

**MALAKLI KÖPEĞİ SPERMASININ DONDURULABİLİRLİĞİ
ÜZERİNE KARNOSİK ASİTİN ETKİSİ**

HULUSİ ŞAHİN

**DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. DENİZ YENİ

Tez No: 2019 -027

2019-AFYONKARAHİSAR

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MALAKLI KÖPEĞİ SPERMASININ DONDURULABİLİRLİĞİ
ÜZERİNE KARNOSİK ASİTİN ETKİSİ**

Veteriner Hekim Hulusi ŞAHİN

**DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman
Doç.Dr. Deniz YENİ**

Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 15.SAĞ.BİL.03 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2019-027

2019-Afyonkarahisar

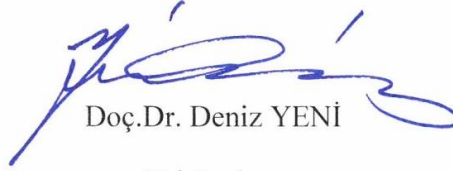
KABUL VE ONAY

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA (VET) PROGRAMI

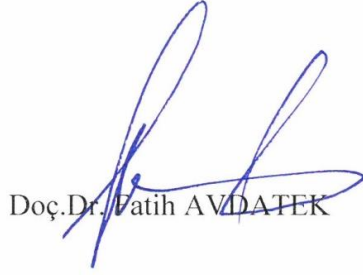
Çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:..19.06.2019



Doç.Dr. Deniz YENİ

Jüri Başkanı



Doç.Dr. Fatih AVDATEK

Üye



Dr. Öğretim Üyesi Şükrü GÜNGÖR

Üye

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Hulusi ŞAHİN'in "Malaklı Köpeğı Spermasının Dondurulabilirliğı Üzerine Karnosik Asitin Etkisi" başlıklı tezi/....../2019 günü saat Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğı'nin ilgili maddeleri uyarınca değlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Esma KOZAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Anadolu coğrafyası, binlerce yıllık insanlık tarihi boyunca gerek medeniyetlerin doğduğu topraklar gerekse bir geçit bölgesi olarak çeşitli medeniyetlerin izlerine sahip olmuştur ve bu yönü ile evcil hayvan genetik kaynakları yönünden son derece zengin bir bölgedir. Bu gen havuzu içinde Anadoluya özgü köpek ırkları da dikkat çekmektedir. Türkiye’de yaklaşık on yerli köpek ırkı mevcuttur. Bu köpek ırklarından üç tanesi çoban köpeğidir (Kangal, Akbaş, Kars). Bu çoban köpeklerinden Kangal ve Akbaş ırkları koyun yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı İç Anadolu Bölgesi illerinde yetiştirilmektedir. İç Anadolu Bölgesinde yetiştirilen bir diğer çoban köpeği de “Aksaray Malaklısı” veya “Malaklı Karabaş” adı verilen ve genel olarak Aksaray yöresinde yetiştirilen bir çoban köpeğidir.

Lokal ırkların ıslahı ve nesillerinin devamında spermalarının dondurulması önemli yer olmaktadır. Köpek spermasının dondurulmasına ait ilk çalışma 1954 yılında Rowson tarafından bildirilmektedir. Daha sonra bu alanda, günümüze kadar birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda başarılı bir kriyopreservasyon işlemi için spermaya antioksidan madde ilavesinin dondurma başarısını artırdığı ortaya konmuştur.

Sunulan tez çalışmasında, Malaklı köpeği spermasının dondurulmasında karnosik asitin etkinliğinin dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik parametreler üzerine etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Tez çalışmamın her aşamasında yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Danışmanım Doç. Dr. Deniz YENİ başta olmak üzere, tez projemde desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Fatih AVDATEK’e, Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Mustafa GÜNDÖĞAN’a ve hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu dönemde de bana destek olan eşim ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	iii
ÖNSÖZ	i
Çizelgeler	iv
Şekiller	v
Resimler	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
1.GİRİŞ	1
1.1. Malaklı Köpeği.....	1
1.2. Köpek Spermasının Spermatolojik Özellikleri.....	3
1.3. Spermanın Morfolojik Yapısı.....	4
1.4. Ejakulat Miktarı.....	4
1.5. Spermatozoa Motilitesi.....	4
1.6. Spermanın Saklanması	6
1.6.1. Spermanın Sulandırılması.....	6
1.6.2. Spermanın Kısa Süreli Saklanması.....	7
1.6.3. Spermanın Uzun Süre Saklanması.....	8
1.7. Spermanın Çözdürülmesi	10
1.8. Serbest Radikallerin Dondurma Üzerine Etkisi	10
1.8.1. Antioksidanların Oksidatif Stres Üzerine Etkileri	11
1.8.2. Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	11
1.8.3. Karnosik asit	12
2.GEREÇ ve YÖNTEM.....	14
2.1. Gereç	14
2.2 Yöntem	14
2.2.1. Spermanın Alınması	14
2.2.2. Sperma Sulandırıcısının Hazırlanması.....	15
2.2.3. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması	15
2.2.4. Çözüm Sonu Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi.....	16
2.3. İstatistiksel Analiz	17

3.BULGULAR	18
3.1. Dondurma-Çözdürme Sonrası Motilite Bulguları	18
3.2. Dondurma-Çözdürme Sonrası Anormal Spermatozoon Oranları	18
3.3. Dondurma-Çözdürme Sonrası HE-test parametreleri	19
4.TARTIŞMA	21
5. SONUÇ	25
ÖZET.....	26
SUMMARY	27
KAYNAKLAR	28



Çizelgeler

Çizelge 1. Malaklı Çoban Köpeklerinde Bazı Spermatolojik Muayene Bulguları	3
Çizelge 2. Dondurma-çözdürme sonrası motilite değerleri ($X \pm SEM$, n:6).	18
Çizelge 3. Dondurma-çözdürme sonrası anormal spermatozoon oranları ($X \pm SEM$, n:6).	19
Çizelge 4. Dondurma-çözdürme sonrası HE-test parametreleri ($X \pm SEM$, n:6).	20



Şekiller

Şekil 1. Biberiyede karnosik asitin kimyasal yapısı.....	12
--	----



Resimler

Resim 1. Çalışmada Hayvan materali olarak Kullanılan Malaklı Köpeklerinden	2
--	---



SİMGELER VE KISALTMALAR

AKÜHADYEK	Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
CA	Karnosik asit
CASA	Bgisayar destekli sperma analiz cihazı
H-E test	Hipoozmotik şişme eozin testi
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LPO	Lipit peroksidasyon
°C	Santigrat derece
RA	Rosmarinik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
S.E.M.	Standart hata
µM	Mikromol
µm	Mikrometre
mM	Milimolar
%	Yüzde
<	Küçüktür
>	Büyüktür
±	Artı-eksi

1.GİRİŞ

Köpek (*Canis lupus familiaris*); köpekgiller (Canidae) familyasından olup görünüş ve büyüklükleri birbirinden farklı yaklaşık 400'den fazla ırkı olan, etçil ve memeli bir hayvandır. Köpekler Boz kurdun (*C.lupus*) alt türlerinden biri olan tilki ve çakal ile de akrabadır. Kediler ve köpekler birlikte dünya coğrafyasının tamamına yayılmış en çok beslenen iki evcil hayvan türüdür. Tahminlere göre 2001 yılında dünyada 400 milyondan fazla köpek vardır. Yaklaşık 12 bin yıldan daha uzun bir süreden beri köpekler insanoğlunun av partneri, koruyucusu ve arkadaşı olmuştur. Değişik ihtiyaçlara göre farklı köpek türlerinin evrimleşmesinde insanoğlunun önemli rolü olmuştur. İlk köpekler keskin görme ve koku duyusuna sahip avcı köpekleriydi. İnsanlar, ilk tanışmalarından bu yana köpeklerin çeşitli yararlı özelliklerini genetik mühendisliğin konvansiyonel formlarıyla ön plana çıkartmış ve farklı köpek türlerinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Örneğin, 7-9 bin yıl önce çiftlik hayvanları evcilleştirildiğinde çobanlık yapmaya başlayan köpekler bu yönde seçilime uğramıştır (Coppinger, 2001).

1.1. Malaklı Köpeği

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. Sunulan bazı çalışmalarda Karabaş Malaklı köpekleri Kangal ırkına göre daha iri yapılı, kısa tüylü, kuyruğun ise Kangal köpeğine göre daha az kıvrık olduğu, insan ve diğer köpeklere karşı daha saldırgan olduğu gözlenmiştir (Atasoy, 2011). Malaklı köpeklerinde kafa büyüklüğü ve ağız

yapısı, dudak sarkıklıkları ve daha az kıvrık kuyrukları ile Kangal ırkından morfolojik olarak ayrıldığı görülmektedir (Atasoy, 2005). Malaklı canlı ağırlığı 50-150 kg arası değişen ve daha çok Aksaray bölgesine özgün bir koruma ve çoban köpeğidir. Renkleri çoğunlukla boz karabaş ve sarı karabaştır, ancak akbaş ve ala renkte olan Malaklılar da mevcuttur. Vücutları çok kalındır bu yüzden dışarıdan bakıldığında hantal ve tembel gibi dururlar, ancak gerçekte çok seri ve hızlı köpeklerdir. Üreme özellikleri henüz ırka spesifik olarak ortaya koyulmamasına rağmen, Anadolu'ya has diğer bir ırk olan Kangal çoban köpeklerine benzemektedir ve dişileri ortalama olarak 7-8 aylık olduklarında, erkekler ise çoğunlukla dişilerden 2 ay sonra 9-12 aylık iken cinsel olgunluğa (Puberta) ulaşırlar ve 1 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) (Resim 1). Türkiye'nin yerel bir ırkı olarak Aksaray Malaklısının korunması ve yetiştiriciliğinin yaygınlaştırılması gerekmektedir.



Resim 1. Çalışmada Hayvan matereali olarak Kullanılan Malaklı Köpeklerinden

1.2. Köpek Spermasının Spermatolojik Özellikleri

Erkek hayvanların damızlık değerinin belirlenmesinde ve yetiştiriciliğinde sperma muayenesi ve değerlendirilmesi önemlidir. Spermatolojik özelliklerden herhangi birinde meydana gelen olumsuzluk fertilizasyonu doğrudan etkilemekte ve diğer verim özellikleri yönünden olumlu görülen damızlık değerlerini kaybetmektedir. Özellikle erkek damızlıkların değerlendirildiği suni tohumlama uygulamalarında spermatolojik özellikler erkek hayvanların dölleme yeteneklerini (potentia generandi) ortaya koyan önemli bir kriterdir (Tekin,1994). Malaklı köpeklerinde ırka ait spermatolojik parametrelerin araştırıldığı bir çalışmada Malaklı ırkı köpeklerde ortalama spermatolojik değerler ortaya konulmuştur (İnanç, 2018) (Çizelge 1).

Çizelge 1.Malaklı Çoban Köpeklerinde Bazı Spermatolojik Muayene Bulguları (İnanç, 2018)

Ejakulat miktarı (ml)	Motilite (%)	Yoğunluk ($\times 10^6/\text{ml}$)	Anormal Spermatozoa oranı (%)
2,2	82,4	320,7	20,51

Pek çok hayvan türünde geliştirilen sperma alma ve muayene yöntemleriyle erkek hayvanların fertilite kontrolü büyük ölçüde yapılabilmektedir. Erkek köpeklerden sperma almak için kullanılan en etkili yöntem el yardımı ile masaj yöntemidir (Akçay 2000).

1.3. Spermanın Morfolojik Yapısı

Memeli spermatozoası baş, boyun ve kuyruk olarak üç bölümden oluşmaktadır. Uzunluğu ise türlere göre değişkenlik göstermektedir. Köpek spermatozoasının ortalama uzunlukları, baş kısmı 6.49-7.06 μm kuyruk kısmı 53.5 μm ve total uzunluk olarak ise 60-70 μm olarak bildirilmiştir (Pesch ve Bergmann, 2006).

1.4. Ejakulat Miktarı

Bir ejakulasyonla dışarı atılan, spermatozoa ve eklenti bezlerinin salgılarından oluşan sıvının tamamının hacmidir ve ml olarak belirlenir.

Köpekler, diğer evcil hayvan türlerinden farklı olarak, ön sekret, sperma ve son sekret olmak üzere 3 fazda sperma vermektedirler. Birinci faz seminal sıvıdan, üçüncü fazın ise prostat sıvısından zengin olduğu bildirilmiştir. Sperma ise ejakulasyonun ikinci fazında verilmektedir (England ve ark. 1990).

1.5. Spermatozoa Motilitesi

Motilite, spermatozoonun başı yönünde ileri doğru düzgün doğrusal hareket eden spermatozoonların tüm spermatozoonlara oranı olarak tanımlanır ve % olarak ifade edilir. Motilite muayenesinin, sperma alınmasından hemen sonra çevre şartlarından etkilenmeden yapılması gerekmektedir (Akçay 2000).

İlk olarak 1979' da Dott ve Foster'ın bilgisayar destekli bir yazılımla motilite tayinini yapmasının ardından artık günümüzde kullanılan mevcut bilgisayar teknolojileri ve halen geliştirilmeye devam eden yazılımlar sayesinde birçok spermatolojik özelliklerin belirlenmesi daha hızlı ve hassas bir şekilde yapılabilmektedir. Bilgisayar destekli sperma analiz sistemleri, periyodik olarak hareket eden sperma hücrelerinin zaman ayarlı olarak fotoğraflanıp bilgisayar yazılımı sayesinde analiz edilmesi prensibiyle çalışmaktadır. Farklı hayvan türlerine göre spermatolojik özelliklerin değerlendirilmesi amacıyla bilgisayar destekli sperm analiz cihazları (CASA), cihazın çalışma metodunun güvenilirliği ve objektifliği sayesinde günümüzde artan biçimde tercih edilen bir teknik olarak kullanılmaktadır. (Foote 2003).

İnanç ve ark. (2018), Malaklı köpeklerinde ortalama spermatozoa motilitesini $\% 82.4 \pm 10.3$, olarak bildirmişlerdir (İnanç, 2018).

İnanç ve ark. (2018), farklı yaş grubu Malaklı köpeklerinde yaptıkları çalışmalarında genç hayvanlarda $\leq 3 \%$ 85.7 ± 5 ; orta yaşlılarda $4-6 \%$ 80.8 ± 10.4 ; ve yaşlı hayvanlarda $\geq 7 \%$ 79.8 ± 14.8 motilite değerlerini olarak bildirmişlerdir.

Akçay ve Tekin (2002), Kangal ırkı köpeklerde yaptıkları çalışmada ortalama motilite değerini $\% 74,54 \pm 1,21$ olarak bildirmişlerdir.

Smith (1989), köpek ejakulatında kabul edilebilir spermatozoa motilitesinin $\% 80$ olması gerektiğini, Stockner (1991) ise $\% 50$ den daha düşük motiliteye sahip spermanın kötü olarak değerlendirilmesi gerektiğini öne sürmüşlerdir.

1.6. Spermanın Saklanması

1.6.1. Spermanın Sulandırılması

Başarılı bir kriyopreservasyon işleminde temel noktalar olarak pH ve iyonik yapının devamlılığının ve enerji kaynağının sağlanması, osmolarite, donma sırasında oluşacak soğuk şoku hasarların azaltılması olarak bildirilmektedir (Hammerstedt ve ark 1990, England 1993). Spermatozoada meydana gelen metabolik aktivite hidrojen iyonlarının açığa çıkmasına sebep olur. Bu iyonlarında sulandırıcının pH'sının düşmesine ve dolayısıyla motilite ve fertilite azalmasına neden olmaktadır. Bu sebeple tampon nitelikli sıvıların sperma sulandırıcılarında kullanılması zorunlu hale geldiği belirtilmektedir (England 1993). Köpek spermasının sulandırılması amacıyla ilk yapılan çalışmalarda krebs-ringer-fosfat tampon sulandırıcıları kullanılmış, daha sonra Seager ve ark (1975), %11 laktoz içeren sulandırıcı ile başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Günümüzde dipolar iyon (zwitterionic) tampon sulandırıcıları spermanın sulandırılmasında kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan en önemlisi tris-sitrik asit-fruktoz- yumurta sarısı sulandırıcısı olup, modifiye edilmiş farklı içerikleri ile birçok araştırmada kullanılmaktadır (Woods ve ark 2000, Tosun ve Uysal 2007, Stanescu ve Birtoiu 2010).

Memeli spermasında pH nötre yakındır. Buna göre sulandırıcıların pH'sı genellikle 6,9-7,1 arasında olmaktadır. Köpeklerde spermatozoon bulunan ana sekretin pH'sı $6,27 \pm 0,3$ dür. Motilite oranı yüksek olan spermatozoonlarda ejakulat pH değerinin 7'nin üzerinde olduğu ifade edilmektedir (England 1993). Sulandırıcılara katılan yumurta sarısının fosfolipit yapısında olup, spermatozoayı soğuk şokundan koruduğu ve sulandırıcılara katılması gerektiği bildirilmiştir (Medeiros ve ark 2002). Dondurma sürecinde yumurta sarısında bulunan düşük yoğunluklu lipidler (LDL) yumurta sarısının jelatinleşmesini sağlar. Yumurta sarısının koruyucu kısımlarının fosfolipitler (lesitin) ve LDL olduğunu bildirilmektedir. LDL spermatozoon

membranını sararak dondurma-çözdürme sırasında spermatozoonun zarar görmesini engellemeye çalışmaktadır (Medeiros ve ark 2002, Purdy 2006). Yumurta sarısı sulandırıcı içerisinde türlere göre farklı olmakla birlikte genellikle % 3-25 oranlarında kullanılmaktadır. Yumurta sarısının kriyoprotektan özelliği tam olarak bilinmemekle birlikte, spermatozoonun soğutulması esnasından spermatozoon membranına yapışarak membran bütünlüğünün bozulmasını engelleyici etki gösterdiği düşünülmektedir (Akçay 2000).

Sulandırıcılarda spermatozoonların enerji gereksinimlerini sağlamak adına eksojen olarak şekerlerden faydalanılmaktadır. Glikolizis etkinliğinden dolayı spermatozoa için glukoz, fruktoz ve mannoz enerji kaynağı olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Bu nedenle sulandırıcılara glukoz ve fruktoz eklenmektedir (Silva ve ark 2001).

1.6.2. Spermanın Kısa Süreli Saklanması

Bu teknik, birkaç gün içinde spermanın kullanılması durumunda uygulanmaktadır. İn vitro spermatolojik parametre incelemeleri yapılmış olan spermanın uygun teknik ve yöntemlerle sulandırıldıktan sonra 35°C'deki su dolu bir kap içerisine yerleştirilip genellikle 2-3 saatlik bir sürede buzdolabında sıcaklığın 5°C'ye düşürülmesi esasına dayanır. Bu yöntemle saklanan spermalarla köpeklerde 24 saate kadar kullanılması mümkündür. Kısa süreli saklanması için, tris yumurta sarısı sulandırıcısı ve sodyum sitrat-yumurta sarısı sulandırıcısı genel olarak kullanılmaktadır (Sönmez, 2008).

1.6.3. Spermanın Uzun Süre Saklanması

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 gliserolü bulması ile başlamıştır ve ilk dondurulan hücrenin de spermatozoon olduğu bilinmektedir (Leibo ve Brandley, 1999).

1.6.3.1.Spermanın Dondurulması

Hücre dondurulması sırasında, su kristalleşir. Hücre dışında oluşan buz kristalleri, beraberinde tuz bileşiklerinin donmamış kısımda yoğun hale gelmesine ve ozmotik basıncın artmasına sebep olur. Buz kristalleri, hücre zarının dışında bulunduğu için bu aşamada hücreye ulaşamazlar. Hücrenin iç ortamı da soğumaya maruz kalır. Hücre içinde bulunan bir kısım su, ozmoz aracılığı ile hücre dışına kayarak su kaybına neden olur ve hücrenin iç ortam yoğunluğu da artmış olur. Hücre içi ve hücre dışı tuz derecesi belirli seviyeye gelince (oda ortamında 0,8 M), hücre zarındaki katyon kanalları açılarak, yıkılan potasyum-klor köprüsünden potasyum hücre dışına çıkar. Ortamdaki sodyum ise hücre içine doğru yönelir. Çözüm sırasında da hücre zarındaki katyon kanalları kapanır, hücre içi tuz seviyesi düşer, hücre içinde proteinlerle bağlı haldeki potasyum-klor köprüleri tekrar meydana gelir. Bu değişiklik hücre içine suyu geri alır ve hücre tekrar ozmotik olarak şişer (Schuster,

2003; Yavaş Korkmaz, 2009). Günümüzde en çok payet yöntemiyle dondurma prosedürü tercih edilmektedir. Sulandırılan sperma, 4°C’de ekilibrasyona (1,5-4 saat) bırakılmasının ardından, payetlerde doldurulmaktadır. Normal şartlarda, payetler yatay olarak sıvı azotun 4-5 cm üzerinde, sıvı azot buharında 10 dakika tutulur ve bu sürenin sonunda sıvı azota atılır. Payetlerin sıvı azot seviyesinden uzaklığı, donma hızı ve payet hacimlerine göre değişiklik gösterebilir (Kulaksız, 2009). Bunun yanı sıra, programlanabilen dondurma cihazlarının kullanılması ile spermanın sıcaklığını belli aralıklarda düşürmek suretiyle dondurma işlemleri yapılmaktadır. Bu yöntemde sırasıyla üç safhada +4 °C/ -5°C 4°/dakika, -5°C/-110°C 25°/dakika,-110°C/-140°C 35°/dakika toplamda 7 dakikada gerçekleştirilmektedir (Purdy, 2006).

1.6.3.2. Gliserol

Gliserol yüksek oranda hidrofilik yapıda bir poliol bileşiğidir. Gliserol hücre içi su ile hücre sitoplazması arasına girerek hücre içi kristalizasyonu önlemektedir (Vidament ve ark 1997). Gliserolün karbon atomu ile hidroksil grubu oranının eşit olması ve bunun yanında liyofilik/hidrofilik özelliği dolayısıyla spermanın dondurulması esnasında soğuktan koruma etkinliğini artırmaktadır (Storey ve ark. 1998). Gliserolün farklı konsantrasyonları spermanın dondurulmasında denenmiş ve düşük konsantrasyonlarda kullanımı kriyoprotektan etkinliğinin daha iyi ortaya çıkmasını sağlamıştır (Cochran ve ark 1984, Cristanelli ve ark 1985). Hücrelerde gliserolün toksik etkisi, membran biyoenerji dengesinde değişikliğe ve ozmotik strese ve sonucunda da protein denatürasyonu ve membran hasarına yol açmaktadır (Hammerstedt ve Graham 1992, Alvarenga ve ark 2000, Woods ve ark 2000).

Gliserol köpek spermasının dondurulmasında en yaygın kullanılan kriyoprotektan olduğu bildirilmektedir (Rota ve ark 2006). Köpeklerde dondurulmuş sperma ile yapılan ilk suni tohumlama uygulamalarında gliserol % 8 oranında kullanılmıştır. Sonraki çalışmalarda farklı gliserol oranı içeren sulandırıcılarla dondurulan köpek

spermalarının çözüm sonu verilerine göre optimum gliserol oranının % 2-8 arasında olması gerektiği kanısına varılmıştır (Cardoso ve ark 2003, Silva ve ark 2003, Pena 2004).

1.7. Spermanın Çözdürülmesi

Spermanın çözdürülmesi dondurulması kadar önemlidir. Sperma -196 °C'ye dondurulup saklanması ardından çözdürülme safhasına kadar yaşamını devam ettirir. Fakat, çözdürülme sırasında kritik sıcaklık derecelerini geçmesi gerekmektedir (-15/-60 °C). Hızlı çözdürme metodu kristalizasyonu engellediği için tercih edilen bir yöntemdir. Payet yöntemi ile dondurulan köpek spermalarının çözdürülmesinde birçok araştırmacı 38-42°C'de spermayı çözdürmektedir.

Yukarıda da belirtildiği gibi, çözdürme sonrası en iyi in vivo başarıyı yakalamak için, çeşitli çözdürme sıcaklıkları ve süreleri bildirilmektedir. Saha koşulları göz önüne alındığında suni tohumlamalarda kullanılacak spermanın 37 °C'de 30 saniyede çözdürülmesi en uygun yöntem olacaktır (Tekin, 1994).

1.8. Serbest Radikallerin Dondurma Üzerine Etkisi

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 ne zaman düşük konsantrasyonda bulunursa normal spermatozoon fonksiyonları için aralucu gibi davranırken ne zamanki üretimi gerekenden daha fazla olursa o zaman hücreler için toksik hale gelmektedir (Griveau ve Le Lannou, 1997).

Dondurma süresince meydana gelen ozmotik stres ve soğuk şoku ile LPO lipid peroksidasyon (LPO) nedeniyle zamanından önce oluşan kapasitasyon dondurma-çözdürme sonrası spermatozoonların motilitesi ile membran bütünlüğünü azaltabilmektedir (Salamon ve Maxwell, 2000; Watson, 2000).

1.8.1. Antioksidanların Oksidatif Stres Üzerine Etkileri

Organizmada bulunan birçok savunma mekanizması sayesinde serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve meydana getirdikleri hasarın önlenebileceğini, 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 karşı korunması olmuştur. Bunun neticesinde, başlangıçta antioksidanlar LPO’u engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Bu gün 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).

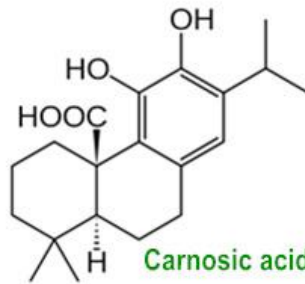
1.8.2. Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.)

Biberiye, Akdeniz bölgesinde yaygın olarak dağılan aromatik özellikte yaprak dökmeyen bir çalı bitkisidir ve iyi bilinen güçlü bir antioksidan, antibakteriyel ve antimutajenik özellikleri için yüzyıllardır şifalı bitki olarak büyük önem kazanmıştır.

Biberiyenin güçlü antioksidan aktivitesinden sorumlu olan en önemli biyolojik özellikler, içerdiği sayısız diterpen bileşeni, yani, karnosik asit (CA), karnosol ve rosmarinik asittir (RA) (Zanganeh ve ark., 2013).

1.8.3. Karnosik asit

Karnosik asitin (CA) kimyasal yapısı bir abietan diterpendir. CA yağ peroksidasyonuna karşı güçlü bir inhibitördür. Antioksidan aktivitesinin dışında antimikrobiyal, antiviral, antimutajenik ve antikansojenik aktiveye de sahiptir (Şekil 1). Dondurma ve çözme süreci, spermatozoon membranında hasara neden olan, canlılığı ve fertilite kabiliyetini etkileyen fiziksel ve kimyasal stres oluşturur. (Alvarez, 1992). Her iki hasar da aşırı miktarda reaktif oksijen türleri (ROS) ve membrandaki fosfolipitlerin peroksidasyonu ile ilişkilidir (Chatterjee, 2001). Pro ve anti-oksidanlar spermatozoon ortamında dengeli olarak bulunmaktadır. Normal spermatozoon fonksiyonunda ROS'un önemli bir rolünün, fertiliteyi kazanma ve kromatin yoğunlaşmasına, membranın yeniden modellenmesine ve hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna katkıda bulunabilme yeteneği olduğu bildirilmiştir (Kodama, 1996, Lamirande, 1997).



Şekil 1. Biberiyede karnosik asitin kimyasal yapısı

Biberiye ekstraktı ve polifenoller CA ve RA son zamanlarda keşfedilmiş ve güçlü antikanser etkiler gösterdiği belirlenmiştir (González-Vallinas, 2015, Petiwala, 2015). Biberiye ekstraktında bulunan polifenollerin ve biyoaktif bileşiklerin

seviyelerinin, bitki yetiştirme koşulları (toprak, iklim, strese maruz kalma) gibi birçok faktör tarafından etkilenebileceğine dikkat edilmelidir. Ek olarak, ekstraksiyon metodu ve biberiye ekstraktının depolanması potansiyelini etkileyebilir. Su, metanol, etanol süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu, farklı çalışmalarda kullanılan metotlardır ve metanol (alkolik-solvent) ekstraksiyonunun biberiye ekstresi ile daha yüksek etkiye yol açabileceğini düşündürmektedir. Son yıllarda, sıklıkla kanserde mutasyona uğramış spesifik yolları modüle edebilecek yeni hedefe yönelik kanser tedavileri kurmaya odaklanılmıştır. Biberiye ekstresi ve onun polifenoller CA ve RA, apoptosisin indüksiyonuna ve azalmış hücre sağ kalımına yol açan spesifik yolları hedeflemek için kimyasal maddeler olarak kullanılabilir. Ek olarak, biberiye ekstresi, CA ve RA, mevcut kemoterapötiklerin antikanser etkilerini artırmak için nutrasötik olarak kullanılabilir. Bu, daha düşük dozların kullanılmasına ve sağlıklı çevre dokuda daha az toksisiteye neden olabilir. Biberiye ekstresi, CA ve RA tarafından hedeflenen sinyal molekülleri ve yollarını inceleyen çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, mevcut çalışmalar bu bileşiklerin hem kendi başlarına hem de diğer kanser terapileri ile birlikte kullanılmasına yönelik destekleyici kanıtlar sağlamaktadır b(Jessy Moore, 2016).

Bir grup araştırmacı (Frankel ve ark., 1996; Munne-Bosch ve ark., 2000; Wu ve ark., 2004) tarafından ise buhar distilasyonu ile elde edilen biberiye uçucu yağında güçlü antioksidan etkiye sahip rosmarik asit, karnosik asit ve rosmanol gibi fenolik bileşiklerin bulunmadığı bildirilmektedir(Frankel, 1996 Munne-Bosch, 2000 Wu, 2004).

Yapılan bu tez çalışması Malaklı Köpeklerinin spermalarının dondurularak saklanması esnasında sperma sulandırıcılarına katılacak olan biberiye ekstraktının (Karnosik asitin) dondurma-çözdürme sonrası motilite, anormal spermatozoon oranı ve Hipoozmotik şişme eozin test (H-E test) üzerine etkileri, çözdürme sonrası meydana gelebilecek hasarların en aza indirilmesinde karnosik asitin etkinliğinin belirlenmesi ile mevcut dondurma metodunun geliştirilmesine katkı sağlanması hedeflenmektedir.

2.GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

Araştırma Afyonkarahisar’da 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 Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’ndan gerekli izin (AKÜHADYЕК-456-l5-Referans no’lu araştırma) alındı ve 3-5 yaşlı 5 baş ergin Malaklı köpeğinden alınan spermalar kullanıldı. Köpeklerin bakım ve beslemesi işletme şartlarında standart yetiştirme koşullarında yapıldı.

2.2 Yöntem

2.2.1. Spermanın Alınması

Köpeklerden sperma, 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 sperması alındı (Akçay, 2000).

Ejakulatlar, haftada bir kez, 5 tekrar yapılarak alındı. Alınan ejakulatlardan uygun özellik (sperma yoğunluğu $\geq 400 \times 10^6$ spermatozoa/ml; motilite ≥ 80 %) gösterenler miks yapılarak spermanın sulandırılması ve dondurulması işleminde kullanıldı.

2.2.2. Sperma Sulandırıcısının Hazırlanması

Spermaların sulandırılmasında kullanılan tris bazlı sulandırıcı aşağıda belirtilen formüle göre hazırlandı.

Tris (Hidroksimetilaminometan)	297,58 mM
Sitrik asit	96,32 mM
Fruktoz	82,66 mM
Penisilin	1 mcg/100ml

Çalışmada yer alacak farklı sulandırıcı grupları şöyledir:

Grup 1: Tris+Yumurta sarılı sulandırıcı+% 5 Gliserol

Grup 2: Tris+Yumurta sarılı sulandırıcı+% 5 Gliserol+10 μ M Karnosik Asit

Grup 3: Tris+Yumurta sarılı sulandırıcı +% 5 Gliserol + 50 μ M Karnosik Asit

Grup 4: Tris+Yumurta sarılı sulandırıcı + % 5 Gliserol + 100 μ M Karnosik Asit

Grup 5: Tris+Yumurta sarılı sulandırıcı + % 5 Gliserol + 200 μ M Karnosik Asit

2.2.3. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması

Köpeklerden alınan ejakulatlar makroskobik (renk, koku, kıvam, miktar) ve mikroskobik yönden değerlendirildi (spermatozoa motilitesi, yoğunluğu, canlılığı), normospermi özelliği gösteren ejakulatların spermadan zengin olan 2. fraksiyonları birleştirilerek çalışmada kullanıldı. Birleştirilen ejakulatlar 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M ve kontrol (0 μ M) karnosik asit içeren temel tris yumurta sarısı sulandırıcısı ile yoğunluğu 100×10^6 /ml olacak şekilde sulandırıldı, payetlere çekildi, uçları polivinil alkol ile kapatıldı ve +4°C' de 1,5 saat ekilibrasyona bırakıldı. Ekilibrasyon

sonrası sperma grupları sıvı azot buharında ($-100\text{ }^{\circ}\text{C}$) 10 dakika tutularak donduruldu. Daha sonra dondurulmuş spermalar azot tankı içerisine (-196°C) alındı. Çalışmada; dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik parametrelerden; motilite, morfolojik muayene ve membran bütünlüğü ve ölü canlı spermatozoonları belirleyen HE-test kullanılarak yapıldı.

2.2.4. Çözüm Sonu Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

2.2.4.1. Spermatozoa Motilitesi

Dondurma sonrası, spermatolojik muayeneler için, dondurulmuş payetler 37°C ' de 30 saniyede çözdürüldü. Isıtma tablalı faz kontrast mikroskopun (Olympus CX31) 37°C 'ta, 20X büyütmesinde lam-lamel arasına alınan bir damla sperma numunesinde en az 3 mikroskop sahası incelenerek, sahalardaki motilite değerlerinin ortalaması % motilite oranı olarak kaydedildi (Demirci, 2002, Tekin, 1994).

2.2.4.2. 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).

2.2.4.3. HE-test

Sperma numunelerinde ölü-canlı spermatozoon oranını ve hipo-ozmotik şişme testinin (HOS) birlikte uygulandığı Hipo-ozmotik Eosin boyama testi olarak

adlandırılan HE-test kullanıldı (Ducci ve ark., 2002; Gündoğan ve ark., 2011). Ependorf tüpler içerisine su banyosunda 37 °C'deki 100 mOsm'luk HOS solüsyonundan 1 ml alınarak üzerine sperma numunesinden 10 µl eklendi. Daha sonra eosin boyası ilave edilip karışım 37 °C'lik su banyosunda 30 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası lam üzerine bu karışımdan bir damla 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.

Buna göre; Eosin boyasının hazırlanışı:

Eosin-Y (1,67 g) Sodyum Sitrat (2,9 g), 100 ml distile suya tamamlanarak hazırlandı.

HOS Test Solüsyonunun hazırlanışı:

0,9 g fruktoz 0,49 g sodyum sitrat, 100 ml'ye tamamlanarak (100 mOsm/kg) hazırlandı (Pinto. 2008).

Tip I. Kuyruk şişmiş, baş boya almamış (H+/E-)

Tip II. Kuyruk şişmemiş, baş boya almamış (H-/E-)

Tip III. Kuyruk şişmiş, baş boya almış (H+/E+)

Tip IV. Kuyruk şişmemiş, baş boya almış (H-/E+)

2.3. 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.

3.BULGULAR

3.1. Dondurma-Çözdürme Sonrası Motilite Bulguları

Aksaray Malaklısı Çoban köpeklerinde dondurma çözündürme sonrası grupların motilite oranları Çizelge 2’de sunulmaktadır. Buna göre subjektif motilite yönünden 10 μ M, 50 μ M ve 100 μ M karnosik asit içeren grupların, kontrol grubuna göre istatistiki bir üstünlük ($p < 0.05$) sağladığı gözlemlendi.

Çizelge 2. Dondurma-çözdürme sonrası motilite değerleri ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:6).

Gruplar	Motilite %
Kontrol	46.66 $\pm$ 5.57 ^b
CA 10 μ M	65.00 $\pm$ 2.23 ^a
CA 50 μ M	61.66 $\pm$ 3.07 ^a
CA 100 μ M	60.00 $\pm$ 2.58 ^a
CA 200 μ M	55.00 $\pm$ 4.28 ^{ab}
P	*

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

3.2. Dondurma-Çözdürme Sonrası Anormal Spermatozoon Oranları

Araştırmada çözüm sonrası anormal spermatozoon oranları ile ilgili elde edilen bulgular Çizelge 3’te verilmiştir. Buna göre kontrol grubu ile kıyaslandığında 10 μ M karnosik asit katılan grupta belirgin bir derecede düşüş saptanmış ve istatistiki olarak fark ($p < 0.05$) önemli bulunmuştur. Karnosik asit katılan diğer tüm gruplarda anormal spermatozoon oranları kontrol grubuna göre düşük olarak elde edilmiş olsa da istatistiki olarak fark ($p > 0.05$) gözlenmedi.

Çizelge 3. 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. (*: $P < 0.05$).

3.3. Dondurma-Çözdürme Sonrası HE-test parametreleri

Dondurma-çözdürme sonrası HE-test sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 4’te verildi. Modifiye HOS Test yönünden değerlendirdiğimizde, H+/E- oranı açısından 10 μM ve 100 μM karnosik asit eklenen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiki olarak farkın ($p < 0.05$) önemli olduğu görülmektedir.

Çizelge 4. Dondurma-çözdürme sonrası HE-test parametreleri ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:6).

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

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

4.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 asidi bulunan spermatozoon membranında, LPO'a karşı duyarlı hale gelmektedir. Spermatozoonun soğutulması, dondurulması ve çözündürülmesi geri dönüşümsüz faz değişimine bağlı hasarlara ve oksidatif strese neden olmakta ve meydana gelen oksidatif stres ve oluşan sitotoksik aldehytler spermatozoada 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 spermalardan daha iyi sonuçlar alınmasını sağlamaktadır (Aitken 1994, Alvarez ve Storey 1995, Bucak ve Tekin 2007, Bucak ve ark 2010, Agarwal ve ark. 2014).

Köpek spermasının dondurulmasına olan ilgi tüm dünyada suni tohumlamanın yaygınlaşması ile artış göstermiştir. Ancak bilinen sperma dondurma protokolleri spermatozoada kalıcı hasarlara neden olarak canlılığında azalmalara ve çözüm sonu fonksiyonel hasarlara yol açmaktadır. Spermatozoada oluşacak dondurma kaynaklı hasarlar çözüm sonu sperma kalitesini önemli düzeyde etkilemektedir (Güngör ve Bucak, 2016).

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

dâhil olmak üzere diğer antioksidanları kullanan diyet takviyesi, hayvan sağlığını ve sperma kalitesini önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Surai 1998, Surai 2014, Surai 2016).

Güngör (2015), Kangal ırkı köpeklerde yaptığı çalışmada temel sulandırıcıya % 5 oranında gliserol ve etilen glikol eklemiş ve % 5 oranında gliserol eklenerek oluşturulan 1. 2. ve 3. TG gruplarının çözüm sonu subjektif motilite değerlerini sırasıyla % $50,7 \pm 1,7$; $47,8 \pm 1,7$; $47,8 \pm 4,06$ olarak belirlemiştir. Ayrıca kriyoprotektan olarak % 5 oranında etilen glikol kullandığı ve 1. 2. ve 3. TE gruplarının çözüm sonu subjektif motilite değerleri sırasıyla % $51,4 \pm 0,92$; $51,4 \pm 0,92$; $50,0 \pm 2,67$ olarak tespit etmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz temel tris sulandırıcısı ve % 5 gliserol eklediğimiz grupta değerimiz $46,66 \pm 5,57$ olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz değer TG grupları grubu ile benzer, TE gruplarından ise düşük olduğu belirlenmiştir.

İnanç ve ark. (2018), 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 değerleri çalışmamızda bulduğumuz değerlerden yüksektir. Bu fark spermaya katılan maddeler, boyama yöntemi ve analiz yönteminden kaynaklanmış olabilir.

Zanganeh ve ark. (2013), geyik sperma 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, canlılık ve HOST değerleri üzerinde olumlu etki yaptığını bildirmişlerdir. Daghigh-Kia ve ark. (2014), boğa spermasına rosmarinik 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 ekstaktı) 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-çözdürme sonrası sulandırıcıya ilave edilen biberiye ekstaktı ile değiştiğini belirtmişlerdir. 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 ekstaktının 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.

Touazi ve ark. (2018), horozlarda diyetek 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.

Türk ve ark (2016), sıcaklık sterine maruz bıraktıkları Japon Bildircınlarında sıcaklık stresinin apoptozisi artırdığını ve spermatojenik hücre sayısını önemli derecede azalttığını gördükleri çalışmalarında diyetek ekledikleri biberiye yağının bu etkileri

önemli ölçüde azalttığını bildirmişler ve bu etkinin biberiyenin antiperoksidatif etkisinden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Yeni ve ark. (2018) 25, 50, 100 and 200 µg/ml rosmarinik asit katarak dondurdukları boğa spermasında motilite, membran bütünlüğü ve spermatozoon morfolojisinin etkilenmediğini fakat 200 µg/ml grupta motilite ve membran bütünlüklerinin olumsuz etkilendiğini, bununla birlikte, 25 ve 50 µg/ml gruplarda toplam antioksidan aktivitelerinin artırmış olduğu ve bunun bir sonucu olarak spermatozoon hücrelerinde MDA ve DNA hasarının azaldığını 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.

5. SONUÇ

Köpek spermasının dondurulması esnasında spermanın çözüm sonu parametrelerini iyileştirmek amacıyla sulandırıcılara farklı antioksidan maddeler katılmaktadır. Sonuçlar genel olarak olumlu olmakla birlikte, hayvan türlerinde kullanılmış olan antioksidanların etkinliği uygulanan hayvan türüne, sulandırıcının içeriği ve çeşidine, spermatozoanın saklanma şekli ve süresine, katılan antioksidanın dozuna ve dondurma protokolüne göre değişiklikler göstermektedir.

Sunulan tez çalışmasından elde edilen verilere göre tüm parametreler değerlendirildiğinde tris sulandırıcısına 10 μ M karnosik asit eklemenin köpek spermasının çözüm sonrası motilite, morfoloji ve membran bütünlüğü-canlılığı üzerine olumlu etki ettiği sonucuna varılmıştır.

Biberiye ekstraktındaki karnosik asitin köpek spermasının spermatolojik parametreleri üzerine etkilerine dair herhangi bir çalışma bulunmadığı için ilave çalışmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır. Bunun yanında ileride yapılacak araştırmalarla spermatolojik parametrelerin yanı sıra fertilité parametreleri ile de desteklenmesinin yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

ÖZET

Malaklı Köpeği Spermasının Dondurulabilirliği Üzerine Karnosik Asitin Etkisi

Sunulan çalışmanın amacı, biberiyeden (*rosmarinus officinalis*) ekstrakte edilen karnosik asidin dondurulmuş çözdürülmüş Malaklı Çoban Köpeği spermasında motilite, morfoloji, canlılık ve membran bütünlüğü parametrelerine etkisini belirlemektir.

Bu çalışma beş erkek hayvan ile yapıldı, alınan ejakülatların spermatozoon bakımından zengin kısmı kullanıldı ve beş eşit gruba bölündü. Kontrol grubu temel Tris sulandırıcısıyla sulandırıldı ve 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M karnosik asit içeren gruplar oluşturuldu. Bir buçuk saat boyunca ekilibrasyonun ardından, payetler azot buharında donduruldu ve daha sonra sıvı azot içinde depolandı. Ardından dondurulmuş payetler sıcak suda çözdürüldü ve motilite, morfoloji, canlılık ve membran bütünlüğü parametreleri değerlendirildi.

En yüksek motilite ve H-E değerleri 10 μ M'lık grupta elde edildi ve sırasıyla % 65.00 $\pm$ 2.23 ve % 69.83 $\pm$ 0.70 olarak belirlendi, en düşük anormal spermatozoon oranı ise 9.50 $\pm$ 1.52 ile yine 10 μ M'lık gruptan elde edildi ve bu gruplardaki farklar ($p<0.05$) kontrol grubuna göre istatistiki olarak önemli bulundu.

Sonuç olarak Malaklı köpek dondurulmasında sulandırıcıya eklenen 10 μ M karnosik asitin, motilite, spermatozoon morfolojisi, membran bütünlüğü ve canlılığı açısından kontrol grubuna kıyasla koruyucu bir etki gösterdiği belirlendi.

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

SUMMARY

The Effect of Carnosic Acid on Semen Freezability in Malaklı Dogs

The objective of the study was to determine the effect of carnosic acid, extracted from rosemary (*rosmarinus officinalis*), to Malaklı Shepherd dog semen motility, morphology, viability and membran integrity parameters after frozen-thawed process. Five male 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 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M. Following equilibration for one and a half hours, 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 motility and H-E test results were detected in 10 μ M group at 65.00 ± 2.23 % and 69.83 ± 0.70 % respectively, the lowest abnormal sperm rate were detected in 10 μ M 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 μ M of carnosic acid added to extender in freezing of Malaklı 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 dogs, sperm

KAYNAKLAR

- AGARWAL, A., DURAIRAJANAYAGAM, D., HALABI, J., PENG, J., VAZQUEZ-LEVIN, M. (2014). Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, **29**: 32– 58.
- AITKEN, RJ, (1994). Pathophysiology of human spermatozoa. *Curr Opin Obstet Gynecol*, **6**: 128-35.
- AKÇAY, E. (2000). Kangal Çoban köpeklerinde androlojik muayeneler ve spermanın dondurulması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- AKÇAY, E., VE TEKİN, N. (2002) *Kangal Çoban Köpeklerinde (Karabaş) Androlojik Değerlendirmeler*. *Turk J Vet Anim Sci*, **26**: 965-973.
- AKKUŞ, İ, (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 32.
- ALVARENGA, M.A., LANDIM-ALVARENGA, F.C., MOREIRA R.M., CESARINO M.M. (2000). Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet J*, **32(6)**: 541-5.
- ALVAREZ, J.G., STOREY, B.T. (1992). Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl*, **13**: 232–41.
- ALVAREZ, J.G., STOREY, B.T. (1995). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, **42**: 334–346.
- ATASOY, F(2010). *Köpek - Kedi Yetiştiriciliği Ders Notları*, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Zootečni Anabilim Dalı, Ankara.
- ATASOY, F, Erdoğan M, Yüceer B, Özarslan B, Kocakaya A(2011). *Türk Mastifi morfolojik ve genetik özelliklerinin belirlenmesi ve bu köpeğin tanıtılması*, Broşür 1. Baskı, Medisan Yayınevi Ltd Şti., Ankara.
- ATASOY, F, Kanlı O(2005). *Türk Çoban Köpeği Kangal*, 2. Baskı, Medisan Yayıncılık, No: 60, Ankara.
- BORGHEI-RAD, S.M., ZEINOALDINI, S., ZHANDI, M., MORAVEJ, H., ANSARI, M. (2017). Feeding rosemary leaves powder ameliorates rooster age-related subfertility. *Theriogenology*, **101**: 35–43.
- BREQUE, C., SURAI, P.F., BRILLARD, J.P. (2003). Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, **66**: 314–323.

- BUCAK, M.N., TEKİN, N. (2007). Kriyoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kriyoprotektif etki. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, **54**: 67-72.
- BUCAK, MN, TUNCER, PB, SARIÖZKAN, S, BAŞPINAR, N, TAŞPINAR, M, ÇOYAN, K, BİLGİLİ, A, AKALIN, PP, BÜYÜKLEBLEBİCİ, S, AYDOS, S, ILGAZ S, (2010). Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. Cryobiology, **61**: 248–53.
- CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R., UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. (2003). Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. Theriogenology, **59**: 743-51.
- CHATTERJEE, S., GAGNON, C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. Mol Reprod Dev, **59**: 451–8.
- COCHRAN, J.D., AMANN, R.P., FROMAN, D.P., PICKETT, B.W. (1984). Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. Theriogenology, **22(1)**: 25-38.
- COPPINGER, Ray (2001). Dogs: a Startling New Understanding of Canine Origin, Behavior and Evolution. New York: Scribner
- CRISTANELLI, M.J., AMANN, R.P., SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W. (1985). Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. Theriogenology, **24(6)**: 681-6.
- CUPPS, P. T. (1991). Reproduction in the dog and cat, Reproduction in Domestic animals, Editör: Cupps, P. T. California: Academic Press.
- CUVELIER, M.E., RICHARD, H., BERSET, C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. J. Am. Oil. Chem. Soc., **73**: 645–652.
- DAGHIGH-KIA H, OLFATI-KARAJI R, HOSEINKHANI A, ASHRAFI I. (2014). Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts and glutathione antioxidants on bull semen quality after cryopreservation, Spanish J. Agric. Res., **12(1)**: 98-105.
- de LAMIRANDE, E., JIANG H., ZINI A, KODAMA H., GAGNON C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. Rev Reprod, **2**: 48 –54.
- DEMİRCİ, E. (2002). Evcil hayvanlarda reproduksiyon, suni tohumlama ve androloji ders notları (1nd ed). F.Ü.Vet.Fak., Ders Teksiri No:53 Elazığ.)
- DUCCI, M., GAAZANO, A., VILLANI, C., CELA, V., ARTINI, P.G., MARTELLI, F., GENAZZANI, A.R. (2002). Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. Eur. J. Obstet. Gynaecol. Reprod. Biol., **102**: 53–56.
- ENGLAND, G.C.W. (1993). Cryopreservation of dog semen. J Reprod Fert Suppl, **47**: 243-55.

- FOOTE, RH, (2003). Fertility estimation: A review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci*, **75**: 119-39.
- FRANKEL E.N., HUANG S.W., AESCHBACH R., PRIOR E. (1996). 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.*, **44**: 131–135.
- FRANKEL, E. N., HUANG, S. W., AESCHBACH, R., PRIOR, E. (1996). 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* **44**: 131-135.
- GONZÁLEZ-VALLINAS, M., REGLERO, G. (2015). Ramírez de Molina, A. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract as a Potential Complementary Agent in Anticancer Therapy. *Nutr. Cancer*, **67**: 1221–1229.
- GRIVEAU, J.F., LE LANNOU, D. (1997). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int. J. Androl.* **20**: 61–69.
- GÜNGÖR, Ş. (2015). Kangal Köpeği Spermasının Dondurulmasında Farklı Antioksidanlar ve Kriyoprotektanların Etkisi. Doktora tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- GÜNGÖR, Ş., BUCAK, M.N. (2016). Basal medium eagle solution may improve the post-thaw parameters of Kangal dog semen. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, **32**,(3): 193-199
- GÜNDOĞAN, M., AVDATEK, F., YENİ, D. (2011) Effect of extenders on motility, morphology and osmotic resistance parameters of ram sperm during liquid storage. *Revue Méd. Vét.*, **162** (11): 546-551.
- HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology*, **29**: 26-38.
- HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive? *J Androl*, **11**: 73–88.
- HEIDARI-VALA, H., HARIRY, R. E., SADEGHI, M. R., AKHONDI, M. M., NOVIN, M. G., HEIDARI, M. (2013). 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*, **12**(2): 445.
- HOLT, W.T. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, **53**: 47-58.
- INANC, M.E., TEKIN, K., OLGAC, K.T., YILMAZ, B., CIL, B., TASDEMİR, U., TUNCER P.B., BUYUKLEBLEBICI, S., UYSAL O. (2018). Effect of cholesterol loaded cyclodextrin on semen cryopreservation of Aksaray Malakli shepherd dogs of different ages. *Animal Reproduction Science*, **193**, 191-200.

- INANC, M.E., TEKIN, K., AKKURT, M.Y., OLGAC, K.T., YILMAZ, B., CIL, B., KIZILASLAN, M., TASDEMİR, U., TUNCER, P.B., BUYUKLEBLEBICI, S., UYSAL, O., CINAR, KUL B. (2018) Genomewide association of male reproductive traits in Aksaray Malakli dogs. *Reprod Dom Anim.* **53**:1555– 1562.
- JESSY, M., MICHAEL, Y., (2016). EVANGELIA, T. Anticancer Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract and Rosemary Extract Polyphenols. *Nutrients*, **8**: 731.
- KIM, J.G., PARTHASARATHY, S. (1998). Oxidation and the spermatozoa. *Semin Reprod Endocrinol*, **16**(4): 235-9.
- KODAMA, H., KURIBAYASHI, Y., GAGNON, C. (1996). Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J Androl*, **17**: 151–7.
- KULAKSIZ, R. (2009). Farklı Antioksidanlar Eklenmiş Sulandırıcılarla Dondurulmuş Saanen Teke Spermasının In Vitro Değerlendirilmesi, Doktora tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- LEIBO, S.P., BRANDLEY, L. (1999). Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa, *The Male Gamet: From Basic Science to Clinical Applications*. Editör: Gagnon, C. St Louis: Cache River Press.
- LEMMA, A. (2011). Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility, Artificial Insemination in Farm Animals. Editör: Manafı, M. InTech
- MALO, C., GIL, L., GONZALEZ, N., MARTINEZ, F., CANO, R., DE BLAS, I., ESPINOSA, E. (2010). Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*, **61**(1): 142– 147.
- MEDEIROS, C.M., FORELL, F., OLIVEIRA, A.T., RODRIGUES, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, **57**: 327–44.
- MOTLAGH, M.K., SHARAFI, M., ZHANDI, M., MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A., SHAKERI, M., SOLEIMANI, M., ZEINOALDINI, S. (2014). Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithinbased semen extender following freeze– thawing process of ram sperm. *Cryobiology*, **69**(2): 217-222.
- MUNNE-BOSCH, S., ALEGRE, L., SCHWARZ, K. (2000). The formation of phenolic diterpenes in *Rosmarinus officinalis* L. under mediterranean climate. *Eur. Food. Res. Technol.* **210**: 263-267.
- ÖZBEYAZ, C. (1994). “Kangal köpeklerinde bazı morfolojik özellikler”, *Lalahan Hay. Araş. Ens. Derg.*, **34**(1-2): 38-46.
- ÖZGÜNEŞ, A. F., Çiftçi, N. (1993). “Kangal köpeği hakkında genel bilgiler”, *Tigem Derg.*, 1-8.
- PENA, M.A.I. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci*, **82**(83): 209–24.

- PESCH S, BERGMANN M, 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, **37**: 597-612.
- PETIWALA, S.M., JOHNSON, J.J. (2015). Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. *Cancer Lett.*, **367**: 93–102.
- PINTO, C.R., KOZINK, D.M. (2008). Simplified hypo-osmotic swelling test (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci.*, **104**:450-456.
- PURDY, P.H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, **6**: 215–25.
- RANGAN, U., BULKLEY, G.B. (1993). Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull*, **49(3)**: 700-18.
- RAŠKOVIĆ, A., MILANOVIĆ, I., PAVLOVIĆ, N., ĆEBOVIĆ, T., VUKMIROVIĆ, S., MIKOV, M. (2014). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis*L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement. Altern. Med.* **14**: 225.
- RICHEIMER, S.L., MATTHEW, W.B., GREG, A.K., MICHAEL, C.K., DAVID, T.B. (1996). Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**: 507–514.
- ROTA, A., MILANI, C., CABIANCA, G., MARTINI, M. (2006). Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, **65**: 1848-58.
- SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. (2000). Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, **62 (1-3)**: 77-111.
- SCHUSTER, T.G., KELLER, L.M., DUNN, R.L., O.H.L, D.A., SMITH, G.D. (2003). Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryolops, *Human Reproduction*, **8**: 788-795.
- SEAGER, S.W.J., PLATZ, C., FLETCHER, W.S. (1975). Conception rates and related data using frozen dog semen. *J Reprod Fertil*, **45**: 189-92.
- SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. (2003). Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, **59**: 821-29.
- SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. (2001). Efeito das etapas do processo de criopreservação sobre a qualidade do sêmen canino diluído em tampão tris. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, **25**: 474-5.
- SÖNMEZ, M. (2016). Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları, Elazığ.
- STANESCU, M.P., BIRTOIU A.I., 2010. Freezing of dog's sperm: a review. *Romanian Biotechnological Letters*, **67(2)**: 209-15.

- STOREY, B.T., NOILES, E.E., THOMPSON, K.A. (1998). Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, **37**: 46–58.
- SURAI, P, FISININ, V.I. (2014). Selenium in poultry breeder nutrition:An update. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **191**: 1–15.
- SURAI, P. (2016). Antioxidant systems in poultry biology:Superoxide dismutase. *Anim. Nutr.*, **1**: 1–17.
- SURAI, P., CEROLINI, S., WISHARTA, G.J., SPEAKE, B.K., NOBLE, R.C., SPARKS, N.H.C. (1998). Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. *Avian. Poult. Biol. Rev.*, **9**(1):11–23.
- TEKİN, N. (1994). Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi. In: Alaçam, E. Ed. *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Suni Tohumlama, Doğum ve İnfertilite*. Dizgievi, Konya. 69-79.
- TOSUN, H., UYSAL, O. (2007). Köpek spermasının dondurulmasında farklı sulandırıcıların ve bireylerin etkisi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, **54**: 23-28.
- TOUAZI, L., ABERKANE, B., BELLIK, Y., MOULA, N., IGUER-OUADA, M. (2018). Effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* (L.) on rooster sperm motility during 4°C short-term storage, *Veterinary World*, **11**(5): 590-597.
- TÜRK, G., ÇERİBAŞI, A.O., ŞİMŞEK, Ü.G., ÇERİBAŞI, S., GÜVENÇ, M., KAYA, Ş.Ö., ÇİFTÇİ, M., [SÖNMEZ, M.](#), [YÜCE, A.](#), [BAYRAKDAR, A.](#), [YAMAN, M.](#), [TONBAK, F.](#) (2016). Dietary rosemary oil alleviates heat stress-induced structural and functional damage through lipid peroxidation in the testes of growing Japanese quail. *Animal reproduction science*, **164**: 133-143.
- VIDAMENT, M.D.A., JULIENNE, P, EVAIN, A, NOUE, P, PALMER, E. (1997). Equine frozen semen: Freezability and fertility field results. *Theriogenology*, **48**: 905-17.
- WATSON PF. (1975). Use of Giemsa stain to detect changes in the acrosome of frozen ram spermatozoa *Vet Rec.* **97**(1): 12-15.
- WATSON, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, **60**: 481-92.
- WOODS, E.J., GILMORE, J.A., LIU, J. (2000). Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod*, **15**: 335-43.
- WU, X., BEECHER, G.R., HOLDEN, J.M., HAYTOWITZ, D.B., GEBHARDT, S.E., PRIOR, R.L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 4026– 403.
- YAVAŞ KORKMAZ, T. (2009). Alternatif dondurma yöntemlerinin boğa sperması üzerine etkisi, Doktora tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- YENİ, D., AVDATEK, F. (2017). Kısa Süreli Saklanan Epididimal Anadolu Mandası Spermasına İlave Edilen Karnosik Asitin Etkisi. *Kocatepe Vet J.*, **10(3)**: 187-195.
- YENİ, D., İNANÇ, M.E., AVDATEK, F., TUNCER, P.B., TÜRKMEN, R., TAŞDEMİR, U. (2018). Supplementation of Rosmarinic Acid Has Reduced Oxidative Stress on Bull Spermatozoa Following the Freeze Thawing Process. *CryoLetters*, **39(2)**: 156-165.
- ZANGANEH, Z., ZHANDI, M., ZARE-SHAHNEH, A., NAJAFI, A., NABI, M.M., MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A. (2013). Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? *Small Rumin. Res.* **114**: 120–125.

