bakım ve idari giderlerinin düşük düzeylerde olması gibi sebeplerden dolayı alım gücü düşük yetiştiriciler için uygun çiftlik hayvanlarıdır (Küçükkebağcı ve ark. 2002). Manda varlığı 2014 yılı verilerine göre çoğu Asya ve Afrika ülkelerinde olmak üzere yaklaşık 195 milyon kadardır (FAO, 2017). Ülkemizde Anadolu Mandası adı verilen Türkiye'ye özgü bir ırk bulunmakta olup, Akdeniz mandalarından ayrı veya onun küçük yapılı bir varyetesi oldukları öne sürülmektedir (Uçar ve ark. 2005). Ülkemizde manda sayısı 2016 yılı itibarı ile 141.065 olarak bildirilmiş ve bu sayı giderek artma eğilimi göstermektedir. Türkiye'de manda yetiştiriciliği yaygın olarak İstanbul, Afyon, Samsun, Tokat, Sinop, Çorum ve Amasya illerinde yapılmaktadır (TÜİK, 2017). Biberiye, küçük iğne uçlu, 2 metreye kadar uzayabilen yaz kış yeşil kalabilen ve güçlü bir aromaya sahip çalı görünümüne aromatik bir bitkidir. Yapraklarının ekstrakte edilmesiyle elde edilen uçucu yağdan yararlanılır. Antioksidan özelliği, yapısında bulunan karnosol, karnosik asit ve rosmarinik asitten kaynaklanmaktadır. Karnosik asitin antioksidan özelliğinin karnosoldan üç kat, Butillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) ve Butillendirilmiş hidroksianisol (BHA)'dan ise yedi kat fazla olduğu bildirilmiştir (Frankel ve ark. 1996). Biberiyenin yapısında bulunan ve ekstrakte edilerek elde edilen karnosol ve karnosik asit kanser tedavisinde tümör gelişimini engelleyen önemli etken maddelerdendir (Lopez-Jimenez ve ark. 2013). Spermada reaktif oksijen türlerinin (ROS) ana kaynağının spermatozoonun kendisi olması yanında spermada bulunan lökositler ve nötrofillerde ROS kaynağı olarak bilinmektedir. Kısa veya uzun süreli saklama amacıyla farklı solüsyonlar ile spermanın sulandırılması, ROS'a karşı antioksidanların doğal kaynağı olan seminal plazma oranını ve antioksidatif yoğunluğu da seyreltmektedir. Ayrıca uzun veya kısa süreli saklama koşullarında atmosferik oksijen basıncına maruz kalan spermada oksidatif stres meydana gelebilmektedir (Arı ve Öztürkler, 2015). Biberiye biyoaktif maddeler, flavonoidler ve polifenoller içerdiğinden antioksidan özelliklere sahip çok yıllık bir bitkidir. Antioksidan desteğinin olası olumlu etkilerini belirlemek amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. Biberiye ekstraktının sperma sulandırıcısına katılması ile domuz (Malo ve ark. 2010, Luno ve ark. 2014.), geyik (Zanganeh ve ark. 2013), koç (Motlagh ve ark.2014)ve boğa

spermatozoon hücrelerinde (Daghigh-Kia ve ark. 2014) çözdürme sonrası spermatolojik özelliklerde koruyucu antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Artmış oksidatif stres seviyeleri ile ilişkili olarak, motilite kaybı, membran ve DNA hasarlarının yanı sıra canlılık kaybına uğramış olan spermada, antioksidan desteğinin olumlu etkileri beklenebilir. Oksidatif stresle ilişkili ROS'da spesifik antioksidanların kullanımını optimize etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Taşdemir ve ark. 2014). Epididimal spermanın in vivo dölveriminin ejaküle spermaya kıyasla daha düşük olduğu bilinmektedir. Ejaküle spermanın, plazma membranına bağlanan protein türleri içermesi ve hareket özellikleri de dâhil olmak üzere birçok faktörden kaynaklı özelliklerden dolayı epididimal spermadan farklıdır (Lee ve ark. 1985, Goovaerts ve ark. 2006). Bunun yanı sıra epididimal spermatozoonlar, katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi çeşitli antioksidan enzimler tarafından fizyolojik olarak korunmaktadır (Vernet ve ark. 2004). Almeida ve ark.'nın (2016) elde ettikleri sonuçlar hem ejaküle spermatozoonun hem de dondurulup çözdürülmüş epididimal spermatozoonun, sığır embriyolarının in vitro üretiminde kullanılması için eşit derecede uygun olduğunu göstermektedir. Memelilerde bulunan cauda epididimis, ejaküle olmadan önce spermatozoonların depolandığı ve birkaç hafta boyunca dölleme kapasitesinin korunması için uygun bir ortam oluşturmaktadır (Jones, 2004). Bununla birlikte, hayvanların gametlerin hayvanın öldürülmesinden sonra hızlı dejenerasyona uğradığı ve epididimisin maruz kaldığı zaman ve sıcaklık gibi koşulların direkt olarak spermatozoonların yaşayabilirliğini etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle, gametlerin toplanmasının hayvanın ölümünden hemen sonra yapılması gerekir (Kaabi ve ark. 2003). Bazı araştırmacılar, manda epididimisinden toplanan spermatozoonların ejaküle spermatozoonlarla aynı kalitede oldukları ve suni tohumlama uygulaması için güvenilir olduklarını bildirmişlerdir (Lambrechts ve ark. 1999, Herold ve ark. 2006). Tuncer ve ark. (2005) ise kısa süreli saklanan boğa spermaları spermanın alındığı gün dahil olmak üzere üç günden fazla kullanılmaması gerektiğini ve bunun sebebi olarakta motilitenin % 50' nin altına düşeceği ve döl verimini olumsuz yönde etkileyeceği olarak bildirmişlerdir. Bu araştırma biberiyeden (rosmarinus officinalis) elde edilen karnosik asitin epididimal manda spermasına farklı oranlarda (12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml) katılmasının 0., 24. ve 48. saatlerdeki motilite, anormal spermatozoon oranları ve HOST/HE test sonuçlarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Afyonkarahisar ilinde özel bir mezbahadan kesim öncesinde genel muayene açısından bir sorun gözlenmeyen hayvanlardan, kesim sonrası alınan 36 adet (4-5 yaşlı) Anadolu Mandası testisi (tek taraflı) çalışmanın materyal bölümünü oluşturdu. Lambrechts ve ark.'nın(1999) bildirdiği gibi mezbahada kesilen mandaların testisleri kesimin hemen ardından skrotumun bir bıçak yardımıyla kesilip açılması ile dışarı çıkarıldıktan sonra spermatik kord'dan kesilerek epididimisleri ile birlikte alındı. Alınan testisler, içerisinde buz kalıpları (+4°C) bulunan kapalı bir kaba konularak kesimden sonraki 15 dakika içinde laboratuvara ulaştırıldı ve bunu takiben en geç 2 saat içinde spermanın elde edilmesi ve işlenmesi tamamlandı. Laboratuvara getirilen testislerden epididimisler ayrıldı ve steril bir bisturi yardımıyla kauda epididimis üzerine kesitler yapılarak, spermanın dışarı çıkması sağlandı. Daha sonra dışarı alınan sperma steril bir enjektör yardımıyla çekilerek toplandı (Patrizio ve ark.1988). Her bir testisten elde edilen sperma TYS (Tris: 30,7 g, Sitrik Asit: 16,4 g, Fruktoz: 12,6 g, Yumurta Sarısı: % 20, Penicillin: 1000 IU/ml, Streptomycin: 1000 microgram/ml, Distile su: 1000 ml'ye tamamlandı pH: 6,8) solüsyonu içine alındı. Karnosik asit (Sigma, C 0609-10 MG), 1 ml etanol (% 99) ile seyreltildi ve stok çözeltisi hazırlandı. Toplanan ve pooling yapılan spermalar beş eşit hacme bölündü ve her bir payette 80×10^6 spermatozoon/ml olacak şekilde karnosik asit içeriği (12,5, 25, 50 ve 100 µg/ml) olan ve antioksidan içermeyen kontrol grubu ile sulandırıldı. Her bir tekrar için 6 mandaya ait testisler pooling yapılarak kullanıldı ve 6 tekrar yapıldı. Soğutma kabineine nakledilen sulandırılmış spermaların sıcaklığı +4°C'ye düşürüldü. Daha sonra farklı yoğunluklarda karnosik asit içeren ve kontrol grubuna ait örnekler, 0., 24., ve 48. saatlerde spermatolojik parametreler yönünden muayene edildi.

Spermatolojik Muayeneler

Sperma motilitesi her gün aynı saatte 37°C'ta ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta (Olympus CX31, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) ve en az 3 alan olacak şekilde 200x ve 400x lik büyütmede değerlendirildi ve % olarak kaydedildi.

Anormal spermatozoon oranı Giemsa boyama yöntemiyle boyanan slaytlar immersiyon objektif altında (100x) incelenerek çeşitli spermatozoon kısımlarına (baş, orta kısım ve kuyruk) ait bozukluklar ve bunların görülme oranları tespit edildi (Watson, 1975). Her slatta 200 hücre sayıldı ve % olarak kaydedildi.

Spermatozoon membran bütünlüğü ve canlılığının belirlenmesi amacıyla HOST-HE testi uygulandı

(Gündoğan ve ark. 2011). Sperma örneklerinin 100 mOsm/lit(Kumar ve ar. 2014)ye ayarlanmış fruktoz solüsyonu içerisine % 1'lik eozin-Y ilave edildi ve 35°C de 30 dakika inkübe edildi.İnkübasyon sonrası froti çekilen lamalar hızlıca kurutularak hazırlandı. Hazırlanan preparatlardan toplam 200 hücre sayıldı vedört tipe (Tip I: kuyruk şişmiş ve baş boya almamış, HOS + /E- ;Tip II: kuyruk şişmemiş ve baş boya almamış, HOS- / E-; Tip III: kuyruk şişmiş ve baş boya almış, HOS + / E +; Tip IV: kuyruk şişmemiş ve baş boya almış, HOS- / E +) göre spermatozoon başının boya alma ve spermatozoon kuyruğunun kıvrılma durumuna göre değerlendirildi.

İstatistiksel Analizler

Araştırmada, her gruba ait spermatolojik parametrelerin (spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa veHOST-HE test) karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi uygulandı. Fark çıkan grupların karşılaştırılmasında Duncan testi kullanıldı. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda 0. saat spermatolojik parametrelere ait değerler Tablo 1'de sunulmuştur. Buna göre motilite yönünden gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmemiş olmasına karşın baş anomalileri yönünden 25 µg/ml lik, orta kısım ve toplam anormal spermatozoon oranına göre ise 12,5 µg/ml lik grupta sonuçlar kontrol grubuna göre azalma istatistiki açıdan önemli bulundu($p < 0,05$). H+E- değeri ise 25 µg/ml lik gruptaki artış kontrol grubuna göre istatistiki açıdan önemli bulundu($p < 0,05$). Araştırmamızın 24. saate verileri Tablo 2'de verilmiş olupkontrol grubuna göre tüm gruplardaki yüksek motilite değerleri, toplam anormal spermatozoon oranı yönünden kontrole kıyasla 12,5 ve 25 µg/ml lik gruplardaki düşük oranlar ve tüm karnosik asit gruplarındaki yüksek H+E- oranları kontrolle karşılaştırıldığında istatistiki açıdan önemli ($p < 0,05$) olduğu görüldü. Elde edilen 48. saat verilerine bakıldığında 12,5,25 ve 50 µg/ml lik gruplar kontrol grubuna göre yüksek bulundu ve bu değerlerin istatistiki açıdan önemli ($p < 0,05$) olduğu görüldü. Karnosik asit gruplarının tamamında gerek anormal spermatozoon oranları gerekse H+E- değerleri açısından elde edilen koruyucu etkinin kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan önemli ($p < 0,05$) olduğu tespit edildi.

Tablo 1: Epididimal manda spermatozoonlarının 0. saatte elde edilen ortalama spermatojistik parametreleri.
Table 1: Mean spermatological parameters obtained at 0 h of epididymal buffalo spermatozoa.

0 h									
Gruplar (n=6)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı				H+E- (%)	H-E- (%)	H+E+ (%)	H-E+ (%)
		Baş (%)	Orta Kısım (%)	Kuyruk (%)	Toplam (%)				
Kontrol	73.3±2.10 ^{ab}	3.0±0.28 ^c	14.0±0.38 ^b	6.4±0.30	23.4±0.68 ^b	68.5±0.76 ^b	10.6±0.71 ^c	13.0±0.57 ^b	7.8±0.70 ^{bc}
12.5 mg/ml	75.0±2.23 ^{ab}	3.2±0.21 ^c	11.5±0.76 ^c	5.9±0.43	20.6±0.78 ^c	70.8±1.19 ^{ab}	13.3±0.95 ^{bc}	8.50±0.42 ^c	6.0±0.81 ^{cd}
25mg/ml	76.6±2.10 ^{ab}	2.1±0.15 ^d	14.8±0.44 ^{ab}	5.8±0.50	22.8±0.87 ^b	73.8±1.49 ^a	12.3±0.66 ^{bc}	7.6±0.84 ^c	5.5±0.92 ^d
50 mg/ml	78.3±1.66 ^{ab}	3.9±0.23 ^b	14.6±0.68 ^{ab}	5.3±0.38	22.9±0.72 ^b	64.8±0.94 ^c	16.3±1.33 ^a	9.6±0.61 ^c	9.1±0.47 ^{ab}
100 mg/ml	71.6±1.66 ^b	4.7±0.21 ^a	16.1±0.52 ^a	6.0±0.28	26.8±0.45 ^a	55.8±0.79 ^d	14.3±0.76 ^{ab}	18.6±0.95 ^a	11.1±0.79 ^a

a-d Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.(p<0,05)

Tablo 2: Epididimal manda spermatozoonlarının 24. saatte elde edilen ortalama spermatolojik parametreleri.

Table 2: Mean spermatological parameters obtained at 24 h of epididymal buffalo spermatozoa.

Gruplar (n=6)	Motilite (%)	24 h				H+E- (%)	H-E- (%)	H+E+ (%)	H-E+ (%)
		Anormal Spermatozoon Oranı							
		Baş (%)	Orta Kısım (%)	Kuyruk (%)	Toplam (%)				
Kontrol	31.6±1.66 ^{ab}	4.5±0.18 ^{ab}	11.0±0.53 ^{bc}	11.2±0.38 ^a	26.7±0.82 ^{ab}	47.6±0.88 ^d	22.3±0.87 ^a	16.1±1.35 ^b	15.5±0.76 ^a
12.5 µg/ml	46.6±2.10 ^a	3.6±0.23 ^{bc}	9.2±0.28 ^c	9.3±0.35 ^b	22.2±0.65 ^c	59.0±0.57 ^b	15.3±0.49 ^c	16.0±0.81 ^b	9.6±0.61 ^{bc}
25µg/ml	45.6±2.20 ^a	2.9±0.23 ^c	10.2±0.62 ^{bc}	7.4±0.30 ^d	20.5±0.62 ^c	71.8±1.35 ^a	13.5±1.25 ^c	8.8±0.94 ^c	7.8±1.19 ^c
50 µg/ml	43.3±2.10 ^a	4.8±0.38 ^a	11.8±0.76 ^b	8.4±0.15 ^{bc}	25.1±0.67 ^b	60.8±0.60 ^b	18.6±0.88 ^b	11.1±1.81 ^c	9.16±0.47 ^{bc}
100 µg/ml	41.6±1.66 ^a	5.4±0.56 ^a	14.0±0.61 ^a	8.3±0.35 ^{cd}	27.8±1.11 ^a	52.5±1.23 ^c	14.8±1.24 ^c	20.1±0.60 ^a	12.0±0.96 ^b

a-d Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.(p<0,05)

Tablo 3: Epididimal manda spermatozoonlarının 48. saatte elde edilen ortalama spermatolojik parametreleri.

Table 3: Mean spermatological parameters obtained at 48 h of epididymal buffalo spermatozoa.

Gruplar (n=6)	Motilite (%)	48 h				H+E- (%)	H-E- (%)	H+E+ (%)	H-E+ (%)
		Anormal Spermatozoon Oranı							
		Baş (%)	Orta Kısım (%)	Kuyruk (%)	Toplam (%)				
Kontrol	21.6±1.66 ^d	6.5±0.40 ^{ab}	7.4±0.41 ^b	16.6±0.27 ^a	30.5±0.90 ^a	31.0±2.25 ^d	17.5±0.99 ^a	23.5±1.33 ^a	28.0±2.06 ^a
12.5 mg/ml	43.3±2.10 ^a	4.7±0.21 ^c	7.6±0.30 ^b	13.4±0.30 ^b	25.7±0.47 ^c	52.8±3.09 ^b	12.0±0.73 ^{bc}	18.8±1.19 ^b	16.3±2.52 ^b
25mg/ml	40.0±2.58 ^{ab}	3.9±0.15 ^c	6.5±0.28 ^b	9.1±0.32 ^d	19.5±0.57 ^d	62.5±4.46 ^a	11.0±0.68 ^c	12.6±1.68 ^c	14.0±2.43 ^b
50 mg/ml	33.3±2.10 ^{bc}	6.4±0.47 ^b	10.1±0.55 ^a	10.5±0.28 ^c	26.4±0.71 ^c	41.8±0.94 ^c	14.3±0.71 ^b	20.3±0.21 ^{ab}	23.5±0.76 ^a
100 mg/ml	28.3±3.07 ^{cd}	7.5±0.36 ^a	10.2±0.23 ^a	10.8±0.30 ^c	28.4±0.15 ^b	43.5±1.89 ^c	13.5±0.99 ^{bc}	19.8±1.04 ^{ab}	23.1±2.30 ^a

a-d Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.(p<0,05)

TARTIŞMA

Kauda epididimis canlılarda, spermatozoonların olgunlaşma ve hareketlilik kazanmaları için uygun bir ortam sağlar. Bununla beraber çalışmalar kauda epididimisten elde edilen spermatozoonların yalnızca seminal sıvı veya medyumlarla karşılaştıklarında hareket ettiklerini (Amann ve Almquist, 1962, Lima, 2013) ve bir canlının ölümünden saatler sonra bile işlevsel kaldıklarını göstermiştir (Chaveiro ve ark. 2015). Kaabi ve ark. (2003) post-mortem alınan testislerin saklama koşullarının, spermatozoa canlılığı üzerine de bir miktar etkisi olduğunu bildirmektedirler. Ölüm sonrası kauda epididimisten toplanan spermatozoon hücrelerinin kalitesindeki değişimin iklim koşullarına, sıcaklığa, işleme koşullarına veya tür farklılıklarına bağlı olarak değişebileceği bildirilmiştir. Bununla birlikte, kısa süreli saklama ile spermatozoon hücrelerinin metabolik hızını ve dejenerasyonunu yavaşlatarak daha uzun bir süre canlı tutulabildiği belirtilmiştir (Tittarelli ve ark. 2006). Farklı türlerde daha önce yapılan çalışmalar post-mortem etkilenen ilk parametrenin epididimal spermatozoon motilitesinin ardından morfolojik değişiklikler olduğunu göstermiştir (Yu ve Leibo 2002, Kaabi ve ark. 2003, Martinez-ve ark. 2005, Muradás ve ark. 2006). Songsasen ve ark. (1998) bunun nedeni olarak post-mortem bekleme süresinin uzamasının motil spermatozoonların dejenerasyonu ve bozulmasını artırdığını belirtmişlerdir. Çalışmalarında 24 saate kadar akrozom bütünlüğü ve canlılık oranlarında fark olmadığını bunun aksine spermatozoa motilitesinin ölümden 0 ila 12 saat sonra toplananlara kıyasla 18. ve 24. saatte toplandığında azaldığını bildirmişlerdir. Sunmuş olduğumuz çalışmada 0. saat motilitesi ile 24 ve 48. saatlerdeki motiliteki kayıpların belirtilen çalışmalarla uyumlu olduğu gözlenmiştir. Barati ve ark. (2009) yaptıkları epididimal manda spermasının in vivo kısa süreli saklama çalışmasında 0., 24. ve 48. saatte elde ettikleri motilite değerlerini sırasıyla % 73.4±3.4, % 37.5±3.5 ve % 27.1±3.2 olarak bildirmişlerdir. Bu değerler yapmış olduğumuz in vitro 24. ve 48. saat verilerinden düşük bulunmuş ve aradaki farkın epididimis ortamı ile sulandırıcı ve sulandırıcıya ilave edilen antioksidan yoğunluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Yulnawati ve ark. (2009) epididimal manda spermasında sulandırma sonrası anormal spermatozoon oranını %15 olarak belirledikleri çalışmaya karşın yapmış olduğumuz çalışmada gerek kontrol gerekse karnosik asit gruplarında yüksek anormal spermatozoon oranları tespit edilmiştir. Ortaya çıkan bu farklılığın çalışmamızda orta kısım da stoplazmik damlacığın yüksek olmasıyla ilgili olduğu yönünde değerlendirilmektedir. Lambrechts ve ark. (1999) yaptıkları araştırmada epididimal manda

spermasında anormal sperma oranlarını sırasıyla % 31.3±7.6 ve 24.7±6.7 olarak belirlemişler ve bu yüksek oranın stoplazmik damlacık ve diğer anomalilerden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bu değerler çalışmamız ile uyumlu bulunmuştur.

Araştırmamızda çarpıcı bir şekilde 24. ve 48. saatlerde stoplazmik damlacık oranlarında düşüş görülmüştür. Bu durumun Harayama ve ark. (1996)'nın domuzlarda fruktoz ilavesinin spermatozoadaki stoplazmik damlacık sayısını azalttığı çalışmada bildirdikleri gibi sulandırıcıya katılan maddelerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Hoseinzadeh-Sani ve ark. (2013) tekelerde yaptıkları çalışmada kesim sonrasında 4 °C'de sakladıkları testislerden 0., 24., 48. ve 72. saatlerde sperma elde ederek dondurdukları çalışmalarında stoplazmik damlacık yüzdelерinin depolama süresinin uzamasına bağlı olarak dondurma öncesi ve çözündürme sonrasında azalma eğiliminde olduğunu bildirmişlerdir. Karnosik asit ve karnozol abietan tipindeki fenolik diterpenlerdir ve rosmarinik asit, kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenilakton'un bir esteridirler (fenolik depilasyon). Biberiye özündeki bu maddelerin belirgin antioksidan, antiinflamatuvar ve sitotoksik özellikleri vardır. (Bai ve ark. 2010, Mulinacci ve ark. 2011). Daghigh-Kia ve ark. (2014) yalnız biberiye ekstaktı (10 g L⁻¹) ilavesinin ve glutatyon (5 mM glutatyon + 10 g L⁻¹ biberiye ekstaktı) ile kombinasyon halinde boğa spermasında ROS üretimine karşı hücre içi savunma sistemini önemli ölçüde iyileştirdiğini, ayrıca Malo ve ark. (2010) MDA üretiminin, domuz spermasında dondurma-çözündürme sonrası sulandırıcıya ilave edilen biberiye ekstaktının (10 g 100 L⁻¹) varlığından etkilendiğini belirtmiştir.

Malo ve ark. (2010) sulandırıcıya eklenen biberiye ekstaktının domuz spermatozoonunun motilitesini iyileştirdiğini, Zanganeh ve ark. (2013) geyik spermasına katılan biberiye ekstaktının (% 4 düzeyinde) çözüm sonrası spermatozoon motilitesi, membran bütünlüğü ve canlı spermatozoon oranları üzerine koruyucu etki gösterdiğini ve Daghigh-Kia ve ark. (2014) rozmarinik asit ilavesinin (10 g L⁻¹) canlı spermatozoon oranı ve motiliteyi koruduğunu bildirmişlerdir. Motlagh ve ark. (2014) koçlarda biberiye ekstaktının % 4 ve % 6 lık konsantrasyonlarının çözüm sonu yüksek motilite, membran bütünlüğü ve canlı spermatozoon oranları gösterdiklerini bildirmişlerdir. Yaptığımız literatür taramalarında epididimal manda spermasının kısa süreli saklanması üzerine karnosik asitin ya da biberiye ekstaktının etkisini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlamamış olsak da yukarıda verdiğimiz literatürlerde biberiye ekstaktının spermatolojik verilere yaptığı olumlu etkinin çalışmamızda bulduğumuz değerler ile paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, manda epididimal

spermasının kısa süreli saklanması sulandırıcıya eklenen karnosik asitin motilite, spermatozoon morfolojisi, membran bütünlüğü ve canlılığı açısından özellikle 12,5 ve 25 µg/ml lik dozlarının kontrol grubuna göre koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte karnosik asitin etkilerini belirlemek amacıyla özellikle fertilité sonuçlarının ortaya konulacağı daha kapsamlı çalışmalara gerek vardır.

KAYNAKLAR

- Almeida FC, Silva SV, Souza HM, Gomes WA, Lima Filho JAC, Wicke AA, Batista AM, Guerra MMP.** Effects of glycerol, equilibration time and antioxidants on post-thaw functional integrity of bovine spermatozoa directly obtained from epididymis. *Andrologia*. 2017; 49(3) 1-9.
- Amann RP, Almquist JO.** Reproductive capacity of dairy bulls VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J. Dairy Sci.* 1962; 45 774-781.
- Bai N, He K, Roller M, Lai CS, Shao X, Pan MH, Ho CT.** Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(9) 5363-5367.
- Arı UÇ, Öztürkler Y.** Spermanın Kısa ve Uzun Süreli Saklanması Oksidatif Stres ve Antioksidan Kullanımı. *Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin Special Topics.* 2015; 1(3)16-21.
- Barati F, Khaksary MM, Mohammadi, G.** Cryopreservation of in situ cool stored buffalo (*Bubalus bubalis*) epididymal sperm. *Iran. J. Vet. Res.* 2009; 10(4) 339.
- Chaveiro A, Cerqueira C, Silva J, Franco J, Moreira da Silva F.** Evaluation of frozen thawed cauda epididymal sperms and in vitro fertilizing potential of bovine sperm collected from the cauda epididymal. *Iran. J. Vet. Res.* 2015; 16(2) 188-193.
- Daghigh-Kia H, Olfati-Karaji R, Hoseinkhani A, Ashrafi I.** Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts and glutathione antioxidants on bull semen quality after cryopreservation, *Spanish J. Agric. Res.* 2014; 12(1) 98-105.
- FAO.** Live animals. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>. Erişim tarihi: 31.07.2017
- Frankel EN, Huang S, Aeschbach R, Prior E.** Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44(1) 131-135.
- Goovaerts I, Hoflack G, Van Soom A, Dewulf J, Nichi M, de Kruif A, Bols P.** Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. *Theriogenology.* 2006; 66(2) 323-330.
- Gündoğan M, Avdatek F, Yeni D.** Effect of extenders on motility, morphology and osmotic resistance parameters of ram sperm during liquid storage *Revue Med. Vet.* 2011; 162(11) 546-551.
- Harayama H, Shibukawa T, Miyake M, Kannan Y, Kato S.** Fructose stimulates shedding of cytoplasmic droplets from epididymal boar spermatozoa. *Reprod Fertil Develop.* 1996; 8(7) 1039–1043.
- Herold FC, de Haas K, Colenbrander B, Gerber D.** Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl™ or Andromed®. *Theriogenology* 2006; 66(5) 1123-1130.
- Hoseinzadeh-SaniSKA, BaratiF, Mahabady MKM.** The effects of ex vivo cold-storage on cryopreservation of the goat (*Caprus hircus*) epididymal sperm. *Iran. J. Reprod. Med.* 2013; 11(9) 747-752.
- Jones R.** Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: A hypothesis. *Biol Reprod.* 2004; 71(5) 1405-1411.
- Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Herraes P, Anel L.** Effects of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered *post-mortem*. *Theriogenology.* 2003; 60(7) 1249-1259.
- Kumar A, Saxena A, Verma AK, Perumal P.** Hypo-Osmotic Swelling Test On Buffalo (*Bubalus Bubalis*) Semen. *Buffalo Bulletin.* 2014; 33(1) 111-114.
- Küçükkebabcı M, Aslan S.** Evcil Dişi Mandaların Üreme Özellikleri. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.* 2002; 42(2) 55–63.
- Lambrechts H, van Niekerk FE, Coetzer WA, Cloete SW, van der Horst G.** The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Syncerus caffer*) sperms. *Theriogenology* 1999; 52(7) 1241- 1249.
- Lee CN, Handrow RR, Lenz RW, Ax RL.** Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. *Gamete research.* 1985; 12(4) 345-355.

- Lima ICS, Andrade IRA, Aguiar GV, Silva MM, Catunda AGV, Martins GA, Gadelha CRF, Campos ACN.** In vitro evaluation of goat cauda epididymal sperm, cooled in different extenders at 4°C. *Arch. Zootec.* 2013; 62(239) 429-437.
- Lopez-Jimenez A, Garcia-Caballero M, Medina MA, Quesada AR.** Antiangiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *Eur. J. Nutr.* 2013; 52(1) 85–95.
- Luno L, Gil M, Olaciregui N, Gonzalez RA, Jerez IB.** Rosmarinic acid improves function and in vitro fertilising ability of boar sperm after cryopreservation. *Cryobiology.* 2014; 69(1) 157–162.
- Malo C, Gil L, Gonzalez N, Martinez F, Cano R, de Blas I, Espinosa E.** Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology.* 2010; 61(1) 142–147.
- Martinez-Pastor F, Guerra C, Kaabi M, Diaz AR, Anel E, Herraez P, Anel L.** Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology.* 2005; 63(1) 24-40.
- Motlagh MK, Sharafi M, Zhandi M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Soleimani M, Zeinoaldini S.** Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. *Cryobiology.* 2014; 69(2), 217-222.
- Mulinacci N, Innocenti M, Bellumori M, Giaccherini C, Martini V, Michelozzi M.** Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: an HPLC/DAD/MS study. *Talanta.* 2011; 85(1) 167-176.
- Muradás PR, Weiss RR, Kozicki LE, Granemann LC, Santos IW, Pimpão CT.** Some viability parameters from equine spermatozoa harvested by artificial vagina and by epididymal tail washing. *Arch Vet Sci.* 2006; 11(3) 69-74.
- Patrizio P, Silber S, Ord T, Balmaceda J, Asch R** Two births after microsurgical sperm aspiration in congenital absence of vas deferens. *The Lancet.* 1988; 332(8624) 1364.
- Songsasen N, Tong J, Leibo SP.** Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to 24 hours after death. *J. Exp. Zool.* 1998; 280 189-196.
- Taşdemir U, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Özgurtas T, Durmaz E, Büyükleblebici O.** Effects of Various Antioxidants on Cryopreserved Bull Sperm Quality. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2014; 20(2) 253-258.
- Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, De La Sota RL.** Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology.* 2006; 66(6-7) 1637-1640.
- Tuncer PB, Çevik M, Kinet H.** Holstayn Boğa Spermalarının +4°C'de Saklanması Farklı Sperm Sulandırıcılarının Motiliteye Etkisi. *Lalahan Hay. Arast. Enst. Derg.* 2005; 45 (2) 1–7
- TÜİK.** <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=21871>. Erişim tarihi: 31.07.2017
- Uçar M, Gündoğan M, Yılmaz O.** Mandalarda Mevsimsel Üreme Özellikleri ve Folliküler Dinamikler. *Hay. Araş. Derg.* 2005; 15(2) 24–29.
- Vernet P, Aitken R, Drevet J.** Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and cellular endocrinology.* 2004; 216(1) 31-39.
- Watson PF.** Use of Giemsa stain to detect changes in the acrosome of frozen ram spermatozoa. *Vet Rec.* 1975; 97(1) 12-15.
- Yu I, Leibo SP.** Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides store for 8 days at 4°C. *Theriogenology.* 2002; 57(3) 1179-1190.
- Yulnawati, H, Maheshwari, H, Herdis and Rizal, M.** Viability and plasma membrane integrity of the spotted buffalo epididymal spermatozoa after thawing with the addition of dextrose into the extender. *Biotropia.* 2009; 16(1) 21-27.
- Zanganeh Z, Zhandi M, Zare-Shahneh A, Najafi A, Nabi MM, Mohammadi-Sangcheshmeh A.** Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? *Small Rum. Res.* 2013;114 120–125.