



RESEARCH ARTICLE

Koç spermasının +4 C⁰'de saklanması gallik asitin spermatolojik parametreler üzerine etkisi

Şükrü Güngör^{1*,a}, Muhammed Enes İnanç^{1,b}, Ayhan Ata^{1,c}

¹Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Burdur Türkiye

Geliş:09.11.2018, Kabul: 05.02.2019

*sukrugungor@mehmetakif.edu.tr

^aORCID: 0000-0003-3460-522X, ^bORCID: 0000-0001-6954-6309, ^cORCID: 0000-0003-0590-5995

Effect of gallic acid on ram semen spermatological parameters at +4 °C storage

Eurasian J Vet Sci, 2019, 35, 2, 87-92

DOI: 10.15312/EurasianJVetSci.2019.228

Öz

Amaç: Bu çalışmada sezon dışı dönemde, koç spermasının kısa süreli saklanması sulandırıcıya farklı oranlarda ilave edilen Gallik asitin etkilerinin ortaya konması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada Burdur Çallica kasabasında bulunan özel bir koyun işletmedeki 4 baş Merinos koç (2-3 yaş) kullanıldı. Çalışma süresince koçlardan sperma elektro-ejekülatör yardımıyla haftada iki kez olmak üzere elde edildi. Toplanan ejakülatlardan spermatozoa motilitesi %80>, yoğunluğu 0 mM (kontrol) ile 1.5x10⁹ spermatozoa/ml üzerinde olanlar pooling yapıldı ve deney grupları oluşturuldu. Deney grupları sırasıyla antioksidan içermeyen (kontrol), 2 mM, 5 mM ve 10 mM dozlarında gallik asit içeren sulandırıcı grupları olacak şekilde belirlendi ve +4 C⁰'de saklandı. Grupların oluşturulmasında sonra 24 saat aralıklar ile 96 saat süresince subjektif motilite (%), morfolojik (%) ve membran bütünlüğü (HOS test, %) bakımından değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmada 48. saatin sonunda kontrol grubuna (%51.0±2.7) göre en yüksek motilite Gallik asit 2 mM (%72.7±5.3) ve 5 mM (%69.4±4.8) içeren sulandırıcı gruplarından elde edildi (P<0.05). Saklama süresi sonunda (96. saat) gallik asit 2 mM ve gallik asit 5 mM grupları spermatozoa motilitesi kontrol grubuna kıyasla daha fazla koruyucu özellik gösterdi (P<0.05). Buna karşın gallik asit 10 mM membran bütünlüğü bakımından kontrol grubuna göre olumsuz etki gösterdi. (P<0.001). Anormal spermatozoa oranları bakımından her bir zaman dilimi açısından gruplar arasında istatistiki açıdan bir farklılık tespit edilmedi (P>0.05). Ancak, saklama zamanına bağlı olarak anormal spermatozoa oranında artış istatistiksel olarak önemli bulundu (P <0.001).

Öneri: Sonuç olarak, sezon dışında koç spermasının kısa süreli saklanması amacıyla sulandırıcıya 2 ve 5 mM dozlarında gallik asitin eklenmesi, motilite oranlarında olumlu etki yapabileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Gallik asit, koç sperması, motilite, membran bütünlüğü

Abstract

Aim: The purpose of this study was to investigate the effect of different rate of gallic acid on ram semen liquid storage in non-breeding season.

Materials and Methods: In this study, four Merino rams (2-3 ages) were used and belonging to the special sheep farm in Callica, Burdur/ Turkey. Ejaculates were collected from the rams using an electroejaculator, the ejaculates containing spermatozoa with >80% motility and concentrations higher than 1.5x10⁹ spermatozoa/ml were mixed and used in the study. The mixed ejaculates were divided into four equal aliquots and samples were extended with tris containing 0 mM (control), 2 mM, 5 mM, 10 mM gallic acid and they were stored at 4°C. After the groups were created, sperm motility (%), morphologic integrity (%), membrane integrity subjective (Hipo Osmotic Swelling Test, HOS test, %) were examined 24 hour intervals until 96 hour.

Results: The highest motility at 48. hour was seen gallic acid 2 mM (72.7±5.3%) and 5 mM (69.4±4.8%) groups compared the control (51.0±2.7%) group (P<0.05). At the end of the storage time to (96. hour) gallic acid 2mM and gallic acid 5 mM was protected to sperm motilities compared the control group (P<0.05). Also, gallic acid 10 mM were decreased to the membrane integrity compared to the control group (P < 0.001). There were no significant differences among groups on abnormal spermatozoa rate in every storage period (P > 0.05) but, there was a statistically significant increase in abnormal spermatozoa rate at the depending on storage time (P < 0.001).

Conclusion: In conclusion, gallic acid 2 mM and gallic acid 5 mM should be supplement to ram semen extender at short term storage period on non-breeding season for improvement of sperm motility.

Keywords: Gallic acid, ram semen, motility, membrane integrity

Giriş

Evcil memeli hayvanlarda spermanın saklanması, değerli damızlıkların genetik aktarımın bölgeler hatta ülkeler arası transportunun sağlanabilmesi açısından büyük önem arz etmektedir. Ülkemiz hayvancılığı açısından dondurulmuş sperma ticareti diğer ülkelerde de olduğu gibi ön plandadır. Ancak, küçükbaş hayvancılıkta böyle bir yaygınlaşma görülmemektedir. Küçükbaş hayvancılığında suni tohumlama uygulaması genellikle natif ejakülatın eldesini takiben transservikal yolla ivedilikle yapılmaktadır. Buradaki en önemli sebep dondurulmuş-çözdürülmüş koç/teke spermasında çözüm sonu motilite değerlerinin düşük olması ve bu yolla yapılacak olan suni tohumlama uygulamalarından elde edilecek gebelik oranlarının beklentiyi karşılamaması olarak gösterilmektedir. Araştırmacılar, dondurulmuş payetlerin kullanılmasında trans-servikal yöntemden ziyade laparoskopik yöntem ile suni tohumlama uygulamasının daha iyi sonuçlar vereceğini belirtmektedir. Laparoskopik suni tohumlama yönteminden saha şartlarında elde edilen sonuçların çok değişken olması ve yardımcı personele ihtiyaç duyulması sebebiyle istenilen düzeyde kullanım alanının olmadığı belirtilmektedir (Langford ve ark 1979). Koyunlarda taze spermanın suni tohumlamada dondurulmadan saklanması bu alanda yapılacak olan uygulamalarının başarısını artıracığını bildiren Zarei ve ark (2018) spermanın 4-5 gün süresince fertilitite kabiliyetinin korunmasının önemli olduğunu belirtmişlerdir. Spermanın dondurulmadan saklamasına dair yapılan çalışmalar küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinde suni tohumlama uygulamasının yaygınlaşması için büyük önem taşımaktadır (Langford ve ark 1979, Zargari ve ark 2016).

Spermanın yaşam süresine etki eden başlıca faktör sperma sulandırıcısının kompozisyonudur. Evcil memeli hayvanların spermasının saklanmasında sulandırıcıya eklenen temel maddenin yumurta sarısı olduğu belirtilmektedir. Yumurta sarısı içerdiği birçok bileşenlerinin yardımıyla spermanın soğuk şokundan korunmasına, enerji ihtiyacının karşılanmasına katkı sağladığı ifade edilmektedir (Lardy ve Phillips 1939, Phillips ve Lardy 1940). Düşük yoğunluklu lipoproteinler, (LDL) yumurta sarısının içeriğinde bulunan ve spermanın soğuk şokundan korunmasında en önemli rolü olan bileşendir (Quinn ve ark 1980, Moussa ve ark 2002). LDL sperma üzerindeki bu etkisini fosfolipit kısmının, sperm hücresinin dış tarafında bir savunma tabakası oluşturarak veya soğutma sürecinde hasar görmüş veya kaybolan membran fosfolipit moleküllerinin yerine geçmesini sağlayarak sperm hücrelerini koruduğu ileri sürülmüştür (Aurich 2005).

Yapılan çalışmalarda koç spermasının saklanmasında yumurta sarısının tek başına sulandırıcıya eklenmesinin saklama süresince spermanın özelliklerini istenen düzeyde koruyamadığı çalışmalarda ortaya konmasından sonra çeşitli araştırmacılar sulandırıcıya eklenecek olan katkı maddelerinin sürece olumlu etkisi olduğunu belirtmektedir (He ve

ark 2001, Blackburn 2004, Moore ve ark 2005, Bucak ve ark 2012).

Bazı bitkilerin, antioksidan özelliklerinin belirlenmesiyle birlikte beslenme ve medikal uygulamalarda son yıllarda geniş bir kullanım alanı bulmuştur (Motlagh ve ark 2014). Keçi-boynuzu gıda, kozmetik, tekstil ve ilaç endüstrisinde kendisi ya da tohumlarının kullanımı uzun yıllardır devam etmektedir (Kumazawa ve ark 2002). Keçi-boynuzun içeriğinde yer alan gallik asit (GA) antioksidan; anti-mutajenik; anti-karsinojenik; anti-alerjik anti-bakteriyel olarak da çeşitli çalışmalarda kullanım alanı bulmuştur (Joslyn ve ark 1968, Kuppan ve ark 2010, Li ve ark 2011). Çalışmanın dizaynı amacıyla yapılan literatür taramasında GA'nin sperma sulandırıcısına ilavesinin kısa yada uzun süreli saklamada etkilerini içeren çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda koç spermasının kısa süreli saklanmasında sulandırıcıya farklı oranlarda ilave edilen GA'nin saklama süresince spermatolojik parametreler üzerine etkisinin ortaya konması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada Burdur ili Çallica kasabasında bulunan özel bir işletmedeki 4 baş Merinos koç (2-3 yaş) kullanıldı. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (06.12.2017 tarih ve 360 sayılı kararı) izin alınması ile, koçlardan haftada iki defa elektro ejakülatör yardımıyla sezon dışında sperma alındı. Her bir koçtan alınan nativ ejakülatlar makroskopik ve mikroskopik yönden muayene edilerek normo-spermi değerleri gösteren (%80 motilite, 1.5×10^9 /ml yoğunluğun üzerinde, sperma miktarı en az 0,5 ml) ejakülatlar birleştirildi. Birleştirilen ejakülatlar temel tris yumurta sarısı sulandırıcısı (3,63 gr Tris; 1,82 gr Sitrik asit, 0,5 gr glikoz/100 ml distile su, %20 yumurta sarısı) ile konsantrasyonu 200×10^6 /ml olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırma sonrası sperma grupları antioksidan içermeyen (kontrol), 2mM, 5 mM ve 10 mM dozlarında GA içeren sulandırıcı grupları oluşturuldu. Payetlere sulandırılmış sperma çekildikten sonra uçları polivinil alkol ile kapatıldı. Gruplar oluşturulduktan sonra saat 0. saat olarak kabul edildi ve 96. saate kadar $+4 C^0$ 'de saklandı. Saklama sırasında 24 saat aralıklar ile spermatolojik parametrelerden olan subjektif motilite (%), morfolojik bütünlük (%), membran bütünlüğü (Hipo Osmotic Swelling Test, %) incelendi.

Spermatolojik parametrelerin değerlendirilmesi

Motilite muayenesi, subjektif olarak, faz-kontrast mikroskopta ($\times 20$) ısıtma tablası kullanılarak 7 farklı mikroskop sahası incelenerek ortalamaları alındı ve motilite sonucu (%) belirlendi. Anormal spermatozoa oranı (morfolojik bütünlük) Hancock solüsyonu (62.5 ml formalin (% 37), 150 ml salin solüsyonu, 150 ml buffer solüsyonu ve 500 ml bi-

Tablo1. Koç spermmasının +4 °C'de farklı dozlarda GA içeren sulandırıcılarda 96 süresince saklanmasında motilite (%) (Ort±SH) değerleri

GRUPLAR	Numune değerlendirme zamanı					G-EMM±SH	P-değeri		
	0.Saat	24. Saat	48.Saat	72. Saat	96. Saat		Zaman	Grup	Zaman*Grup
Kontrol	85.0±0.0	78.3±4.4	51.0±2.7 ^b	41.2±3.3 ^c	35.4±6.1 ^b	58.2±1.6 ^d			
GA 2 mM	83.3±1.6	81.6±0.9	72.7±5.3 ^a	70.7±0.4 ^a	55.9±2.9 ^a	72.8±1.6 ^c			
GA 5 mM	81.6±3.4	77.7±1.4	69.4±4.8 ^a	62.4±3.1 ^{ab}	56.0±6.8 ^a	69.4±1.6 ^c	<0.0001	<0.0001	0.004
GA 10 mM	74.0±5.5	71.9±3.1	62.7±3.8 ^{ab}	57.7±4.7 ^b	39.9±0.9 ^{ab}	61.2±1.6 ^d			
P	-	-	*	*	*				
T-EMM±SH	80.9±1.8 ^A	77.4±1.8 ^A	63.9±1.8 ^B	58.0±1.8 ^B	46.8±1.8 ^C				

G-EMM±SH: Sulandırıcı gruplarındaki tahmin edilen marjinal ortalamaları ve standart hata değeri

T-EMM±SH: Zamana göre sulandırıcı gruplarındaki tahmin edilen marjinal ortalamaları ve standart hata değeri

a-b: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak farklıdır (P<0.05).

c-d: Zamana göre sulandırıcı gruplarının istatistiksel farklıdır (P<0.05).

A-C: Sulandırıcı gruplarına göre istatistiksel farklıdır (P<0.05).

Tablo 2. Koç spermmasının +4 °C'de farklı dozlarda GA içeren sulandırıcılarda 96 süresince saklanmasında membran bütünlüğü (%) (Ort±SH) değerleri

GRUPLAR	Numune değerlendirme zamanı					G-EMM±SH	P-değeri		
	0.Saat	24. Saat	48.Saat	72. Saat	96. Saat		Zaman	Grup	Zaman*Grup
Kontrol	64.8±6.7	57.3±3.6	53.9±3.0	48.3±6.7	41.8±6.8	53.2±1.7 ^a			
GA 2 mM	60.6±1.9	56.3±2.4	51.0±2.6	47.9±4.1	43.9±3.1	51.9±1.7 ^{ab}			
GA 5 mM	61.2±1.3	51.0±1.0	47.1±1.4	44.3±1.1	34.7±2.1	47.7±1.7 ^{ab}	<0.0001	0.034	0.978
GA 10 mM	58.2±2.3	52.7±4.9	48.7±2.9	44.8±6.0	30.4±3.5	47.0±1.7 ^b			
T-EMM±SH	61.2±1.9 ^A	54.4±1.9 ^B	50.2±1.9 ^{AB}	46.3±1.9 ^C	37.7±1.9 ^D				

G-EMM±SH: Sulandırıcı gruplarındaki tahmin edilen marjinal ortalamaları ve standart hata değeri

T-EMM±SH: Zamana göre sulandırıcı gruplarındaki tahmin edilen marjinal ortalamaları ve standart hata değeri

A-D: Sulandırıcı gruplarına göre istatistiksel farklıdır (P<0.05).

a-b: Zamana göre sulandırıcı gruplarının istatistiksel farklıdır (P<0.05).

Tablo 3. Koç spermmasının +4 °C'de farklı dozlarda GA içeren sulandırıcılarda 0. ve 96. saatteki anormal spermatozoa (%) (Ort±SH) değerleri

GRUPLAR	Numune değerlendirme zamanı		G-EMM±SH	Zaman	P-değeri	
	0.Saat	96. Saat			Grup	Zaman*Grup
Kontrol	12.0±0.9	17.0±2.1	14.5±1.9			
GA 2 mM	4.7±1.1	18.2±1.7	11.5±1.9			
GA 5 mM	6.9±3.0	21.1±5.5	14.0±1.9	<0.0001	0.434	0.311
GA 10 mM	6.7±1.0	14.3±3.3	10.5±1.9			
T-EMM±SH	7.6±1.3 ^A	17.6±1.3 ^B				

G-EMM±SH: Sulandırıcı gruplarındaki tahmin edilen marjinal ortalamaları ve standart hata değeri

T-EMM±SH: Zamana göre sulandırıcı gruplarındaki tahmin edilen marjinal ortalamaları ve standart hata değeri

A-B: Sulandırıcı gruplarına göre istatistiksel farklıdır (P<0.05).

distile su) kullanarak faz kontrast mikroskopunda immer-siyon yağı kullanılarak x1000'lik büyütmede toplam 200 adet spermatozoa incelendi ve sonuç % olarak belirlendi (Schafer ve Holzmann, 2000). Membran fonksiyonel bütünlüğünün belirlenmesi için ise HOS test kullanıldı. 37 C⁰'deki 100 mOsm'lük HOS sıvısından (1.35 gr fruktoz, 0.735 gr trisodyum sitrat/100 ml distile su) 100 µl alınarak üzerine

sulandırılmış spermadan 10 µl eklendi ve 37 C⁰'de 60 dakika inkübasyonu sonrası, lam üzerine bu karışımdan 5 µl damla alınıp üzerine lamel kapatıldı. Hazırlanan preparatlar mikroskop altında (x400) incelenerek 200 hücre sayıldı ve kuyruktaki kıvrımlar dikkate alınarak HOS teste yanıt veren spermatozoonlar % olarak değerlendirildi. Kuyruğu kıvrık olan spermatozoonlar membran bütünlüğü sağlam olarak belirlendi (Ata ve ark 2018).

İstatistiksel analizler

Elde edilen veriler önemlilik testlerinden önce parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilks test ile, varyansların homojenliği yönünden ise Levene's testi ile incelendi. Normal dağılan değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile, normal dağılmayan değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Tukey testi'nden yararlanıldı. Her değişken için tanımlayıcı istatistikler hesaplandı ve "Ortalama \pm Standart Ortalama Hatası" (Ort \pm SH) olarak sunuldu. Veriler, elde edilen ölçümler için "grup" ve "zaman" ın etkisini incelemek için tekrarlanan ölçümler prosedürü için Genel Doğrusal Model kullanılarak iki yönlü karışık tasarım ANOVA (varyans analizi) ile değerlendirildi. Model, ana etki terimleri olarak "Grup" ve "zaman"; etkileşim etki terimi olarak "Grup * zaman" ı içerecek şekilde belirlendi. Önemli etkileşimler için post-hoc testi Bonferroni ayarı ile basit etki analizi kullanılarak yapıldı. Etkileşim terimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı durumlarda, ana etkileri analiz etmek için kontrastlar kullanıldı. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelendi. SPSS 15.0 paket programından yararlanıldı. $P < 0.05$ düzeyi anlamlı olarak kabul edildi. Ana etki etkileşiminde $P < 0.001$; Anova ve Tukey testi değerlendirilmelerinde. $P < 0.05$ düzeyi anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

Sulandırma sonrası GA'in farklı dozların içeren sulandırıcılardaki spermaların spermatolojik özellikleri Tablo 1, Tablo 2 ve Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 1'de Tek yönlü varyans analizi sonuçlarına göre 0. ve 24. saatlerde motilite açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık bulunamadı ($P > 0.05$). 48. saatin sonunda en yüksek motilite oranları GA 2 mM (72.7 \pm 5.3) ve 5 mM (%69.4 \pm 4.8) içeren sulandırıcı gruplarından elde edildi ($P < 0.05$). Saklama süresi sonunda (96. saat) GA 2mM ve GA 5 mM grupları kontrol grubuna kıyasla spermatozoa motilite oranlarını koruyucu özellik gösterdi ($P < 0.05$). Grup etkileşimi incelendiğinde GA 2 ve 5 mM gruplarının kontrol ve GA 10 mM gruplarına göre motilite oranları yüksek bulundu ($P < 0.001$, Tablo 1). Buna karşın 96 saatlik saklama süresince en düşük membran bütünlüğü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gallik asit 10 mM grubunda elde edildi ($P < 0.001$, Tablo 2).

Zamana bağlı olarak saklama süresi uzadıkça motilite ve membran bütünlüğünde azalma; anormal spermatozoa oranında artış (Tablo 3) tespit edildi ($P < 0.001$). İncelenen parametreler için Grup * zaman etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($P > 0.05$).

Tartışma

Bu çalışmada GA'in 2 mM, 5 mM ve 10 mM dozlarının koç spermalarının kısa süreli saklanması 96 saat süresince spermatolojik parametreler üzerine etkisi araştırıldı. Spermanın kısa/uzun süreli saklanması amacıyla uygulanan işlemler ve özellikle ısının düşürülerek spermanın sulandırıcıya alışı sırasında meydana gelen fiziksel, biyolojik ve kimyasal değişimler sperma üzerinde hasarlar oluşturmaktadır (Uysal ve Bucak 2007). Bu hasarlardan en önemlileri canlılık ve motilite kaybı olarak dikkat çekmektedir (Yeni ve ark 2018). Oluşan bu durum sonucunda fertilitte kaybının kaçınılmaz olduğu belirtilmektedir (Waberski ve ark 2011). Spermanın soğutulması sırasında metabolik hızın düşürülmesi ve sonucunda kullanılan enerji miktarının minimize edilmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla yapılan işlemler sonucu ATP miktarlarındaki azalma hücrenin hareket yeteneğini ve ortama serbest oksijen türlerin (SOT) açığa çıkmasına sebep olmaktadır. Bu süreçte spermanın antioksidan potansiyeli oluşan SOT'u elimine etmeye ve hücrenin hasar görmesinin önüne geçmek istese de süreç içerisinde antioksidan potansiyelin yetersiz kalması ve hücrenin geri dönüşümsüz hasar görmesine neden olur (Fraser ve ark 2001, Gogol ve ark 2009, Li ve ark 2016). Sulandırıcıya ilave edilen antioksidan özellikli maddeler spermanın maruz kaldığı olumsuz durumları ortadan kaldırmak ya da minimize etmek amaçlı kullanılmaktadır (Bucak ve ark 2007). Çalışmamızda kullanılan GA'in ekstrekte edildiği meyve ve bitkilerin rasyona ilavesi ile beslenen ratların reproduktif performansların arttığı belirtilmiştir (Nikseresht ve ark 2015). Sunulan çalışmada da benzer şekilde GA 2 ve 5 mM eklenen sulandırıcı gruplarında koç sperması motilite oranları kontrol grubun göre yüksek olduğu belirlendi. Ancak GA'in 10 mM dozunda ise olumlu etki görülmedi. Buna sebep olarak sulandırıcıya ilave edilen yüksek orandaki antioksidanların koruyucu etkinliğinden çok toksik özellikleri oluşabileceği düşünüldü. Antioksidan maddelerin optimum dozları kullanılmaz ise ya hiç etkinlik gözlenmediği yada beklenen olumlu etkiden çok olumsuz etkinlik ortaya çıkabileceği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Maxwell ve Stojanov 1996, Najafi ve ark 2013, Perumal ve ark 2013). Pomjunya ve ark (2017) Vernonia Cinerea adlı bitki ekstraktının diyabetik ratlarda kullanılması sonucu içerdiği GA'in spermatozoa motilitesi, konsantrasyonu ve testosteron seviyelerinde yükselmeye neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Benzer sonuçlar sulandırıcıya ilave edilen 2 mM dozunda GA grubunda membran bütünlüğü oranlarında olumlu etki gösterdiği belirlendi. Gallik asitin antioksidan etkinliğinin serebral sistem üzerine de olumlu etkisi Naghizadeh ve Mansori (2015) tarafından belirtilmiştir. Sperma sulandırılması süresince anormal spermatozoa oranlarının karşılaştırıldığında ise gruplar arası istatistiksel fark bulunmamıştır. Bunu sebebi olarak sperma üzerine kısa süreli saklamanın tersiyer bozukluğa sebep olabileceği bu durumda daha çok sulandırma işlemlerindeki iatrojenik etkilerinden kaynaklanacağı düşünülmektedir. Buna karşın 96 saatlik saklama sonunda GA 10 mM içeren sulandırıcı grubundaki



anormal spermatozoa oranı diğer gruplara göre daha düşük elde edilmiş ama farklılık istatistiksel olarak önemli bulunamamıştır. Farelere uygulanan anti-kanserojen ve anti-neoplastik ilaçların olumsuz etkinliklerini önlemek amaçlı GA'in etkilerinin incelendiği çalışmada; GA'in anormal sperma oranlarını düşürdüğü ve ayrıca canlı ve motil spermatozoa oranlarını koruduğu araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Oyagbemi ve ark 2016).

Öneriler

Sonuç olarak sunulan çalışmada GA'in 2 ve 5 mM dozlarının koç sperma sulandırıcısına ilavesi sonrası +4 C⁰'de kısa süreli saklanmasında spermatozojik parametrelere olumlu etki gösterebileceği ortaya konuldu. Sulandırıcıya eklenmesi ile etkinliğinin araştırıldığı ilk çalışma olması bakımından bu alanda yapılacak çalışmalara katkı yapması ve yapılacak fertilitte denemeleri ile de sonuçların incelenmesi gerektiği kanısına varıldı.

Kaynaklar

Aurich C, 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 89, 65-75.

Ata A, Gulay-Yıldız G, Güngör S, Balic A, Gülay MS, 2018. The effect of carob (*Ceratonia siliqua*) bean extract on male New Zealand White rabbit semen. *World Rabbit Sci*, 26, 209-15.

Blackburn HD 2004. Development of national animal genetic resource programs. *Reprod Fertil Dev*, 16, 27-32.

Bucak MN, Ateşşahin A, Varişli O, Yüce A, Tekin N, Akçay A, 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*, 67, 1060-67.

Bucak M. N, Cöyan K, Öztürk C, Güngör Ş, Ömür AD, 2012. Methionine supplementation improves ram sperm parameters during liquid storage at 5 °C. *Cryobiology*. 65, 335-337.

Fraser L, Gorszczaruk K, Strzezek J, 2001. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod Domest Anim*, 36, 325-329.

Gogol P, Szcześniak-Fabiańczyk B. Wierzchoś-Hilczler A. 2009. The photon emission, ATP level and motility of boar spermatozoa during liquid storage. *Reprod Biol*, 9, 39-49.

He L, Bailey JL, Buhr MM. 2001. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. *Biology of Reproduction*, 64, 69-79.

Joslyn MA, Nishira H, Ito S. 1968. Leucoanthocyanins and related phenolic compounds of carob pods (*Ceratonia siliqua*). *J Sci Food Agric*, 19, 543-550.

Kumazawa S, Taniguchi M, Suzuki Y, Shimura M, Kwon, M, Nakayama T. 2002. Antioxidant activity of polyphenols in

carob pods. *J. Agric. Food Chem*, 50, 373-377.

Kuppan G, Balasubramanyam J, Monickaraj F, Srinivasan G, Mohan V, Balasubramanya M, 2010. Transcriptional regulation of cytokines and oxidative stress by gallic acid in human THP-1 monocytes. *Cytokine*, 49, 229-234.

Langford GA, Marcus GJ, Hackett AJ, Ainsworth L, Peters HF, Wolynetz MS, 1979. A comparison of fresh and frozen semen in the insemination of confined sheep. *Can J Anim Sci*, 59, 685-691.

Lardy HA, Phillips PH, 1939. Preservation of spermatozoa. *Proc. Am. Soc. Anim Nutr*, 32, 219-221.

Li D, Liu Z, Zhao W, Xi Y, Niu F, 2011. A straightforward method to determine the cytotoxic and cytopathic effects of the functional groups of gallic acid. *Process Biochemistry*, 46, 2210-2214.

Li X, Wang L, Zhao Y, Li NL, Zhen J, Fu Q, 2016. Yang Calcium regulates motility and protein phosphorylation by changing cAMP and ATP concentrations in boar sperm in vitro. *Anim Reprod Sci*, 172, 39-51.

Maxwell WM, Stojanov T, 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod Fertil Dev*, 8, 1013-1020.

Moore AI, Squires EL, Graham JK, 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, 51, 241-249.

Motlagh MK, Sharafi M, Zhandi M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Soleimani M, Zeinoaldini S, 2014. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. *Cryobiology*, 69, 217-222.

Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M, 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method, cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57, 1695-1706.

Naghizadeh B, Mansouri MT, 2015. Protective effects of gallic acid against streptozotocin-induced oxidative damage in rat striatum. *Drug Res*, 65, 515-520.

Najafi A, Zhandi M, Towhidi A, Sharafi M, Akbari Sharif A, Khodaei Motlagh M, 2013. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender *Cryobiology*, 66, 275-282.

Nikseresht M, Fallahzadeh AR, Toori MA, Mahmoudi R, 2015. Effects of pomegranate seed oil on the fertilization potency of rat's sperm. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9, 1-4.

Oyagbemi AA, Omobowale TO, Saba AB, Adedara IA, Olowu ER, Akinrinde AS, Dada RO, 2016. Gallic acid protects against cyclophosphamide-induced toxicity in testis and epididymis of rats. *Andrologia*, 48, 393-401.

Perumal P, Vupru K, Rajkhowa C, 2013. Effect of addition of taurine on the liquid storage (5 degrees C) of Mithun (*Bos frontalis*) semen. *Vet Med Int*, 2013, 165348.

Phillips PH, Lardy HA, 1940. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull sperm. *J Dairy Sci*, 23, 399-404.



- Pomjunya A, Ratthanophart J, Fungfuang W, 2017. Effects of vernonia cinerea on reproductive performance in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Vet Med Sci*, 79, 572-578.
- Quinn PJ, Chow PYW, White IG, 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Reproduction* 60, 403-407.
- Schafer S, Holzmann A, 2000. The use of transmigration and spermac stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 59, 201-211.
- Uysal O, Bucak MN, 2007. Effect of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen thawed ram semen. *Acta Veterinaria Brno*, 76, 383-390.
- Waberski D, Henning H, Petrunkina AM, 2011. Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. *Reprod Domest Anim*, 46, 45-48.
- Yeni D, Inanc ME, Avdatek F, Tuncer PB, Cil B, Türkmen R, Tasdemir U, 2018. Supplementation of rosmarinic acid has reduced oxidative stress on bull spermatozoa following the freeze thawing process. *Cryo Letters*, 39, 156-165.
- Zarei M, Rostami B, Masoumi R, Sharafi M, Shahir MH, Stear M, Catt S, 2018. Egg yolk enriched with polyunsaturated fatty acids (PUFAs) improves the shelf life of ram semen in liquid storage. *Small Rumin Res*, 166, 87-92.
- Zargari S, Masoumi R, Rostami B, Nejatbakhsh R, Eskandari-Nasab MP, 2016. Morphological and biochemical characteristics of Afshari and Afshari×Booroola Merino cross bred rams (cross-continental cross breeding) semen before and after cryopreservation. *Small Rumin Res*, 139, 26-29.

