

The Effect of Carnosic Acid on Semen Freezability in Malaklı Shepherd Dogs

Hulusi ŞAHİN¹, Deniz YENİ^{1*}, Fatih AVDATEK¹

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Reproduction and Artificial Insemination Department, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

ABSTRACT

The objective of the study was to determine the effect of carnosic acid, to Malakli Shepherd dog semen motility, morphology, viability and membran integrity parameters after frozen-thawed process. Five animal were used in this study and the sperm rich portion of the ejaculates were mixed and divided in to five equal groups. Each group extended with either tris as a control group and containing carnosic acid 10 µM, µM, 100 µM, 200 µM. Following equilibration for one and a half hour, the straws were frozen in nitrogen vapor and then stored in liquid nitrogen. Later, the frozen straws were thawed in a water bath for motility, morphology, viability and membran integrity parameters examination. The highest motilities and HOST-Eosin test results were detected in 10 µM group at 65.00±2.23 % and 69.83±0.70 % respectively, the lowest abnormal sperm rate were detected in 10 µM group at 9.50±1.52 % and the differences in these groups (p <0.05) were statistically significant compared to the control group. With regard conclusion, it was determined that the doses of 10 µM of carnosic acid added to extender in freezing of Malakli dog sperm showed a protective effect compared to the control group in terms of motility, spermatozoon morphology, membrane integrity and viability.

Keywords: Carnosic acid, cryopreservation, Malaklı shepherd dogs, sperm

Malaklı Köpeği Spermasının Dondurulabilirliği Üzerine Karnosik Asitin Etkisi

ÖZ

Sunulan çalışmanın amacı, dondurulmuş çözündürülmüş Malaklı Çoban Köpeği spermasında karnosik asitin motilite, morfoloji, canlılık ve membran bütünlüğü parametrelerine etkisini belirlemektir. Bu çalışmada beş baş Malaklı köpeğine ait ejakülatların spermatozoon bakımından zengin kısmı kullanıldı. Ejakülatlar birleştirildi ve beş eşit gruba bölündü. Kontrol grubu temel Tris sulandırıcısıyla sulandırıldı ve diğer gruplar 10 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM karnosik asit içeren gruplar oluşturuldu. Bir buçuk saat ekilibrasyonun ardından, payetler azot buharında donduruldu ve daha sonra sıvı azot içinde depolandı. Ardından dondurulmuş payetler 37°C sıcak suda çözündürüldü ve motilite, morfoloji, canlılık ve membran bütünlüğü parametreleri değerlendirildi. En yüksek motilite ve HOST-Eozin değerleri 10 µM'lık grupta elde edildi ve sırasıyla %65,00±2,23 ve %69,83±0,70 olarak belirlendi, en düşük anormal spermatozoon oranı ise 9,50±1,52 ile yine 10 µM'lık gruptan elde edildi ve bu gruplardaki fark (p<0.05) kontrol grubuna göre istatistiki olarak önemli bulundu. Sonuç olarak Malaklı köpeği spermasının dondurulmasında 10 µM karnosik asitin, motilite, spermatozoon morfolojisi, membran bütünlüğü ve canlılığı açısından kontrol grubuna kıyasla koruyucu bir etki gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Karnosik asit, kriyoprezervasyon, Malaklı köpeği, sperma

To cite this article: Şahin H, Yeni D, Avdatek F. The Effect of Carnosic Acid on Semen Freezability in Malaklı Shepherd Dogs. Kocatepe Vet J. (2021) 14(4):492-498

Submission: 18.10.2021 Accepted: 06.12.2021 Published Online: 07.12.2021

ORCID ID; HŞ: 0000-0003-1376-2437, DY: 0000-0002-9105-5677, FA: 0000-0003-2345-8826

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

GİRİŞ

Çoban köpekleri Türkiye’de Akbaş ve Karabaş isimleri altında sınıflandırılabilir. Kangal ve Malaklı Karabaş grubunun en tanınan iki üyesidir (Atasoy, 2010). Karabaş tipi Malaklı köpekler başta Aksaray, Nevşehir ve Şereflikoçhisar olmak üzere Türkiye’nin farklı bölgelerinde yetiştirilmektedir. Üreme özellikleri henüz ırka spesifik olarak ortaya koyulmamasına rağmen, Anadolu’ya has diğer bir ırk olan Kangal çoban köpeklerine benzemektedir. Dişileri ortalama olarak 7-8 aylık olduklarında, erkekler ise çoğunlukla dişilerden 2 ay sonra 9-12 aylık iken cinsel olgunluğa (Puberta) ulaşırlar ve bir yaşından sonra yetiştirmeye alınırlar (Cupps, 1991). Dişiler 6-8 ayda bir kızgınlık gösterirler ve iyi bakım besleme koşullarında bir defada 6-8 yavru doğurup 8-10 yaşına kadar yavru verebilirler. Erkekler ise yıl boyunca seksüel aktivite gösterirler, mevsimsel etkiler minimum düzeyde görülmektedir (Özgüneş ve Çiftçi, 1993, Özbeyaz, 1994).

Suni tohumlama tekniğinden faydalanılmak istendiğinde uzun süre fertilité yeteneğini koruyabilen spermaya ihtiyaç duyulmaktadır. Spermanın metabolik işlevlerini durdurularak fertilizasyonda önemli bir kayba yol açmadan süresiz bir şekilde muhafaza edilmesi spermanın dondurularak saklanması ile yapılabilir (Lemma, 2011). Bilimsel ve teknolojik olarak canlı hücre dondurma işlemleri, Polge ve arkadaşlarının 1949 yılında kriyoprotektan özelliği olan gliserolün bulması ile başlamıştır ve ilk dondurulan hücrelerinde spermatozoon olduğu bilinmektedir (Leibo ve Brandley, 1999).

ROS (reaktif oksijen türleri) spermatozoonların fertilizasyon kabiliyetlerinde fizyolojik olarak rol oynamakta olup özellikle spermatozoonların zona pellusidaya bağlanmasını, akrozom reaksiyonu geçirmesini ve zona pellusida içerisinden geçerek oositin membranı ile birleşmesini sağlamaktadır. ROS düşük konsantrasyonda bulunduğu normal spermatozoon fonksiyonları için arabulucu gibi davranırken üretimi gerekenden daha fazla olursa o zaman hücreler için toksik hale gelmektedir (Griveau ve Le Lannou, 1997).

Organizmada bulunan birçok savunma mekanizması sayesinde serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve meydana getirdikleri hasarın önlenebileceği, bunların da antioksidanlar olarak adlandırılabilceği bildirmiştir (Akkuş, 1995). Spermatozoonlar seminal plazmasında bulunan antioksidanlar vasıtasıyla kendini oksidatif strese karşı korumaya çalışmaktadır (Kim ve Parthasarathy 1998). Antioksidanların ilk etkileri, hücre membranı yapısında bulunan lipid peroksidasyona (LPO) karşı korunmasıdır. Bunun neticesinde, başlangıçta antioksidanlar LPO’u engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Bugün ise antioksidan tanımı lipidlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir. Böylece antioksidanlar hedef

moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak nitelenmekte ve buna bağlı olarak antioksidanların etkileri değişik şekillerde olabilmektedir (Rangan ve Bulkley 1993).

Rosmarinus officinalis L.’nin güçlü antioksidan aktivitesinden sorumlu olan, karnosik asit (CA), karnosol ve rosmarinik asittir (RA) (Zanganeh ve ark, 2013). Abietatrien türevi diterpenler karnosik asit ve karnozol biberiyenin antioksidan etkisinin %90’ından sorumludur. Biberiye ekstresi ve onun polifenollerini CA ve RA, apoptosisin indüksiyonuna ve azalmış hücre sağ kalımına yol açan spesifik yolları hedeflemek için kimyasal maddeler olarak kullanılabilir. Sulu biberiye ekstraktında bulunan CA ve diğer fenolik bileşiklerin, zar lipid düzenini artırarak membranı sertleştirdiği ve antioksidan etkinliğini bu yolla gösterebileceği bildirilmiştir (Prez-Fons ve ark, 2006).

Sunulan bu çalışmada Malaklı köpeği spermasının dondurularak saklanması sulandırıcıya katılacak olan karnosik asitin dondurma-çözdürme sonrası motilite, anormal spermatozoon oranı ve HE (HOST-Eozin) test üzerine etkileri, çözdürme sonrası meydana gelebilecek hasarların en aza indirilmesinde karnosik asitin etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL METOT

Araştırma Afyonkarahisarda bulunan ticari bir işletme ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Sunulan çalışma için Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu’ndan gerekli izin (AKÜHADYEK-456-15-Referans nolu araştırma) alınmış ve 3-5 yaşlı 5 baş ergin Malaklı köpeğinden alınan spermalar kullanıldı. Köpeklerin bakım ve beslemesi özel bir işletme şartlarında ve standart yetiştirme koşullarında yapıldı.

Spermanın Alınması ve Değerlendirilmesi

Köpeklerden sperma, kızgın bir dişi olmadan deneyimli bir araştırmacı tarafından elle masaj yöntemiyle alındı. Erkek köpeklere sağ tarafından yaklaşılarak prepusyum üzerinden penis ve bulbus glandise masaj yapıldı. Bulbus glandis şişmeye başladığında prepusyum çekilerek penis prepusyumdan sıyrıldı ve bulbus glandis köküne masaja devam edildi. Ardından penis arka bacaklar arasından geriye çevrilerek spermatozoon zengin olan ikinci fraksiyon alındı (Akçay, 2000, İnanç ve ark. 2018a).

Ejakulatlar, haftada bir kez, 6 tekrar yapılarak alındı. Alınan ejakulatlardan uygun özellik (sperma yoğunluğu $\geq 400 \times 10^6$ spermatozoa/ml; motilite $\geq \%80$) gösterenler miks yapılarak antioksidan içermeyen (kontrol) ve 4 farklı konsantrasyonda

karnosik asit (10 µM, 50 µM, 100 µM ve 200 µM) içeren 5 farklı çalışma grubu oluşturuldu.

Spermaların sulandırılmasında, Tris (Hidroksimetilaminometan) (297,58 mM), Sitrik asit (96,32 mM), Fruktoz (82,66 mM), %20 yumurta sarısı ve %5 gliserol içeren sulandırıcı kullanıldı.

Köpeklerden alınan ejakulatlar makroskobik ve mikroskobik yönden değerlendirildi ve normospermi özelliği gösteren ejakulatlar çalışmada kullanıldı. Birleştirilen ejakulatlar 10 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM ve kontrol (0 µM) karnosik asit içeren temel tris yumurta sarısı sulandırıcısı ile yoğunluğu 200x10⁶/ml olacak şekilde sulandırıldı. Ardından payetlere çekildi, uçları polivinil alkol ile kapatıldı ve +4°C’ de 1,5 saat ekilibrasyona bırakıldı. Ekilibrasyon sonrası sperma grupları sıvı azot buharı (-100 °C) yüzeyinin 11cm üzerinde 15 dakika tutularak donduruldu. Daha sonra dondurulmuş spermalar azot tankı içerisine (-196°C) alındı. Çalışmada; dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik muayeneler; motilite, morfolojik muayene ve membran bütünlüğü ve ölü canlı spermatozoonları belirleyen HE test kullanılarak spermatolojik muayeneleri yapıldı.

Çözüm Sonu Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Spermatozoa Motilitesi

Dondurma sonrası, spermatolojik muayeneler için, dondurulmuş payetler 37°C’ de 25 saniyede çözdürüldü. Isıtma tablalı faz kontrast mikroskopun (Olympus CX 31) 37°C’ ta, 20X büyütmesinde lam-lamel arasına alınan sperma numunesinde en az 3 mikroskop sahası incelenerek, sahalardaki motilite değerlerinin ortalaması % motilite oranı olarak kaydedildi (Demirci, 2002, Tekin, 1994).

Anormal Spermatozoa Oranı

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 bir slayttan 200 hücre sayıldı ve % olarak kaydedildi (Watson 1975).

HE Test

Sperma numunelerinde ölü-canlı spermatozoon oranını ve membran bütünlüğünü birlikte değerlendiren HE test kullanıldı (Ducci ve ark., 2002; Gündoğan ve ark., 2010). Ependorf tüpler içerisine su banyosunda 37 °C’deki 100 mOsm’luk HOS solüsyonundan 1 ml alınarak üzerine sperma numunesinden 10 µl eklendi. Daha sonra eozin boyası ilave edilip karışım 37 °C’lik su banyosunda 30 dk.

inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası lam üzerine bu karışımdan alınıp frotileri çekilerek çok kısa bir sürede kuruması sağlandı. Hazırlanan frotilerde 400’lük büyütmede 200 spermatozoon baş kısmının tamamın ya da bir bölümünün boya alıp almayışına ve kuyruktaki kıvrılma veya şişme olup olmayışına göre dört tipte sınıflandırıldı. Kuyruğu şişmiş, baş boya almamış (H+/E-), kuyruğu şişmemiş, baş boya almamış (H-/E-), kuyruğu şişmiş, baş boya almış (H+/E+), kuyruğu şişmemiş, baş boya almış (H-/E+) şeklinde değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizde en az 6 farklı uygulamadan elde edilen verilerin ortalamaları kullanıldı. Karnosik asit içeren ve içermeyen sulandırıcı grupların karşılaştırılmasında SPSS 16.0 programında Varyans analizi, aralarında önemli farklılık bulunan ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında ise çoklu karşılaştırma testlerinden Duncan Testi kullanıldı. Farkın p<0.05 düzeyde olması önemli kabul edildi.

BULGULAR

Dondurma-Çözdürme Sonrası Motilite Bulguları

Aksaray Malaklısı Çoban köpeklerinde dondurma çözdürme sonrası grupların motilite oranları Tablo 1’de sunulmaktadır. Buna göre subjektif motilite yönünden 10 µM, 50 µM ve 100 µM karnosik asit içeren grupların, kontrol grubuna göre istatistiki bir üstünlük (p<0.05) sağladığı gözlemlendi.

Dondurma-Çözdürme Sonrası Anormal Spermatozoon Oranları

Araştırmada çözüm sonrası anormal spermatozoon oranları ile ilgili elde edilen bulgular Tablo 2’de verilmiştir. Buna göre kontrol grubu ile kıyaslandığında 10 µM karnosik asit katılan grupta belirgin bir derecede düşüş saptanmış ve istatistiki olarak fark (p<0.05) önemli bulunmuştur.

Dondurma-Çözdürme Sonrası HE test parametreleri

Dondurma-çözdürme sonrası HE test sonucunda elde edilen bulgular Tablo 3’te verildi. Modifiye HOS Test yönünden değerlendirdiğimizde, canlı ve membran bütünlüğü oranı açısından kontrol grubuna göre 10 µM ve 100 µM karnosik asit eklenen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiki olarak farkın (p<0.05) önemli olduğu belirlendi.

Tablo 1. Dondurma-çözdürme sonrası motilite değerleri ($X \pm SEM$, n:6).

Gruplar	Motilite %
Kontrol	46.66±5.57 ^b
CA 10 µM	65.00±2.23 ^a
CA 50 µM	61.66±3.07 ^a
CA 100 µM	60.00±2.58 ^a
CA 200 µM	55.00±4.28 ^{ab}
p	*

a-b: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir. (*: $p < 0.05$).

Tablo 2. Dondurma-çözdürme sonrası anormal spermatozoon oranları ($X \pm SEM$, n:6).

Gruplar	Anormal Spermatozoon Oranı %
Kontrol	18.33±2.17 ^a
CA 10 µM	9.50±1.52 ^b
CA 50 µM	12.50±1.83 ^{ab}
CA 100 µM	14.33±1.17 ^{ab}
CA 200 µM	12.33±3.10 ^{ab}
p	*

a-b: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir. (*: $p < 0.05$).

Tablo 3. Dondurma-çözdürme sonrası HE-test parametreleri ($X \pm SEM$, n:6).

Gruplar	HE-Test (%)			
	H+/E-	H-/E-	H+/E+	H-/E+
Kontrol	62.33±1.33 ^{cd}	24.00±1.28 ^a	6.00±1.09 ^b	7.67±0.67 ^b
CA 10 µM	69.83±0.70 ^a	15.83±1.16 ^{bc}	7.83±0.60 ^b	6.50±0.50 ^b
CA 50 µM	65.33±2.31 ^{bc}	22.66±1.81 ^a	5.66±0.80 ^b	6.33±0.49 ^b
CA 100 µM	67.16±0.60 ^{ab}	18.66±1.12 ^b	7.16±0.40 ^b	7.00±1.06 ^b
CA 200 µM	59.33±1.20 ^d	14.17±0.87 ^c	15.33±0.56 ^a	11.16±0.48 ^a
p	*	*	*	*

a-d: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir. (*: $p < 0.05$).

TARTIŞMA

Spermanın dondurulması esnasında soğuk şokuna karşı spermatozoonlarda görülen aşırı hassasiyet, hasarı artırarak çözüm sonrası in vitro ve in vivo spermatolojik parametreleri olumsuz yönde etkilemektedir. Yüksek oranda doymamış yağ asiti bulunan spermatozoon membranında, LPO'a karşı duyarlı hale gelmektedir. Spermatozoonun soğutulması ve dondurulması ve çözündürülmesi geri dönüşümsüz faz değişimine bağlı hasarlara ve oksidatif strese neden olmakta ve meydana gelen oksidatif stres ve oluşan sitotoksik aldehyitler spermatozoonlarda fonksiyon kayıplarına sebep olmaktadır (Holt 2000, Watson 2000). Bu nedenle sulandırıcılara katılan kriyoprotektif ve antioksidan özellikli katkı maddeleri sayesinde oksidatif stres ve soğuk şoku hasarı en aza indirilebilmektedir. Kriyoprotektan özellikler gösterebilen antioksidan bileşiklerin de bulunması, bu maddelerle dondurulan spermallerden daha iyi sonuçlar alınmasını sağlamaktadır (Aitken 1994, Alvarez ve Storey 1995, Bucak ve Tekin 2007, Bucak ve ark 2010, Agarwal 2014).

Touazi ve ark. (2018), horozlarda diyetle ekledikleri düşük yoğunluklu biberiye esansiyel yağının kısa süreli saklanan spermada lipid peroksidasyonu ve soğuk şokunun etkilerini azalttığını ve yüksek motilite oranları olduğunu bildirmişlerdir. Yüksek dozlarda ise etkilerin yıkıcı olduğunu ve bunun yüksek dozların hücre zarları ve akrozom bütünlüğü olmak üzere farklı spermatozoa yapılarına verdiği zarardan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Heidari-Vala ve ark. (2013) gastrik gavajla 60 gün süreyle 50 veya 100 mg/kg biberiye ekstraktı verdikleri ratlarda her iki dozda da serum testosteron dozunu azalttığı, toplam spermatozoon sayısı, motilite ve canlılığın değişmediğini bunun yanında Rosmarinus officinalisin her iki dozda spermatogonia, 50 mg/kg dozda leydig hücresi ve spermatid, 100 mg/kg dozlarında ise spermatid sayısını artırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmalar biberiye ekstraktı ile yapılmış ve karnosik asit içeren çalışmalardır ve sonuçları çalışmamız ile uyumlu bulunmuştur.

Rosmarinus officinalis, karnosik, rosmarinik asitler ve kafur gibi molekülleri içeren zengin bir polifenol ve uçucu yağ kaynağı olarak bilinir (Cuvelier, 1996, Frankel E.N, 1996, Richheimer, 1996, Rašković, 2014). Bu bileşikler, antioksidan, antiinflamatuvar ve antikarsinojenik özellikler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteler gösterir. Yaşlı horozlarda, Borghei-Rad ve ark. (2017) biberiye yaprağı ekstraktı ile yapılan besin takviyesinin, oksidatif stres hasarlarıyla mücadele ederek sperma kalitesini ve fertilitite düzeylerini önemli ölçüde iyileştirdiği bildirmiştir.

İnanç ve ark. (2018b), farklı yaşlarda Malaklı köpeklerinde yaptıkları çalışmada dondurma çözündürme sonrası elde ettikleri total motilite değerleri çalışmamızda elde ettiğimiz motilite değerleri ile

uyumlu bulunmuştur. Yine aynı çalışmada elde ettikleri anormal spermatozoon oranlarında elde ettikleri değerler çalışmamızda bulduğumuz değerlerden yüksektir. Bu fark spermaya katılan maddeler, boyama yöntemi ve analiz yönteminden kaynaklanmış olabilir.

Zanganeh ve ark. (2013), geyik sulandırıcısına ilave ettikleri %4'lük biberiye ekstraktının çözüm sonu motilite, canlılık ve membran bütünlüğü parametrelerine pozitif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Malo ve ark. (2010), domuz sperma sulandırıcısına düşük, orta ve yüksek yoğunlukta biberiye ekstraktının eklenmesi ile motilite ve canlılık ve HOST değerleri üzerinde olumlu etki yaptığını bildirmişlerdir. Daghigh-Kia ve ark. (2014), boğa spermasına rozmarinik asit ilavesinin canlı spermatozoa yüzdesi, motilite ve membran bütünlüğünü koruduğunu tespit etmişlerdir. Biberiye özündeki bu maddelerin belirgin olarak yangı önleyici, sitotoksik ve antioksidan, özellikleri bulunmaktadır. Daghigh-Kia ve ark. (2014), glutasyon (5 mM glutasyon + 10 g L⁻¹ biberiye ekstraktı) ile kombinasyon halinde ve yalnız biberiye ekstaktı (10 g L⁻¹) ilavesinin boğa spermasında ROS üretimine karşı hücre içi immünolojik sistemin önemli ölçüde iyileştirdiğini, ayrıca Malo ve ark. (2010), domuz spermasında malondialdehit (MDA) üretiminin, dondurma-çözündürme sonrası sulandırıcıya ilave edilen biberiye ekstraktı ile değiştiği belirtmiştir. Motlagh ve ark. (2014) koçlarda biberiye ekstaktının %4 ve %6 lık konsantrasyonlarının çözüm sonu yüksek motilite, membran bütünlüğü ve canlı spermatozoon oranları gösterdiklerini bildirmişlerdir. Sunulan bilimsel çalışmaların sonuçları incelendiğinde, biberiye ekstraktının spermatolojik verilere yaptığı olumlu etkinin çalışmamızda özellikle 10 µl'lik grupta elde ettiğimiz sonuçlar ile benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Yeni ve Avdatek (2018), kısa süreli sakladıkları epididimal manda spermasına kattıkları karnosik asit sonrası 12.5, 25 ve 50 µg/ml gruplarda motilite değerlerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu, yine aynı çalışmada en düşük toplam anormal spermatozoon oranının 12.5 µg/ml'lik grupta elde edildiğini ve bunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) olduğunu ve en yüksek H+E-oranının ise 62.5±4.46 ile 25 µg/ml'lik grupta elde edildiğini bildirmişlerdir. Yazarların elde ettikleri sonuçlar çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur.

Güngör ve ark. (2019), koç spermasına dondurma esnasında 0.05 ve 0.2 mM düzeyinde karnosik asit ekledikleri çalışmalarında total motiliteyi sırasıyla 35.0 ± 7.15 ve 31.0 ± 4.45 olarak belirlemişlerdir. Bu sonuçları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak fark göstermemiştir. Kullandıkları dozları çalışmamızda kullandığımız 50 ve 200 µM lık gruplarımız ile aynı dozdadır. Elde ettikleri değerlerin bizim değerlerimizden düşük olmasının hayvan türlerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği

değerlendirilmiştir. Yine aynı çalışmada plazma membran ve akrozom bütünlüğü (PMAI) ve çalışmamızdaki membran bütünlüğü (HE) değerleri açısından 50 ve 200 µM'lık dozlarda her iki çalışmada da kontrol gruplarına göre fark bulunamamıştır. Çalışmamızda elde edilen verilere göre tüm parametreler değerlendirildiğinde tris sulandırıcısına 10 µM karnosik asit eklemenin köpek spermasının çözüm sonrası motilite, morfoloji ve membran bütünlüğü-canlılığı üzerine olumlu etkileri olduğu sonucuna varılmıştır.

Çıkar çatışması: Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Etik izin: Bu çalışma "Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli izin (AKÜHADYEK-456-15-Referans no'lu araştırma) alınarak yapılmıştır.

Finansal destek: Bu araştırma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 15.SAĞ.BİL.03 proje numarası ile desteklenmiştir.

Açıklama: Bu çalışma, AKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2019-027 numaralı ve aynı isimli tez çalışmasından özetlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, Peng J, Vazquez-Levin M. Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 2014; 29: 32– 58.
- Aitken RJ. Pathophysiology of human spermatozoa. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 1994; 6: 128-35.
- Akçay E. Kangal Çoban köpeklerinde androlojik muayeneler ve spermanın dondurulması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2000.
- Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 1995; 32.
- Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 1995; 42: 334–346.
- Atasoy F. Köpek-Kedi Yetiştiriciliği Ders Notları, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Zootečni Anabilim Dalı, Ankara, 2010.
- Borghai-Rad SM, Zeinoaldini S, Zhandi M, Moravej H, Ansari M. Feeding rosemary leaves powder ameliorates rooster age-related subfertility. *Theriogenology*, 2017; 101: 35–43.
- Bucak MN, Tekin N. Kriyoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kriyoprotektif etki. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2007; 54: 67-72.
- Bucak MN, Tuncer PB, Sarıözkan S, Başpınar N, Taşpınar M, Çoyan K, Bilgili A, Akalın PP, Büyükleblebici S, Aydos S, Ilgaz S. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*, 2010; 61: 248–53.
- Cupps PT. Reproduction in the dog and cat, Reproduction in Domestic animals, Editör: Cupps, P. T. California: Academic Press. 1991
- Cuvelier ME, Richard H, Berset C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1996; 73: 645–652.
- 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.
- Demirci E. Evcil hayvanlarda reproduksiyon, suni tohumlama ve androloji ders notları (1nd ed). F.Ü.Vet.Fak., Ders Teksiri No:53, Elazığ, 2002.
- Ducci M, Gaazano A, Villani C, Cela V, Artini PG, Martelli F, Genazzani AR. Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. *Eur. J. Obstet. Gynaecol. Reprod. Biol.*, 2002; 102: 53–56.
- Frankel EN, Huang SW, 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996; 44: 131-135.
- Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int. J. Androl*. 1997; 20: 61–69.
- Gündoğan M, Avdatek F, Yeni D. Effect of extenders on motility, morphology and osmotic resistance parameters of ram sperm during liquid storage. *Revue Méd. Vét.*, 2011; 162 (11): 546-551.
- Güngör Ş, İnanç ME, Öztürk C, Korkmaz F, Baştan İ, Çil B, Kastelic JP. Gallic and carnosic acids improve quality of frozen-thawed ram spermatozoa. *Andrologia*. 2019; 51: e13393.
- Heidari-Vala H, Hariry RE, Sadeghi MR, Akhondi MM, Novin MG, Heidari M. Evaluation of an aqueous-ethanolic extract from *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) for its activity on the hormonal and cellular function of testes in adult male rat. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 2013; 12(2): 445.
- Holt WT. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 2000; 53: 47-58.
- İnanç ME, Tekin K, Akkurt MY, Olgac KT, Yılmaz B, Çil B, Kızılaslan M, Taşdemir U, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Uysal O, Çınar Kul B. Genomewide association of male reproductive traits in Aksaray Malakli dogs. *Reprod Dom Anim.*, 2018a; 53:1555– 1562.
- İnanç ME, Tekin K, Olgac, KT, Yılmaz B, Çil B, Taşdemir U, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Uysal O. Effect of cholesterol loaded cyclodextrin on semen cryopreservation of Aksaray Malakli shepherd dogs of different ages. *Animal Reproduction Science*, 2018b; 193, 191-200.
- Kim JG, Parthasarathy S. Oxidation and the spermatozoa. *Semin Reprod Endocrinol*, 1998; 16(4): 235-9.
- Leibo SP, Brandley L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa, *The Male Gamet: From Basic Science to Clinical Applications*. Editör: Gagnon, C. St Louis: Cache River Press, 1999.
- Lemma A. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility, *Artificial Insemination in Farm Animals*. Editör: Manafi, M. InTech, 2011.
- 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.
- 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 lecithinbased semen extender following freeze– thawing

process of ram sperm. Cryobiology, 2014; 69(2): 217-222.

- Özbeyaz C.** “Kangal köpeklerinde bazı morfolojik özellikler”, Lalahan Hay. AraĖ. Ens. Derg., 1994; 34(1-2): 38-46.
- Özgüneş AF, Çiftçi N.** “Kangal köpeği hakkında genel bilgiler”, Tigem Derg., 1993; 1-8.
- Pérez-Fons L, Aranda FJ, Guillén J, Villalaín J, Micol V.** Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes. Archives of biochemistry and biophysics, 2006; 453(2), 224-236.
- Rangan U, Bulkeley GB.** Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. Br Med Bull, 1993; 49(3): 700-18.
- Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Ćebović T, Vukmirović S, Mikov M.** Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis*L.) essential oil and its hepatoprotective potential. BMC Complement. Altern. Med., 2014; 14: 225.
- Richheimer SL, Matthew WB, Greg AK, Michael CK, David TB.** Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. J. Am. Oil Chem. Soc., 1996; 73: 507–514.
- Tekin N.** Spermamın Muayenesi ve Değerlendirilmesi. In: Alaçam, E. Ed. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Suni Tohumlama, Doğum ve Ğnfertilite. Dizgievi, Konya, 1994; 69-79.
- Touazi L, Aberkane B, Bellik Y, Moula N, Iguer-Ouada M.** Effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* (L.) on rooster sperm motility during 4°C short-term storage, Veterinary World, 2018; 11(5): 590-597.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci, 2000; 60: 481-92.
- Watson PF.** Use of Giemsa stain to detect changes in the acrosome of frozen ram spermatozoa Vet Rec., 1975; 97(1): 12-15.
- Yeni D, Avdatek F.** Kısa Süreli Saklanan Epididimal Anadolu Mandası Spermasına İlave Edilen Karnosik Asitin Etkisi. Kocatepe Vet J., 2017; 10(3): 187-195.
- Zanganeh Z, Zhandi M, Zare-Shahneh A, Najafi A, Nabi MM, Mohammadi-Sangcheshmeh A.** Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? Small Rumin. Res., 2013; 114: 120–125.