

Submission: 09.01.2018 Accepted: 11.02.2018 Published Online: 21.02.2018

Merinos Koçlarda Spermaya Katılan Antioksidanların Kısa Süreli Saklama Sırasında Spermatolojik Parametreler ve DNA Hasarı Üzerine Etkileri[#]

Fatih AVDATEK^{1*}, Deniz YENİ¹, Mustafa GÜNDOĞAN¹

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

[#]Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 14.VF.09 nolu proje ile desteklenmiştir.

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

ÖZ

Çalışmada koç ejakülatlarının kısa süreli saklanması sürecinde sperma sulandırıcısına katılan curcumin ve eugenolün spermatolojik değerler ve DNA hasarı üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada toplam 5 Merinos koçtan suni vagina ile alınan ejakülatlar kullanıldı. Başlıca spermatolojik özellikleri belirlenen normospermi kalitesindeki ejakülatlar birleştirilerek kullanıldı. Araştırma ve kontrol gruplarında spermalar mix ejakülat biçiminde değerlendirildi. Spermaların sulandırılması ve dozlanması, farklı curcumin (0,5, 1 ve 2 mM) ve eugenol (0,5, 1 ve 2 mM) dozları Tris ana sulandırıcısı ile yapıldı. Ayrıca antioksidan içermeyen kontrol grubu da oluşturuldu. Sulandırma işlemini takiben örneklerin +5 °C'deki 0. saat spermatozoon motilitesi, morfolojik muayene, membran bütünlüğü (HOST-Eozin testi) ve DNA hasarı belirlenip daha sonra müteakip zamanlar olan 24., 48. ve 72. saatteki spermatolojik ve DNA hasarı değişimleri kaydedildi. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre curcuminin 0.5 mM ile 1 mM ve eugenolün 1 mM lik gruplarının spermatozoon motilitesi, anormal spermatozoon oranları, HE test oranları ve DNA hasarı yönünden kontrol grubu ve diğer gruplara göre istatistik açıdan (p<0.05) en iyi korumayı sağladığı görüldü. Her iki antioksidan maddenin koç spermasının kısa süreli saklanması amacıyla kullanılan sulandırıcıya katılmasında yararlı olacağı kanısına varıldı. Ayrıca literatür taramalarında söz konusu antioksidanlardan eugenol ile ilgili spermatolojik parametrelere dair verilere rastlanmadığından konuyla ilgili daha geniş hayvan materyalleri ile başka çalışmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Curcumin, DNA hasarı, Eugenol, Kısa süreli saklama, Koç sperma

The Effects of Antioxidants Supplementation on Spermatological Parameters and DNA Damage in Liquid Storage Process in Merinos Ram Semen

ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the effects of different doses Curcumin and Eugenol adding to extender on some spermatological parameters and DNA damage during liquid storage of ram semen. The ejaculate samples collected by artificial vagina from 5 Merino rams. Determined principle spermatological properties and having/with normospermic quality will pooled. Samples will evaluated as mix ejaculate in the experiment and control groups. The semen samples which were diluted with a Tris-based extender containing additives including curcumine(0,5, 1 ve 2 mM) and eugenol (0,5, 1 ve 2 mM), and extender containing no antioxidant (control) were constitute. After diluted semen samples will evaluated in point of spermatozoa motility, morphological examination, membrane integrity (HE test) and DNA damage at +5°C for 0. 24, 48 and 72 hours of storage. According to our study, curcuminin 0.5 mM to 1 mM and eugenolin 1 mM groups showed the best protection against spermatozoon motility, abnormal spermatozoon rates, HOST-Eosin test ratios and DNA damage in the control group and other groups (p<0.05). It was concluded that both substances would be useful for the diluent used for short-term storage of ram sperm. Since there is no evidence of eugenol-related spermatological parameters in antioxidants mentioned in the literature, it is necessary to carry out further studies with larger animal materials related to the subject.

Keywords: Curcumine, DNA damage, Eugenol, Short-term storage, Ram semen

To cite this article: Avdatek F, Yeni D, Gundogan M. Merinos Koçlarda Spermaya Katılan Antioksidanların Kısa Süreli Saklama Sırasında Spermatolojik Parametreler ve DNA Hasarı Üzerine Etkileri. Kocatepe Vet J. (2018) 11(2): 126-133.

GİRİŞ

Kısa süreli saklama metodunun esasını sıvı durumda olan spermanın ısısının belirli derecelere kadar düşürülmesi (0-5°C veya 10-15°C) ve bu derecelerde spermatozoanın reversibile olarak inaktive edilmesi oluşturmaktadır. Kısa süreli saklama için en uygun olan ısı dereceleri üzerine şimdiye kadar çeşitli görüşler ortaya atılmıştır. Bazı araştırmacılar kısa süreli (likit saklama) saklama için en uygun sıcaklıkların 10-15°C olduğunu (Salamon ve Maxwell 2000), bazıları da koç ve boğa spermalarının canlılıklarını devam ettirebilmeleri için 0-5°C'lerin daha iyi olduğunu belirtmişlerdir (Johnson ve ark. 2000, Huo ve ark. 2002).

Spermatozoonlarda irreversible bozukluklar meydana getirebilen ani ısı değişikliklerine soğuk şoku adı verilir. Spermayı düşük ısılarda saklarken soğuk şokuna uğrayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle spermatolojik özellikleri belirlenmiş ve sulandırılmış spermanın 5°C'ye soğutulması sırasında çok dikkatli olunmalıdır. Çünkü 17°C'nin altındaki ani ısı değişikliklerinde özellikle spermanın akrozomunda olmak üzere irreversible bozukluklar meydana gelebilecektir. Sonuçta oluşabilecek değişiklikler spermanın potansiyel fertilitasını düşürebilir niteliktedir (Maxwell ve Salamon 1993).

Soğuk şoku, spermatozoanın motilite ve fertilitate gücünün azalmasına sebep olan önemli etkenler arasındadır. Spermatozoa plazma membranı, akrozom ve mitokondri bölümleri soğuk şokuna karşı oldukça duyarlı yapılardır. Soğuk şoku sonucu spermatozoa membran bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte potasyum, adenosin trifosfat (ATP), lipoproteinler, enzimler ve diğer önemli hücre içi yapıların hücreden dışarıya sızabileceği bildirilmektedir (Cupps 1991). Kısa süreli saklama tekniğiyle spermayı 2-3 gün süreyle saklamak mümkün olabilmektedir. Ancak, zamana bağlı olarak 4-8 saatten sonra motilitede sürekli bir azalma ve morfolojik bozukluklarda artma meydana gelmektedir. Yapılan bir çalışmada ise, kısa süreli saklanan koç spermasının mitokondriyal aktivitesinin ve akrozomal bütünlüğünün azaldığı tespit edilmiştir (Güngör ve ark. 2017). Süre uzadıkça spermanın kalitesinde meydana gelen bu azalma, dikkate alınması gereken bir durumdur. Saklama süresince her gün spermanın motilite ve morfolojik muayenelerinin yapılması ve tohumlama dozunun bulgulara göre yeniden hesaplanmasının yararlı olacağı bildirilmektedir (Maxwell ve Saloman 1993).

Kısa süreli saklamalarda sulandırıcının kompozisyonu, sulandırma oranı, saklama ısısı ve şartlarıyla ilişkili olmaksızın, sadece saklama süresinin uzamasına bağlı olarak da spermatozoa zarar görebilmektedir. Saklama sırasında ortaya çıkan başlıca değişiklikler, spermatozoanın motilitesinin azalması ve morfolojik bütünlüğünün bozulması olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu değişikliklere spermatozoanın plazma membranında lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan reaktif oksijen türleri (serbest oksijen radikalleri) olarak bilinen toksik metabolizma ürünlerinin birikimi de olumsuz yönde etkilemektedir. Bu olaylar sonucunda da, spermatozoanın dişi genital kanalında yaşam süresinin kısalması ve transportunun gerçekleşmemesi ve fertilitate düşüşler ortaya çıkmaktadır (Maxwell ve Saloman 1993, Maxwell ve Stojanov 1996). Bununla beraber kısa süreli saklama sürecinde DNA hasarında artışlar meydana gelerek bu da infertilite, kusurlu embriyonel gelişim, implantasyon kusuru ve tekrarlayan abortlara neden olmaktadır (Gündoğan ve ark. 2010).

Güçlü bir antioksidan olan zerdaçal, curcumin, B-karoten, vitamin E ve vitamin C maddelerini içermektedir. Zerdaçalın en önemli bileşeni olan curcumin kuvvetli bir antioksidan olma özelliğinin yanında kolesterolü düşürdüğü, virus, bakteri ve paraziter etkenlere karşı etkili olduğu, yangı ve immun sistem mekanizmaları üzerine pozitif etkilerinin olduğu da belirtilmektedir (Sharma ve ark. 2001). Curcumin içerdiği hidroksil grupları sayesinde antioksidan özelliğine sahip polifenoldür (Gupta ve ark. 2009). Antioksidan özelliğinden dolayı oksidatif strese yol açan çeşitli radikallere karşı DNA'yı koruduğu (Reddy ve Lokesh 1994, Ahsan ve ark. 1999), kanserojen maddelerin vücuttan atılmasında görev alarak DNA'yı zararlı etkenlere karşı koruyan enzimlerin aktivasyonunda rolleri olduğu belirtilmektedir (Koo ve ark. 2004). Eugenol, defneyaprağı, yenibahar ve syzygium bitki türünden köken alan karanfil yağında bulunan kısa hidrokarbon zinciri olan bir metoksifenoldür (Ito ve ark. 2005). Eugenol ve isoeugenolün antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Çeşitli antioksidan sistemler ile oksidatif uyarılma arasındaki denge bozulduğunda oksidatif stres meydana gelmektedir (Atsumi ve ark. 2005). Eugenol mitokondriyal membran dahil ve zincir kırıcı ajan olarak görev yapar, lipid peroksidasyonu inhibe ederek antioksidan etkinliğini göstermektedir (Nagababu ve ark. 2010).

Çalışma, Merinos koçların spermalarının kısa süreli saklanması spermata sulandırıcılarına katılan curcumin ve eugenolün farklı konsantrasyonlarının 0., 24., 48. ve 72. saatlerdeki spermatolojik özelliklere ve DNA hasarı üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapıldı.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada hayvan materyali olarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezinde yetiştirilen 2-3 yaşlarındaki Merinos ırkı 5 baş koç kullanıldı. Çalışma süresince hayvanlara yapılan tüm müdahaleler Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu tarafından bildirilen kurallar doğrultusunda 08/05/2014 tarihli, (AKÜHADYEK 344-14) referans no'lu ve 56 sayılı etik kurul onayı ile gerçekleştirildi. Aşım sezonunda, haftada iki kez olmak üzere her bir koçtan toplam 6 ejakulat toplandı. Çalışmada sulandırıcı olarak Tris (Trisma base 3,63 g, sitrik asit 1,99 g, fruktoz 0,50 g) kullanılmış olup daha sonra farklı konsantrasyonlarda curcumin (0,5, 1 ve 2 mM) ve eugenol (0,5, 1 ve 2 mM) ve herhangi bir antioksidan eklenmeyerek (kontrol) 7 farklı grup oluşturuldu. Her bir koçtan alınan sperma örnekleri birleştirilerek spermatolojik muayeneleri yapıldı ve 7 eşit hacme ayrıldı. Sulandırılmış sperma grupları 5°C'de 2-2.5 saat ekilibre edildikten sonra çalışma süresince aynı derecede muhafaza edildi. Ekilibrasyon sonrası 0. saat kabul edilerek 0., 24., 48. ve 72. saatlerde spermatolojik parametreler ve DNA hasarı yönünden değerlendirmeler yapılarak kaydedildi. Çalışma süresi boyunca sperma örnekleri +5 C⁰'de saklandı ve bu işlem 6 kez tekrarlandı.

Spermatolojik Muayeneler

Sperma motilitesi 37°C'ta ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta (Olympus CX31, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) 400x büyütmede en az 5 farklı alanın ortalaması alınarak % olarak kaydedildi. Anormal spermatozoon oranı Giemsa boyama yöntemiyle immersiyon objektif altında (1000x) belirlenerek farklı spermatozoon bölümlerine (baş, orta kısım ve kuyruk) ait bozukluklar % olarak kaydedildi (Watson 1975). Spermatozoon membran bütünlüğü ve canlılığının belirlenmesi amacıyla HOST-E testi Gündoğan ve ark. (2011) metodu kullanılarak yapıldı. Bunun için, sperma örneklerinin 100 mOsm/l'te ayarlanmış fruktoz solüsyonu içerisine % 1'lik eozin-Y ilave edildi ve 35°C de 30 dakika inkübe edilerek sonrasında froti çekildi. Hazırlanan slaytlardan toplam 200 hücre spermatozoon başının boya alma ve spermatozoon kuyruğunun kıvrılma durumuna

göre dört tip de (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 +) değerlendirildi. Spermatozondaki DNA hasarının belirlenmesinde Single Cell Gel Electrophoresis (COMET) (Ostling ve Johanson, 1984; Singh ve ark., 2003) metoduna göre görsel skorlama (AU) ile değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Her bir tekrar için tanımlayıcı istatistikler hesaplanarak ortalama±standart hata ($\bar{X} \pm SEM$) belirlendi. Gruplar arası farkın önemini belirlemek için Post-hoc Duncan testi kullanıldı. Analizler bilgisayar ortamında SPSS (16.0) paket programında gerçekleştirildi.

BULGULAR

0. Saat Spermatolojik Parametreler ve DNA

Hasarı Bulguları

Çalışmada 0. saatte elde edilen ortalama spermatolojik parametreler ve DNA hasarı oranları Tablo 1' de verilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda, 0. saatte motilite, anormal spermatozoon baş, orta, kuyruk oranlarında, H+E- oranlarında ve DNA hasarında kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak bir fark olmadığı gözlemlendi (p<0,05).

24. Saat Spermatolojik Parametreler ve DNA

Hasarı Bulguları

Araştırmamızda 24. saatte elde edilen ortalama spermatolojik parametreler ve DNA hasarı oranları Tablo 2' de verilmiştir. 24. saatte elde edilen motilite, anormal spermatozoon baş, kuyruk, orta kısım, H+E- oranlarında ve DNA hasarında oranlarında kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak bir fark olmadığı belirlendi (p<0,05).

48. Saat Spermatolojik Parametreler ve DNA

Hasarı Bulguları

48. saatte elde edilen ortalama spermatolojik parametreler ve DNA hasarı oranları Tablo 3' de verilmiştir. 48. saatte elde edilen motilite ve başa bağlı anormal spermatozoa oranlarında kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülürken (P>0,05); orta kısım anormal spermatozoa oranları bakımından eugenol 1 mM gruptaki azalma kontrol göre istatistiki açıdan önemli bulundu (p<0,05). H+E- oranları

açısından kontrole göre 1 mM eugenol gurubundaki artış ve DNA hasarı açısından 1 mM eugenol gurubundaki azalma istatistiki açıdan önemli bulundu ($p < 0,05$).

Tablo 1. Çalışmada 0. saatte elde edilen ortalama ($X \pm SEM$) spermatojolojik parametreler ve DNA hasarı oranları.
Table 1. Mean ($X \pm SEM$) spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 0 hours in the study.

Grup (n=6)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı			H+E- (%)	H-E- (%)	H+E+ (%)	H-E+ (%)	DNA HASARI (AU)
		Baş (%)	Orta (%)	Kuyruk (%)					
Kontrol	83,3±2,10 ^{ab}	0,4±0,32	1,9±0,35	3,6±0,27	67,6±4,46	13,3±1,60	11,1±2,94	7,8±1,77	38,8±4,72 ^{ab}
Curcumin 0,5 mM	85,0±2,23 ^{ab}	0,4±0,15	1,8±0,24	3,4±0,50	68,5±3,65	14,0±1,65	9,2±2,67	8,3±1,45	29,5±0,61 ^{ab}
Curcumin 1 mM	86,6±2,10 ^{ab}	0,1±0,08	1,4±0,23	3,5±0,27	64,5±2,55	13,3±0,71	11,6±2,24	10,5±1,45	30,1±6,70 ^{ab}
Curcumin 2 mM	85,0±2,23 ^{ab}	0,1±0,10	1,5±0,25	3,7±0,17	60,0±3,82	14,8±1,74	15,5±4,13	9,6±1,25	31,0±5,00 ^{ab}
Eugenol 0,5 mM	81,6±1,66 ^b	0,2±0,11	1,7±0,28	3,5±0,44	67,3±3,66	15,0±2,14	10,3±2,75	7,3±1,30	30,6±4,55 ^{ab}
Eugenol 1 mM	88,3±1,66 ^a	0,3±0,16	1,4±0,20	3,2±0,28	66,6±3,29	16,6±1,68	9,6±1,87	7,5±1,52	26,3±3,50 ^b
Eugenol 2 mM	83,3±2,10 ^{ab}	0,1±0,08	2,3±0,51	4,2±0,47	59,5±3,01	16,8±1,75	13,0±1,52	10,6±1,02	42,2±5,68 ^a

a-b: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir ($p < 0,05$).

Tablo 2. Çalışmada 24. saatte elde edilen ortalama ($X \pm SEM$) spermatojolojik parametreler ve DNA hasarı oranları.
Table 2. Mean ($X \pm SEM$) spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 24 hours in the study

Gruplar (n=6)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı			H+E- (%)	H-E- (%)	H+E+ (%)	H-E+ (%)	DNA HASARI (AU))
		Baş (%)	Orta (%)	Kuyruk (%)					
Kontrol	73,3±2,11 ^{ab}	0,4±0,72	1,6±0,41	4,3±0,46 ^{ab}	61,0±4,76	16,5±0,76	10,8±2,62 ^b	11,6±2,61	69,0±5,25
Curcumin 0,5 mM	75,0±2,23 ^{ab}	0,4±0,15	1,7±0,16	3,9±0,30 ^b	57,6±3,09	18,5±1,60	10,6±2,40 ^b	13,1±1,07	48,1±4,98
Curcumin 1 mM	76,6±2,11 ^{ab}	0,1±0,08	1,7±0,50	4,4±0,69 ^{ab}	56,3±3,43	18,5±2,17	11,6±2,36 ^b	13,5±1,91	49,1±7,66
Curcumin 2 mM	71,6±1,66 ^b	0,2±0,10	2,0±0,37	5,2±0,84 ^{ab}	51,8±3,26	14,5±0,71	19,6±3,29 ^a	14,5±1,78	59,0±10,57
Eugenol 0,5 mM	73,3±2,11 ^{ab}	0,2±0,11	1,7±0,40	4,4±0,91 ^{ab}	57,5±4,20	16,8±0,98	11,8±1,53 ^b	13,8±2,67	58,0±8,79
Eugenol 1 mM	78,3±1,66 ^a	0,3±0,16	2,0±0,30	4,0±0,58 ^b	60,1±3,97	16,3±2,53	12,5±1,08 ^b	11,0±1,57	50,1±7,39
Eugenol 2 mM	73,3±2,11 ^{ab}	0,1±0,08	2,3±0,21	6,4±0,75 ^a	54,8±0,87	17,1±1,42	14,0±1,69 ^{ab}	14,0±0,73	58,8±8,70

a-b: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir ($p < 0,05$).

Tablo 3. Çalışmada 48. saatte elde edilen ortalama ($X \pm SEM$) spermatojistik parametreler ve DNA hasarı oranları
Table 3. Mean ($X \pm SEM$) spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 48 hours in the study

Gruplar (n=6)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı			H+E- (%)	H-E- (%)	H+E+ (%)	H-E+ (%)	DNA HASARI (AU)
		Baş (%)	Orta (%)	Kuyruk (%)					
Kontrol	53,3±2,10	0,5±0,13	2,6±0,52 ^{ab}	5,9±1,13	42,7±2,10 ^{bc}	17,0±1,63	23,3±2,70 ^{ab}	17,0±1,50 ^{ab}	109,3±3,48 ^a
Curcumin 0,5 mM	58,3±3,07	0,2±0,10	2,7±0,25 ^{ab}	5,3±0,73	52,3±4,16 ^{ab}	14,8±2,45	20,0±2,38 ^{ab}	12,8±1,78 ^b	87,8±4,64 ^{bc}
Curcumin 1 mM	58,3±1,67	0,4±0,15	1,7±0,28 ^b	6,2±1,13	46,1±2,83 ^{abc}	16,3±2,07	21,1±3,17 ^{ab}	16,3±1,52 ^{ab}	87,8±3,99 ^{bc}
Curcumin 2 mM	53,3±3,33	0,3±0,17	2,4±0,53 ^{ab}	6,5±1,30	41,8±4,30 ^{bc}	17,0±2,73	24,0±4,39 ^a	17,2±1,70 ^{ab}	98,3±7,10 ^{ab}
Eugenol 0,5 mM	58,3±3,07	0,2±0,10	2,2±0,42 ^{ab}	5,1±0,95	53,6±2,86 ^a	16,1±2,42	16,3±2,71 ^{ab}	13,8±2,02 ^b	87,5±4,83 ^{bc}
Eugenol 1 mM	61,6±1,67	0,3±0,17	2,3±0,30 ^{ab}	4,4±0,53	54,6±3,80 ^a	18,6±1,80	13,3±2,74 ^b	13,3±1,83 ^b	75,8±6,23 ^c
Eugenol 2 mM	55,0±3,41	0,2±0,17	3,4±0,37 ^a	6,5±0,75	41,3±2,95 ^c	16,0±1,29	23,3±3,48 ^{ab}	19,3±1,62 ^a	100,8±4,97 ^{ab}

a-c: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler istatistiki açıdan önemlidir ($p < 0.05$).

72. Saat Spermatojistik Parametreler ve DNA Hasarı Bulguları

Çalışmada 72. saatte elde edilen ortalama spermatojistik parametreler ve DNA hasarı oranları Tablo 4' de verilmiştir. 72. saatte elde edilen motilite, anormal spermatozoon baş ve kuyruk oranlarında kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak bir fark olmadığı

gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). H+E- oranları açısından kontrole göre 0.5 ve 1 mM eugenol gurubundaki artış ile DNA hasarı açısından curcumin 0.5 mM ve 1mM ile eugenol 0.5 mM ve eugenol 1 mM gruplarda elde edilen azalma kontrol ve diğer gruplara göre istatistiki açıdan önemli bulundu ($p < 0,05$).

Tablo 4. Çalışmada 72. saatte elde edilen ortalama ($X \pm SEM$) spermatojistik parametreler ve DNA hasarı oranları
Table 4. Mean ($X \pm SEM$) spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 72 hours in the study

Gruplar (n=6)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı			H+E- (%)	H-E- (%)	H+E+ (%)	H-E+ (%)	DNA HASARI (AU)
		Baş (%)	Orta (%)	Kuyruk (%)					
Kontrol	63,3±2,10	0,3±0,16	2,4±0,47 ^a	5,7±0,87 ^{ab}	49,3±3,33 ^{abc}	15,5±2,02	18,8±2,95 ^a	16,3±1,58	90,3±6,80 ^a
Curcumin 0,5 mM	65,0±2,23	0,2±0,10	1,7±0,31 ^{ab}	4,4±0,57 ^{ab}	55,1±2,53 ^{ab}	17,0±2,23	14,6±1,92 ^{ab}	13,1±2,42	73,1±5,58 ^{ab}
Curcumin 1 mM	66,6±2,11	0,2±0,11	2,2±0,48 ^{ab}	4,7±0,77 ^{ab}	53,8±3,99 ^{abc}	15,0±2,30	16,5±4,01 ^{ab}	14,6±0,98	76,3±3,41 ^{ab}
Curcumin 2 mM	63,3±3,33	0,2±0,16	2,1±0,27 ^{ab}	4,7±1,17 ^{ab}	46,6±3,40 ^{bc}	15,6±2,13	18,1±2,31 ^a	19,5±2,30	89,5±6,52 ^a
Eugenol 0,5 mM	65,0±2,24	0,2±0,10	1,9±0,15 ^{ab}	4,2±0,50 ^{ab}	53,6±1,90 ^{abc}	13,3±1,68	14,6±1,70 ^{ab}	18,3±1,66	73,6±6,14 ^{ab}
Eugenol 1 mM	68,3±1,66	0,2±0,11	1,2±0,21 ^b	3,2±0,30 ^b	58,3±3,72 ^a	17,0±1,21	10,3±1,58 ^b	15,3±1,94	63,6±4,22 ^b
Eugenol 2 mM	65,0±3,41	0,2±0,17	2,7±0,42 ^a	5,9±0,77 ^a	44,3±3,97 ^c	17,0±1,86	19,0±1,48 ^a	18,5±2,67	82,3±7,60 ^{ab}

a-c: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir ($p < 0.05$).

TARTIŞMA

Türkiye’de mevcut koyun popülasyonunun önemli bir kısmının verim düzeyinin düşük olması nedeniyle ıslah edilmesi ve verimlerinin artırılması gerekmektedir. Bunun da başlıca yolu, yüksek verimli ve sağlıklı koçların spermalarını kullanarak suni tohumlama yapmaktır. Bu amaçla spermanın saklanması da önemli bir avantaj ve kolaylık sağlayacaktır. Bu alanda en geçerli ve en uygun yöntem koç spermasının kısa ve uzun süreli saklanmasıdır. Ancak uzun süreli saklama koçlarda sığırlarda olduğu gibi başarılı biçimde ve yüksek fertilité oranlarıyla uygulanmadığı için koyunlarda henüz arzu edilen sonuçlara ulaşılamamıştır. Bunun başlıca nedenleri arasında halen koç spermatozoonlarının dondurma-çözdürme süreci içerisinde yüksek oranda ölmesi, düşük ısılarla daha duyarlı olması ve koç spermatozoon membranlarının yüksek oranda doymamış yağ asidi içermeleri nedeniyle daha kırılabilir bir yapı göstermesi sayılabilir. Bu sebeplerden dolayı koçlarda spermanın kısa süreli saklanarak kullanılmasının uygun olabileceği kanısına varılmıştır.

Spermanın kısa süreli saklanması sırasında hücreler lipid peroksidasyona maruz kalabilmekte ve bunun sonucu olarak spermatozoon motilitesinde ve membran bütünlüğünde kayıplar ve fertilité oranlarında düşmeler yaşanmaktadır (Salamon ve Maxwell, 2000). Bu tür yan etkileri, sperma sulandırıcılarına bazı antioksidanların ve lipid formlarının eklenmesi ile ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır (Lopez-Saaz ve ark. 2000, Yıldız ve Daşkın 2004, Bucak ve ark. 2007, İnanç ve ark. 2017).

Araştırmamızda 0., 24., 48. ve 72. saat bulgularına bakıldığında 0.5 ile 1 mM curcumin’in sperma sulandırıcısına ilave edilmesi sonucunda gruplardaki spermatolojik parametreler ve DNA hasarı yönünden değerlendirildiğinde spermanın kısa süreli saklanmasında etkili olabileceği belirlendi.

Ömür (2011) Merinos koçlarda yaptığı çalışmada tris bazlı sperma sulandırıcısına ilave ettiği curcuminin 1, 2 ve 4 mM’lık konsantrasyonlarda ekilibasyon sonrası motilité değerleri ve HOS test değerleri çalışmamızda bulduğumuz motilité ve HOS test değerleri ile paralellik arz ederken anormal spermatozoon oranı açısından çalışmamızda elde ettiğimiz değerlerden yüksek bulunmuştur. Bucak ve ark (2012) boğa sperma sulandırıcısına farklı antioksidanları farklı konsantrasyonlarda ilave ettikleri çalışmalarında çözüm sonrası kontrole göre curcumin içeren grubun spermatolojik parametrelere ve oksidatif stres parametrelerine olumlu yönde katkı yaptığını

bildirmektedirler. Çalışmada curcumin grubunda elde edilen anormal spermatozoon oranları ile çalışmamızda elde ettiğimiz değerler uyumlu bulunmuştur. Bucak ve ark (2010) Ankara keçisi üzerine yaptıkları çalışmalarında tris bazlı sperma sulandırıcısına curcumin (2.5, 5, 10 mM), inositol (2.5, 5, 10 mM), karnitin (2.5, 5, 10 mM) ilave etmişler ve çözüm sonrası 2.5 mM curcumin grubundan % 65 motilité elde ederek kontrol ve diğer antioksidan guruplarına göre anlamlı oranda koruma sağladığını bildirmektedir. Shah ve ark. (2017) manda sperma sulandırıcısına farklı dozlarda curcumin ilave ettikleri çalışmalarında çözüm sonu spermatolojik, CASA ve oksidatif stres parametreleri açısından 1.5 mM curcumin içeren grubun kontrole göre daha iyi bir koruyucu etkisi olduğunu bildirmektedirler. Elde edilen veriler çalışmamız ile paralel olduğu görülmektedir. Ancak DNA hasarı açısından curcumin içeren tüm grupların kontrol grubuna göre daha fazla hasar oluşturduğunu bildirmektedirler. Çalışmamızda curcumin içeren guruplar DNA hasarını azaltıcı bir etki ortaya koymuşlardır. Bu farklılık DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan yöntemden, kullanılan sulandırıcı kompozisyonundan, hayvan türünden ve çalışma metodundan meydana gelmiş olabilir.

Tvrđá ve ark (2016) boğa spermasını ferrous ascorbate – FeAA ile 6 saat inkübe ederek oksidatif stresi uyardıkları çalışmalarında medyuma ilave edilen curcuminin oksidatif stresi azalttığı ayrıca spermatolojik parametreleri de iyileştirdiğini bildirmektedirler. Oğuztürk ve ark. (2012) akut kadmiyum toksitesi oluşturdukları çalışmalarında ratlara koruyucu madde olarak curcumin verdikleri araştırmalarında curcuminin toksiteden dolayı oluşan infertiliteyi ve yan etkileri ortadan kaldırdığını bildirmektedirler. Karbalay-Doust ve Noorafshan (2011) farelerde metronidazolün terapötik ve yüksek dozunu uyguladıkları çalışmalarında spermatozoon sayısında, motilitéde ve testosteron seviyelerindeki azalmayı farelere koruyucu olarak verdikleri curcumin ile ortadan kaldırarak iyileşmenin olduğunu bildirmektedirler. Abarikwu ve ark. (2014) ratlarda gallik asit toksitesine karşı koruyucu olarak curcumin uyguladıkları çalışmalarında curcuminin reproduktif aktiviteyi, antioksidan savunma sistemini ve testiküler doku hasarını azaltarak olumlu yönde katkı yaptığını bulmuşlardır. Mathuria ve Verma (2008) aflotoksin ile indüklenen farelerde koruyucu madde olarak curcumin uyguladıkları çalışmalarında aflotoksinin spermatozoon sayısında, motilitesinde ve morfolojisinde oluşturduğu hasarı curcuminin iyileştirdiğini bildirmektedirler. Farombi ve ark. (2007) ratlarda di-n-bütiftalat ile indükleyerek oluşturdukları toksite çalışmasında koruyucu madde olarak uyguladıkları curcumin ve

kolavironun testiküler oksidatif hasarı iyileştirici etkisi olduğu bildirilmektedir.

Araştırmamızda 0., 24., 48. ve 72. saat bulgularına bakıldığında 1 mM dozunda sperma sulandırıcısına ilave edilen eugenolün gruplardaki motilite, anormal spermatozoon oranları, HOST-Eozin test oranları ve DNA hasarı yönünden değerlendirildiğinde spermanın kısa süreli saklanması etkili olacağı belirlendi. Türk ve ark (2015)'nin Japon bildircinlerinde yaptıkları çalışmada başlıca bileşenleri sinnamaldehit, benzil alkol ve eugenol olan Cinnamomum zeylanicum yağı ile yaptıkları çalışmada sıcaklık stresi kaynaklı lipid peroksidasyon hasarına karşı testis dokusunu koruduğunu bildirmişlerdir. Yapılan literatür taramasında, Türk ve ark.'larının (2015) yaptıkları çalışma dışında; sperma veya başka bir hücre hasarı ile ilgili her hangi bir literatüre rastlanmadı.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada koç spermanın kısa süreli saklanması spermaya katılan farklı dozlardaki curcuminin 0.5 mM ile 1 mM ve eugenolün 1 mM lik gruplarının spermatozoon motilitesi, anormal spermatozoon oranları, HOST-Eozin test oranları ve DNA hasarı yönünden kontrol grubu ve diğer gruplara göre en iyi korumayı sağladığı görüldü. Literatür taramalarında söz konusu antioksidanlardan eugenol ile ilgili spermatolojik parametrelere dair verilere rastlanmadığından konuyla ilgili hem koç spermasının hem de diğer hayvan türlerine ait spermalar üzerine çalışmaların yapılmasına gerek duyulmaktadır. Ayrıca, eugenol'ün koç sperması üzerine etkileri ile yapılan ilk çalışma olması da araştırmaya orijinallik katmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abarikwu SO, Akiri OF, Durojaiye MA, Alabi AF.** Combined administration of curcumin and gallic acid inhibits gallic acid-induced suppression of steroidogenesis, sperm output, antioxidant defenses and inflammatory responsive genes. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 2014; 143: 49–60.
- Ahsan H, Parveen N, Khan N, Hadi SM.** Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Chemico-Biological Interactions.* 1999; 121(2): 161-175.
- Atsumi T, Fujisawa S, Tonosaki KA.** comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations

and oxidation conditions. *Toxicology in Vitro.* 2005; 19: 1025–1033.

- Bucak MN, Başpınar N, Tuncer PB, Çoyan K, Sarıözkan S, Akalın PP, Büyükleblebici S, Küçükğünay S.** Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen-thawed bovine semen. *Andrologia.* 2012; 44:102–109.
- Bucak MN, Tekin N, Kulaksız R.** Koç spermasının kısa süreli saklanması antioksidanların etkisi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi.* 2007; 47: 15-21.
- Bucak MN, Sarıözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A, Kulaksız R, Çevik M.** The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research.* 2010; 89: 24-30.
- Cupps PT.** *Reproduction in Domestic Animals.* 4th ed. Academic Press, 1991; San Diego, CA.
- Farombi EO, Abarikwu SO, Adedara IA, Oyeyemi MO.** Curcumin and Kolaviron Ameliorate Di-n-Butylphthalate-Induced Testicular Damage in Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology,* 2007; 100: 43–48.
- Gupta A, Vij G, Sharma S, Tirekey N, Rishi P, Chopra K.** Curcumin, a polyphenolic antioxidant, attenuates chronic fatigue syndrome In murine water immersion stress model. *Immunobiology.* 2009; 214(1): 33-39.
- Gündoğan, M., Yeni, D., Avdatek, F., Fidan, A.F.** Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 122: 200-207.
- 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, Öztürk C, Ömür AD.** Positive effects of trehalose and cysteine on ram semen parameters. *Veterinari Medicina.* 2017; 62: 245-252.
- Huo LJ, Yue KZ, Yang ZM.** Characterization of viability, mitochondrial activity, acrosomal integrity and capacitation status in boar sperm during in vitro storage at different ambient temperatures. *Reprod Fert Develop.* 2002; 14: 509–514.

- Ito M, Murakami K, Yoshino M.** Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food and Chemical Toxicology* 2005; 43: 461–466.
- İnanç ME, Tekin K, Olğaç KT, Özen D, Stelletta C, Uysal O, Daşkın A.** Effect of 7-dehydrocholesterol and cholesterol-loaded cyclodextrins on bull sperm motility during short term storage. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2017; 23(4): 661-664.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC.** Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* 2000; 62: 143–172.
- Karbalay-Doust S, Noorafshan A.** Ameliorative Effects of Curcumin on the Spermatozoon Tail Length, Count, Motility and Testosterone Serum Level in Metronidazole-treated Mice. *Prague Medical Report.* 2011; 112(4):288–297.
- Koo JY, Kim HJ, Jung KO, Park KY.** Curcumin inhibits the growth of AGS human gastric carcinoma cells in vitro and shows synergism with 5-fluorouracil. *J Med Food.* 2004;7: 117-121.
- Lopez-Saaz A, Ortiz N, Gallego L, Garde JJ.** Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. *Arch. Androl.* 2000; 44: 155-164.
- Mathuria N, Verma RJ.** Curcumin ameliorates aflatoxin-induced toxicity in mice spermatozoa. *Fertility and Sterility.* 2008; 90(3): 775-779.
- Maxwell WMC, Salamon S.** Liquid storage of ram semen. *Reprod. Fertil. Dev.* 1993; 5: 613-638.
- Maxwell WMC, Stojanov T.** Liquid storage of ram semen in the absence of some antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996; 8: 1013-1020.
- Nagababu E, Rifkind JM, Sesikeran B, Lakshmaiah N.** Assessment of Antioxidant Activities of Eugenol by in vitro and in vivo Methods. *Methods Mol Biol.* 2010; 610: 165–180.
- Oğuztürk H, Çiftçi O, Aydın M, Timurkaan N, Beytur A, Yılmaz F.** Ameliorative effects of curcumin against acute cadmium toxicity on male reproductive system in rats. *Andrologia.* 2012; 44: 243-249.
- Ostling O, Johanson KJ.** Microelectrophoretic Study Of Radiation-Induced DNA Damage In Individual Mammalian Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 123: 291–298.
- Ömür AD.** Sezon İçi ve Sezon Dışında Koç Spermasının Dondurulmasında Antioksidanların Etkisi. Doktora Tezi, Selçuk Ü. Sağ. Bil. Enst., Konya, 2011.
- Reddy AC, Lokesh BR.** Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 1994; 137(1): 1-8.
- Salamon S, Maxwell WMC.** Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 62(1-3): 77-111.
- Shah SA, H., Andrabi S, MH, Qureshi IZ.** Freezability of water buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa is improved with the addition of curcumin (diferuoyl methane) in semen extender. *Andrologia.* 2017; 498:1-10.
- Sharma RA, Ireson CR, Verschoyle RD et al.** Effect of dietary curcumin on glutathione S-transferase and malondialdehyde-DNA adducts in rats liver and colon mucosa. *Clin Cancer Res.* 2001; 7: 1452-1458.
- Singh NP, Muller CH, Berger RE.** Effects of Age on DNA Double-Strand Breaks and Apoptosis in Human Sperm. *Fertil. Steril.* 2003; 80(6): 1420-1430.
- Türk G, Şimşek ÜG, Çeribaşı AO, Çeribaşı S, Kaya SÖ, Güvenç M, Çiftçi M, Sönmez M, Yüce A, Bayrakdar A, Yaman M, Tonbak F.** Effect of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark oil on heat stress-induced changes in sperm production, testicular lipid peroxidation, testicular apoptosis, and androgenic receptor density in developing Japanese quails. *Theriogenology.* 2015; 84: 365–376.
- Tvrđá E, Tušimová E, Kováčik A, Paál D, Greifová H, Abdramanov A, Lukáč N.** Curcumin has protective and antioxidant properties on bull spermatozoa subjected to induced oxidative stress. *Animal Reproduction Science.* 2016; 172:10-20.
- Watson PF.** Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Veterinary Record.* 1975; 97(1): 12-15.
- Yıldız S, Daşkın A.** Koç spermasının farklı antioksidanlar içeren sulandırıcılarla kısa süreli saklanması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2004; 10: 155-159.